

CLEYTON NASCIMENTO MAKARA

**Desenvolvimento de um dispositivo microfluídico baseado em papel (μ PAD)
para diagnóstico rápido em amostras de sangue no local de atendimento
(POC)**

**SÃO CARLOS
JULHO / 2023**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
QUÍMICA ANALÍTICA E INORGÂNICA**

CLEYTON NASCIMENTO MAKARA

**Desenvolvimento de um dispositivo microfluídico baseado em papel (μ PAD)
para diagnóstico rápido em amostras de sangue no local de atendimento
(POC)**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências. Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Aluno: Me. Cleyton Nascimento Makara
Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
Acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

**SÃO CARLOS
JULHO / 2023**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Makara, Cleyton Nascimento

Desenvolvimento de um dispositivo microfluídico baseado em papel (?PAD) para diagnóstico rápido em amostras de sangue no local de atendimento (POC) / Cleyton Nascimento Makara. — São Carlos, 2023.

103 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2023.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

1. Microfluídica. 2. Papel. 3. Anemia. 4. Sangue. 5. Nanopartícula de ouro. I. Título.



AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por todas as oportunidades, momentos de intuição, saúde e força para conduzir esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho, pela oportunidade de trabalho, por toda orientação, aprendizagem, confiança, auxílio e compreensão.

Ao Dr. Saulo Barretto e ao Instituto de Pesquisa em Tecnologia e Inovação pelo apoio, colaboração e auxílio.

Em especial, meus agradecimentos a Dr^a Laís Brazaca, Dr Thiago Segato, Dr^a Juliane Borba, Dr. Eduardo L. Rossini, Dr^a Mariana Bortholazzi e Dr^a Elza pelo apoio, amizade, colaboração e sugestões.

A Dr^a Claudia Bernal por todo apoio e auxílio prestado.

Aos pesquisadores da Universidade de Juiz de Fora (Dr. Leonardo Goliatt e a Dr^a Priscila Capriles) e da Universidade Federal do Ceará (Dr. Guilherme Diniz Irffi) pelo desenvolvimento e contribuição na modelagem computacional.

A família BioMicS pelo apoio, sugestões, amizade e companheirismo.

A USP e ao Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos, pelo apoio e estrutura ofertada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001”.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com objetivo de monitorar a prevalência de anemia na população, baseado nos dispositivos analíticos microfluídicos de papel (μ PAD), oferecendo uma ferramenta de diagnóstico rápida e barata, inestimável para tomadas de decisão. Seu funcionamento consiste na aplicação de uma gota de sangue em um pedaço de papel filtro, onde uma fotografia é retirada com *smartphone* e a imagem tratada com *software* fornece resultados de hemoglobina, hematócrito e ferritina. Para minimizar erros provenientes da etapa de aquisição de imagem, propusemos a construção de um suporte em acrílico para o *smartphone*, reduzindo assim o desvio padrão dos resultados, protegendo o operador de possível contaminação do material coletado. A impressão de região colorida no interior do suporte de acrílico apresentou uma alternativa atraente para a calibração das cores decorrente da câmera de diferentes *smartphones*. Os resultados de hematócrito e hemoglobina apresentaram correlação de 56,85 % e 55,48 % respectivamente, com 207 voluntários do gênero masculino e feminino, compreendendo idades entre 17 e 62 anos, utilizando variáveis de área da imagem, intensidade de cor e gênero. Os dados analisados apresentaram-se em consonância aos obtidos pelo equipamento CompoLab TM do HemoBanco. O método proposto para obtenção de plasma no interior do μ PAD de maneira passiva para quantificação de ferritina, apresentou reprodutibilidade e ausência de hemólise, com plasma límpido. Este método para obtenção de plasma em μ PAD poderá ser empregado para quantificação de outros analitos de interesse no sangue. A reação com AuNPs para quantificação de ferritina apresentou alteração visual de cor na faixa sérica humana entre 30 e 300 ng/mL, testado com padrão de ferritina em solução PBS. O método proposto para diagnosticar anemia com a quantificação de hemoglobina e hematócrito mostrou-se rápido, simples e exato. Espera-se que o contínuo desenvolvimento de μ PADs de baixo custo na área da saúde, integrado aos sistemas e políticas de saúde do governo, auxilie no seu planejamento e que chegue àqueles que o necessitem, contribuindo com a saúde da população e seu desenvolvimento.

Palavras-chave: Microfluídica, papel, μ PAD, anemia, nanopartículas de ouro, ferritina, hemoglobina, análise de imagem, sangue, saúde.

ABSTRACT

This work was developed with the aim of monitoring the prevalence of anemia in the population, based on microfluidic paper analytical devices (μ PADs), offering a rapid and inexpensive diagnostic tool invaluable for decision-making. Its operation involves applying a drop of blood to a piece of filter paper, where a photograph is taken with a smartphone and the image is processed with software to provide results for hemoglobin, hematocrit, and ferritin. To minimize errors from the image acquisition stage, we proposed the construction of an acrylic support for the smartphone, thus reducing the standard deviation of results and protecting the operator from possible contamination of the collected material. The printing of a colored region inside the acrylic support provided an attractive alternative for color calibration resulting from different smartphones' cameras. Hematocrit and hemoglobin results showed correlations of 56,85% and 55,48%, respectively, with 207 male and female volunteers aged between 17 and 62 years, using variables such as image area, color intensity, and gender. The analyzed data were in line with those obtained by the CompoLab TM equipment from HemoBanco. The proposed method for passive plasma collection inside the μ PAD for ferritin quantification demonstrated reproducibility and absence of hemolysis, yielding clear plasma. This method for plasma collection in μ PAD could be employed for quantifying other analytes of interest in the blood. The reaction with AuNPs for ferritin quantification showed a visual color change in the human serum range between 30 and 300 ng/mL, tested with a ferritin standard in PBS solution. The proposed method for diagnosing anemia through the quantification of hemoglobin and hematocrit proved to be fast, simple, and accurate. It is hoped that the continued development of low-cost μ PADs in healthcare, integrated into government health systems and policies, will assist in planning and reach those in need, contributing to the health and development of the population.

Keywords: Microfluidic, paper, μ PAD, anemia, gold nanoparticles, ferritin, hemoglobin, image analysis, blood, health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Levantamento bibliográfico realizado na plataforma <i>Web of Science</i> utilizando a palavra-chave microfluídica e microfluídica baseada em papel.	2
Figura 2. Projeção do crescimento populacional por faixa etária.	4
Figura 3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do papel Whatman nº 1.	10
Figura 4. Histórico da evolução da aplicação de papel na ciência.	12
Figura 5 Exemplos de μ PADs desenvolvidos com detecção qualitativa visual. A) Quantificação de hematócrito através da aplicação de 45 μ L sangue humano em papel filtro de espessura e porosidades diferentes; B) Tipagem sanguínea através da adição de anticorpo no papel e lavagem do sangue no papel com soro fisiológico. .	15
Figura 6. Abordagens básicas para a preparação de nanopartículas.	16
Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de AuNPs: a) nanoesferas; b) <i>nanorods</i> ; c) nanohalter; d) nanoprisma-triangular; e) nanofios; f) nanoestrelas; (g-h) Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) de imagens de AuNPs: g) <i>nanodendrites</i> h) nanocubos.	17
Figura 8. <i>Layout</i> das peças do suporte em acrílico de 5 mm de espessura.	21
Figura 9. <i>Layout</i> da parte externa do μ PAD. A imagem do lado esquerdo está demonstrada a impressão do <i>layout</i> com as informações pertinentes a sua aplicação, as dimensões do dispositivo e a região de aplicação de amostra (ao lado direito do dispositivo). A imagem do lado direito representa a região de corte, representado em vermelho onde o corte será realizado com a cortadora a laser.	22
Figura 10. Papel cromatográfico Whatman nº 1 para quantificação de hematócrito.	23
Figura 11. Processo de fabricação dos dispositivos de papel (μ PAD) com cera. (a) desenho do microdispositivo; (b) impressão de cera na superfície do papel; (c) fusão e permeação da cera no papel por aquecimento na estufa.	24
Figura 12. Abordagem da montagem do μ PAD para quantificação de ferritina em amostra de sangue total. A) Partes que compõem o μ PAD em ordem de montagem (esquerda para direita) e B) μ PAD montado.	24
Figura 13. Processo de conjugação das AuNPs no papel com glutatona e EDC/NHS.	27
Figura 14. Processo de conjugação das AuNPs no papel com glutatona e EDC/NHS.	28

Figura 15. Estratégia geral para quantificar ensaio colorimétrico com imagem utilizando software de edição de imagem <i>ImageJ</i> . A) Aquisição de imagem com câmera do <i>smartphone</i> ; B) Procedimento para adquirir dados de intensidade de cor na escala Red Green e Blue, e área da imagem, e C) Procedimento para adquirir dados de intensidade de cor na escala cinza e área da imagem.	29
Figura 16. Esquema simplificado do funcionamento de um μ PAD para quantificação de ferritina com AuNPs.....	30
Figura 17. Estratégia para o diagnóstico de anemia ferropriva baseado no hematócrito. Parte superior, da esquerda para a direita: punção, transferência do sangue para o μ PAD, obtenção da imagem e resultado através de um aplicativo de <i>smartphone</i> ...	30
Figura 18. Curva analítica para diferentes concentrações de glicose em urina artificial. A intensidade média para cada <i>spot</i> foi obtida utilizando <i>AdobePhotoshop</i> . Foi medido concentrações de glicose entre 0 e 20 mmol L ⁻¹ . A linearidade (R ²) da curva analítica foi de 0,991 para scanner de mesa, 0,983 câmera digital e 0,986 <i>smartphone</i>	31
Figura 19. Suporte para aquisição de imagem. a) Chapa de acrílico translúcido cortado na cortadora a laser de CO ₂ com 70 W de potência; b) Peças em acrílico após o corte; c) Suporte montado.	33
Figura 20. Peças do suporte para aquisição de imagens modificado. a) detalhe do recobrimento das peças laterais do suporte com papel contact branco; b) instalação de 4 LEDs com uma chave seletora na tampa superior do suporte; c) demonstração dos 4 LEDs ligados, dispostos a 90° cada e d) partes que compõem o suporte.	34
Figura 21. Influência do <i>flash</i> do <i>smartphone</i> na qualidade da imagem. A) Imagem tirada com câmera do <i>smartphone</i> com <i>flash</i> ligado e B) Imagem tirada com câmera do <i>smartphone</i> com <i>flash</i> desligado.	35
Figura 22. Suporte para aquisição de imagem. a) Ao lado esquerdo está apresentado o suporte em acrílico, ao lado direito está apresentado o suporte de acrílico modificado; b) Vista lateral do suporte de acrílico modificado.	35
Figura 23. Apresentação da implementação da estratégia de calibração de cores. a) cartão “A” impresso com gradiente de cores; b) cartão “A” introduzido no suporte de acrílico translúcido revestido com papel <i>contact</i> preto fosco; c) cartão “A” introduzido no suporte de acrílico translúcido revestido com papel <i>contact</i> branco.	36
Figura 24. Parte externa do μ PAD. Na imagem A) está apresentado a parte externa em papel rígido devidamente cortado. Nas imagens B) e C) está apresentado a montagem do μ PAD com a parte interna e externa, sendo o a imagem B a visão	

posterior do μPAD , onde é realizado a adição da amostra, e a imagem C a visão frontal do μPAD , onde ocorre a obtenção da imagem.....	37
Figura 25. Imagem do papel cromatográfico Whatman nº 1 com dimensões 35 x 15 mm para triagem de anemia através da quantificação de hematócrito e hemoglobina.....	38
Figura 26. Espectros de absorção do reagente Drabkin (gráfico em vermelho), sangue diluído em água (gráfico em roxo) e sangue com o reagente Drabkin (gráfico em verde).	39
Figura 27. Estudo da permeabilidade do sangue em papel filtro Whatman nº1 em diferentes concentrações de hematócrito para contagem de hematócrito.	41
Figura 28. Demonstração do <i>software</i> ImageJ delimitando a área da imagem para calcular a área e a intensidade da cor.....	41
Figura 29. Curva analítica correlacionando a área da imagem / mm ² vs quantidade de hematócrito / %.	42
Figura 30. Curva analítica correlacionando a área da imagem / mm ² vs hematócrito / %.	44
Figura 31. Diferença entre os resultados de hematócrito observados no capilar utilizado na microcentrífuga do HemoBanco e no μPAD	44
Figura 32. Curva analítica correlacionando a área da imagem / mm ² vs hemoglobina / g / dL.....	45
Figura 33. Diferença entre os resultados de hemoglobina observado no CompoLab TM utilizado no HemoBanco e em nosso μPAD	46
Figura 34. Curva analítica para indivíduos femininos. A) Curva analítica área da imagem / mm ² vs hemoglobina / g / dL construída com 105 indivíduos; B) Curva analítica área da imagem / mm ² vs hematócrito / % construída com 58 indivíduos. .	46
Figura 35. Curva analítica para indivíduos masculinos. A) Curva analítica área da imagem / mm ² vs hemoglobina / g / dL construída com 101 indivíduos; B) Curva analítica área da imagem / mm ² vs hematócrito / % construída com 48 indivíduos; .	47
Figura 36. Relatório de regressão múltipla para os dados de hemoglobina com <i>software xlstat</i>	48
Figura 37. Relatório de regressão múltipla para os dados de hematócrito com <i>software xlstat</i>	49
Figura 38. Obtenção de plasma de maneira passiva com o uso de membrana. A) Fluxo vertical e B) Fluxo horizontal.	53

Figura 39. Separação de glóbulos vermelhos por filtro de profundidade que se ligam às fibras de vidro.....	54
Figura 40. MEV das membranas de fibra de vidro. A) MEV membrana LF1; B) MEV membrana MF1; C) MEV fibra de vidro marca STARTTECH, porosidade 1,2 μm ; D) MEV fibra de vidro MILIPORE; E) MEV Fibra de vidro GE 8133-6621; F) MEV fibra de vidro marca STARTTECH, porosidade 1,2 μm	55
Figura 41. MEV da membrana de nitrocelulose 5 μm	56
Figura 42. Imagem de microscopia óptica de sangue ampliado 40x em lamínula de vidro.....	57
Figura 43. μPAD construídos com membrana Vivid Plasma para obtenção de soro sanguíneo no interior do μPAD e de maneira passiva por capilaridade. A) Vista de cima do μPAD montado sem aplicação de sangue humano; B) Vista de cima do μPAD com aplicação de 8,6 μL de sangue humano e C) Vista de baixo do μPAD com aplicação de 8,6 μL de sangue humano.....	58
Figura 44. Processo de compactação de uma folha de polipropileno, compactado à esquerda com 13,08 Mpa e não compactado à direita.....	59
Figura 45. Soluções de AuNPs de 30 nm conjugadas e adicionada solução de padrão de ferritina. Ao lado esquerdo está representado a reação com padrão de ferritina e do lado direito, reação com ferritina liofilizada proveniente de um kit comercial de quantificação de ferritina por turbidimetria da Goldanalisa.....	60
Figura 46. Discos de papel AuNPs conjugadas com 1,5 $\mu\text{g/mL}$. A) Discos de papel com AuNPs conjugadas com absorbâncias medidas em espectrofotômetro em 525 nm; B) Discos de papel com AuNPs conjugadas com absorbâncias medidas no NanoDrop 525 nm; C) Obtenção das intensidades Vermelho, Verde e Azul (RGB) para os discos secos onde a absorbância da solução de AuNPs foram medidas em 525 nm em cubeta de espectrofotômetro e D) Obtenção das intensidades RGB para os discos secos onde a absorbância da solução de AuNPs foram medidas em 525 nm NanoDrop.....	62
Figura 47. Intensidade no canal azul para determinação de ferritina em discos de papel Whatman nº1 com solução de AuNPs padronizadas em Espectrofotômetro. A) discos de papel após aplicação de solução de ferritina e B) discos de papel secos após 20 minutos.....	63

Figura 48. Intensidade no canal azul para determinação de ferritina em discos de papel Whatman nº1 com solução de AuNPs padronizadas em NanoDrop. A) discos de papel após aplicação de solução de ferritina e B) discos de papel secos.....	64
Figura 49. Intensidade no canal RGB para determinação de ferritina em discos de papel Whatman nº1 com solução de AuNPs de 30 nm conjugadas com 1,5 µg / mL de anticorpo e aplicação de ferritina. Os dados foram abstraídos dos discos de papel após secos.....	65
Figura 50. MEV – FEG da solução de AuNPs de 50 nm. A) Imagem e B) Distribuição do tamanho das AuNPs.....	66
Figura 51. MEV – FEG de um disco de papel Whatman nº1 após conjugação das AuNPs de 30 nm, após adição de 8,5 µL de uma solução de 1,5 µg / mL de anticorpo. A) Região da fibra de celulose onde foi identificado AuNPs; B) e C) regiões onde foram realizados zoom da imagem A e D) AuNPs com diâmetro de 35 nm.....	67
Figura 52. Imagem MEV – FEG/EDX de um disco de papel Whatman nº1 após conjugação das AuNPs de 30 nm, após adição de 8,5 µL de uma solução de 1,5 µg / mL de anticorpo. A) Região da fibra de celulose onde foi identificado AuNPs e B) caracterização EDX de região localizada com ouro na superfície do papel.....	68
Figura 53. Demonstração do processamento da imagem através do aprendizado de máquina. A) Imagem original; B) Imagem processada.....	69
Figura 54. Relação entre hematócrito observado e estimado.	69
Figura 55. Resultados do aprendizado profundo. A) Número de vezes de treinamento da rede e B) acurácia da rede.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Influência da hidratação na variação da concentração de Hb intradia.50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Crescimento populacional e a demanda de recursos e seus impactos	3
1.2 Sangue	6
1.2.1 Anemia	7
1.3 Dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (μ PADs).....	9
1.3.1 Histórico.....	11
1.4 Processamento de imagem e detecção colorimétrica	13
1.5 Nanopartículas de Ouro (AuNPs).....	16
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Construção do suporte em acrílico para aquisição das imagens	20
3.2 Construção do microdispositivo analítico baseado em papel (μ PAD)	21
3.2.1 Construção do dispositivo externo em papel	22
3.2.2 Construção do dispositivo interno para quantificação de hematócrito ...	23
3.2.3 Construção do dispositivo interno para quantificação de ferritina.....	23
3.3 Amostras de sangue	25
3.4 Analitos de interesse	25
3.4.1 Anemia ferropriva	25
3.4.2 Ferritina.....	26
3.5 Detecção	28
3.6 Otimização do μ PAD para quantificação de hematócrito e hemoglobina.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
4.1 Construção do suporte para aquisição das imagens.....	33
4.2 Construção do μ PAD.....	37
4.2.1 Construção da parte externa do μ PAD.....	37
4.2.2 Construção da parte interna do μ PAD	38
4.3 Diagnóstico de anemia por área e cor.....	38
4.3.1 Influência da hidratação.....	50
4.4 Construção do μ PAD para quantificação de ferritina.....	52
4.4.1 Obtenção de plasma sanguíneo	52
4.4.2 Conjugação das AuNPs para determinação de ferritina	59
4.5 Caracterização das AuNPs	66

4.6	Aplicativo de smartphone para detecção de anemia.....	68
5.	CONCLUSÕES	71
6.	BIBLIOGRAFIA.....	73
7.	ANEXOS.....	85

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, uma mudança notável no estilo de vida da sociedade ocorreu em todo o mundo, acarretando em grandes alterações na saúde das pessoas. Em todo o mundo tivemos um grande desenvolvimento econômico, avanços técnicos, aumento da urbanização e um aumento da vida sedentária. Notavelmente, as pessoas reduziram a prática de atividade física e aumentaram o consumo de alimentos não nutritivos¹.

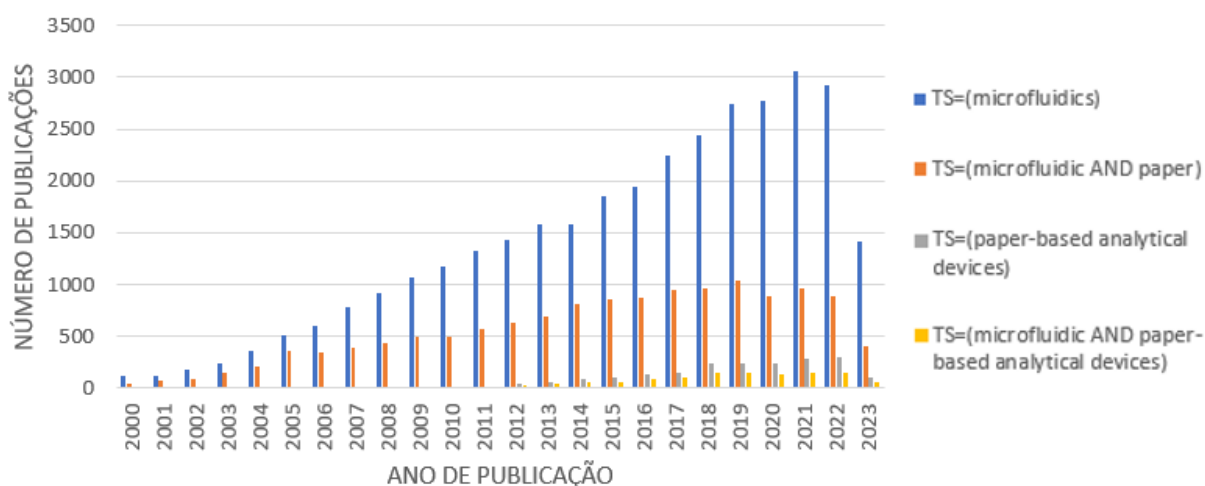
Marques *et al.* (2018) demonstraram que hábitos adquiridos na adolescência podem ser críticos. Por esse motivo, várias doenças crônicas podem ter sua origem e progressão mediante consumo de álcool ou alimentos pouco nutritivos^{1,2,3}. Porém, pessoas de todas as faixas etárias estão vulneráveis, seja pelo consumo de alimentos industrializados, inatividade física, exposição ao tabaco ou uso nocivo do álcool^{3,4,5}.

Deste modo, a adoção de hábitos não saudáveis pode resultar no surgimento da anemia ferropriva, através da ingestão insuficiente de ferro na alimentação e uso de tabaco. Até o momento, segundo a *World Health Organization*, a anemia é uma das dez principais causas de agravo à saúde da população mundial, responsável por 273 mil óbitos em 2004 e presente em mais de 30% da população mundial em 2011. Ela é definida pela diminuição na concentração de hemoglobina (Hb) no sangue como resultado da carência de um ou mais nutrientes, sendo o ferro a causa mais comum no mundo^{5,6,7}. Ela reduz a capacidade de transporte de oxigênio do sangue, sobrecarregando o sistema cardiopulmonar, que responde aumentando a frequência cardíaca e o volume sistólico para manter o fornecimento de oxigênio⁸. Contudo, estudos demonstram resultados desfavoráveis da gravidez, comprometimento do desenvolvimento físico e cognitivo em crianças, aumento do risco de morbidade em crianças e redução da produtividade no trabalho, representando uma ameaça à saúde e à economia^{5,7,9}.

Em contrapartida, o sangue é uma rica fonte de informação biológica, transportando uma miríade de biomarcadores bioquímicos, imunológicos e moleculares, fornecendo informações e alvos para diagnóstico, tratamento e monitoramento de saúde, além de ser responsável pelo fornecimento de nutrientes e oxigênio para manter a homeostase no corpo humano^{10,11}.

Desta forma, estratégias simples para processar o sangue em campo acelerariam o diagnóstico, melhorando as chances de sucesso no tratamento dos pacientes¹². Com objetivo de acelerar o diagnóstico e obter resultados rápidos, tivemos nos últimos 23 anos um aumento do interesse no desenvolvimento de dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (μ PADs) como uma alternativa aos exames utilizados atualmente¹³. Na Figura 1 temos apresentado o levantamento das publicações relativas a microfluídica compreendendo o período de 2000 a 2023 no site *Web of Science*.

Figura 1. Levantamento bibliográfico realizado na plataforma *Web of Science* utilizando a palavra-chave microfluídica e microfluídica baseada em papel.



Fonte: Autoria própria.

Apesar do termo microfluídica aparecer em meados dos anos 2000 (Figura 1), o desenvolvimento de dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel foi mencionado por Whitesides em 2007, e desde então, o número de publicações vêm aumentando consecutivamente, refletindo o interesse em seu desenvolvimento. Porém, segundo Whitesides, a microfluídica como tecnologia nos oferece muitas vantagens e poucas desvantagens¹⁴. As vantagens são convincentes, mas projetar e fabricar dispositivos de tamanho reduzido que funcionam efetivamente é um desafio¹⁵.

Estes sistemas fluídicos com características de escala micrométrica apresentam uma capacidade excepcional no processamento e análise de amostras a um custo e requisitos de materiais mais baixos do que as suas contrapartes laboratoriais¹². Seu desenvolvimento torna-se atraente quando associado ao uso de

papel como substrato. Sua abundância associada ao baixo custo, produção em massa, área superficial elevada e fácil descarte o tornam uma plataforma atraente para análises químicas, motivando o desenvolvimento de vários métodos^{14,16,17,18}. São dispositivos pequenos, leves, portáteis e apresentam baixo custo de fabricação, consumo de reagentes e amostras^{15,19,20,21,22}. Sua aplicação abrange desde a área industrial, ambiental e saúde pública, incluindo detecção de glicose e proteína^{23,24}, tipagem sanguínea^{25,26,27}, hemoglobina²⁸, HIV²⁹, entre outros^{15,17,23,30}.

A combinação destes dispositivos com detectores portáteis capazes de transmitir informações digitais pelos meios de comunicação existentes fornece uma abordagem integrada para detecção²³. O uso de *smartphones*, *scanners* ou câmeras digitais para digitalizar uma imagem associada a cada ensaio colorimétrico, extraíndo os dados de intensidade de cor visando à quantificação já é uma realidade^{13,23,30,31}.

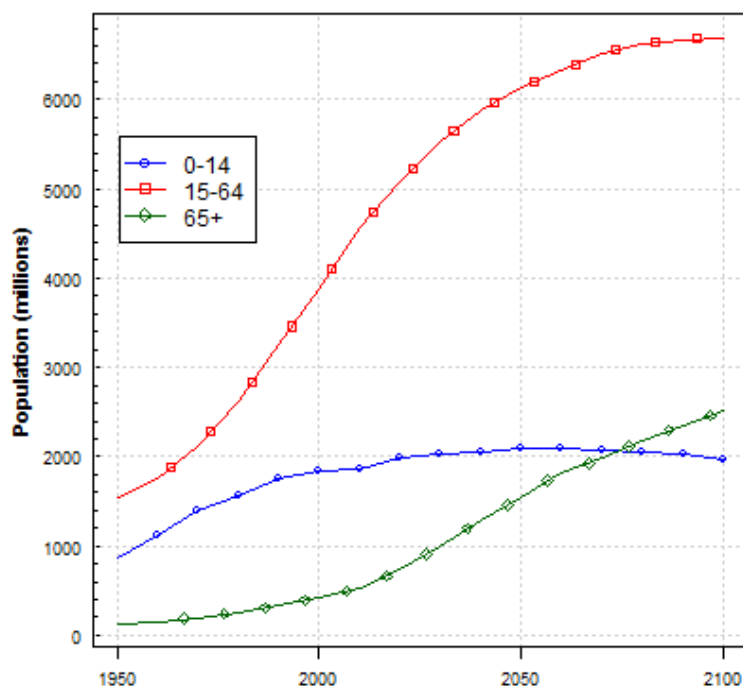
Geralmente, as análises de sangue são terceirizadas para um laboratório, gerando custos com logística e colaboradores habilitados. Testes confiáveis de baixo custo, robustos e convenientes para fornecer instantaneamente análises de sangue sem exigir instrumentação sofisticada seriam inestimáveis para melhorar a saúde nos países em desenvolvimento.

Devido à importância que o sangue exibe para monitorar o estado de saúde, propusemos o desenvolvimento de um teste baseado na tecnologia *microfluidics paper-based analytical devices* (μ PAD) com objetivo de auxiliar na triagem de anemia de forma exata e barata, via hematócrito e ferritina. Seu design permitirá operar próximo ao paciente, podendo inclusive ser aplicado em áreas remotas ou de difícil acesso, bem como em situações de emergência. Seu uso tem como objetivo fornecer resultados exatos, requerendo pequenos volumes de reagentes e sangue. Pessoas sem treinamento poderão manuseá-lo, tornando o seu uso um processo instantâneo em residências, hospitais ou áreas remotas.

1.1 Crescimento populacional e a demanda de recursos e seus impactos

Segundo perspectivas da Divisão de População do Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais da Secretaria das Nações Unidas, éramos aproximadamente 7,6 bilhões em meados de 2017, com projeções de 9,5 bilhões em 2030 (vide Figura 2)^{32,33,34}.

Figura 2. Projeção do crescimento populacional por faixa etária.



Fonte: Adaptado de Nações Unidas, Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais, Divisão de População (2017). Perspectivas da População Mundial: A Revisão 2017, Perfis Demográficos On-line. Disponível em <https://population.un.org/wpp/Graphs/DemographicProfiles/>³². Acessado em: 10/06/2023.

Através da interpretação da Figura 2, é possível notarmos um aumento da população mundial ao longo das últimas décadas e suas projeções³². Estas projeções de crescimento oferecem implicações ao nosso cotidiano, sendo um tema relevante e muito complexo, pois há uma maior demanda por saúde, desenvolvimento socioeconômico e recursos alimentares, e consequentemente nutricionais^{33,34,35}.

A desnutrição é um desafio de saúde global correlacionado com prevalência e morte entre crianças, particularmente em países em desenvolvimento^{36,37}. No entanto, muitas regiões enfrentam desafios no fornecimento adequado de alimentos, especialmente para as populações mais vulneráveis. A lei de *Bennett* indica uma relação da demanda de alimentos com a renda, onde o consumo de alimentos nutritivos como frutas, vegetais e produtos de origem animal aumentam com o crescimento da renda em países em desenvolvimento^{33,38}. Assim, uma baixa renda representa a dificuldade de acesso a alimentação saudável e balanceada, o que

contribuiu para a desnutrição e, conseqüentemente, para o surgimento da anemia, condição que afeta um quarto da população mundial, resultado da falta de ingestão nutricional de ferro, folatos, vitamina A, B12 e outros micronutrientes^{7,39}.

A prevalência de anemia entre crianças tem sido um importante problema de saúde nos países em desenvolvimento⁷, porém a anemia não se restringe apenas à crianças e países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Países desenvolvidos apresentam uma prevalência de 6% e países em desenvolvimento 27%⁴⁰, representando um desafio de saúde global³⁹. No cenário atual do século 21, onde países desenvolvidos caminham para novas inovações e conquistas, países em desenvolvimento lutam com problemas calamitosos como pobreza, fome e desnutrição⁷. O principal fator causador de anemia está na ingestão insuficiente de ferro na alimentação, comum em áreas com altas taxas de crescimento populacional e recursos limitados. O estudo da predominância de anemia na população é complexo, sendo necessário que fatores econômicos, socioculturais, geográficos e geopolíticos sejam interpretados simultaneamente³⁹.

Embora a população mundial exceda 8 bilhões atualmente, a desnutrição e a anemia continuam sendo um problema de saúde recorrente. Uma consequência da desnutrição é a alta suscetibilidade a doenças, pois a desnutrição reduz a imunidade para resistir a agentes infecciosos, podendo inclusive levar à morte, crescimento prejudicado e imunodeficiência, trazendo o ônus social e econômico para a saúde pública. Como resultado, as crianças têm consequências adversas ao longo de sua vida, como baixa estatura adulta, menor escolaridade, baixa frequência escolar e baixo desempenho no trabalho^{7,39,41}.

Nos países em desenvolvimento, a taxa de mortalidade materna e neonatal é frequentemente afetada pela anemia do período pré-natal, uma deficiência evitável e ubíqua atribuída à baixa concentração de hemoglobina⁴¹. O diagnóstico precoce pode reduzir o risco de mais complicações de saúde, iniciando o tratamento padrão com suplementos vitamínicos e ferro⁴¹.

Estudos demonstraram maior prevalência de anemia entre indivíduos do sexo feminino em países em desenvolvimento – 50% (contra 18% em países industrializados) devido a alterações fisiológicas como menstruação, parasitas e ingestão inadequada de alimentos nutritivos³⁵.

Em síntese, temos exposto a disparidade no acesso a saúde e alimentação entre nações desenvolvidas e em desenvolvimento, ressaltando o impacto no desenvolvimento e na necessidade do monitoramento da saúde da população, para auxiliar o governo nas medidas de promoção a saúde.

1.2 Sangue

O sangue é uma rica fonte de informação biológica, proveniente de células-tronco da medula óssea^{10,11,42}. Ele tem como função o transporte de nutrientes e oxigênio, sendo vital para manter a homeostase no corpo humano, além de remover resíduos e transportar uma miríade de biomarcadores bioquímicos, imunológicos e moleculares^{11,12,42,43}.

O sangue é um tecido conjuntivo líquido formado por uma porção celular de natureza diversificada (constituem a parte "sólida" do sangue) imersas em uma parte líquida chamada plasma, de cor amarelo palha e correspondente a aproximadamente 50 – 60 %. O plasma é composto majoritariamente por água, porém contém muitas substâncias como proteínas, açúcares e partículas de gordura. As células sanguíneas são classificadas em três grupos básicos: os leucócitos ou glóbulos brancos (células de defesa do sistema imunológico); os eritrócitos, glóbulos vermelhos ou hemácias (responsáveis pelo transporte de oxigênio); e as plaquetas, responsáveis pela coagulação sanguínea^{11,42,43,44}.

As substâncias que constituem o sangue podem ser separadas em seus componentes individuais utilizando vários métodos, como centrifugação, aglutinação ou filtração. As separações são importantes para serem utilizadas, por exemplo, em transfusões de sangue⁴².

A centrifugação é o padrão-ouro para o processamento de amostras de sangue. A separação ocorre devido a força centrífuga aplicada a amostra, decantando os elementos mais densos, permitindo sua separação para posterior análise ou isolamento de uma proteína específica ou célula sanguínea^{12,42,45}.

A filtração por membranas é outra abordagem para separação do plasma, onde ocorre a separação dos glóbulos vermelhos por exclusão de tamanho. Outro método de separação é a aglutinação com uso de anticorpo com resultados comparáveis à centrifugação convencional. No entanto, os anticorpos específicos

utilizados podem não ser aplicáveis a todos os tipos sanguíneos, requerendo mais de um anticorpo. Além disso, o custo dos materiais baseados na aglutinação com anticorpos apresenta custo elevado quando comparado a centrifugação. Dependendo do objetivo da separação e sua aplicação, a separação pode ser alcançada com a geração de um gradiente de pressão osmótica pela aplicação de sais, induzindo a crenação e agregação dos glóbulos vermelhos¹².

1.2.1 Anemia

A anemia é uma das dez causas de agravo à saúde da população mundial responsável por 841 mil mortes. Ela é definida pela diminuição da capacidade de transporte de oxigênio pela hemoglobina (Hb) (proteína responsável pelo transporte e contida no interior dos glóbulos vermelhos (eritrócitos, hemácias)) decorrente de fatores genéticos ou como resultado da carência de um ou mais nutrientes, sendo o ferro a causa mais comum. Ela sobrecarrega o sistema cardiopulmonar, que responde aumentando a frequência cardíaca e o volume sistólico para manter o fornecimento de oxigênio^{6,28,41,46}. Contudo, estudos demonstram resultados desfavoráveis da gravidez, redução da produtividade no trabalho, comprometimento do desenvolvimento físico, cognitivo e aumento do risco de morbidade em crianças, representando ameaça à saúde e economia^{9,41}.

A Hb é uma proteína globular esférica com diâmetro aproximado de 5,5 nm⁴⁷. Sua estrutura química consiste em quatro cadeias de globina (parte proteica) ligadas a um grupo heme (grupo prostético). O grupo heme possui uma estrutura anelar (porfirina), formada por quatro unidades associadas com um íon de ferro (Fe²⁺)⁴⁷. Sua concentração no sangue de adultos varia de 12 a 16 g dL⁻¹ em mulheres e 14 a 18 g dL⁻¹ em homens^{28,40,48}. Porém, a hemoglobina está presente no sangue juntamente com a mioglobina, metaemoglobina e carboxiemoglobina, proteínas responsáveis pelo transporte e armazenamento de gases como O₂, CO e CO₂⁴⁷.

Uma concentração de Hb baixa pode ser uma indicação de perda crônica de sangue, diminuição da produção de hemácias ou sua destruição anormal (hemólise)²⁸. Outras causas incluem deficiências alimentares, cirrose, doença renal ou excesso de hidratação. Já uma alta concentração de Hb pode indicar eritrocitose devido ao tabagismo ou em resposta à hipóxia em grandes altitudes, policitemia vera,

cardiopatia congênita, doença pulmonar obstrutiva crônica grave ou desidratação grave. A desidratação eleva a viscosidade sanguínea, prejudicando a oferta de oxigênio, reduzindo a perfusão capilar, o que por sua vez pode aumentar o risco de hipóxia, além de complicações trombóticas e hemorrágicas²⁸.

Vale ressaltar que a anemia está associada frequentemente à deficiência de ferro no organismo, comumente conhecida como anemia ferropriva. Porém, no sentido mais amplo, a anemia possui diferentes tipos e causas, além de diferentes intensidades. Associado a anemia, a ferritina também é uma proteína importante, porém de armazenamento de ferro no organismo e utilizada como marcador sérico das reservas totais de ferro no corpo para síntese de hemoglobina. Ela se origina na quebra da hemoglobina (hemólise), sendo um importante biomarcador de diagnóstico clínico para função hepática⁴⁹. Sua concentração sérica e/ou tecidual difere entre populações, gêneros e idade, além de estar associada a anemias, distúrbios neurodegenerativos e síndrome hemofagocítica^{50,51}, sendo comumente mensurada no plasma, através de ensaios enzimáticos,^{46,52} turbidimetria ou teste de fluxo lateral^{53,54}.

Assim como a diminuição da ferritina indica uma redução da reserva de ferro para o organismo, o aumento da bilirrubina indica um excesso de hemólise e conseqüentemente redução da concentração de Hb. Pesquisadores desenvolveram e já relataram trabalhos para sua quantificação através de cromatografia líquida de alta eficiência,^{55,56} fluorescência,⁵⁷ sensores eletroquímicos⁵⁸ e μ PADS⁵⁹.

No âmbito de nosso estudo, utilizamos a anemia ferropriva por ser um grave problema de saúde pública em diversas faixas etárias, afetando negativamente na produção econômica, social e desenvolvimento cognitivo. Como a anemia representa uma redução no transporte de oxigênio pelo sangue, os diagnósticos são realizados através de método invasivo, mediante coleta sanguínea. Geralmente o diagnóstico de anemia ferropriva é baseado na detecção fotométrica de cianometahemoglobina, realizado com reagente Drabkin, a base de cianeto. O reagente Drabkin lisa os glóbulos vermelhos e todas as formas de hemoglobina são convertidas em cianometahemoglobina, um composto de cor castanha com absorção máxima em 540 nm⁸. No entanto, existem no mercado equipamentos que realizam as análises de maneira automatizada e invasiva (*Coulter STKS*, *Cobas Micros OT*, *CompoLab TM* e

HemoCue)⁶⁰ e não invasiva (*Orsense NBM 200*, *Masimo Radical-7* ® *Pulse CO-Oximeter*® com *SpHb*).

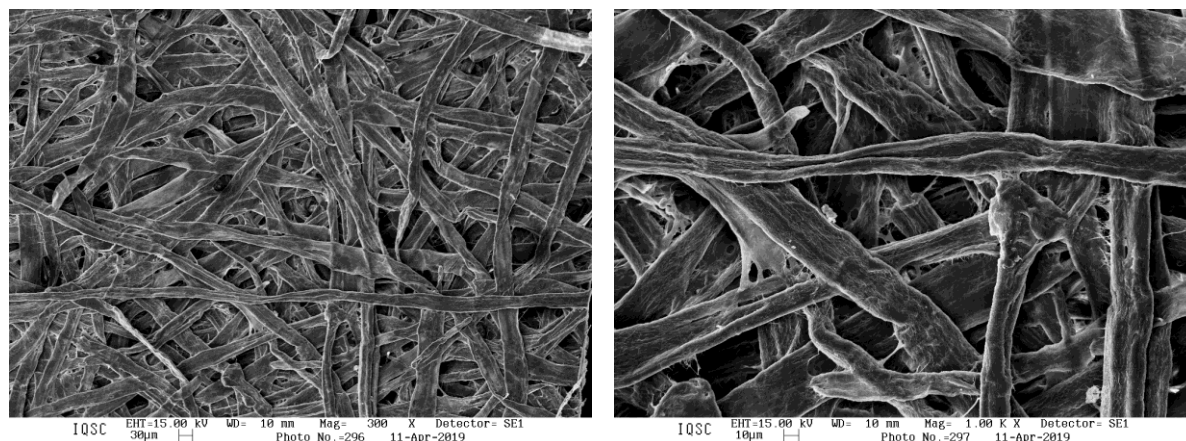
Estes equipamentos necessitam de pessoal com treinamento para seu manuseio e operação, além de uma fonte de energia elétrica. Uma alternativa para regiões distantes de centros urbanos sem rede de energia é a utilização de equipamentos comerciais portáteis como *Hemo Spark*, *DiaSpect Hemoglobin T*, *HemoCue*® *Hb 201+*, ou dispositivos citados na literatura como μ PADs,^{8,61} aplicativos de *smartphone* para análise de imagem⁶², dispositivo microfluídico de poliéster-toner⁶³.

Desse modo, propusemos o desenvolvimento de um μ PAD para diagnóstico de anemia ferropriva pela quantificação de hemoglobina e hematócrito em um único dispositivo, com análise de imagem via *software* de *smartphone*, dispensando fonte de energia elétrica. Os dados de hemoglobina e hematócrito obtidos desta forma poderão alimentar um banco de dados, fornecendo um histórico do paciente ou de uma população ao longo do tempo, possibilitando a sua consulta e utilização pelos órgãos de saúde do governo, o que contribuirá na formulação de políticas públicas de promoção a saúde.

1.3 Dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (μ PADs)

Os μ PADs são plataformas de teste que utilizam o papel como matéria prima principal para a realização de análises químicas. Esses dispositivos combinam os princípios da microfluídica (manipulação de fluídos em escala micrométrica) com as propriedades únicas do papel, como sua capacidade de absorção, porosidade e capilaridade, decorrente de sua estrutura macroscópica de intrincada rede de fibras de tamanhos e posições variáveis (Figura 3)^{21,30}.

Figura 3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do papel Whatman nº 1.



Fonte: Autoria própria.

O transporte de um fluido em papel é um processo passivo, possibilitado pela ação capilar da rede porosa do papel, eliminando a necessidade de um sistema de bombeamento ativo^{12,64}. As propriedades da superfície da matriz do papel determinam sua aderência, assim como os efeitos da evaporação, geometria e característica de umectação¹². Este conjunto de propriedades são resultado da interação entre forças coesivas como a tensão superficial que surge devido à atração intermolecular entre moléculas do fluido na interface líquido-ar, quanto adesivas (força de van der Waals), resultante da atração intermolecular na interface líquido-fibra¹².

O transporte de líquidos pode ocorrer no sentido bidimensional (2D) ou tridimensional (3D). Testes convencionais de fluxo lateral (*Lateral Flow*) oferecem muitas vantagens, incluindo baixo custo, portabilidade, fácil fabricação e operação simples que envolve o carregamento de uma amostra líquida⁶⁵. Em comparação com dispositivos no formato de fluxo lateral (2D), o fluxo tridimensional (3D) oferece as vantagens de tempo de reação mais rápido devido a distâncias de transporte mais curta e menor quantidade de amostra como resultado de camadas fluídicas empilháveis^{12,21,66}.

A fabricação dos μ PADs é geralmente realizada empregando algumas técnicas simples e de baixo custo, como a impressão com cera, impressão a jato de tinta, impressão flexográfica, fotolitografia, corte ou modelagem de papel. O papel também pode ser modificado quimicamente para ter propriedades específicas, como a adição de reagentes ou biomoléculas para detecção de alvos específicos^{21,30,67}.

A principal vantagem dos μ PADs é sua acessibilidade e facilidade de uso. Eles são portáteis, de baixo custo e não requerem equipamentos complexos para a análise. É um material amplamente disponível, o que torna esses dispositivos adequados para aplicações em áreas com recursos limitados, como saúde em países em desenvolvimento ou diagnóstico em campo. As propriedades do papel como armazenamento estável de amostras e reagentes, reciclável (e biodegradável), flexível, elevada disponibilidade, acessibilidade, biocompatibilidade, modificabilidade (estrutural, física e química), filtração, separação e combinação com outros materiais o tornam atraentes⁶⁴.

No entanto, é importante ressaltar que os μ PADs têm algumas limitações. A capacidade de detecção e a sensibilidade desses dispositivos podem ser inferiores aos métodos tradicionais de análise. Além disso, a interpretação dos resultados pode ser mais subjetiva e requerer treinamento adequado.

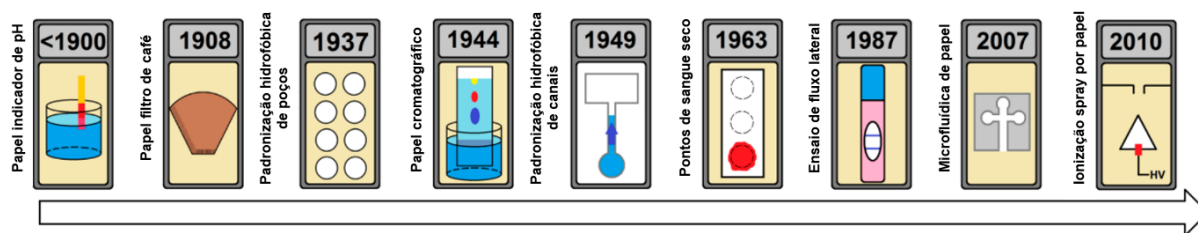
Apesar das limitações, esses dispositivos têm sido aplicados em diversas áreas, incluindo diagnóstico médico, monitoramento ambiental, análises forenses, teste de gravidez e identificação de substâncias em amostras biológicas²¹.

No entanto, apesar dos μ PADs de diagnósticos terem surgido pela primeira vez em 2007 como uma alternativa de baixo custo aos testes laboratoriais convencionais, com o objetivo de melhorar a acessibilidade aos diagnósticos médicos nos países em desenvolvimento, a aplicação de papel no desenvolvimento de μ PADs não se limita há atualidade, como podemos ver a seguir¹².

1.3.1 Histórico

O papel tem sido usado há muitos anos na ciência (Figura 4). Um dos exemplos mais antigos com relatos científicos remonta desde o início do século XIX, envolve a aproximação do pH com o papel de tornassol, técnica ainda hoje utilizada. Podemos reconhecer as propriedades do papel que levaram à concepção deste produto, ou seja, capacidade de armazenamento de reagentes e movimento passivo do fluido⁶⁴.

Figura 4. Histórico da evolução da aplicação de papel na ciência.



Fonte: Adaptado de *Salentijn et al. Reinventing (Bio)chemical Analysis with Paper* (2018)⁶⁴.

O próximo marco foi a invenção do filtro de café da Melitta Bentz em 1908. O processo de filtração é crucial em qualquer laboratório de química e explora a descartabilidade e a deformabilidade do papel, bem como sua porosidade e a possibilidade de integração em um recipiente rígido⁶⁴.

O primeiro exemplo de uma estrutura microfluídica de papel foi descrito em 1937 por Yagoda, que empregou padrões hidrofóbicos de parafina para criar “poços” hidrofílicos.

Na década de 1940, Martin e Synge investigaram a cromatografia de partição no papel. Embora exemplos anteriores de abordagens semelhantes à cromatografia em papel possam ser encontrados na literatura, este trabalho forma a base do método que preparou o caminho para a cromatografia moderna. A cromatografia em papel baseia-se no movimento passivo do fluido, na retenção diferencial e na possibilidade de carregar os poros com alumínio ou sílica gel para melhorar a separação⁶⁴.

Em 1949, Muller et al. complementou o trabalho de Yagoda, empregando padrões hidrofóbicos de parafina para criar um canal microfluídico com objetivo de melhorar a cromatografia em papel. Deixando de lado algumas décadas, a microfluídica de papel recuperou a atenção em 2007, quando o grupo de Whitesides publicou seu artigo seminal sobre o assunto, depois de várias publicações críticas sobre a necessidade de diagnósticos baratos em ambientes de poucos recursos. Neste contexto, os aspectos de acessibilidade, portabilidade e disponibilidade são importantes. Processos alternativos para padronização hidrofóbica também estão sendo investigados para facilitar a fabricação de dispositivos⁶⁴.

Em 1963, o papel foi empregado por Guthrie para testar neonatos para fenilcetonúria (PKU), uma doença que pode levar ao retardo mental se passar despercebida. Uma gota de sangue retirada de uma picada de calcanhar foi aplicada

a um pedaço de papel e seca. Esta mancha de sangue seco poderia ser usada para o diagnóstico da doença. Algumas décadas depois, com o desenvolvimento da espectrometria de massa (MS), a técnica DBS (do inglês *dried blood spot*) tornou-se cada vez mais popular devido à possibilidade de combinar papel com a instrumentação analítica de alta resolução e alta sensibilidade. Várias formas de papel são usadas para o DBS por razões de capacidade de armazenamento, descartabilidade e fácil armazenamento e transporte. Agora, a tecnologia DBS permite diagnósticos para pessoas em países em desenvolvimento, bem como pacientes auto-amostrados que enviam seus DBS para o laboratório pelo correio⁶⁴.

No final da década de 1980, o fluxo lateral (imuno) ensaio (LFA), ou imunocromatografia, foi introduzido, um formato que se tornou particularmente popular após a introdução do teste de gravidez em casa. LFAs são formatados em tiras de nitrocelulose e fazem uso de partículas coloridas modificadas com anticorpos. As partículas são carregadas em um bloco conjugado, resultando na formação de complexos antígeno-anticorpo quando uma amostra é adicionada. Estes complexos são imobilizados mais a jusante por moléculas de captura, acumulando assim a cor da partícula de detecção (geralmente em uma linha). Os LFAs ilustram os méritos das abordagens integrativas baseadas em papel⁶⁴.

O desenvolvimento mais recente na análise baseada em papel foi a introdução pelo grupo Cooks de ionização por *spray* de papel (PSI) para MS. A amostra é depositada em uma ponta afiada recortada em papel, que é então alinhada na frente de um espectrômetro de massa. Quando o solvente e um alto potencial são aplicados, a electrospray é gerada na ponta, e a amostra é introduzida no espectrômetro de massas. No PSI, a amostra geralmente não requer pré-processamento, devido às propriedades extrativas do papel e do solvente. Desde a sua introdução, foram relatados métodos PSI mais avançados, que tiram proveito de várias propriedades adicionais do papel⁶⁴.

1.4 Processamento de imagem e detecção colorimétrica

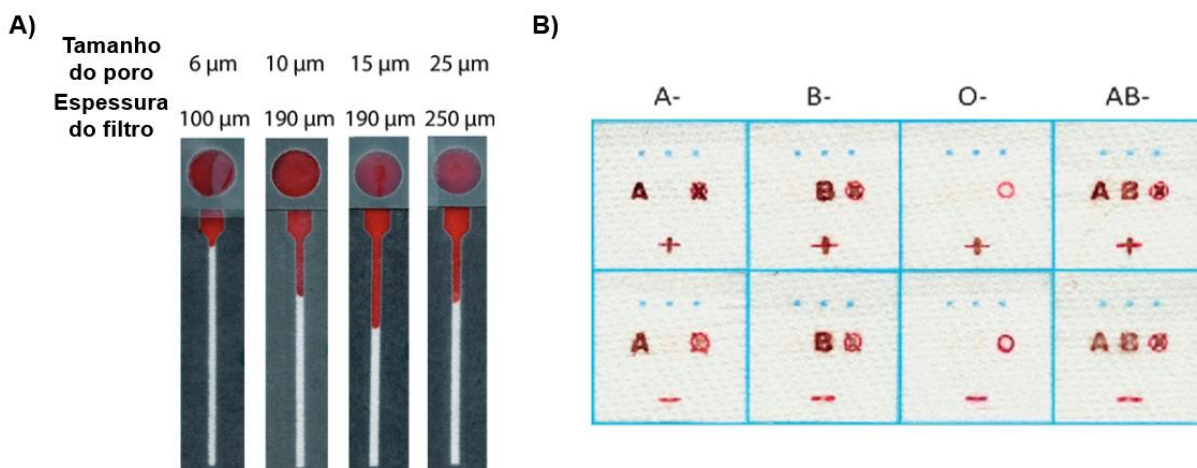
A detecção é um parâmetro importante em plataformas baseadas em papel⁶⁴. As áreas de detecção são criadas no papel por deposição de reagentes ou enzimas.

Quando a solução de amostra atinge a zona de detecção, é realizada uma reação química entre o composto alvo e os reagentes, desenvolvendo-se uma cor^{21,23,68}.

A detecção colorimétrica representa o método mais simples e difundido devido à sua fácil operação e leitura do sinal^{21,68}. Reações que resultam em resposta colorimétrica são numerosas e incluem reações químicas, enzimáticas ou bioquímicas^{30,64}. A detecção colorimétrica, em especial a detecção colorimétrica digital, é uma técnica amplamente difundida e aplicada por ser uma técnica relativamente simples (ou seja, a intensidade da cor é proporcional à concentração do analito) e a tecnologia compatível com *smartphones*, câmeras ou *scanners*. A detecção é baseada através do tratamento da imagem com um *software* específico como *PhotoShop* ou *ImageJ*, com posterior extração dos valores de intensidade das cores (RGB, CMYK, RYB, CMY ou escala de cinza), correlacionando-os com suas respectivas concentrações do analito de interesse^{21,23,68}. Além disso, os detectores são portáteis, relativamente baratos e diretos para operar com pouco ou moderado treinamento. O uso de *smartphones*, como dispositivos de análise disseminou-se devido a seu poder de processamento, possibilidade de integração com a internet e aplicativos de celular³⁰.

Já o método de detecção visual, é na sua essência um método colorimétrico, porém sem a necessidade de equipamentos, obtendo um resultado instantâneo. Um grande número de testes com resultados interpretados a olho nu é utilizado em testes como o teste de gravidez²¹, quantificação de hemoglobina²⁸, hematócrito⁴⁵, tipagem sanguínea⁶⁹. Vantagens dessa abordagem são numerosas, mas apenas se estivermos interessados em uma resposta qualitativa, enquanto muitos testes analíticos exigem um resultado quantitativo. A microfluídica de papel fez uma contribuição valiosa para a leitura a olho nu, com a implementação de resultados facilmente interpretáveis e até legíveis (Figura 5)⁶⁴.

Figura 5 Exemplos de μ PADs desenvolvidos com detecção qualitativa visual. A) Quantificação de hematócrito através da aplicação de 45 μ L sangue humano em papel filtro de espessura e porosidades diferentes; B) Tipagem sanguínea através da adição de anticorpo no papel e lavagem do sangue no papel com soro fisiológico.



Fonte: Imagem adaptado de a) *Berry et al., Measurement of the hematocrit using paper-based microfluidic devices (2016)*⁶¹; b) *Li et al., Paper-based blood typing device that reports patient's blood type "in writing" (2018)*⁶⁹.

Apesar das inúmeras vantagens obtidos através da detecção colorimétrica, os resultados também apresentam limitações. Uma desvantagem da detecção colorimétrica é a heterogeneidade na distribuição da cor na reação, gerando desvios no resultado quando utilizado detecção colorimétrica digital. Além disso, os resultados são influenciados pela luz ambiente, distância focal e pela cor de fundo do papel ou da amostra. Um problema na detecção está que cada fabricante de *smartphone* projeta suas lentes de câmera e utiliza *softwares* de tratamento de imagens próprios (código fechado), gerando um desvio nos resultados quando utiliza *smartphones* de fabricantes diferentes. Este problema poderia ser solucionado com uma certificação (aprovado pela FDA ou similar), o que é simplesmente impossível e retarda a expansão da aplicação de μ PADs com análise colorimétrica⁶⁴.

Uma preocupação adicional pelo uso de *smartphones* vem do risco de contaminação do operador das amostras testadas. Existe um perigo real de infectar / expor o usuário do *smartphone*, caso seu telefone pessoal seja usado para testar uma amostra. Plataformas de leitura dedicadas, desenvolvidas especificamente para

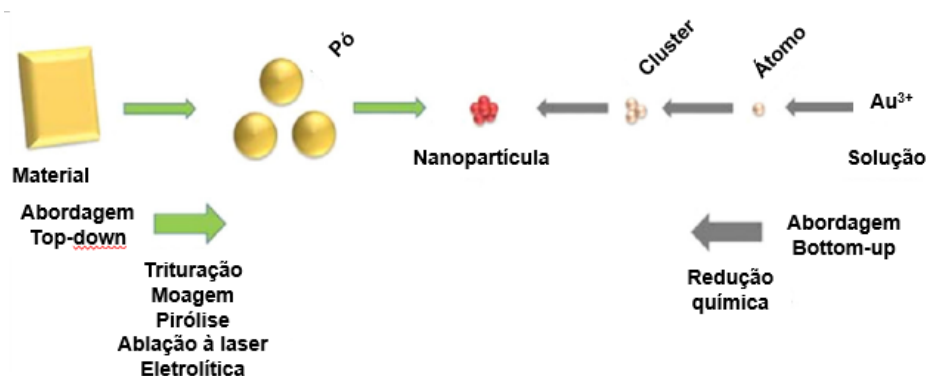
análises no local, dão mais liberdade para o design e a embalagem de um dispositivo com recursos técnicos especiais, sendo provavelmente mais fácil obter a aprovação necessária para uso médico. Além disso, isso reduz a ameaça de transmissão de patógeno de uma amostra para o usuário⁶⁴.

1.5 Nanopartículas de Ouro (AuNPs)

Estudos recentes têm demonstrado grande importância das AuNPs devido a seu tamanho reduzido apresentar várias propriedades físicas e químicas peculiares, como alto coeficiente de absorção de raios X, facilidade de manipulação sintética, permitindo um controle preciso sobre as propriedades físico-químicas da partícula, forte afinidade de ligação com tióis, dissulfetos e aminas e propriedades eletrônicas distintas. Além das propriedades já supracitadas, as AuNPs possuem uma elevada reatividade devido a elevada área superficial. Suas funcionalidades dependem do tamanho da partícula, forma e estado de agregação⁷⁰.

As AuNPs são partículas de ouro extremamente pequenas, geralmente com tamanho entre 1 e 100 nanômetros e sintetizadas através de diferentes métodos, sendo os mais comuns os métodos de *Turkevich* e de *Brust-Schiffrin*^{70,71,72}. Ambos utilizam a abordagem *bottom-up* (Figura 6), onde uma solução de ácido cloroáurico (AuCl_4^-) está na presença de um agente redutor orgânico, citrato de sódio ou tetraborato de estanho, por exemplo. O agente redutor reduz o ouro presente na solução, resultando na formação das AuNPs.

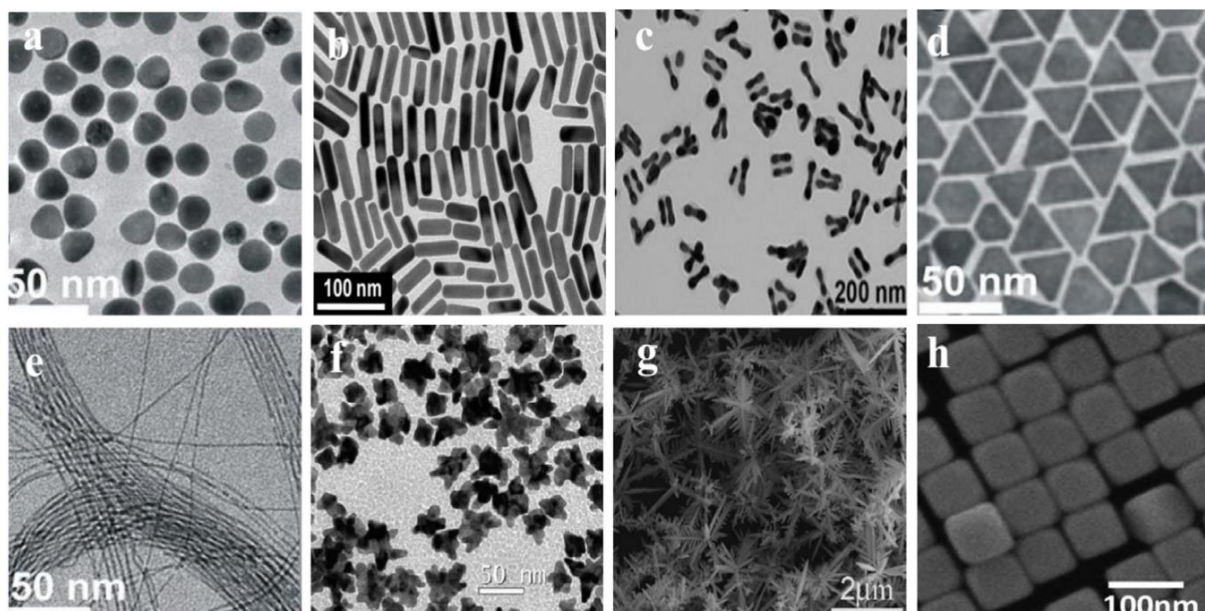
Figura 6. Abordagens básicas para a preparação de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, v. 184, p. 537–556, jul. 2018br. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.02.088⁷⁰.

É importante destacar que sua síntese requer condições controladas de temperatura, pH e concentração dos reagentes (solvente e/ou agente redutor), afetando o tamanho e formato (nanoesferas, nanotubos, nanocubos, nanopirâmides) das AuNPs sintetizadas (Figura 7). Além disso, a caracterização e purificação das NPs também são etapas importantes do processo^{70,72}.

Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de AuNPs: a) nanoesferas; b) *nanorods*; c) nanohalter; d) nanoprisma-triangular; e) nanofios; f) nanoestrelas; (g-h) Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) de imagens de AuNPs: g) *nanodendrites* h) nanocubos.



Fonte: Adaptado de ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, v. 184, p. 537–556, jul. 2018br. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.02.088⁷⁰.

As AuNPs são altamente dependentes do seu diâmetro e formato, apresentando dimensões unidimensionais, bidimensionais ou tridimensionais, manifestando cores que variam do vermelho ao violeta. Estas propriedades ópticas são decorrentes da ressonância plasmônica de superfície (SPR) de absorção e dispersão da luz, no qual os elétrons na superfície das AuNPs oscilam coletivamente em resposta à incidência de luz^{72,73}. Além das propriedades ópticas serem muito exploradas, as AuNPs são amplamente estudadas devido à sua elevada área superficial, estabilidade, baixa toxicidade e propriedades físicas, químicas, elétricas e

catalíticas. Suas aplicações são amplas e abrangem diversas áreas, como medicina (ressonância magnética, terapia fototérmica, tratamento de câncer, entrega de medicamentos e na detecção precoce de doenças), eletrônica (sensores, transistores e circuitos integrados, devido a excelente condutividade elétrica), catálise, sensoriamento, cosméticos ou óptica⁷².

A aplicação de ouro como AuNPs é um reagente detector histórico para ensaios de fluxo lateral. As AuNPs conjugadas com anticorpos são amplamente adotadas em testes comerciais de fluxo lateral, porque sua interpretação qualitativa não requer um leitor, devido sua intensidade de cor ser visível a olho nu após agregação²¹. Atualmente, com o interesse nas aplicações das AuNPs, temos na literatura aplicações que vão desde terapia fotodinâmica, fototérmica, imageamento de raio-x, transferência e entrega de medicamentos e o desenvolvimento de sensores, utilizando por exemplo detecção colorimétrica, eletroquímica ou fluorescente⁷⁰.

2. OBJETIVOS

Geral:

No presente trabalho tivemos como objetivo desenvolver um dispositivo analítico microfluídico baseado em papel (μPAD) para auxiliar no diagnóstico de anemia ferropriva, através da quantificação de hematócrito, hemoglobina e ferritina em amostras de sangue total no local de atendimento, sendo a detecção proporcionada pela análise de imagens digitais.

Específico:

- Desenhar e estudar a viabilidade da construção dos dispositivos microfluídicos em papel;
- Construir suporte para aquisição de imagens digitais de forma controlada e segura;
- Investigar o comportamento do sangue nas plataformas de papel;
- Desenvolver metodologia para obtenção de soro sanguíneo no dispositivo;
- Avaliar a influência da porosidade do papel na capilaridade do sangue;
- Avaliar os parâmetros de intensidade de cor e correlaciona-los com os dados dos doadores;
- Validar o dispositivo microfluídico através da correlação dos resultados com métodos padronizados;
- Conjugação das AuNPs diretamente no papel filtro;
- Obtenção de plasma sanguíneo diretamente no μPAD mediante uso de membrana específica;
- Quantificar hemoglobina, hematócrito e ferritina;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento do trabalho consistiu primeiramente no desenvolvimento de um suporte para aquisição de imagens do μPAD , onde priorizamos a portabilidade, reprodutibilidade na qualidade das imagens obtidas e segurança do operador e do paciente. O suporte foi desenvolvido juntamente com a inserção de Diodo Emissor de Luz (LED) para um controle da luminosidade, sem utilizar o flash do *smartphone*, visto que o *flash* gera reflexos que interferem na análise. Após o desenvolvimento do suporte, concentramos nossos esforços na determinação da melhor matriz de papel para aplicação no projeto, focando na propriedade de capilaridade do sangue e na obtenção de plasma no μPAD , sem necessidade de tratamento prévio da amostra.

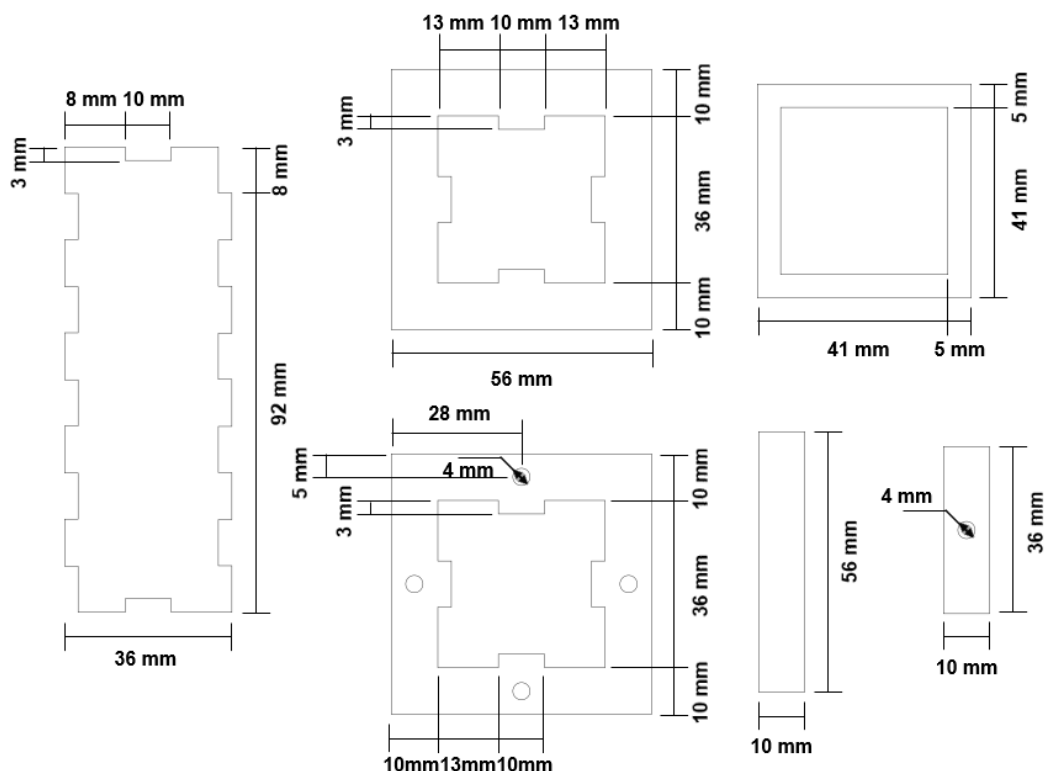
No desenvolvimento do μPAD , optamos em realizar em duas partes distintas. A primeira parte consistiu na confecção de um suporte externo em papel fotográfico, material mais rígido que o papel para receber o μPAD em seu interior. A segunda parte consistiu na escolha do papel para quantificação do hematócrito, na otimização da reação colorimétrica na quantificação de ferritina e no emprego de técnicas para separação do plasma sanguíneo. Ao final, estes materiais foram unidos no formato de sanduíche, finalizando o μPAD para o uso.

3.1 Construção do suporte em acrílico para aquisição das imagens

Um suporte de acrílico foi projetado para aquisição de imagem por intermédio da câmera do *smartphone*. Sua construção foi realizada com intuito de minimizar os erros operacionais, estabelecendo desta forma uma distância focal fixa entre a lente da câmera do *smartphone* e o objeto a ser fotografado, além da inserção de uma iluminação interna no suporte para minimizar efeitos de distorção das cores decorrentes da iluminação e do tamanho da imagem.

Utilizamos uma chapa de acrílico translúcido de 5 mm de espessura para confecção do suporte. Com auxílio do *software* gráfico *Inkscape 0.91*, o *layout* (Figura 8) do suporte foi criado e uma cortadora a laser CNC de CO₂ com 70 W de potência utilizado para cortar as peças.

Figura 8. *Layout* das peças do suporte em acrílico de 5 mm de espessura.



Fonte: Autoria própria.

Adicionamos 4 Diodos Emissor de Luz (LED) alimentados por 2 pilhas de 1,5V cada, para obtenção de iluminação controlada na parte interna do suporte, além de realizar o recobrimento do suporte com papel *contact*, com objetivo de eliminar qualquer iluminação externa.

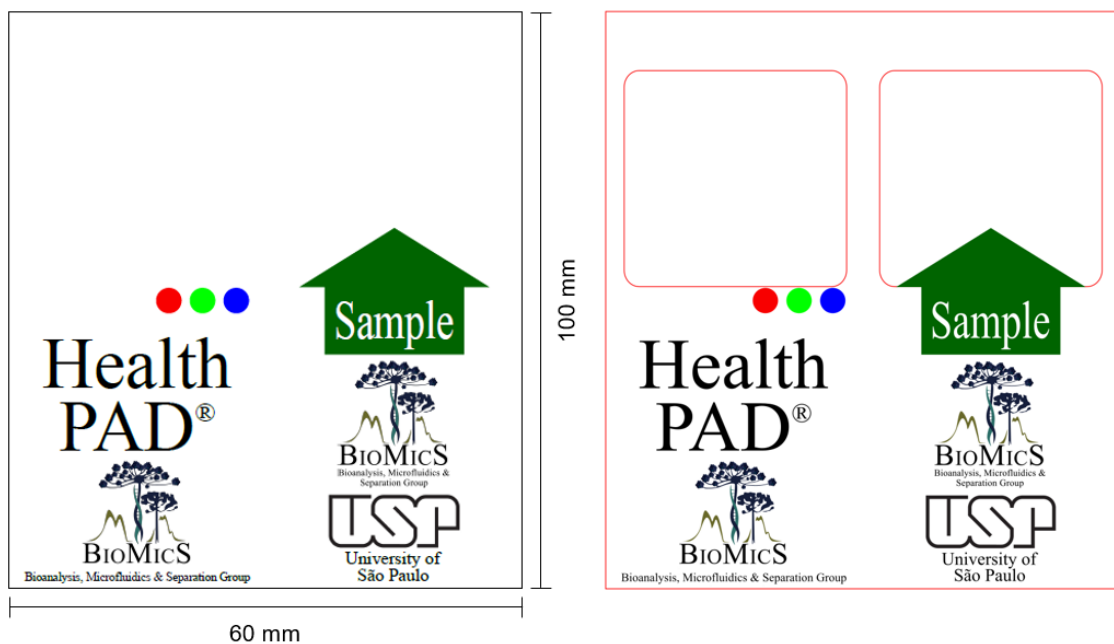
3.2 Construção do microdispositivo analítico baseado em papel (μ PAD)

O desenvolvimento do μ PAD foi dividido em dois dispositivos, sendo um para determinação de hemoglobina e hematócrito e outro dispositivo para quantificação de ferritina. Ambos os dispositivos receberam a mesma construção, sendo o μ PAD dividido em duas partes (externa e interna). A parte externa foi construída com papel fotográfico com objetivo de fornecer um suporte rígido ao papel utilizado na parte interna (onde ocorre a análise), reduzindo o surgimento de imperfeições na superfície do papel proveniente de sua umectação.

3.2.1 Construção do dispositivo externo em papel

A parte externa foi desenvolvida para oferecer um suporte rígido ao μ PAD interno, onde a análise é realizada. O objetivo é deixar a parte interna do μ PAD sempre reta, sem ondulações na superfície decorrente da umectação do substrato decorrente da aplicação da amostra. O *layout* (Figura 9) da parte externa do μ PAD foi realizado em *software* gráfico *Inkscape 0.91*, construído em papel fotográfico premium branco, marca Glossy, A4 (210mm x 297 mm), brilhante, 180 g m⁻² e recortado com uma cortadora laser CNC de CO₂ com 70 W de potência utilizado para cortar as peças. Neste dispositivo, imprimimos em conjunto um padrão de cores para servir como calibrador de cores com intuito de minimizar as diferenças na identificação da tonalidade da cor, decorrente das diferenças de *softwares* empregados nos tratamentos de imagem instalados nos *smartphones* de diferentes fabricantes, permitindo assim seu intercâmbio.

Figura 9. *Layout* da parte externa do μ PAD. A imagem do lado esquerdo está demonstrada a impressão do *layout* com as informações pertinentes a sua aplicação, as dimensões do dispositivo e a região de aplicação de amostra (ao lado direito do dispositivo). A imagem do lado direito representa a região de corte, representado em vermelho onde o corte será realizado com a cortadora a laser.



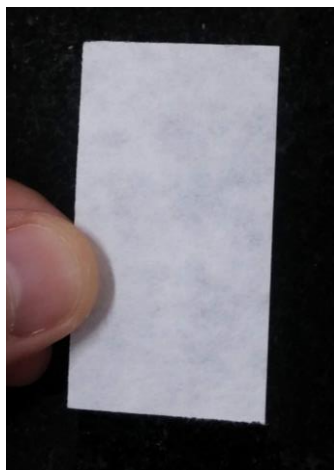
Fonte: Autoria própria.

3.2.2 Construção do dispositivo interno para quantificação de hematócrito

A parte interna do μPAD compreende a região de análise. Desta forma, seu desenvolvimento foi conduzido em função da análise empregada. Seu *layout* foi desenvolvido com auxílio do *software* gráfico *Inkscape 0.91*.

O μPAD para quantificação de hematócrito, a detecção foi feita pela área da imagem do sangue formada, consistindo em um papel cromatográfico Whatman nº 1 com dimensões de 35x15 mm (Figura 10).

Figura 10. Papel cromatográfico Whatman nº 1 para quantificação de hematócrito.



Fonte: Autoria própria.

3.2.3 Construção do dispositivo interno para quantificação de ferritina

Para a quantificação de ferritina, utilizamos para detecção a agregação de AuNPs funcionalizadas com anticorpo (item 4.5) diretamente no papel. Sua construção foi dividida em duas etapas. A primeira etapa consistiu na impressão do *layout* (Figura 11) com impressora de cera sobre o papel filtro Whatman nº 1. O dispositivo então é submetido a 130 °C por um período de 3 min em estufa, com objetivo de fundir a cera às fibras do papel, formando a barreira hidrofóbica. O processo de fabricação está esquematizado na Figura 12.

A segunda etapa consiste na montagem do μPAD (Figura 11), onde adicionamos na parte interna μPAD em cera, os discos de papel sobrepostos na seguinte ordem: filtro para absorção da amostra (papel cromatográfico Whatman nº 1),

3.3 Amostras de sangue

As amostras de sangue utilizadas para desenvolvimento do projeto foram sangue humano. Por se tratar de um material biológico com risco potencial de contágio pelos vírus da hepatite B (VHB), vírus da hepatite C (VHC), citomegalovírus (CMV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV), dentre outras, foram adotados procedimentos de segurança para proteção individual e coletiva, conforme exposto na NBR 14785.

Com objetivo de preservar a integridade e segurança do operador, meio ambiente e demais colaboradores presentes no laboratório, a etapa de coleta de amostra e otimização do μPAD foi realizada com amostras oriundas de doadores de sangue do Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos, após aprovado o processo de comitê de ética (CAAE 15478519.1.3001.8148).

O manuseio da amostra foi conduzido dentro de sala de coleta, uso de luvas, jaleco, óculos de proteção e máscara, adotando procedimentos de limpeza, desinfecção, esterilização e descarte conforme exposto na norma NBR 14785.

3.4 Analitos de interesse

3.4.1 Anemia ferropriva

O diagnóstico de anemia ferropriva geralmente é conduzido pela quantificação da hemoglobina com reagente *Drabkin*, a base de cianeto. Como descrito por Yang *et al.* (2013), os glóbulos vermelhos são lisados e todas as formas de hemoglobina são convertidas em cianometá-hemoglobina, um composto de cor castanha com absorção máxima em 540 nm⁸.

No entanto, propusemos o desenvolvimento de um diagnóstico livre de cianeto, baseado simplesmente no comportamento microfluídico do sangue no papel. Seu desenvolvimento é fundamentado no trabalho de Kan *et al.* (2010), onde relataram a presença de uma fase uniforme de eritrócitos dispersos permeando o papel,²⁶ assim como a influência da concentração de eritrócito na viscosidade sanguínea⁸. Estas características favorecem ao desenvolvimento de um μPAD de

baixo custo para diagnóstico de anemia baseado na capilaridade do sangue, e assim, auxiliar no diagnóstico rápido de anemia em locais remotos.

O diagnóstico de anemia ferropriva via hematócrito foi baseado na área da imagem de sangue formada no papel filtro com aplicação de um volume fixo de 15 μL , onde uma gota fica suspensa na ponta da ponteira de 100 μL , e esta “gota” de sangue suspensa encosta no papel. Foi adotado esta metodologia de aplicação, visto que a única força exercida para transportar o fluido pelo papel era a capilaridade, excluindo qualquer força atuando externamente, o que poderia oferecer resultados menos precisos. A quantificação foi realizada adotando a área da imagem formada de sangue no papel e correlacionando com a curva analítica construída, nos fornecendo um resultado rápido através de uma fotografia tirada com a câmera do *smartphone*.

3.4.2 Ferritina

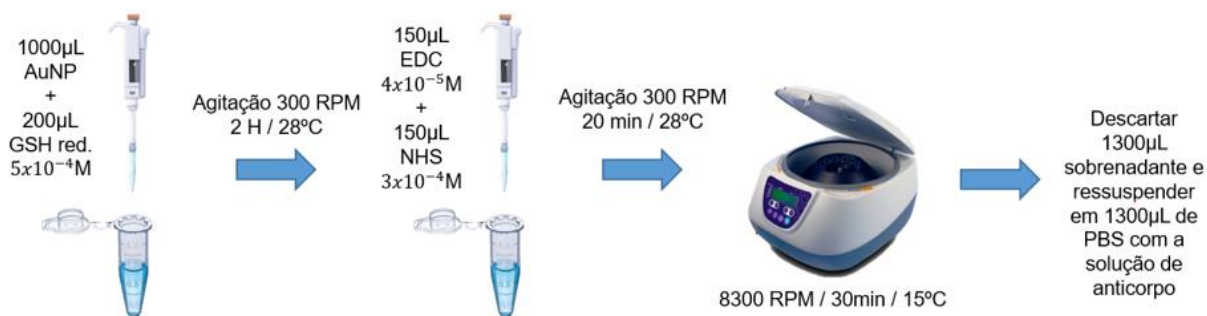
As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram cedidas por colaboração e foram sintetizadas seguindo o método de Turkevich, onde ocorreu a redução do ácido cloroáurico em citrato de sódio, obtendo AuNPs no diâmetro de 30 nm⁷⁴. O crescimento das AuNPs ocorreu após a mistura de duas soluções, $2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ citrato de sódio e $25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ HAuCl_4 . A solução contendo AuNPs foi resfriada pela adição de 50 mL de água ultrapura. A solução foi mantida a 4°C no escuro para posterior caracterização e conjugação^{74,75}.

Primeiramente, realizamos um processo de padronização, onde a solução de AuNPs de 30 nm cedidas em frascos recobertos por alumínio foram centrifugadas e o sobrenadante armazenado para posterior utilização. As AuNPs decantadas foram ressuspensas utilizando o sobrenadante retirado anteriormente, ajustando a absorção da solução resultante em 0,500, 0,400, 0,300, 0,200 e 0,100 A.U. em 525 nm em frascos separados. As absorbâncias foram medidas com 5 μL em Espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000C da Thermo Scientific™, com caminho óptico de 1 mm. Os frascos foram recobertos com papel alumínio e armazenados em geladeira, para posterior utilização. Com soluções já padronizadas com as respectivas absorbâncias, prosseguimos com a conjugação como demonstrado na Figura 13 e Figura 14.

Optamos em realizar o processo de conjugação das AuNPs, com as AuNPs impregnadas em discos de papel cromatográfico Whatman nº 1 previamente

recortadas. Desta forma, prosseguimos primeiramente com a adição de 2 mL da solução de AuNPs previamente ajustadas em um *ependorf* de 4 mL contendo 20 discos de papel. Estes discos de papel partiram de uma folha de papel cromatográfico Whatman nº 1, recortados com uma cortadora a laser CNC de CO₂ com 70 W de potência, utilizando *software* gráfico *Inkscape 0.91* para realizar o *layout* dos discos com diâmetro de 5 mm.

Figura 13. Processo de conjugação das AuNPs no papel com glutaciona e EDC/NHS.



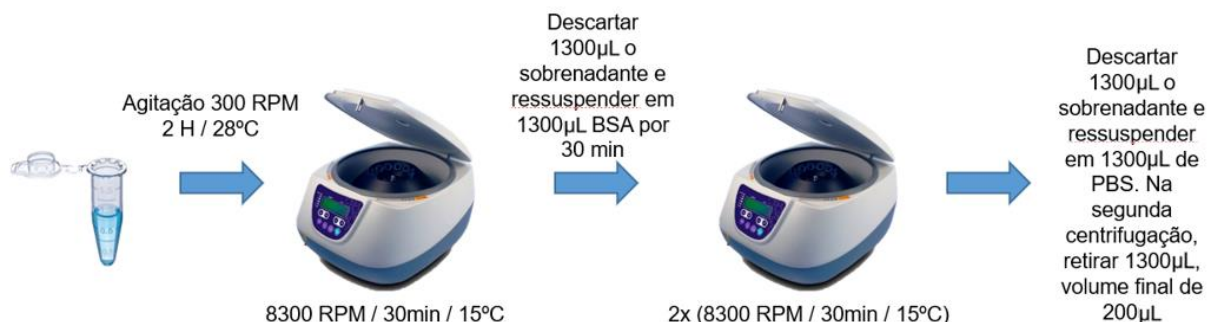
GSH red. = Glutaciona reduzida em solução de PBS; AuNP = Nanopartícula de ouro em solução de citrato de sódio; EDC = 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida em água; NHS = N-hidroxissuccinimida em água; PBS = Tampão fosfato salino 0,001M pH 7,4. Fonte: Autoria própria.

O *ependorf* foi posicionado em um agitador basculante horizontal por 12 horas, recoberto por papel alumínio para proteção da luz. Após o tempo transcorrido, adicionamos 400 µL de GSH red. e colocado em agitação em um agitador basculante horizontal por 2 H e 28°C, para ocorrer a formação de uma ligação covalente entre o grupo sulfidrila (-SH) presentes na cisteína da glutaciona e o ouro⁷⁶.

Posteriormente, as AuNPs recobertas com glutaciona foram ativadas adicionando 300 µL de EDC 40 µM e 300 µL de NHS 300 µM no *ependorf*. O EDC reage com o grupo carboxílico da glutaciona, ativando-o, formando um intermediário éster reativo conhecido como *O-acylisouerea*. O intermediário *O-acilsouereia* reage com NHS, formando um éster de NHS mais estável com tempo de vida mais longo: 4-5 horas em pH 7, 1 hora em pH 8 e apenas 10 minutos em pH 8,6. Este éster sulfonhídrico pode então reagir com aminas primárias (-NH₂) para formar ligações cruzadas de amida^{77,78,79}. O *ependorf* permaneceu sob agitação por 20 min e 28°C. Após o tempo, o *ependorf* foi centrifugado à 8300 RPM por 30min à 15°C em uma centrífuga

refrigerada. O sobrenadante (2600 μL) foi retirado e descartado. Adicionamos em seguida 2600 μL da solução de anticorpo ferritina, MIF2502 da ThermoFisher na concentração de 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS.

Figura 14. Processo de conjugação das AuNPs no papel com glutatona e EDC/NHS.



PBS = Tampão fosfato salino 0,001M pH7,4; BSA = 0,2% em PBS; 0,1% triose ou sacarose 1% no BSA. Fonte: Autoria própria.

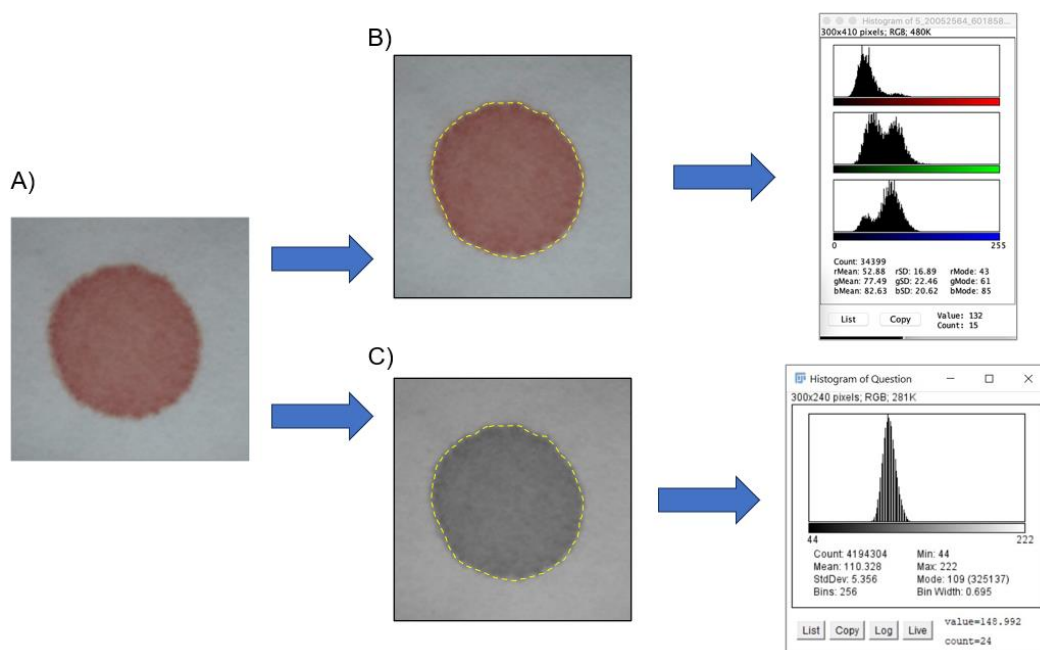
Os discos com solução de anticorpo em PBS foram agitados em um agitador basculante horizontal à 300 RPM por 2 H à 28°C. Após o tempo, o *ependorf* foi centrifugado à 8300 RPM por 30min à 15°C em uma centrífuga refrigerada. O sobrenadante (2600 μL) foi retirado e descartado. Adicionamos em seguida 2600 μL da solução de BSA 0,5 % (m/v) e o *ependorf* agitado sob as mesmas condições por 30min. Após o tempo, o *ependorf* foi centrifugado à 8300 RPM por 30min à 15°C em uma centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi retirado e adicionado 2600 μL de PBS. Foi realizado uma segunda lavagem, repetindo-se as condições de centrifugação. Ao final, os discos foram retirados e separados em uma placa de petri, para que durante a secagem, os discos não ficassem grudados uns aos outros. Processo de secagem se deu a temperatura ambiente, com a placa de petri envolta de papel alumínio, para proteger da luz. Com os discos secos e finalizados, prosseguiu-se com a adição de plasma humano.

3.5 Detecção

Para aquisição das imagens, foi utilizado um *smartphone* LG K41S, com *App* *Open Camera* com foco "travado"; sem *flash*; balanço de branco "*daylight*" e modo cena "*Steady photo*". As imagens capturadas foram tratadas com auxílio de software

ImageJ para obter a informação da intensidade de cor da reação ou a área da imagem formada. A estratégia está apresentada de forma simplificada na Figura 15.

Figura 15. Estratégia geral para quantificar ensaio colorimétrico com imagem utilizando software de edição de imagem *ImageJ*. A) Aquisição de imagem com câmera do *smartphone*; B) Procedimento para adquirir dados de intensidade de cor na escala Red Green e Blue, e área da imagem, e C) Procedimento para adquirir dados de intensidade de cor na escala cinza e área da imagem.

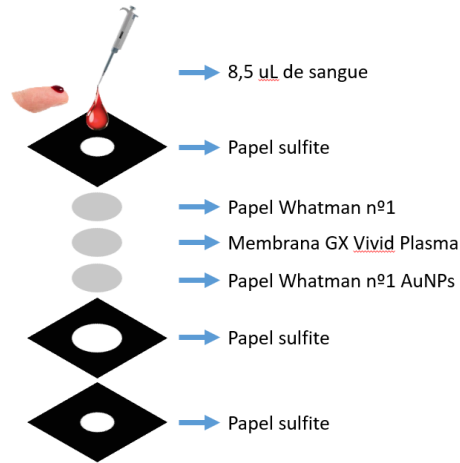


Fonte: Autoria própria.

Os ensaios onde a detecção foi realizada através da intensidade da cor, avaliamos a influência da iluminação, pois é um fator que afeta os resultados⁸⁰. Para minimizar este efeito, propusemos a impressão de círculos RGB no μ PAD com objetivo de ajustar a intensidade da cor em função da iluminação local, uma vez que os dados são tratados nesse sistema de cores.

O funcionamento do μ PAD é baseado na aplicação de um volume de sangue na região de aplicação de amostra. Para quantificação de ferritina, após a aplicação de sangue no dispositivo, o sangue irá percolar por capilaridade através das fibras de celulose do papel filtro e sua filtração através da membrana para obtenção de plasma. O plasma irá percolar para o disco com AuNPs funcionalizadas, ocorrendo alteração de sua cor. Na Figura 16 está apresentado de forma simplificada seu funcionamento.

Figura 16. Esquema simplificado do funcionamento de um μ PAD para quantificação de ferritina com AuNPs.

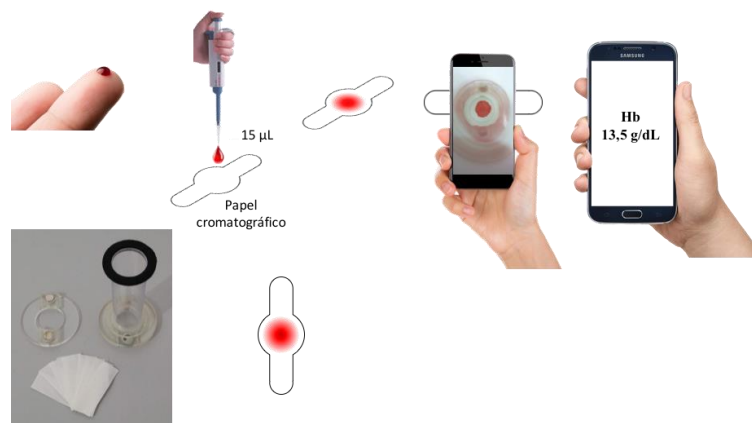


Fonte: Autoria própria.

A membrana GX Vivid Plasma presente na Figura 16 é responsável por separar o plasma do sangue total, permitindo que o plasma permeie a membrana até o papel filtro com AuNPs conjugadas para quantificação de ferritina.

Na Figura 17 está apresentado de forma simplificada a metodologia de quantificação do hematócrito, onde utilizamos a área da imagem formada pelo sangue permeado no papel após aplicação de 15 μ L de sangue total.

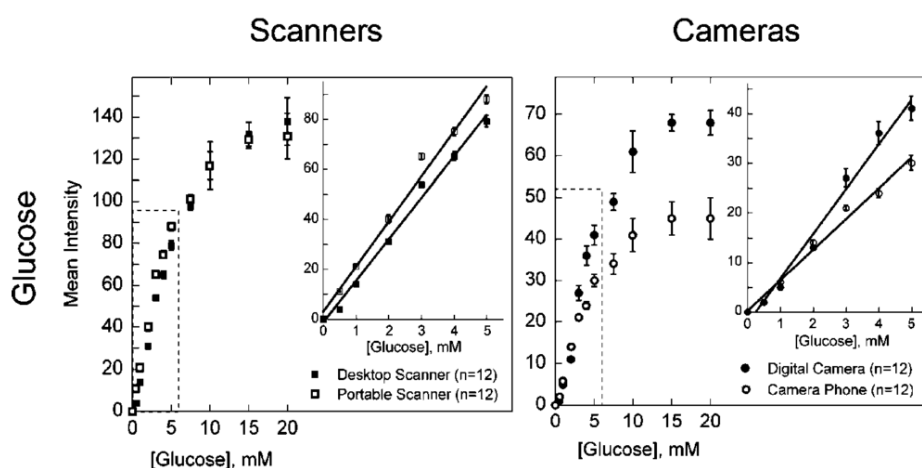
Figura 17. Estratégia para o diagnóstico de anemia ferropriva baseado no hematócrito. Parte superior, da esquerda para a direita: punção, transferência do sangue para o μ PAD, obtenção da imagem e resultado através de um aplicativo de *smartphone*.



Fonte: Autoria própria.

O diagnóstico foi realizado adotando em associação os meios de detecção já mencionados anteriormente em conjunto com a construção da curva analítica para o analito de interesse. Sua construção e funcionamento é baseado na correlação do sinal quantitativo proporcional à concentração do analito. Na Figura 18 está apresentado um exemplo de curva analítica para quantificação de glicose em urina no qual a aquisição de imagem foi realizada através de *scanner* e câmera.

Figura 18. Curva analítica para diferentes concentrações de glicose em urina artificial. A intensidade média para cada *spot* foi obtida utilizando *AdobePhotoshop*. Foi medido concentrações de glicose entre 0 e 20 mmol L⁻¹. A linearidade (R^2) da curva analítica foi de 0,991 para scanner de mesa, 0,983 câmera digital e 0,986 smartphone.



Fonte: Adaptado de Martinez *et al.* (2008)²³.

3.6 Otimização do μ PAD para quantificação de hematócrito e hemoglobina

Para o desenvolvimento e otimização do μ PAD, utilizamos amostras de sangue humano provenientes de 207 voluntários do HemoBanco do Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos após aprovação do Comitê de Ética (CAAE 15478519.1.3001.8148). Todos os voluntários, com idades entre 17 e 62 anos, do gênero masculino e feminino foram informados do projeto e posteriormente convidados a participar, recebendo e assinando nosso Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), disponível no ANEXO I.

A etapa de desenvolvimento e otimização do μ PAD foi realizado nas dependências do Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo (USP), para a posterior coleta, realizadas no Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos. As amostras de sangue foram manuseadas nas dependências da sala de coleta no Hospital, com uso de luvas, jaleco, óculos de proteção e máscara, adotando procedimentos de limpeza, desinfecção, esterilização e descarte conforme exposto na norma NBR 14785. As alíquotas de sangue foram coletadas em triplicata e aplicadas no μ PAD no momento da coleta de triagem, onde é realizado a medição do hematócrito antes do processo de coleta de sangue do voluntário. Utilizamos o resultado do hematócrito e hemoglobina obtido pela centrífuga de microhematócrito e CompoLab TM na triagem respectivamente, para confrontar com o resultado do μ PAD.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

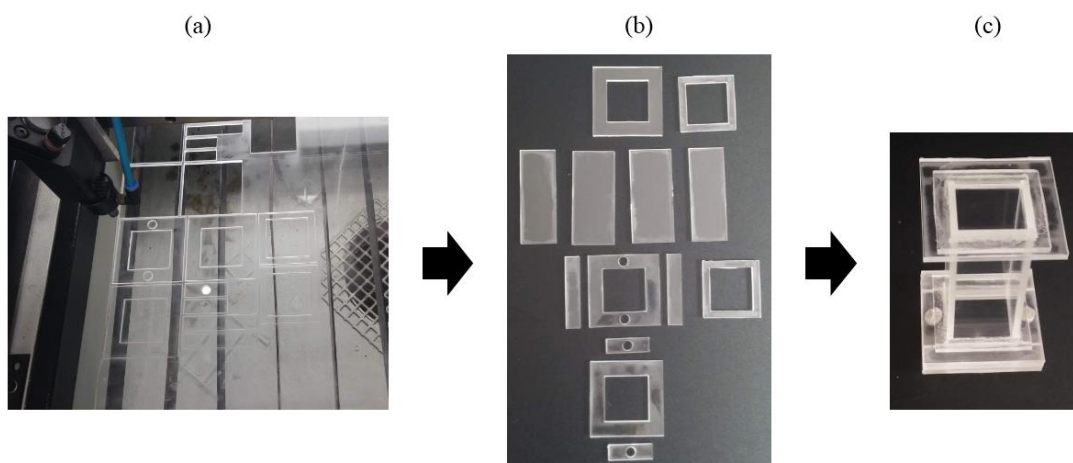
4.1 Construção do suporte para aquisição das imagens

A coleta de amostras é um aspecto frequentemente negligenciado do projeto de desenvolvimento de ensaios baseados em papel¹². Uma preocupação adicional está no risco de contaminação do usuário do *smartphone* ou das amostras, sendo necessário desenvolver plataformas especiais para reduzir ao máximo a ameaça de transmissão de patógeno de uma amostra⁶⁴.

Desenvolvemos um suporte de baixo custo e portátil em acrílico, solucionando uma das etapas mais importantes para quantificar e/ou identificar analitos na detecção em μ PADs, como exposto por Cate *et al.* (2015)⁸¹. Enquanto que, segundo Morbioli *et al.* (2017), fatores como distância e luminosidade interferem de maneira direta na qualidade da imagem, podendo reduzir a reprodutibilidade e aumentando consequentemente o desvio padrão das análises⁸⁰.

Assim, está exposto na Figura 19 o suporte de acrílico construído por nosso grupo com intuito de reduzir fatores externos e minimizar erros operacionais durante a aquisição de imagem. Esta redução dos erros ocorreu estabelecendo uma distância focal fixa entre a lente da câmera do *smartphone* e o objeto que será fotografado, além de proteger o operador de possível contaminação.

Figura 19. Suporte para aquisição de imagem. a) Chapa de acrílico translúcido cortado na cortadora a laser de CO₂ com 70 W de potência; b) Peças em acrílico após o corte; c) Suporte montado.

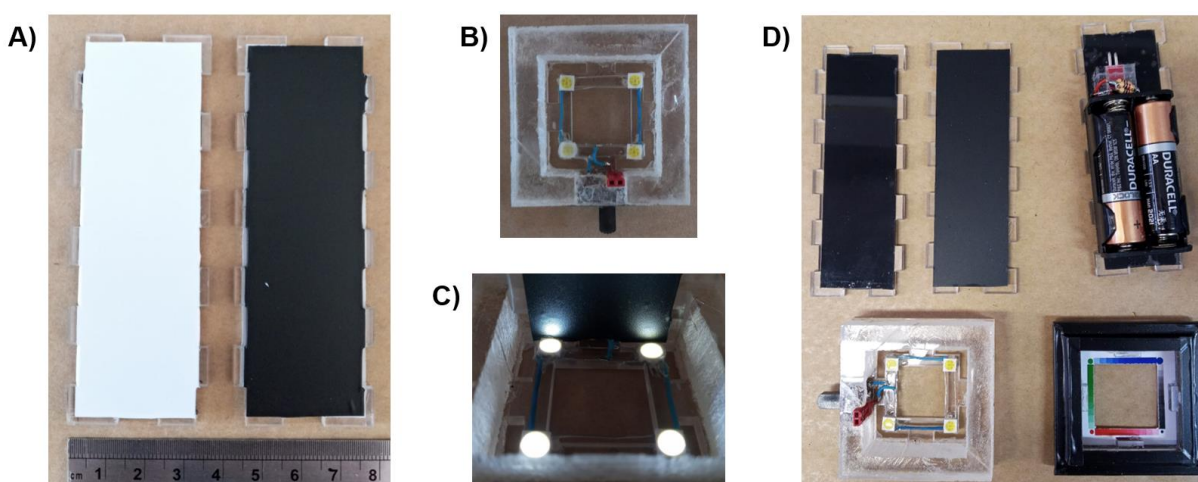


Fonte: Autoria própria.

Conforme exposto na Figura 19b, as peças foram projetadas para serem montadas, desmontadas e transportadas com facilidade, favorecendo a portabilidade, ocupando o mínimo de espaço possível.

O mecanismo de montagem e desmontagem, juntamente com a operação do suporte junto ao *smartphone* se mostraram satisfatórias. Porém, durante os trabalhos em campo e análise de imagens, o suporte se mostrou mais atrativo quando recoberto com papel *contact* e com uma iluminação própria, através do uso de pilhas AA e LEDs. Assim, o suporte foi recoberto com papel *contact* na cor branca e recebeu um sistema de iluminação em LED (Figura 20), disposto a 90° cada.

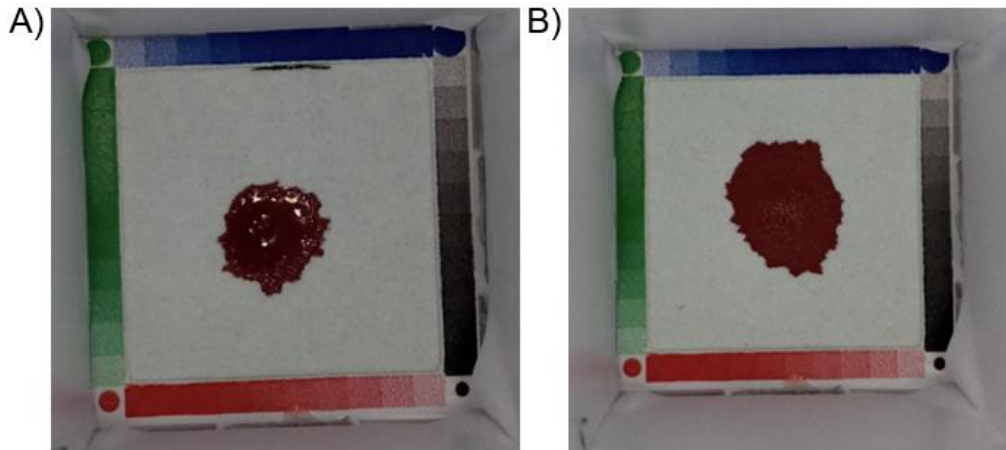
Figura 20. Peças do suporte para aquisição de imagens modificado. a) detalhe do recobrimento das peças laterais do suporte com papel *contact* branco; b) instalação de 4 LEDs com uma chave seletora na tampa superior do suporte; c) demonstração dos 4 LEDs ligados, dispostos a 90° cada e d) partes que compõem o suporte.



Fonte: Autoria própria.

Desta forma, com uma iluminação controlada, a variação de luminosidade será menor na intensidade da cor das imagens capturadas e reduza a variabilidade na qualidade das imagens, sem o uso de *flash*, visto que quando adotado o *flash*, o sangue refletia parte da luminosidade, o que refletia no tratamento da imagem e distorções dos resultados (Figura 21).

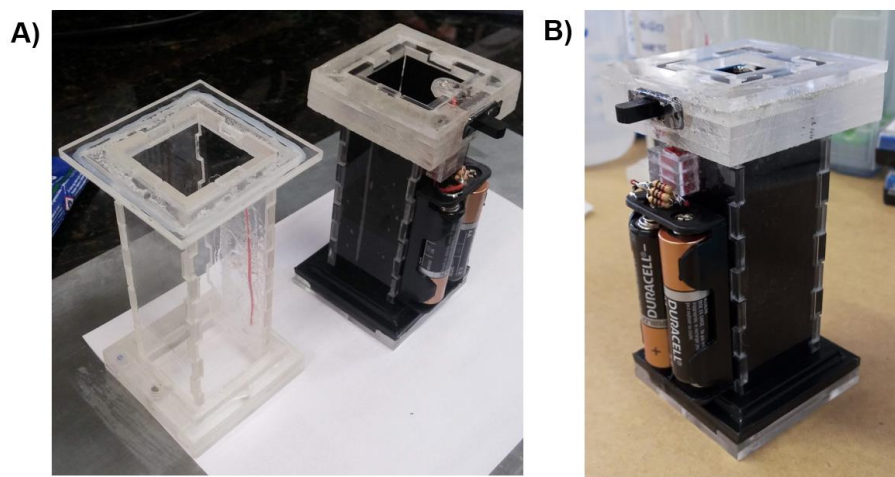
Figura 21. Influência do *flash* do *smartphone* na qualidade da imagem. A) Imagem tirada com câmera do *smartphone* com *flash* ligado e B) Imagem tirada com câmera do *smartphone* com *flash* desligado.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 22 estão apresentadas as imagens do suporte antes e após as modificações.

Figura 22. Suporte para aquisição de imagem. a) Ao lado esquerdo está apresentado o suporte em acrílico, ao lado direito está apresentado o suporte de acrílico modificado; b) Vista lateral do suporte de acrílico modificado.



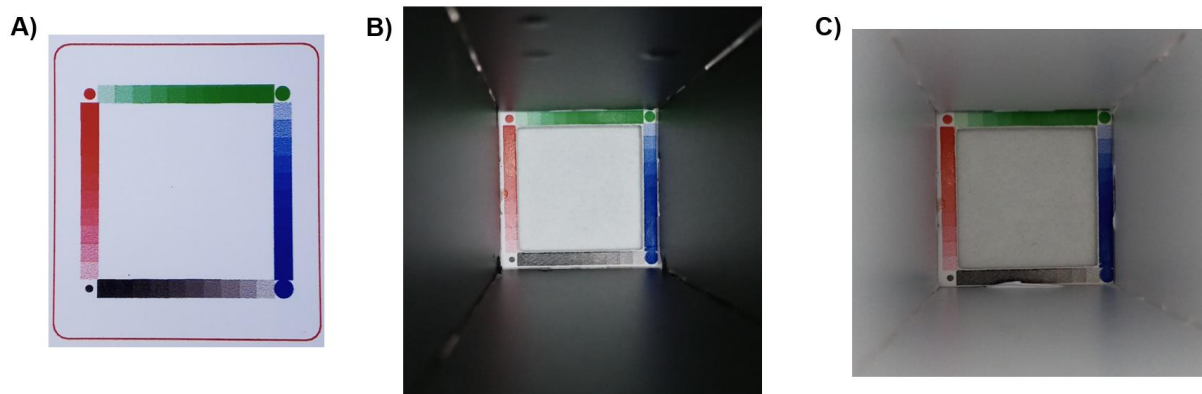
Fonte: Autoria própria.

Para todos os efeitos do melhor ângulo para aquisição de imagem, utilizamos um ângulo de 90° entre a lente do *smartphone* e o objeto a ser fotografado. Este ângulo foi utilizado para evitar distorções na qualidade da imagem como relatado por

Gunasekaran e Ranganathan (2006), onde avaliaram 45°, 60°, 75°, 90°, 105°, 120° e 135°, sendo os ângulos de 75°, 90° e 105° os ângulos que apresentaram menor variação⁸².

Devido à falta de padronização das câmeras de *smartphones*, talvez devido a competitividade de uma fabricante sobre a outra, isto dificultou o desenvolvimento de um aplicativo de celular, devido cada fabricante possuir um *software* de tratamento de imagem próprio e patenteado. Procurando transpassar este inconveniente, procuramos introduzir dentro do suporte de acrílico um degrau de cor, conforme demonstrado na Figura 23. Realizamos esta abordagem com intuito do aplicativo realizar uma calibração antes de realizar o tratamento da imagem. Desta forma, acreditamos que independente da câmera e fabricante, conseguiremos realizar os ajustes necessários para que o aplicativo reconheça a cor e determine um valor fixo.

Figura 23. Apresentação da implementação da estratégia de calibração de cores. a) cartão “A” impresso com gradiente de cores; b) cartão “A” introduzido no suporte de acrílico translúcido revestido com papel *contact* preto fosco; c) cartão “A” introduzido no suporte de acrílico translúcido revestido com papel *contact* branco.



Fonte: Autoria própria.

Nas Figuras 23B e 23C estão apresentadas as imagens do cartão com degrau das cores primárias (RGB) dentro dos suportes revestidos. Adotamos como padrão o suporte revestido com papel *contact* na cor branca devido refletir menos nas paredes quando comparado com o suporte revestido com papel *contact* na cor preto fosco.

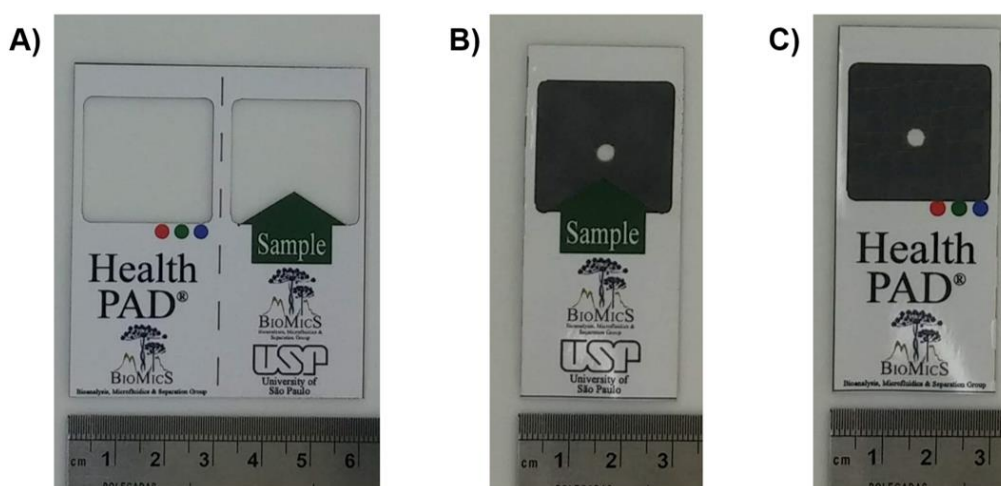
4.2 Construção do μ PAD

Na etapa de desenvolvimento de um μ PAD, passos pré-, intra- e pós-analítico devem ser levados em consideração em um modelo de classificação de erros⁸³. Assim, devido ao uso de um suporte para tirar foto e o desenvolvimento do μ PAD terem sido desenvolvidos com objetivo de criar um produto, o μ PAD foi dividido em duas partes: parte interna e externa.

4.2.1 Construção da parte externa do μ PAD

A parte externa é constituída de papel cartão rígido (Figura 24A), atuando como suporte para receber o μ PAD conforme exposto no item Materiais e métodos 3.2.1.

Figura 24. Parte externa do μ PAD. Na imagem A) está apresentado a parte externa em papel rígido devidamente cortado. Nas imagens B) e C) está apresentado a montagem do μ PAD com a parte interna e externa, sendo o a imagem B a visão posterior do μ PAD, onde é realizado a adição da amostra, e a imagem C a visão frontal do μ PAD, onde ocorre a obtenção da imagem.



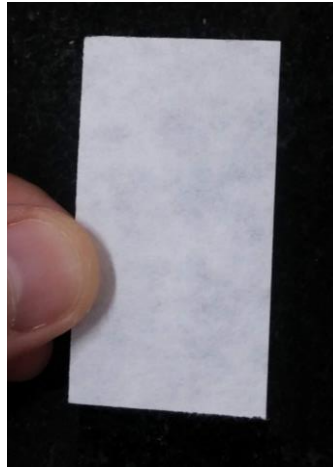
Fonte: Autoria própria.

Nas Figuras 24B e Figura 24C estão apresentados os μ PADs finalizados, montados com a parte externa e a parte interna (dispositivo para quantificação de ferritina, composto de filtro, membrana e reagentes).

4.2.2 Construção da parte interna do μ PAD

A parte interna do μ PAD é dividida em duas partes. Para os ensaios para triagem de anemia, utilizamos a cor e a área do sangue. Assim, este dispositivo é constituído de um pedaço de papel cromatográfico Whatman nº 1 com dimensões 35 x 15 mm (Figura 25) e inserido na parte interna do μ PAD externo (Figura 24A).

Figura 25. Imagem do papel cromatográfico Whatman nº 1 com dimensões 35 x 15 mm para triagem de anemia através da quantificação de hematócrito e hemoglobina.



Fonte: Autoria própria.

Para a quantificação de ferritina, o μ PAD foi segmentado para receber as devidas membranas na parte interna do μ PAD com objetivo de separar o plasma de maneira passiva e receber os reagentes, conforme Figura 12 e Figura 16. Este processo é extremamente importante e crítico, visto que a ferritina está presente no plasma e a cor vermelha do sangue influenciará negativamente nos resultados, devido a quantificação ocorrer através de reações colorimétricas.

4.3 Diagnóstico de anemia por área e cor

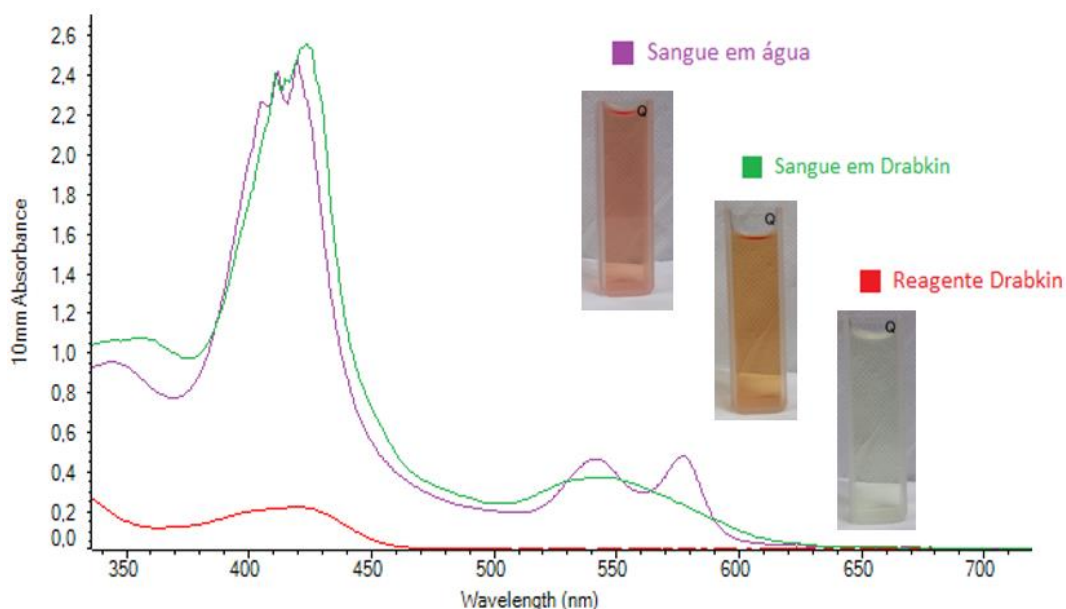
O princípio do desenvolvimento do nosso trabalho é fundamentado no trabalho de Kan *et al.* (2010), onde relataram a presença de uma fase uniforme de eritrócitos dispersos permeando o papel²⁶, assim como a influência da concentração de eritrócito na viscosidade sanguínea⁸. Estas características nos instigaram no

desenvolvimento do μPAD , baseando-se na capilaridade do sangue no papel. Dessa forma, para o desenvolvimento do diagnóstica de anemia com análise de imagem e cor, utilizamos o método sugerido pelo Comitê Internacional de Hematologia para dosagem da hemoglobina via cianometaemoglobina (Drabkin)⁸⁴.

Este método consiste no uso do reagente de Drabkin, uma solução contendo cianeto e ferricianeto de potássio, para conversão da hemoglobina em metaemoglobina; fosfato de potássio hidrogenado para baixar o pH e acelerar a reação e um detergente não-iônico para acelerar a hemólise e reduzir a turvação, incluindo a precipitação das lipoproteínas do estroma (proteínas de membrana) dos eritrócitos⁸⁴.

Esse método converte a hemoglobina, a metaemoglobina e a carboxiemoglobina em cianometaemoglobina, com absorção em 540 nm⁸⁴. Na Figura 26 está apresentado o espectro de absorção do reagente Drabkin (em vermelho), em roxo, o sangue diluído em água e em verde o reagente Drabkin.

Figura 26. Espectros de absorção do reagente Drabkin (gráfico em vermelho), sangue diluído em água (gráfico em roxo) e sangue com o reagente Drabkin (gráfico em verde).



Fonte: Autoria própria.

No espectro apresentado na Figura 26, podemos visualizar que a absorção do reagente Drabkin é nula na faixa que compreende 470 e 700 nm. A Hb está

presente no sangue em formas heme-estruturais caracterizadas por oxihemoglobina, desoxihemoglobina, metemoglobina⁵¹.

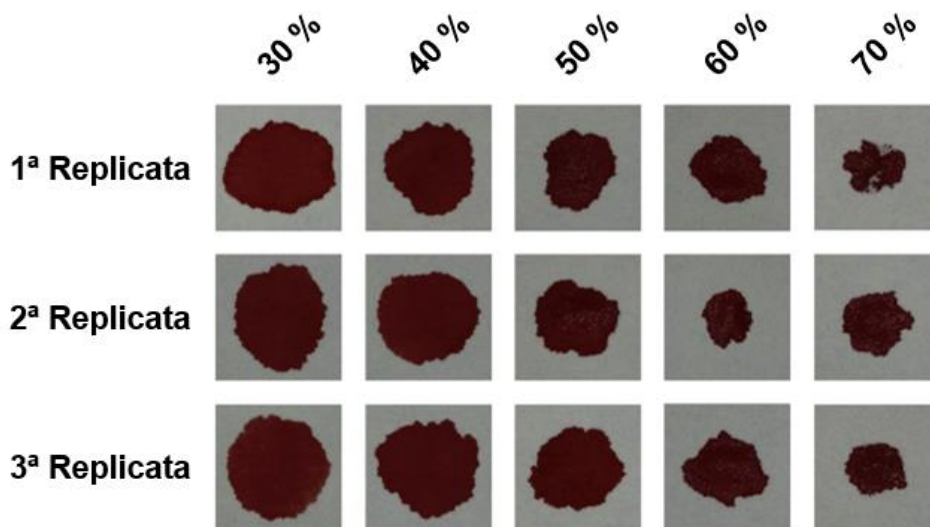
A oxihemoglobina (hemoglobina oxigenada) se caracteriza pelo estado reduzido (Fe^{2+}) no grupo heme, com absorção máxima em 540 e 577 nm, enquanto que a desoxihemoglobina se caracteriza pelo estado reduzido (Fe^{2+}) no grupo heme, porém sem oxigênio ligado, tendo absorção máxima em 555 nm. A metemoglobina é caracterizada pelo estado oxidado (Fe^{3+}) e absorção máxima em 500 e 630 nm, incapaz de se ligar ao oxigênio⁵¹.

Pode-se constatar na Figura 26 que a quantificação de Hb no sangue está livre de interferentes em 540 nm, pois temos a conversão da hemoglobina, metemoglobina e a carboxiemoglobina. Com este método, podemos comparar o método que estamos desenvolvendo, com o método cianometemoglobina.

Para o desenvolvimento do nosso μPAD e devido a inexistência de um padrão que reproduza o sangue humano, realizamos a construção intrínseca de uma curva analítica de hematócrito (Figura 27) após centrifugação do sangue, para obtenção de hemácias e plasma. O procedimento foi conduzido realizando a coleta de um mililitro (1 mL) de sangue de quatro voluntários no HemoBanco do Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos, após aprovação do comitê de ética (CAAE 15478519.1.3001.8148). Estas amostras foram submetidas à centrifugação por 7,5 min à 12500 rpm⁸⁵.

Com o plasma e as hemácias separados, os diversos plasmas foram misturados e homogeneizados, obtendo-se assim um *pool* de plasma. O mesmo procedimento foi realizado para as hemácias. Com o *pool* de plasma e hemácias em mãos, realizamos a diluição da solução de hemácias em plasma nas concentrações de 30%, 40%, 50%, 60% e 70%.

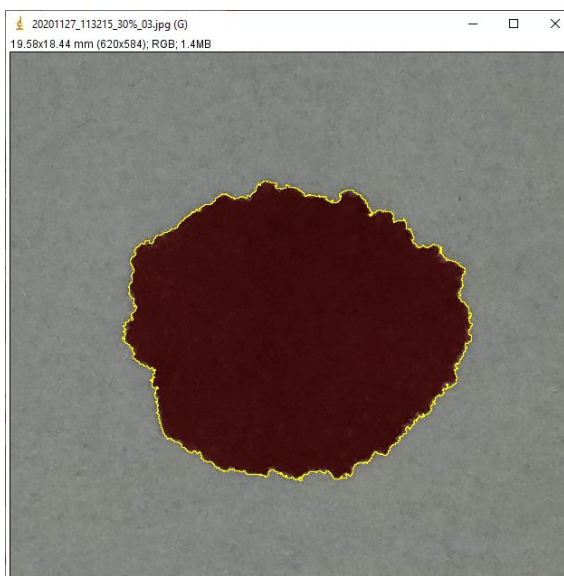
Figura 27. Estudo da permeabilidade do sangue em papel filtro Whatman nº1 em diferentes concentrações de hematócrito para contagem de hematócrito.



Fonte: Autoria própria.

Com as imagens adquiridas, realizamos a construção da curva analítica correlacionando a área da imagem vs hematócrito (Figura 29) e a intensidade da cor da imagem vs concentração de hemoglobina (Figura 30). Vale ressaltar que a construção da curva analítica correlacionando a intensidade da cor vermelha da imagem está relacionado com a área total (Figura 28).

Figura 28. Demonstração do *software* ImageJ delimitando a área da imagem para calcular a área e a intensidade da cor.

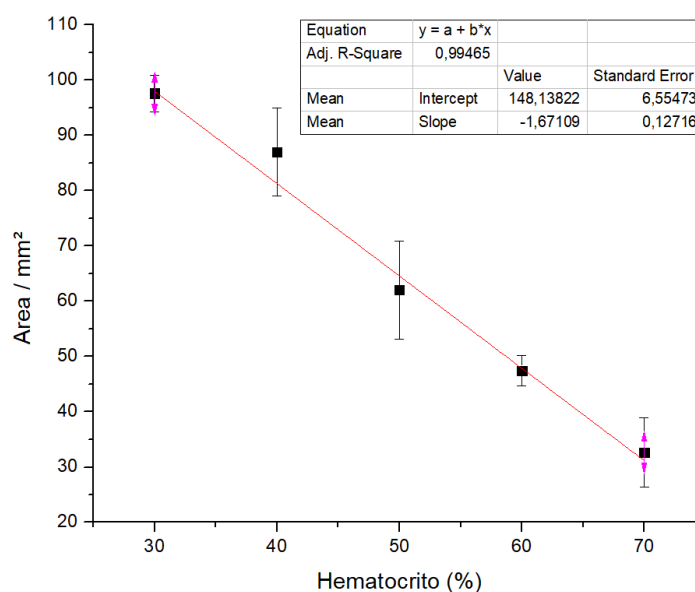


Fonte: Autoria própria.

Vale ressaltar que o processo de coleta e dispensa de amostra influencia diretamente nos resultados de maneira negativa, fornecendo muitas vezes resultados errôneos^{10,83}. Assim, a adição da amostra com volume de 15 µL foi adicionado ao *µPAD* suspendendo-se a gota de sangue na ponta da ponteira da micropipeta e encostando no papel filtro, com objetivo de reduzir-se qualquer efeito proveniente da dispensa rápida da micropipeta no papel, que poderia ocasionar em maior dispersão do sangue no papel e conseqüentemente prejudicar as análises. Para a aquisição da imagem, estabelecemos o tempo de 60 s após a adição do sangue no filtro, com o objetivo de padronizar a coleta de informação e conseqüentemente, reduzir as variações dos resultados. Segundo Gunasekaran e Ranganathan (2006), o tempo para realizar a aquisição da imagem influencia diretamente no resultado final, assim como o ruído das amostras. Os autores ainda demonstraram que o canal vermelho apresentou menor variação de intensidade ao longo do tempo⁸².

O tempo de aquisição de imagem é crucial, uma vez inicia-se a cascata de coagulação ativada por vias intrínsecas e/ou extrínsecas, elevando a viscosidade do sangue gradualmente e, eventualmente, formando coágulos, durante os quais as propriedades físicas do sangue mudam de um fluido viscoelástico para um sólido viscoelástico⁸⁶.

Figura 29. Curva analítica correlacionando a área da imagem / mm² vs quantidade de hematócrito / %.



Fonte: Autoria própria.

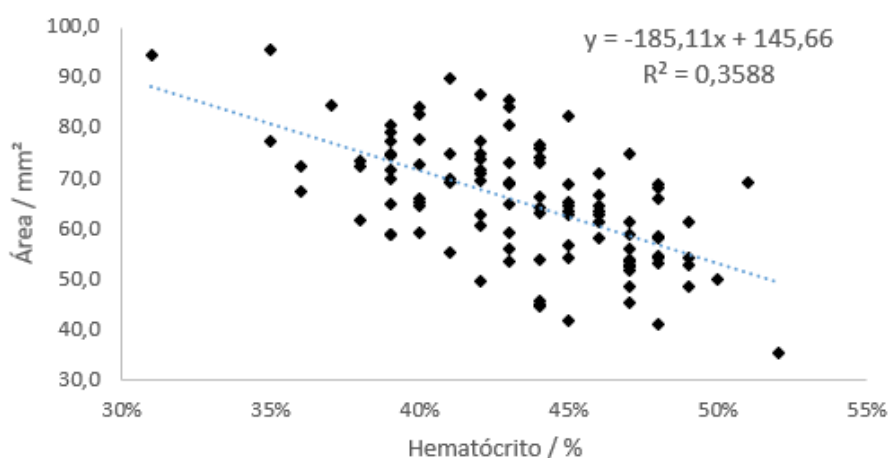
A curva analítica do hematócrito apresentou faixa linear dinâmica e linearidade entre 30% e 70% (dentro da faixa humana) com coeficiente de determinação de 0,995 e uma sensibilidade de $-1,67 \text{ mm}^2 \%^{-1}$. Porém, esta equação foi calculada com a curva analítica para contagem de hematócritos apresentado na Figura 27. Pelos resultados apresentados, utilizamos ela para prever o hematócrito em amostras reais, uma vez que este ensaio foi realizado de maneira limitada, devido não existir um padrão de sangue humano. Como o trabalho foi desenvolvido para ser aplicado em lugares remotos, nós não utilizamos reagentes para alterar as propriedades do sangue. No momento em que o sangue é retirado do paciente, o sangue começa a coagular. Desta maneira, como a curva foi construída a partir da punção capilar e posteriormente centrifugado para obtenção do plasma de um *pool* de quatro colaboradores, esta amostra para construção da curva não reflete a realidade sanguínea na população. Fatores como hemólise, padrões alimentares e de hidratação podem ter contribuído de maneira negativa na curva analítica.

Assim, realizamos a construção de uma nova curva analítica de hemoglobina e hematócrito com 207 voluntários com idade entre 17 e 62 anos de homens e mulheres após aprovação do Comitê de Ética do Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos.

Os valores de hemoglobina do hemobanco foram obtidos com equipamento CompoLab TM, enquanto os valores de hematócrito foram obtidos através de uma centrifuga para microhematócrito através do uso de capilares. Os dados obtidos com o nosso μPAD , obtemos hematócrito, e com o método padrão de *Drabkin*, obtemos os resultados de hemoglobina. Os resultados de hemoglobina obtidos com o método padrão de *Drabkin* auxiliou na veracidade dos dados obtidos com o equipamento CompoLab utilizado no HemoBanco.

A partir do exposto, reconstruímos uma nova curva analítica (Figura 30) correlacionando a área da imagem / mm^2 vs quantidade de hematócrito / % com os dados obtidos durante a coleta de amostras dos 107 doadores de sangue.

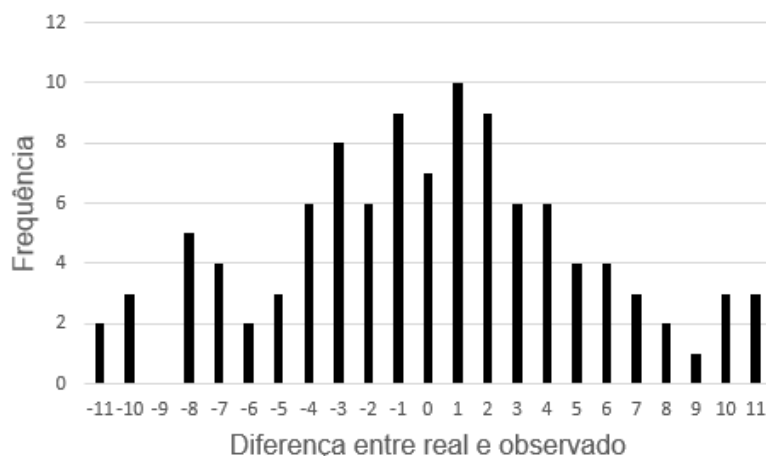
Figura 30. Curva analítica correlacionando a área da imagem / mm² vs hematócrito / %.



Fonte: Autoria própria.

A partir dos dados plotados na Figura 30, podemos notar uma variação quando comparado aos dados da Figura 29, onde havíamos utilizado um pool de amostra de sangue humano no laboratório. A curva de hematócrito apresentado na Figura 31 apresentou uma faixa de trabalho se concentrando entre 35% e 50% de hematócrito com coeficiente de determinação de 0,359 e uma sensibilidade analítica $-185,11 \text{ mm}^2 \text{ \%}^{-1}$. Com a utilização da equação da reta para quantificação de hematócrito, dos 107 voluntários, a equação demonstrou pouca variação para mais ou para menos, como demonstrado na Figura 31.

Figura 31. Diferença entre os resultados de hematócrito observados no capilar utilizado na microcentrífuga do HemoBanco e no μ PAD.

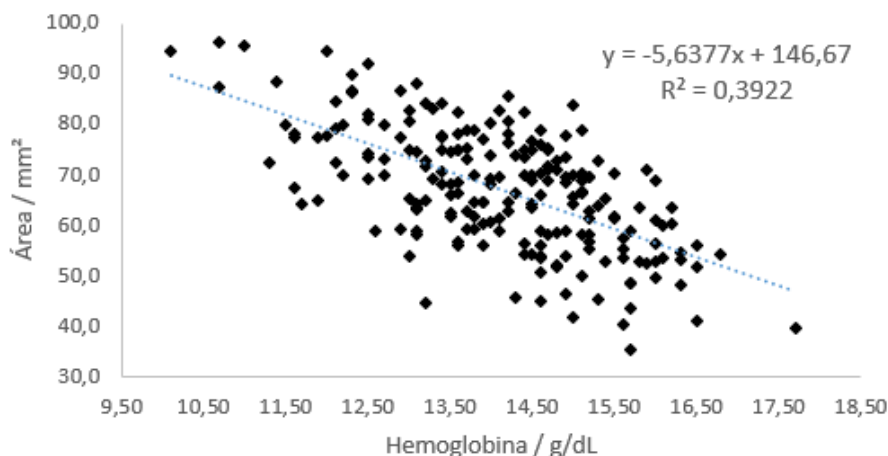


Fonte: Autoria própria.

Dentre 107 amostras coletadas, o μ PAD apresentou 69,81% da população amostral, com a variação de hematócrito compreendendo até 5% de diferença do resultado do HemoBanco (7 resultados com variação de 0%, 19 resultados com variação de 1%, 15 resultados com variação de 2%, 14 resultados com variação de 3%, 12 resultados com variação de 4%, 7 resultados com variação de 5%).

Quando abordamos em nosso estudo a área da imagem de sangue formada no papel em relação a concentração de hemoglobina, utilizamos um total de 207 voluntários. A curva analítica correlacionando a área da imagem / mm^2 vs hemoglobina / g / dL está demonstrada na Figura 32.

Figura 32. Curva analítica correlacionando a área da imagem / mm^2 vs hemoglobina / g / dL.



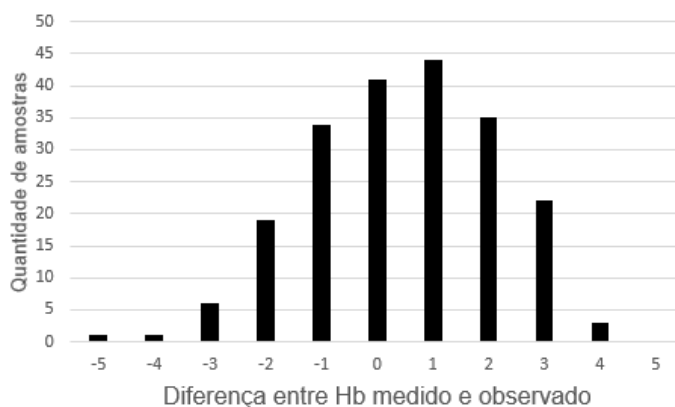
Fonte: Autoria própria.

A curva de hemoglobina apresentado na Figura 32 apresentou uma faixa de trabalho se concentrando entre 11,00 e 17,00 g/dL de hemoglobina com coeficiente de determinação de 0,392 e uma sensibilidade de $-5,638 \text{ mm}^2 \text{ g}^{-1} \text{ dL}$.

Quando adotados a área da imagem de sangue formada no papel e seu correspondente de hemoglobina, dentre 207 amostras coletadas, o nosso μ PAD apresentou 83,98% da população amostral, com variação compreendendo até $2 \mu\text{g} / \text{dL}$ de diferença do resultado do HemoBanco (41 resultados sem variação, 78 resultados com variação de até $1 \mu\text{g} / \text{dL}$ e 54 resultados com variação de $2 \mu\text{g} / \text{dL}$).

A variação dos valores de hemoglobina observados no equipamento CompoLab TM do HemoBanco e nosso μ PAD está apresentado na Figura 33.

Figura 33. Diferença entre os resultados de hemoglobina observado no CompoLab TM utilizado no HemoBanco e em nosso μ PAD.

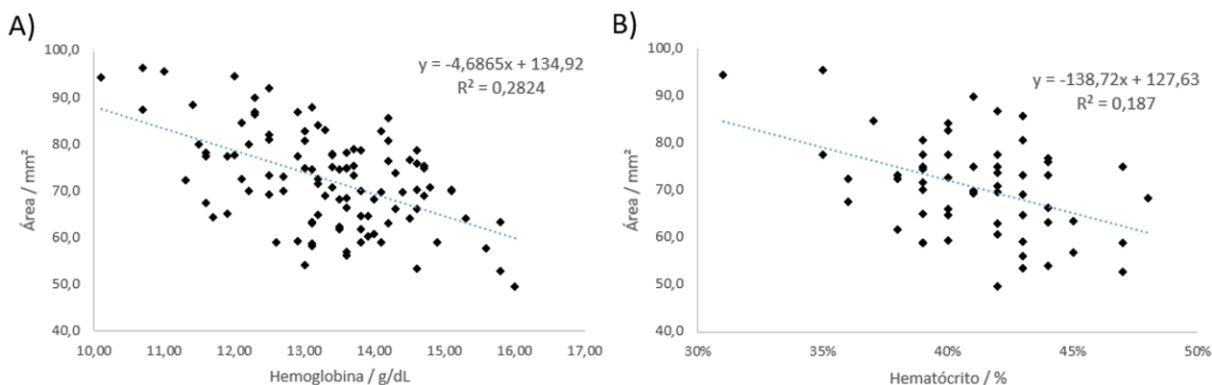


Fonte: Autoria própria.

Na Figura 33 denota-se uma distribuição normal, apresentando um comportamento de um fenômeno natural e aleatório. Com os dados apresentados, tivemos uma melhora quando associamos os resultados de hemoglobina com a área da imagem, em detrimento do hematócrito.

Com o intuito de melhorar os dados apresentados, tratamos os dados dividindo-os em femininos (Figura 34) e masculinos (Figura 35) como demonstrado.

Figura 34. Curva analítica para indivíduos femininos. A) Curva analítica área da imagem / mm² vs hemoglobina / g / dL construída com 105 indivíduos; B) Curva analítica área da imagem / mm² vs hematócrito / % construída com 58 indivíduos.

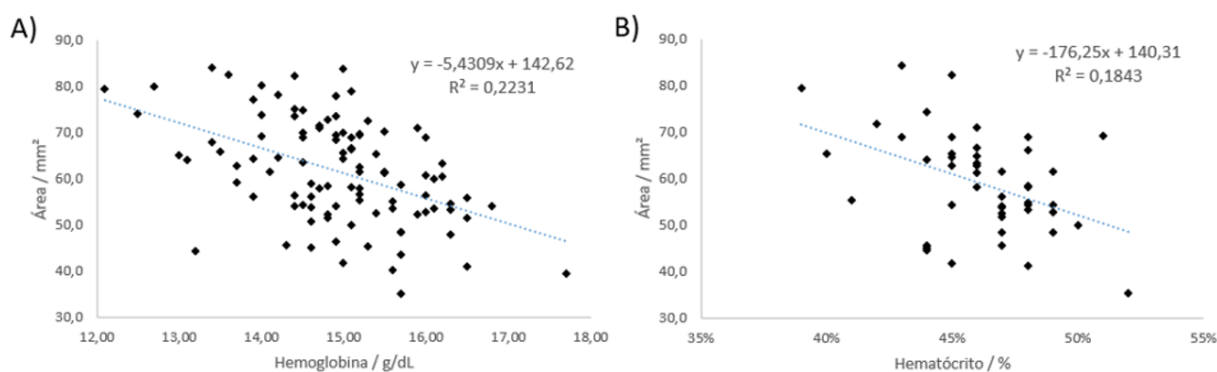


Fonte: Autoria própria.

A curva analítica para tratar de indivíduos do gênero feminino apresentaram redução na diferença entre o dado medido com o CompoLab TM e o nosso μ PAD.

Podemos observar nas imagens 34A e 34B que ambos tiveram uma redução no coeficiente de determinação de 0,359 para 0,187 na quantificação de hematócrito e redução de 0,392 para 0,282 na quantificação de hemoglobina. Houve também redução na sensibilidade, de $-185,11 \text{ mm}^2 \%^{-1}$ para $-138,72 \text{ mm}^2 \%^{-1}$, na quantificação de hematócrito, e redução de $-5,638 \text{ mm}^2 \text{ g}^{-1} \text{ dL}$ para $-4,687 \text{ mm}^2 \text{ g}^{-1} \text{ dL}$ na quantificação de hemoglobina.

Figura 35. Curva analítica para indivíduos masculinos. A) Curva analítica área da imagem / mm^2 vs hemoglobina / g / dL construída com 101 indivíduos; B) Curva analítica área da imagem / mm^2 vs hematócrito / % construída com 48 indivíduos;



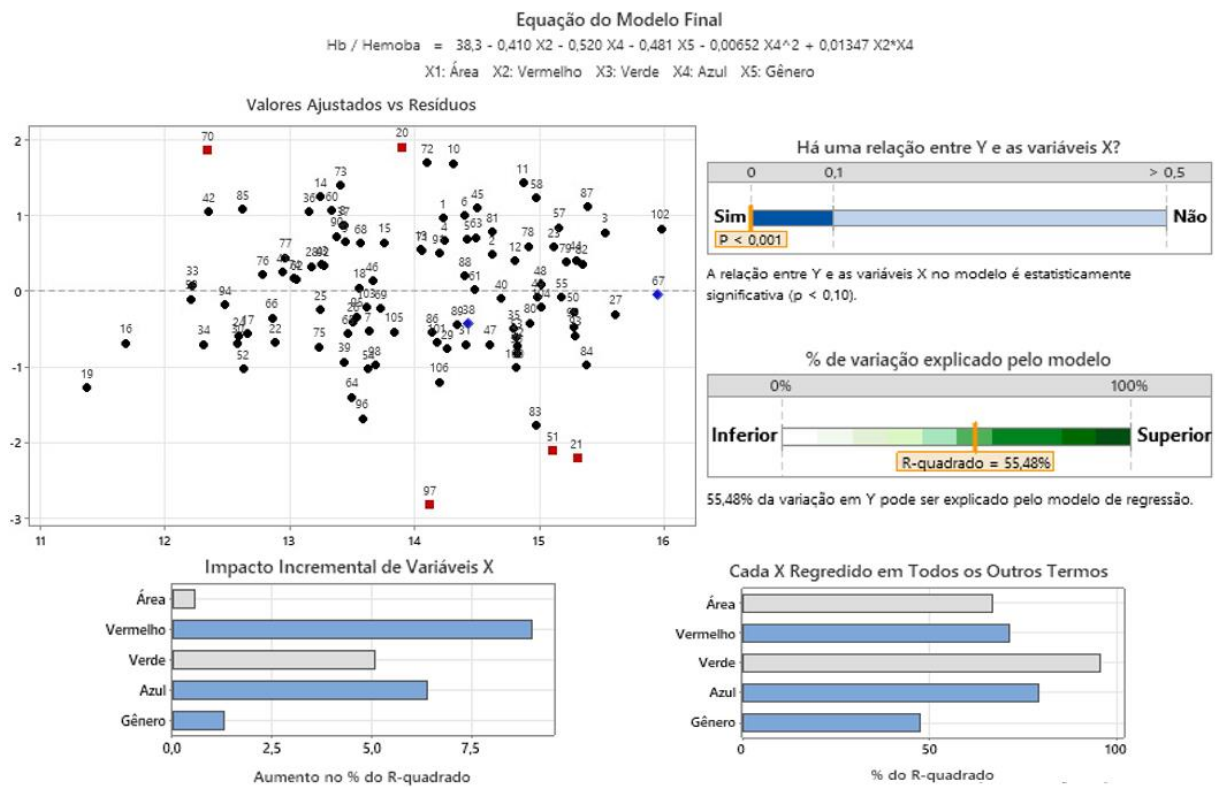
Fonte: Autoria própria.

A curva analítica para tratar de indivíduos do gênero masculino apresentaram redução na diferença entre o dado medido com o CompoLab TM e o nosso μPAD . Podemos observar nas imagens 35A e 35B que ambos tiveram uma redução no coeficiente de determinação de 0,359 para 0,184 na quantificação de hematócrito e redução de 0,392 para 0,223 na quantificação de hemoglobina. Houve também redução na sensibilidade, de $-185,11 \text{ mm}^2 \%^{-1}$ para $-176,25 \text{ mm}^2 \%^{-1}$, na quantificação de hematócrito, e redução de $-5,638 \text{ mm}^2 \text{ g}^{-1} \text{ dL}$ para $-5,4309 \text{ mm}^2 \text{ g}^{-1} \text{ dL}$ na quantificação de hemoglobina.

Com a obtenção das curvas analíticas apresentadas nas Figura 34 e 35 para quantificação de hematócrito e hemoglobina construídas com distinção de gênero feminino e masculino respectivamente, não apresentaram resultados melhores que quando utilizado as curvas analíticas apresentadas nas Figura 31 e Figura 32, para quantificação de hematócrito e hemoglobina respectivamente.

Com os dados obtidos, realizamos a construção de um modelo regressão múltipla para os dados de hemoglobina e para os dados de hematócrito, apresentados na Figura 36 e Figura 37 respectivamente.

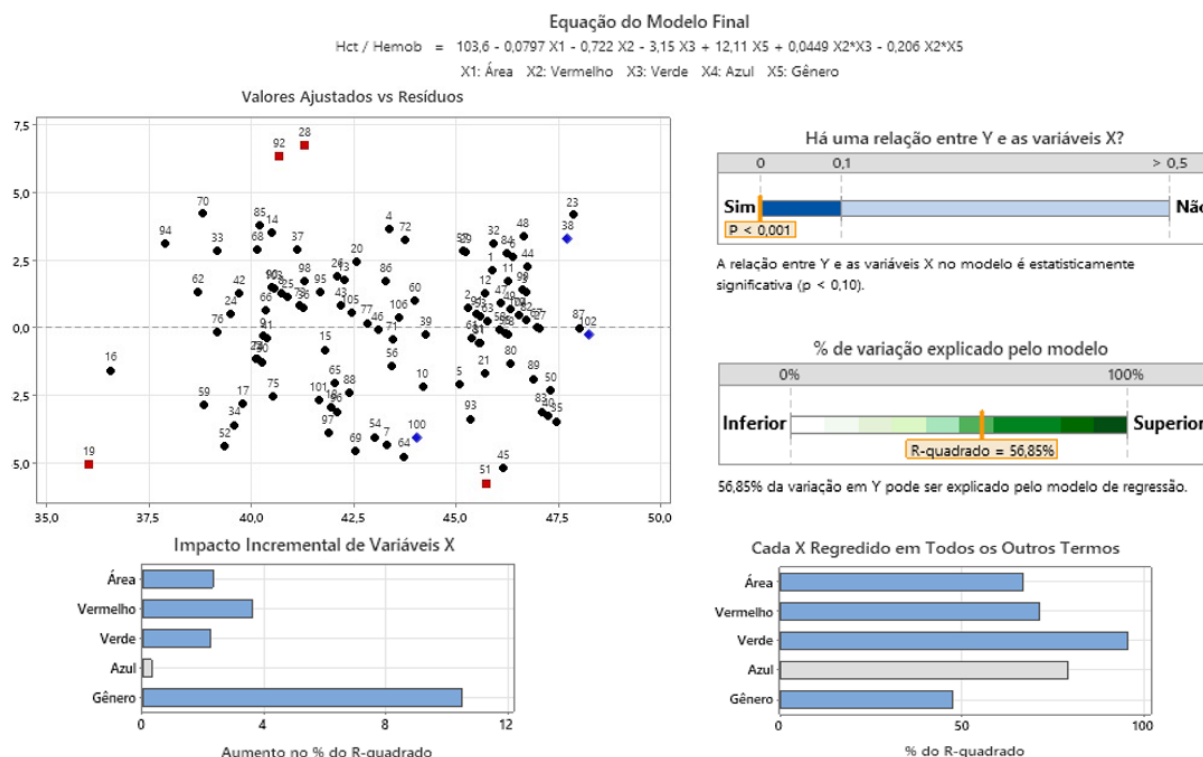
Figura 36. Relatório de regressão múltipla para os dados de hemoglobina com *software xlstat*.



Fonte: Autoria própria.

Como podemos notar na Figura 36, o modelo de regressão trabalhou com os elementos de área, gênero e canais de cores vermelho, verde e azul para explicar o modelo. A relação entre hemoglobina do μPAD e hemoglobina do equipamento CompoLab TM do modelo é estaticamente significativa ($p < 0,001$), com resíduos bem distribuídos e 55,48% de variação explicado pelo modelo de regressão. O elemento área e canal verde no modelo de regressão não ajudam a explicar a variação do modelo. Porém, o elemento canal azul, vermelho e o gênero do voluntário contribuem positivamente no modelo.

Figura 37. Relatório de regressão múltipla para os dados de hematócrito com *software x/stat*.



Fonte: Autoria própria.

Como podemos notar na Figura 37, o modelo de regressão trabalhou com os elementos de área, gênero e canais de cores vermelho, verde e azul para explicar o modelo. A relação entre hematócrito do μ PAD e hematócrito capilar do HemoBanco do modelo é estaticamente significativa ($p < 0,001$), com resíduos bem distribuídos e 56,85% de variação explicado pelo modelo de regressão. O elemento canal azul não ajudou a explicar a variação do modelo. Porém, o elemento área, gênero e canal vermelho e verde contribuem positivamente no modelo, com maior representatividade o gênero do doador.

Desta forma, a curva analítica apresentada na Figura 30 e Figura 32 apresentaram os melhores resultados. Não houve indícios de melhora nas respostas de nosso μ PAD quando os voluntários foram separados por gênero. Talvez, com maior quantidade de dados e separarmos além de gênero, utilizarmos a idade, possamos criar um modelo de curva analítica para nosso μ PAD que melhor represente os resultados obtidos pelo equipamento CompoLab TM.

4.3.1 Influência da hidratação

A viscosidade e a cor do sangue são sensíveis ao grau de hidratação do indivíduo. Desta forma, nós realizamos um ensaio preliminar intrínseco para observar o efeito da água sobre o comportamento sanguíneo, apresentado na Tabela 1. Primeiramente, o ensaio foi conduzido cortando a ingestão de água por um voluntário durante 12 h. Após este período, realizamos a punção capilar e o ensaio para quantificar a hemoglobina (*Drabkin*) e no μ PAD. Após esta análise, ocorreu a ingestão de 3 litros de água no período de 4 horas e a medida foi novamente realizada. Após esta etapa, ocorreu novamente a ingestão de 3 litros de água no período de 3 horas e a medida foi novamente realizada.

Tabela 1. Influência da hidratação na variação da concentração de Hb intradia.

		Drabkin / g dL ⁻¹					
Amostra	Horário	1 ^a med.	2 ^a med.	3 ^a med.	Média	Desvio padrão	Coeficiente de Variação
		Voluntário	08:55	13,6	13,7		
Voluntário	13:25	11,8	11,5	12,6	12,0	0,5	4,4%
Voluntário	16:00	12,5	12,6	12,8	12,6	0,2	1,4%

		Área / mm ²					
Amostra	Horário	1 ^a med.	2 ^a med.	3 ^a med.	Média	Desvio padrão	Coeficiente de Variação
		Voluntário	08:55	88,6	85,9		
Voluntário	13:25	76,6	89,1	92,1	86,0	8,2	9,6%
Voluntário	16:00	66,6	71,6	92,8	77,0	14,0	18,1%

		Intensidade cor vermelha / U.A.					
Amostra	Horário	1 ^a med.	2 ^a med.	3 ^a med.	Média	Desvio padrão	Coeficiente de Variação
		Voluntário	08:55	61,4	64,8		
Voluntário	13:25	67,2	66,1	69,3	67,6	1,6	2,4%
Voluntário	16:00	58,8	55,1	55,2	56,4	2,1	3,7%

Fonte: Autoria própria. U.A. = Unidade Arbitrária.

Infelizmente não existem ensaios clínicos para determinar o grau de hidratação/desidratação de um indivíduo. Porém existem sinais que indicam a desidratação como diminuição da elasticidade da pele e boca e peles secas. Assim, avaliamos não ser possível avaliar precisamente o grau de hidratação para utilizar como fator de correção em nossas análises e melhorar os resultados.

Podemos notar que os resultados variaram muito em função do horário. Para todos os efeitos os resultados demonstraram anemia neste dia. Às 8:55, adotando o método padrão da cianometemoglobina, a concentração de Hb estava em 13,39 g dL⁻¹, sendo que um indivíduo para ser considerado saudável precisaria apresentar uma concentração de Hb entre 14 a 18 g dL⁻¹ em homens. Porém, às 13:25, um novo ensaio foi realizado após a ingestão de 3 litros de água. Já hidratado, a concentração de Hb caiu de 13,39 g dL⁻¹, para 11,98 g dL⁻¹, uma redução na concentração de Hb de 10,5%. Em um último ensaio no dia, realizado às 16:00 após a ingestão de mais 3 litros de água entre o período de 13:25 e 16:00, a concentração de Hb subiu para 12,64 g dL⁻¹. Fica evidente as variações diárias que nosso organismo está submetido e a importância da hidratação nos resultados, podendo inclusive fornecer falso negativo quando desidratado.

Em relação aos resultados obtidos, o desvio padrão e o coeficiente de variação obtidos quando analisado os dados de hematócrito, ficaram elevados. Vale ressaltar que os dados obtidos com o método padrão da cianometemoglobina, não apresentaram uma variação tão grande. Os maiores valores obtidos de Hb foram obtidos às 08:55 com o método da cianometemoglobina, mas levando em consideração que um sangue mais “concentrado” apresenta maior viscosidade, a área obtida às 8:55 deveria ser a menor, o que não ocorreu. Já o resultado obtido de 85,97 mm² às 13:25 condiz com os resultados obtidos no método da cianometemoglobina, uma vez que o sangue não estava tão viscoso após a hidratação. Às 16:00, a área obtida de 76,99 mm² estava abaixo das demais. A área deveria estar condizente com os dados obtidos do método da cianometemoglobina.

Quando analisamos a área da imagem, os dados produzidos da área são reproduzidos. No entanto, temos um menor desvio padrão e coeficiente de variação. Assim, para qualquer efeito de estudo, pesquisa e desenvolvimento de um algoritmo para estimar hematócrito e anemia, é crucial incluir o maior número de participantes, elevando ao máximo a população amostral.

4.4 Construção do μ PAD para quantificação de ferritina

Como exposto no item 3.4.2, a quantificação de ferritina ocorreu a partir da agregação das AuNPs conjugadas com anticorpo em disco de papel Whatman nº1. Para que isto ocorresse, realizamos primeiramente a obtenção de plasma sanguíneo no interior do μ PAD, através de uma membrana, visto que a análise empregada foi colorimétrica e a cor do sangue influencia negativamente a análise.

4.4.1 Obtenção de plasma sanguíneo

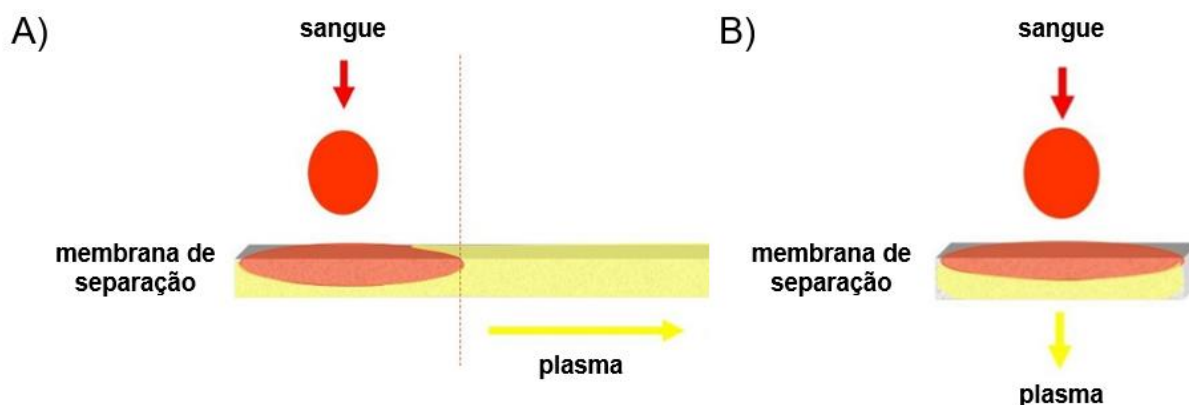
A obtenção do plasma sanguíneo através da separação dos eritrócitos no interior do μ PAD é crítica e fundamental, removendo consigo leucócitos, coloração vermelha e a interferência de material intracelular, como o DNA. Por exemplo, ao excluir os eritrócitos do dispositivo, as membranas de separação de plasma removem contribuições não específicas a um sinal observado, onde a cor vermelha intrínseca da hemoglobina pode interferir na interpretação dos ensaios colorimétricos caso não sejam eliminados⁴⁵.

Li *et al.* (2015) implementaram com sucesso uma membrana de polissulfona assimétrica (ASPM) em um dispositivo microfluídico para separação de eritrócitos para posterior análise de glicose e colesterol em um mesmo dispositivo¹⁰. Outros estudos abordam a remoção dos eritrócitos incorporando anticorpos de aglutinação. Após a adição de sangue total, os glóbulos vermelhos se agregam e são imobilizados dentro da matriz do papel, enquanto o plasma é absorvido pelas zonas de detecção adjacentes. Os métodos de aglutinação demonstram uma separação eficaz do plasma comparável à da centrifugação convencional; no entanto, os anticorpos específicos utilizados podem não ser aplicáveis a todos os tipos sanguíneos humanos. Além disso, o custo dos ensaios baseados na aglutinação pode ser excessivamente elevado se forem necessários múltiplos anticorpos por dispositivo. Uma abordagem mais universal à agregação dos eritrócitos por soluções salinas através na geração de um gradiente de pressão osmótica após a adição de sangue total, o que subsequentemente induz a crenação e agregação de glóbulos vermelhos¹². Porém, mesmo esta abordagem englobar todos os tipos sanguíneos, o sal poderá influenciar

nas reações colorimétricas e até mesmo desestabilizar reagentes devido a força iônica do meio.

Nesta situação, as membranas para obtenção de plasma apresentam-se como um meio menos agressivo e mais barato para emprego no μPAD . Várias membranas são comercializadas e/ou desenvolvidas com o objetivo remover contribuições não específicas. Estas membranas apresentam separações passivas no sentido vertical ou horizontal (Figura 38), da maneira simples e com reprodutibilidade.

Figura 38. Obtenção de plasma de maneira passiva com o uso de membrana. A) Fluxo vertical e B) Fluxo horizontal.

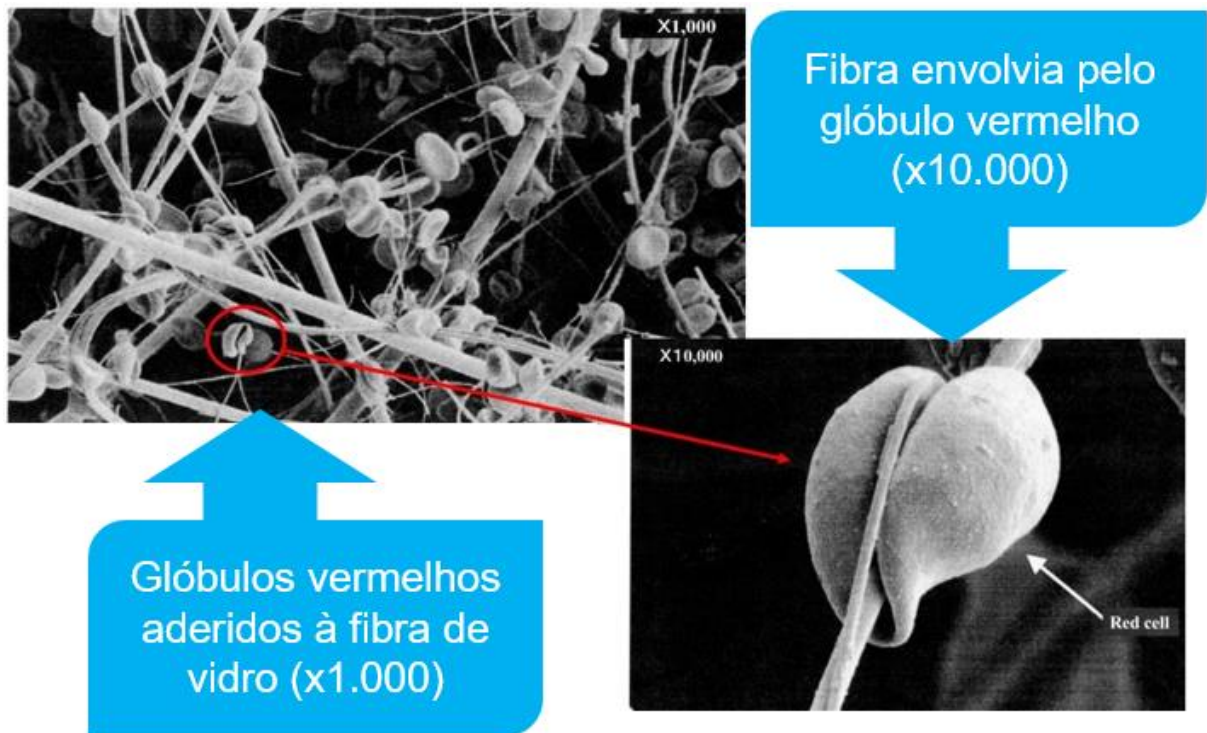


Fonte: Autoria própria.

Porém, o emprego de membranas depende do meio e amostra utilizados. Nisso, a empresa Cytiva (antiga *GE Healthcare Life Sciences*) nos forneceu algumas amostras do seu portfólio para testarmos. Empregamos em nosso μPAD membranas GF/DVA, LF1, MF1, VF2 e Vivid Plasma, apresentado resultados favoráveis com algumas membranas. As membranas de GF/DVA, LF1 e MF1 são fabricadas de fibra de vidro, sendo a GF/DVA adequado para amostras de saliva; a LF1 e MF1 adequado para amostras de soro ou sangue total. A membrana VF2 é adequada como separador vertical, em camadas simples ou múltiplas, para uma ampla gama de volumes de sangue. Porém, tivemos dificuldade na obtenção de plasma. A própria Cytiva disponibiliza em seu site o funcionamento das membranas, todas baseadas em fibra de vidro. As membranas retêm as partículas tanto no interior como na superfície da membrana. As partículas maiores permanecem na superfície, enquanto as partículas menores ficam presas na malha de fibra do vidro. Este efeito de filtragem gradual, chamada de filtragem de profundidade, reduz o entupimento da membrana, permitindo

uma filtragem rápida e o uso de altas cargas de partículas. A fibra de vidro apresenta a característica dos glóbulos vermelhos se ligarem-se à superfície do vidro, envolvendo-se em torno da fibra (Figura 39).

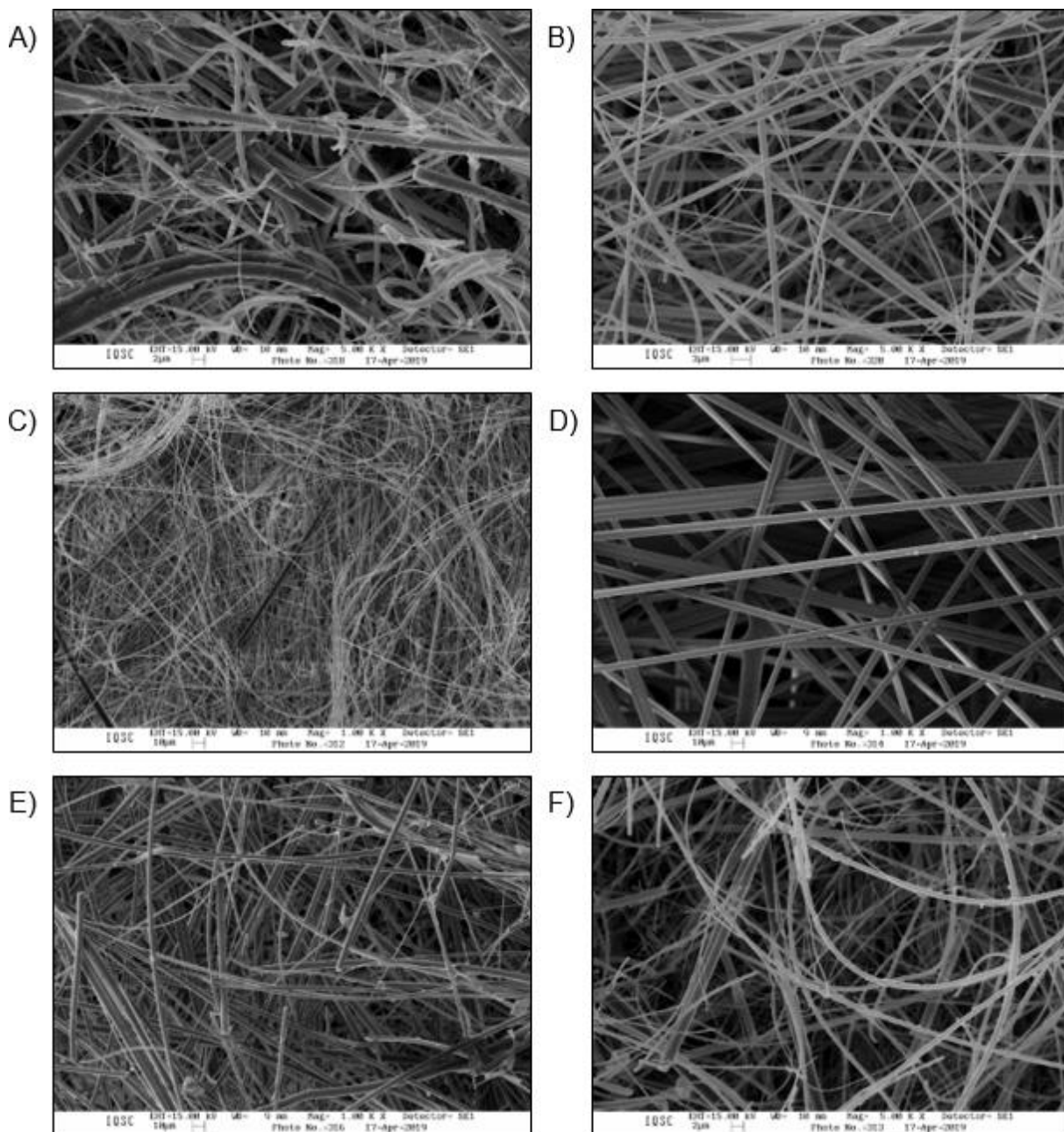
Figura 39. Separação de glóbulos vermelhos por filtro de profundidade que se ligam às fibras de vidro.



Fonte: Adaptado de <https://www.gelifesciences.com/en/us/solutions/lab-filtration/knowledge-center/diagnostic-assays-blood-separation-using-depth-filters>

Como não tivemos sucesso na aplicação das membranas, nós resolvemos realizar o MEV para tentar compreender a estrutura de cada material. Fizemos o MEV de membranas de fibra de vidro que estavam no laboratório, com o objetivo de encontrar um material que pudesse substituir o material comercial. As imagens estão apresentadas na Figura 40.

Figura 40. MEV das membranas de fibra de vidro. A) MEV membrana LF1; B) MEV membrana MF1; C) MEV fibra de vidro marca STARTTECH, porosidade 1,2 μm ; D) MEV fibra de vidro MILIPORE; E) MEV Fibra de vidro GE 8133-6621; F) MEV fibra de vidro marca STARTTECH, porosidade 1,2 μm .

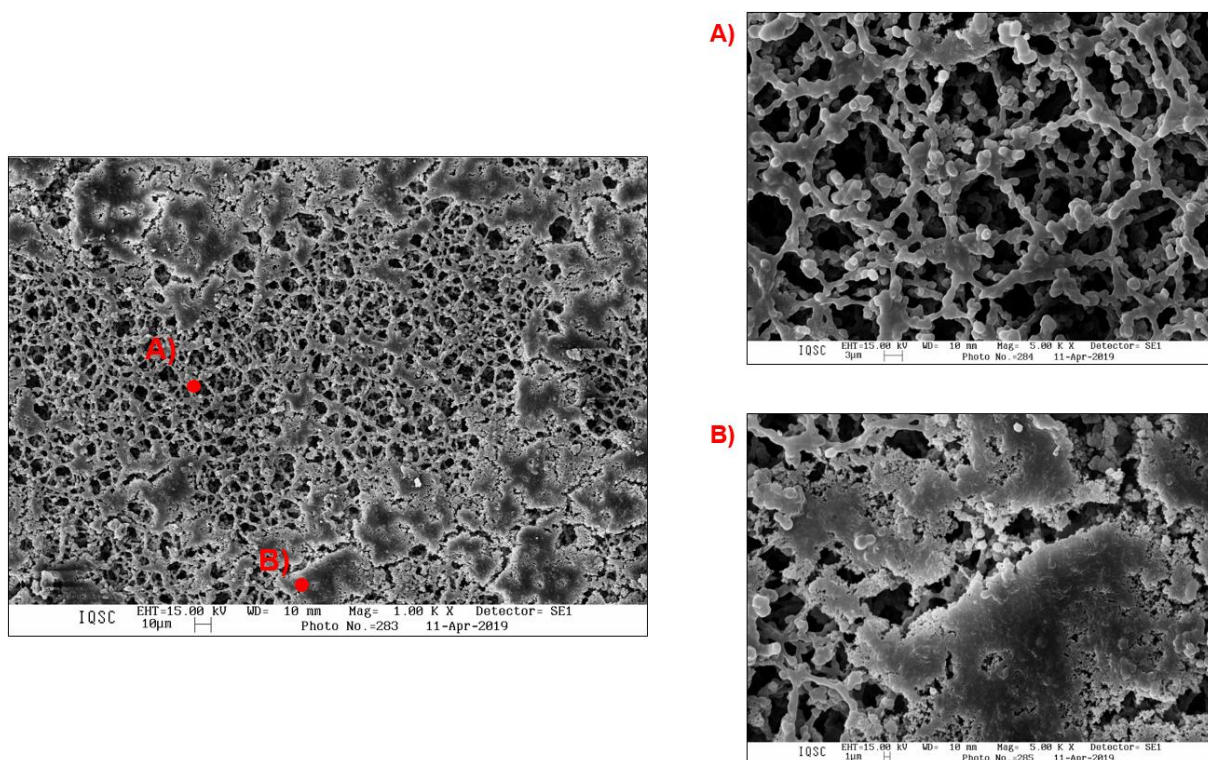


Fonte: Autoria própria. Imagens estão com resolução de 2 μm .

A imagem da Figura 40B está com resolução de 3 μm e as imagens da Figura 40C, Figura 40D e Figura 40E estão com resolução de 10 μm . Notamos que independente da fabricante, a fibra de vidro se apresenta de diversas formas, podendo inclusive surtir efeito distinto no comportamento microfluídico do sangue em função

da fabricante. Com objetivo de reduzir custos no desenvolvimento de um μPAD para obtenção de plasma sanguíneo, testamos uma membrana de nitrato de celulose com porosidade de 5 μm , obtemos plasma no sentido do fluxo do plasma na membrana. O MEV da membrana de nitrocelulose está apresentado na Figura 41.

Figura 41. MEV da membrana de nitrocelulose 5 μm .

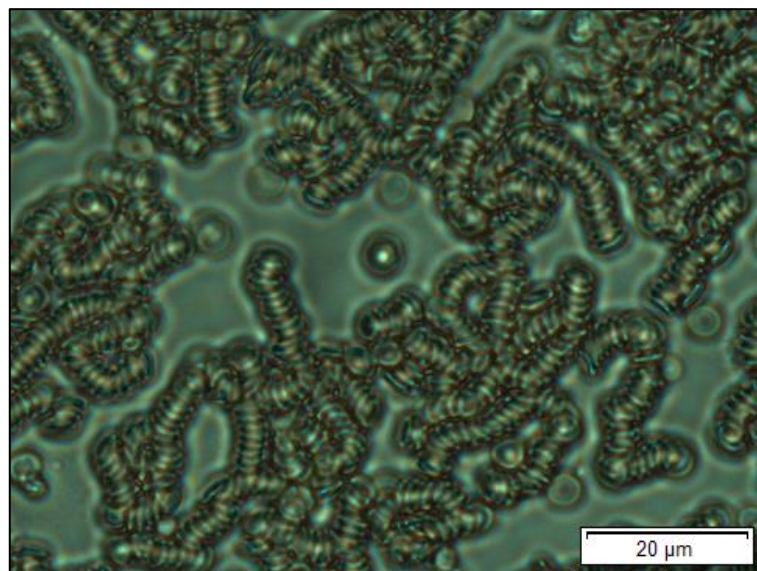


Fonte: Autoria própria. Imagem A apresenta resolução de 10 μm , enquanto a imagem B e C apresentam resolução de 1 e 3 μm respectivamente.

Conforme podemos notar, a porosidade da nitrocelulose é heterogênea, encontrando-se inclusive regiões onde não há porosidade. Isto se deve provavelmente ao processo de síntese ou construção da membrana. Apesar de não termos visto aplicação de nitrocelulose para obtenção de plasma em μPAD , obtivemos plasma no sentido horizontal de aplicação do sangue, demonstrando viabilidade de sua aplicação, além de ser um material presente no laboratório e de baixo custo. A membrana de nitrocelulose apresenta diâmetro de poro de 5 μm , visto que obtemos um diâmetro médio de 4,2 μm e 1,5 μm de espessura dos eritrócitos (Figura 42) após análise de imagem com o *software ImageJ*. Este valor está abaixo do citado por Ward, Cherian e Linden (2017), onde mencionam que os diâmetros de eritrócitos humanos

compreendem um valor de 6 a 8 μm e 1,5 a 2,5 μm de espessura⁸⁷. Para Movassaghian e Torchilin (2015), os eritrócitos apresentam diâmetro médio de 7 μm e espessura de 2 μm ⁸⁸.

Figura 42. Imagem de microscopia óptica de sangue ampliado 40x em lamínula de vidro.

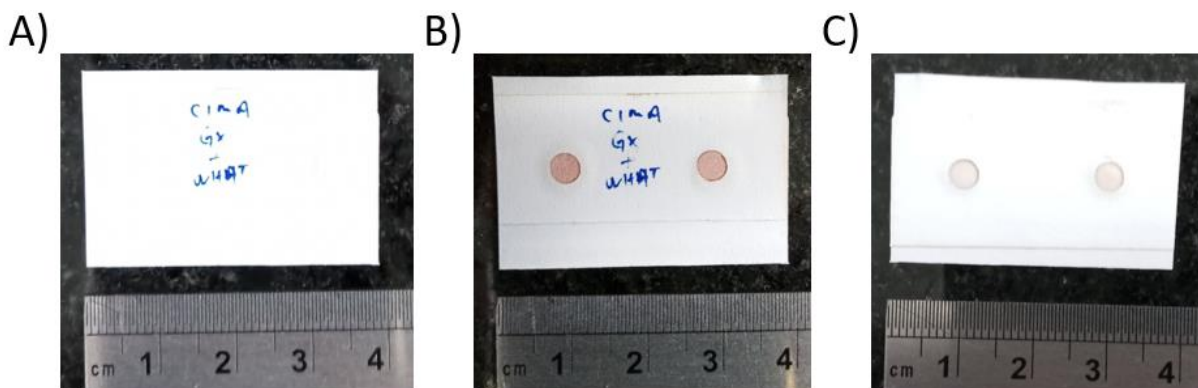


Fonte: Autoria própria.

Devido a diferença entre o diâmetro das hemácias identificadas na Figura 42, e o diâmetro da membrana de nitrocelulose, em algumas ocasiões, obtemos um plasma de cor laranja, sendo resultado de hemólise ou passagem de hemácias pela membrana, visto que seu volume é alterado pela hidratação.

Visto as propriedades do sangue e com objetivo de eliminar este problema, encontramos na literatura a aplicação de uma membrana da empresa Cytiva. Ao entrarmos em contato com a empresa solicitando uma amostra da membrana Vivid Plasma para teste, a empresa prontamente nos enviou uma amostra. Um dispositivo com a membrana Vivid Plasma foi montado e testado, apresentado na Figura 43, onde conseguimos obter um plasma límpido e com reprodutibilidade, sem hemólise.

Figura 43. μ PAD construídos com membrana Vivid Plasma para obtenção de soro sanguíneo no interior do μ PAD e de maneira passiva por capilaridade. A) Vista de cima do μ PAD montado sem aplicação de sangue humano; B) Vista de cima do μ PAD com aplicação de 8,6 μ L de sangue humano e C) Vista de baixo do μ PAD com aplicação de 8,6 μ L de sangue humano.



Fonte: Autoria própria.

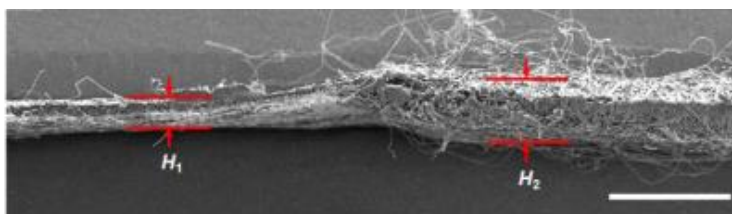
Na Figura 43A temos apresentado o μ PAD montado com a membrana em seu interior. Vale ressaltar que para o perfeito funcionamento da membrana, é necessário que sua montagem siga as instruções de utilização, com a parte fosca voltado para cima, onde ocorre a aplicação de amostra e a parte lisa brilhante para baixo, região que migra o plasma. Na Figura 43A está demonstrado a parte de cima do μ PAD, onde existem duas regiões de aplicação de amostra de sangue. O volume de sangue aplicado deve ser respeitado pelo fabricante, onde existe uma quantidade mínima e máxima de volume de sangue para uma determinada área de membrana. Neste dispositivo aplicamos os discos de membrana possuíam 5 mm de diâmetro, onde o volume máximo de amostra de sangue é de 8,6 μ L.

A Figura 43B apresenta a vista superior do μ PAD, onde aplicamos o sangue mediante punção na ponta de dedo e o sangue captado através de uma micropipeta. O volume aplicação é de crucial importância, pois o excesso de sangue acaba fazendo com que eritrócitos transpassem a membrana, inutilizando-a para análise.

Na Figura 43C podemos notar na parte inferior do μ PAD o processo de difusão, onde as hemácias foram separadas do plasma por um efeito de exclusão de tamanho de tal forma que apenas o plasma entrou na área de reação, identificado pela coloração amarelo do papel filtro. Podemos notar que houve só a passagem do plasma e não houve hemólise.

Uma etapa de extrema atenção é na montagem do μ PAD. Como o processo de montagem é baseado no empilhamento de discos de papel e membrana de separação, a intensidade de compactação dos filtros e membranas pode influenciar na capilaridade de fluídos através da estrutura, conforme Shin *et al.* (2014) (Figura 44) demonstraram que comprimindo a matriz do papel em regiões específicas, a porosidade local é reduzida, ocorrendo o aumento da resistência do fluxo de fluidos na região, podendo alcançar um decréscimo da velocidade do fluxo de até 740%⁶⁵.

Figura 44. Processo de compactação de uma folha de polipropileno, compactado à esquerda com 13,08 Mpa e não compactado à direita.



Fonte: Adaptado de Shin *et al.* (2014)⁶⁵.

Desta forma, optamos na utilização da membrana Vivid Plasma na montagem de nosso μ PAD para obtenção de plasma e posterior quantificação de ferritina, pois apresentou reprodutibilidade na obtenção de plasma e fácil manuseio na montagem do μ PAD.

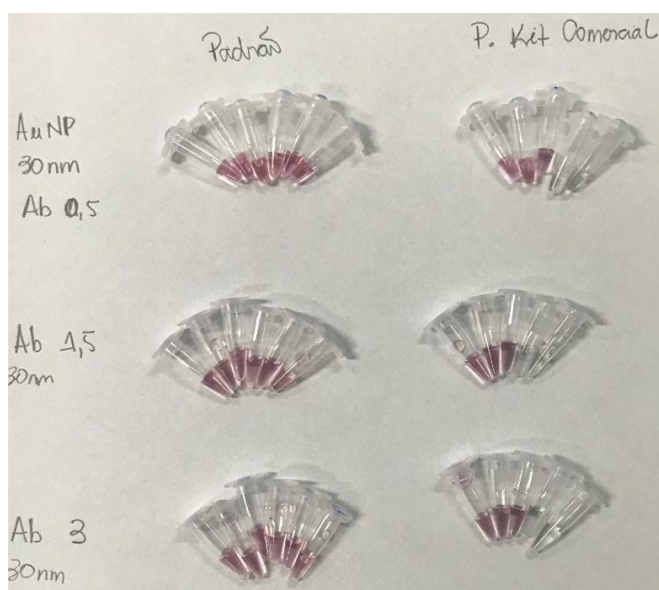
4.4.2 Conjugação das AuNPs para determinação de ferritina

Para realizar a conjugação das AuNPs, foi utilizado uma solução cedida de AuNPs no diâmetro de 30 nm sintetizadas em citrato de sódio (método de *Turkevich*). Estas soluções foram centrifugadas à 10000 RPM por 5 minutos, com objetivos de decantá-las no fundo de *ependorfs*. O sobrenadante foi retirado e armazenado para ser utilizado na ressuspensão das AuNPs posteriormente. As AuNPs foram ressuspensas com o sobrenadante armazenado, com objetivo de produzir soluções com absorvâncias de 0,100, 0,200, 0,300, 0,400 e 0,500 U.A. em 525 nm. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro com cubeta de 2 mL e caminho óptico de 10 mm e com 5 μ L em Espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000C da Thermo Scientific™, com caminho óptico de 1 mm.

O processo de conjugação em solução e no papel seguiram o protocolo exposto nas Figuras 12 e 13. Utilizamos o anticorpo ferritina monoclonal (MIF2502) da *ThermoFisher*, em PBS e pH 7,4 com 0,09% de azida sódica. A azida de sódio é um composto iônico inibidor de crescimento bacteriano, utilizado para prevenir a contaminação microbiana. Dependendo da sua concentração, a azida de sódio pode inibir o acoplamento EDC / NHS ao anticorpo. Para a otimização da conjugação, a faixa de trabalho de detecção da ferritina foi estabelecido entre 35 e 350 ng/mL, concentração sérica encontrada em humanos adultos contemplando ambos os gêneros.

Com o objetivo de verificar a correta conjugação das AuNPs, realizamos primeiramente a conjugação das AuNPs em solução e posterior reação com ferritina, visto que não estávamos conseguindo resultados com o padrão de ferritina. Assim, realizamos a compra de um kit para quantificação de ferritina através de turbidimetria, onde o kit apresentava ferritina liofilizada comercial. Na Figura 45 está apresentado uma curva analítica de AuNPs de 30 nm conjugadas com soluções de ferritina na concentração 0, 50, 150, 250 e 350 ng/mL.

Figura 45. Soluções de AuNPs de 30 nm conjugadas e adicionada solução de padrão de ferritina. Ao lado esquerdo está representado a reação com padrão de ferritina e do lado direito, reação com ferritina liofilizada proveniente de um kit comercial de quantificação de ferritina por turbidimetria da Goldanalisa.



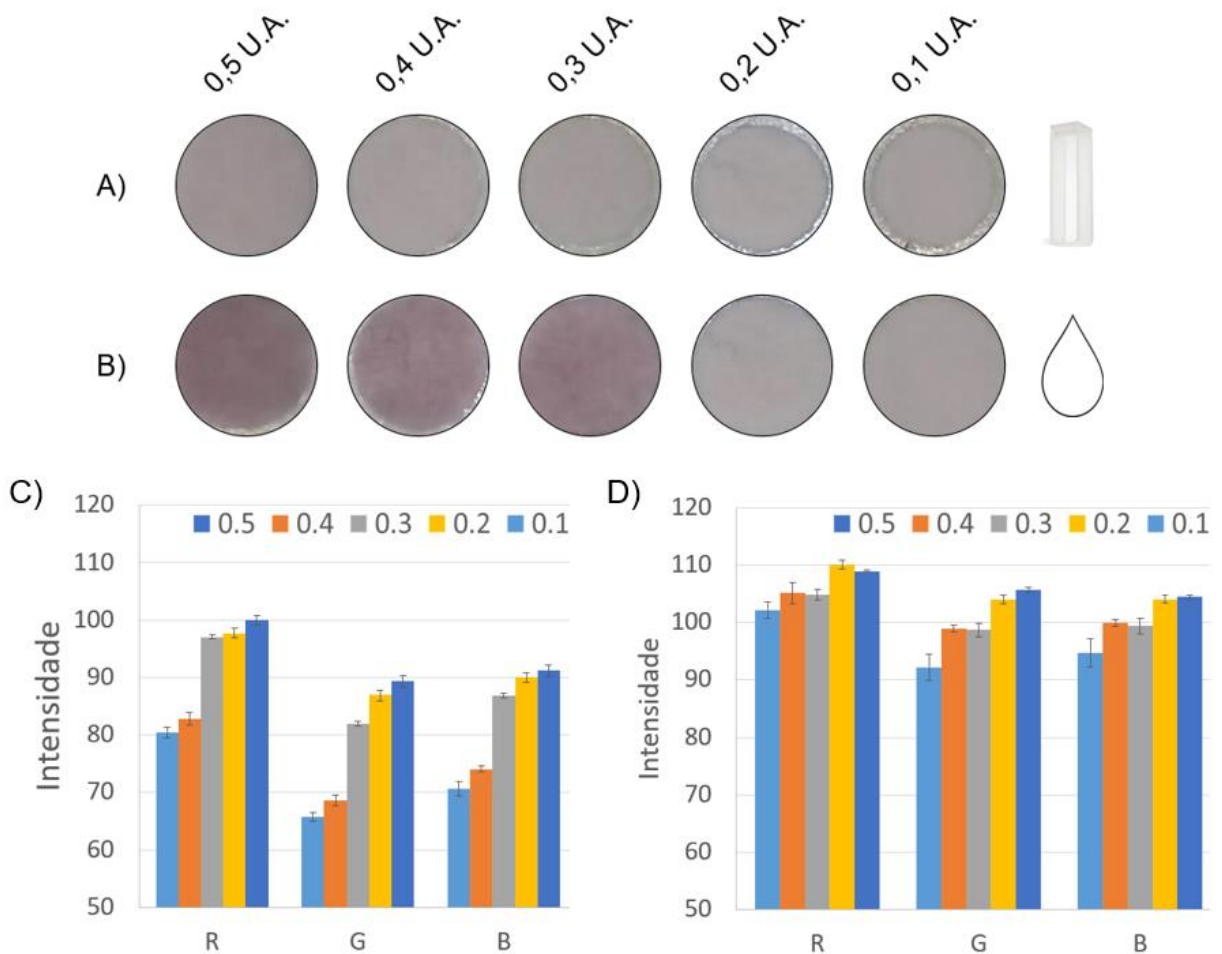
Fonte: Autoria própria.

Este teste foi realizado para conferir se nossa conjugação estava funcionando, visto que a ferritina comercial não estava reagindo, conforme demonstrado na Figura 46 ao lado esquerdo. Ao lado direito está apresentado as AuNPs conjugadas com soluções de ferritina do kit comercial de turbidimetria, onde é possível visualizar a alteração de cor a partir do 3 *eppendorf*, onde o quarto e quinto *eppendorf* apresentaram agregação completa das AuNPs. Assim, prosseguiu-se com as conjugações nos discos de papel, onde utilizamos a ferritina comercializada no kit para quantificação de ferritina através de turbidimetria.

A conjugação das AuNPs foi realizada diretamente no papel para contornar o efeito de *coffee ring*, se adicionado à solução de AuNPs conjugada diretamente no disco de papel. Este efeito de *coffee ring* influencia negativamente na detecção colorimétrica posteriormente, devido a agregação das partículas nas bordas do papel, apresentando heterogeneidade na formação de cor. A forma adotada para contornar este efeito foi acrescentar à solução de AuNPs e os discos de papel em um *eppendorf*, deixando por 12 horas sob agitação. Este processo auxilia na distribuição homogênea no disco de papel (Figura 46A e Figura 46B).

As imagens foram obtidas com o auxílio da câmera do *smartphone* e o suporte (Figura 22B), após tempo de secagem de 20 minutos da aplicação de 8,5 μL solução de ferritina no disco de papel, distância focal fixa de 100 mm e iluminação LED do suporte ativada. Com as intensidades das cores RGB das imagens adquiridas e o processamento na construção da curva analítica, o canal azul apresentou a melhor resposta.

Figura 46. Discos de papel AuNPs conjugadas com 1,5 µg/mL. A) Discos de papel com AuNPs conjugadas com absorbâncias medidas em espectrofotômetro em 525 nm; B) Discos de papel com AuNPs conjugadas com absorbâncias medidas no NanoDrop 525 nm; C) Obtenção das intensidades Vermelho, Verde e Azul (RGB) para os discos secos onde a absorbância da solução de AuNPs foram medidas em 525 nm em cubeta de espectrofotômetro e D) Obtenção das intensidades RGB para os discos secos onde a absorbância da solução de AuNPs foram medidas em 525 nm NanoDrop.



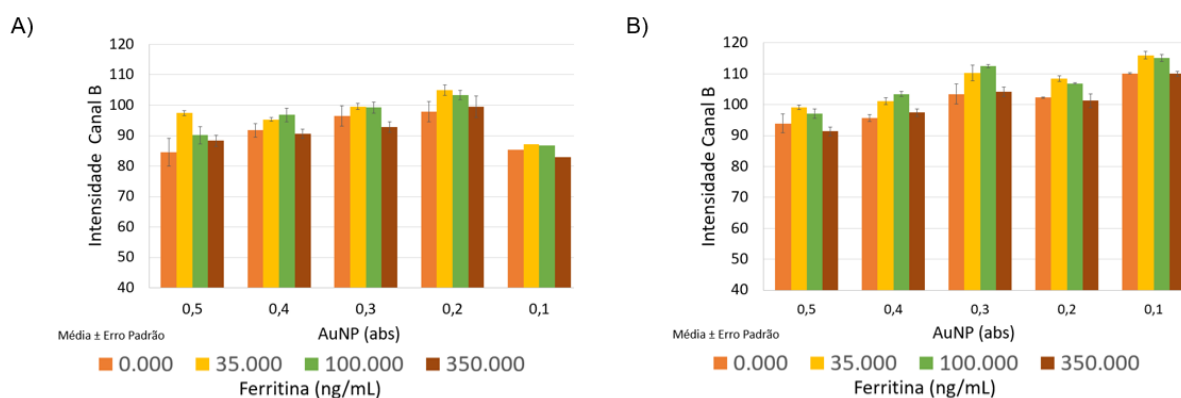
Fonte: Autoria própria.

Podemos visualizar nas imagens da Figura 46C (obtenção da intensidade RGB dos filtros secos após 20 minutos, com solução de AuNP padronizada em cubeta) e Figura 46D (obtenção da intensidade RGB dos filtros secos após 20 minutos, com solução de AuNP padronizada em nanodrop) que com o aumento da absorbância, há o aumento das intensidades das cores que compõem o RGB, com especial atenção a Figura 46D. A diferença na coloração dos discos de papel com

AuNPs conjugadas se deve ao meio empregado de padronização das soluções de AuNPs, onde o caminho óptico entre o espectrofotômetro e o NanoDrop são respectivamente, 10 mm e 1 mm. Como a Lei de Lambert-Beer nos prevê que a absorbância é diretamente proporcional ao produto do coeficiente de absorvidade molar, caminho óptico e a concentração do analito na solução. Assim, quando reduzimos o caminho óptico em 10x, de 10 mm para 1 mm, temos um aumento da concentração de AuNPs na ordem de 10x.

Com objetivo de avaliar a alteração de cor das AuNPs, realizou-se a plotagem das intensidades no canal azul da conjugação nos discos de papel cromatográfico Whatman nº1 e adição de ferritina nas concentrações de 0, 35, 100 e 350 ng / mL. A Figura 47 apresenta a curva analítica no canal azul com a solução de AuNPs padronizadas em espectrofotômetro. A Figura 48 apresenta a curva analítica no canal azul com a solução de AuNPs padronizadas em NanoDrop.

Figura 47. Intensidade no canal azul para determinação de ferritina em discos de papel Whatman nº1 com solução de AuNPs padronizadas em Espectrofotômetro. A) discos de papel após aplicação de solução de ferritina e B) discos de papel secos após 20 minutos.

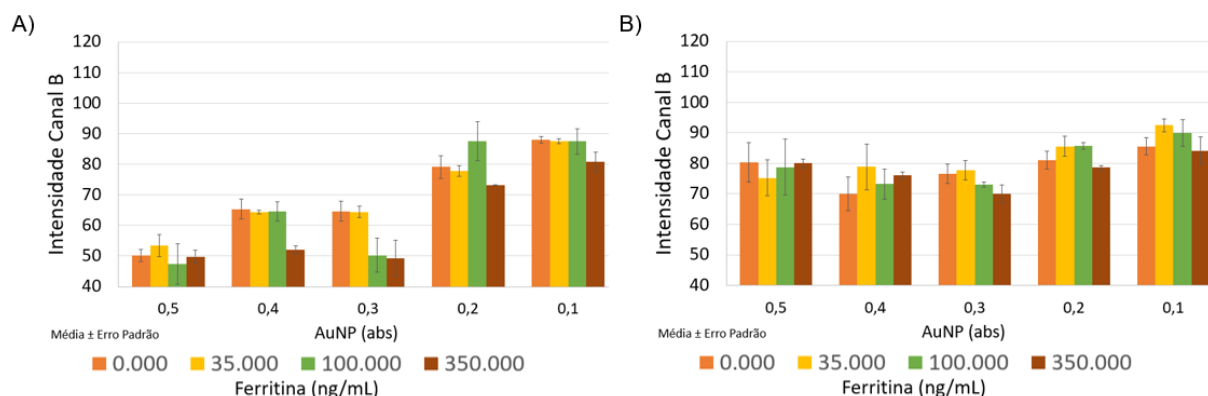


Fonte: Autoria própria. Dados de intensidade no canal azul.

Nota-se que a variação da intensidade do canal azul (Figura 47A) pouco influencia em função da absorbância inicial das soluções de AuNPs. Vemos na Figura 47A, na absorbância de 0,100, 0,200 e 0,500 U.A., a intensidade do canal azul cai com o aumento da concentração de ferritina, mas este comportamento não é visto nas concentrações de 0,300 e 0,400, onde a intensidade aumenta e depois diminui.

Este mesmo comportamento é visualizado nos dispositivos secos apresentados na Figura 47B.

Figura 48. Intensidade no canal azul para determinação de ferritina em discos de papel Whatman nº1 com solução de AuNPs padronizadas em NanoDrop. A) discos de papel após aplicação de solução de ferritina e B) discos de papel secos.



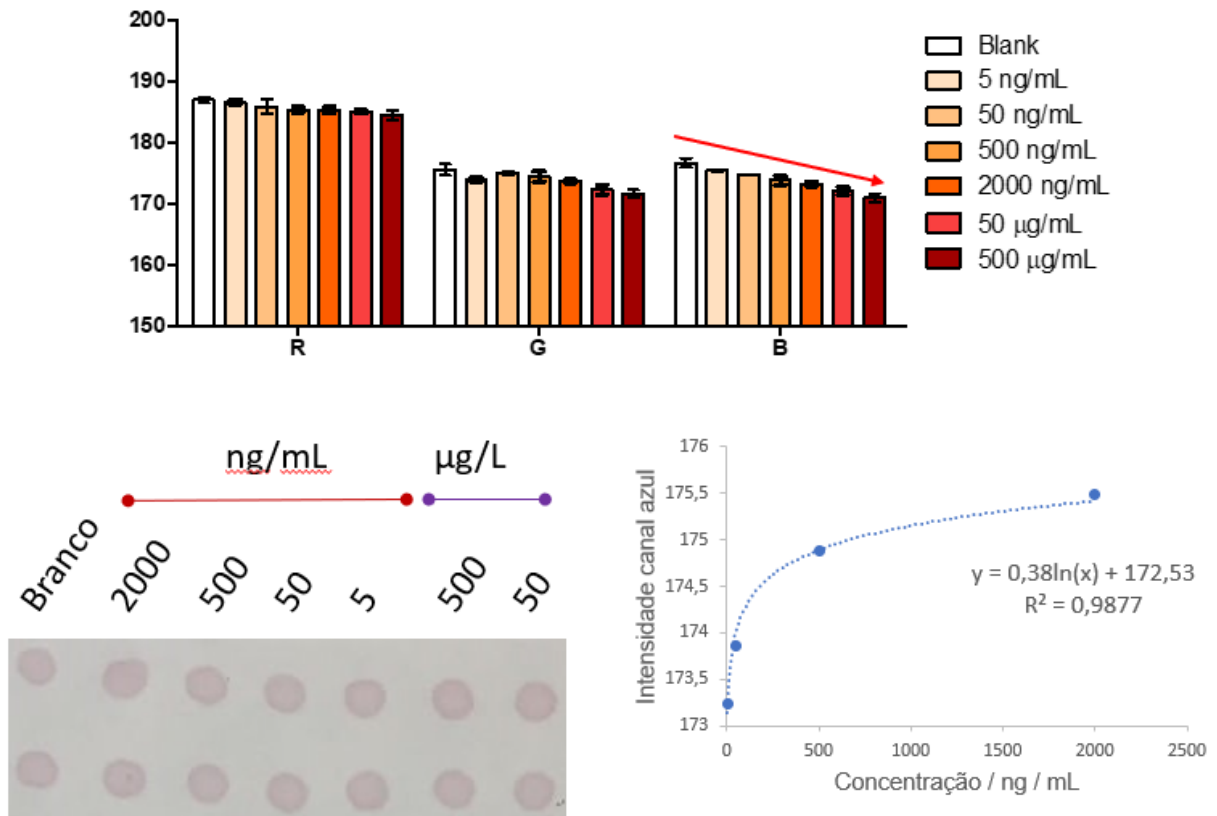
Fonte: Autoria própria.

Quando utilizamos soluções de AuNPs padronizadas com NanoDrop, observamos uma intensidade do canal azul (Figura 48A) menor que quando comparado quando utilizado o espectrofotômetro (Figura 47), tanto úmido quanto seco. Conseguimos visualizar intensidades inferiores, mesmo quando as soluções que foram padronizadas com NanoDrop apresentam maior concentração de AuNPs. Estes resultados demonstram que o aumento de AuNPs conjugadas presentes nos discos de papel cromatográfico, não significa que haverá um aumento na intensidade dos sinais, como exposto.

Podemos ver na Figura 48, que há uma diminuição da intensidade do canal azul em função do aumento da absorbância da solução de AuNPs. Esta diferença é reduzida quando o papel está seco. As intensidades apresentaram uma tendência de redução da intensidade do canal azul quando seco nas absorbâncias de solução de AuNPs 0,100; 0,200 e 0,300.

Na Figura 49 está apresentado a plotagem das intensidades no canal azul para determinação de ferritina, onde a conjugação foi realizada diretamente no disco de papel cromatográfico Whatman nº1 com solução de AuNPs calibradas no NanoDrop, visto a coloração apresentada na Figura 48A e Figura 48B.

Figura 49. Intensidade no canal RGB para determinação de ferritina em discos de papel Whatman nº1 com solução de AuNPs de 30 nm conjugadas com 1,5 µg / mL de anticorpo e aplicação de ferritina. Os dados foram abstraídos dos discos de papel após secos.



Fonte: Autoria própria.

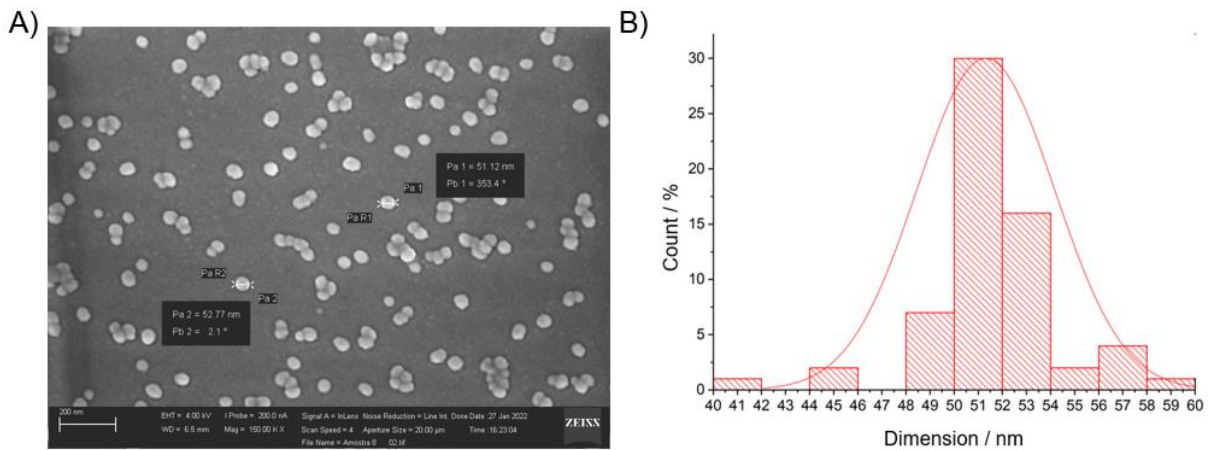
A linearidade da curva de calibração apresentou faixa de trabalho entre 0 e 2000 ng / mL, sendo perceptível sua aplicação em amostras biológicas, visto que sua concentração sérica compreende entre 30 e 300 ng / mL.

Podemos notar que a determinação visual de ferritina nos discos com AuNPs conjugadas não foi possível, porém foi possível extrair os dados de intensidade de cor com o tratamento de imagem do *spot* em RGB e construir uma curva analítica com coeficiente angular 0,988.

4.5 Caracterização das AuNPs

As AuNPs foram caracterizadas através da utilização de um Microscópio Eletrônico de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG), marca Japan Electron Optics Ltd., modelo: JSM 7200F para descrever suas propriedades morfológicas. Na Figura 50 está apresentado a imagem da solução de AuNPs com a sua distribuição de tamanho.

Figura 50. MEV – FEG da solução de AuNPs de 50 nm. A) Imagem e B) Distribuição do tamanho das AuNPs.

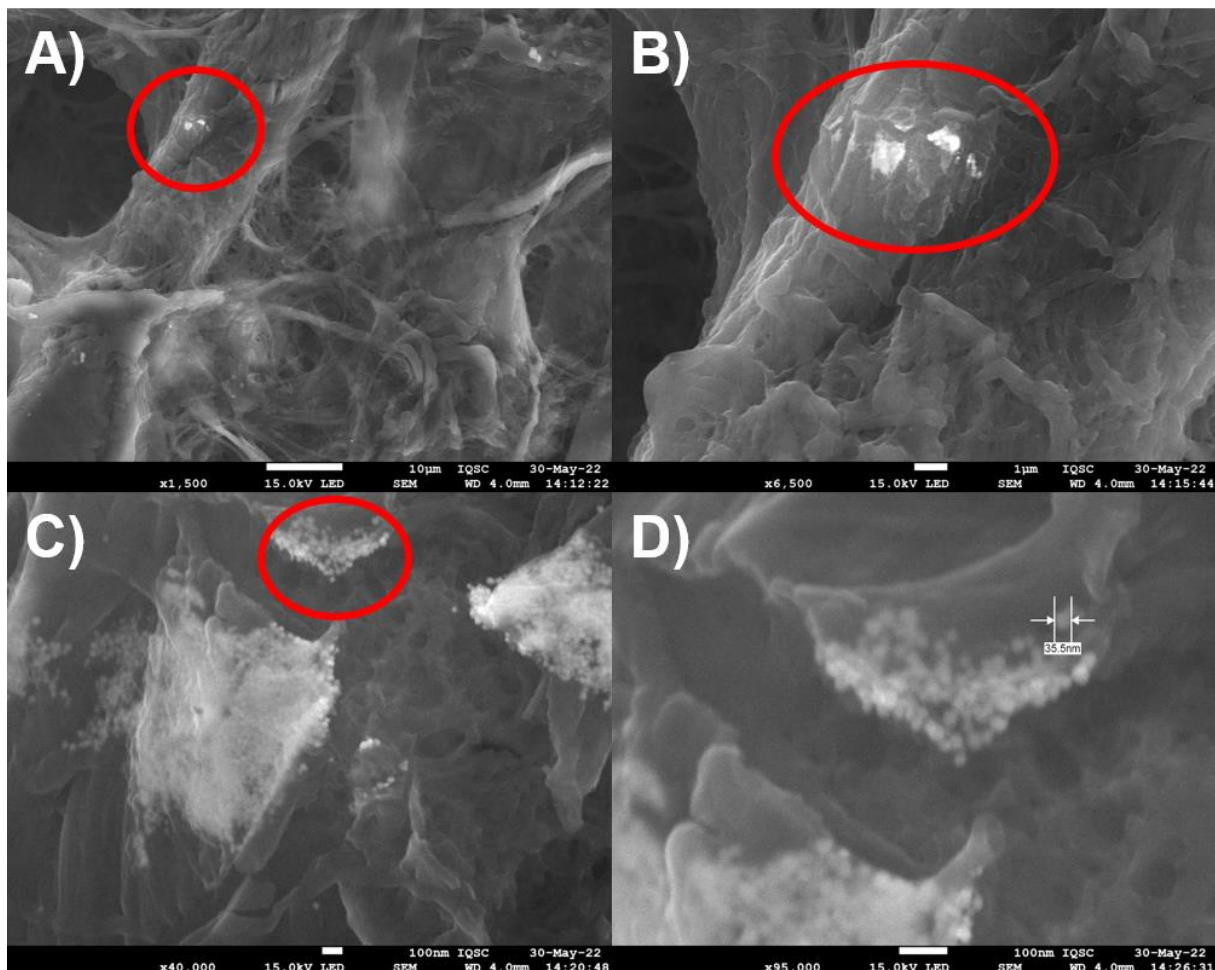


Fonte: Autoria própria.

Com intuito de visualizar o resultado da reação antígeno-anticorpo na superfície do disco de papel para o μ PAD, realizamos um imageamento apresentado na Figura 51 e Figura 52.

Este procedimento foi realizado para verificar se a conjugação das AuNPs estaria ocorrendo na parte interna ou superficial do papel, visto que o substrato é poroso.

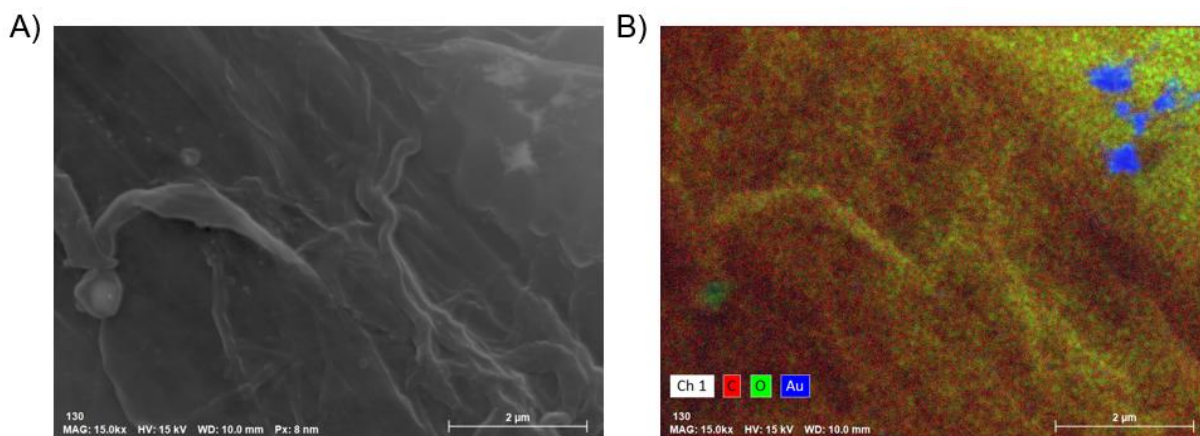
Figura 51. MEV – FEG de um disco de papel Whatman nº1 após conjugação das AuNPs de 30 nm, após adição de 8,5 µL de uma solução de 1,5 µg / mL de anticorpo. A) Região da fibra de celulose onde foi identificado AuNPs; B) e C) regiões onde foram realizados zoom da imagem A e D) AuNPs com diâmetro de 35 nm.



Fonte: Autoria própria.

É possível visualizar nas imagens da Figura 51 as fibras de celulose, onde pontos brancos foram localizados em sua superfície. Com o zoom, é possível visualizarmos na Figura 51D um aglomerado de esferas, com diâmetro médio de 35,5 nm, resultantes das AuNPs. Como a adição de AuNPs ao papel foi realizado em solução conforme protocolo demonstrado na Figura 13 e Figura 14, esperávamos que AuNPs ficassem espaçadas de maneira uniforme na superfície das fibras de celulose em todo o espaço, o que não é visualizado.

Figura 52. Imagem MEV – FEG/EDX de um disco de papel Whatman nº1 após conjugação das AuNPs de 30 nm, após adição de 8,5 µL de uma solução de 1,5 µg / mL de anticorpo. A) Região da fibra de celulose onde foi identificado AuNPs e B) caracterização EDX de região localizada com ouro na superfície do papel.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 52 podemos visualizar uma região onde foi localizado as AuNPs com espectroscopia de energia dispersiva de raios-X, apresentando coloração azul. Os pontos verdes e vermelhos representam elementos de carbono e oxigênio, decorrentes da estrutura da celulose e dos reagentes utilizados durante a conjugação, como o anticorpo, PBS, BSA e EDC/NHS que pode terem adsorvidos na superfície.

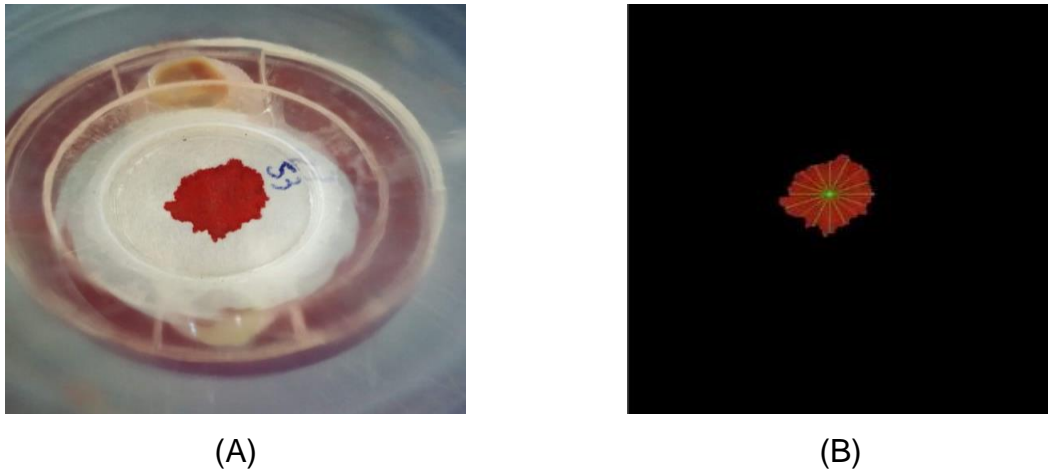
4.6 Aplicativo de smartphone para detecção de anemia

Em conjunto com o desenvolvimento do µPAD, um algoritmo foi desenvolvido por pesquisadores da Universidade de Juiz de Fora. Segundo o grupo parceiro, o aplicativo está em processo de aprimoramento e a aquisição de dados sendo desenvolvido primeiramente para *Android*. O aplicativo apresenta o banco de dados para armazenamento de usuários, assim como análise e armazenamento da imagem.

Em relação ao algoritmo para tratamento das imagens para anemia, foi realizado primeiro uma segmentação da imagem para identificação das classes “sangue” e “não sangue”. O algoritmo cria segmentações por crescimento de regiões, onde os pontos próximos e com características semelhantes são agrupados. Posteriormente a agrupação, é analisado o HSV (*Hue, Saturation, Value*) e RGB (*Red, Green, Blue*) médio de cada região de acordo com os *pixels* da região. Ainda é obtido

o centroide da gota de sangue, de onde são feitas retas até o fim da gota e a variação do tamanho das retas, obtendo assim valores de área e perímetro. A Figura 53 ilustra esse processo.

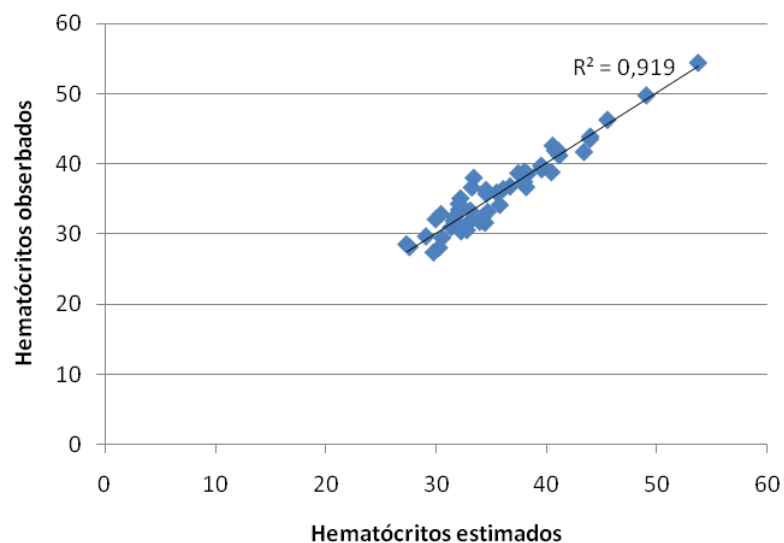
Figura 53. Demonstração do processamento da imagem através do aprendizado de máquina. A) Imagem original; B) Imagem processada.



Fonte: Autoria própria.

A partir dos dados abstraídos, foi criado um modelo de regressão utilizando SVR (*Support Vector Regression*) para prever o teor de hematócitos. O modelo foi utilizado *cross-validation* com 6 conjuntos, o modelo obteve um coeficiente de determinação (R^2) de 0,919 (Figura 54).

Figura 54. Relação entre hematócrito observado e estimado.

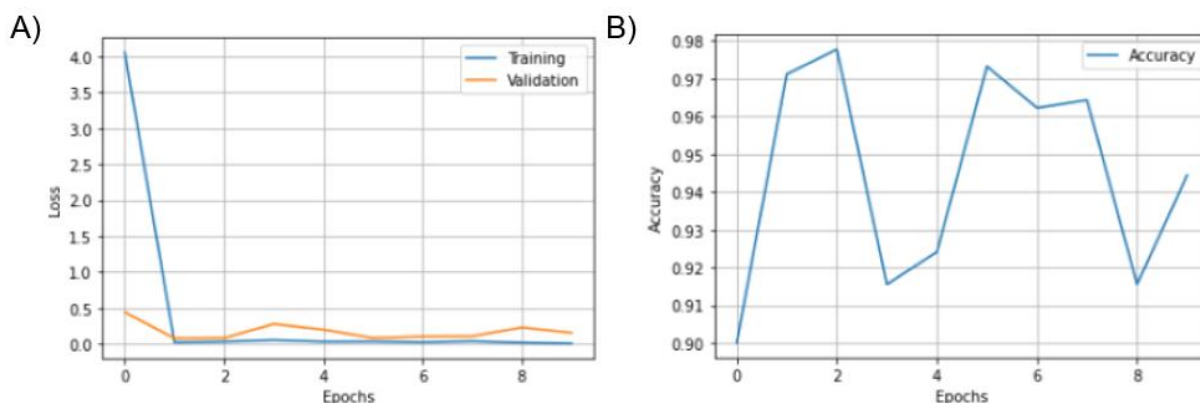


Fonte: Autoria própria.

Apesar da pequena quantidade de dados, foi realizado aprendizado de máquina e aprendizado profundo. Modelos como SVM, MLP, Floresta Aleatória, Regressão Logística, Classificação *Ridge*, *Gaussian Naive Bayes*, Gradiente Descendente Estocástico, KNN, Análise dos Discriminantes Quadráticos e *Gradient Boosting* foram utilizados no aprendizado de máquina. O modelo SVM (*Support Vectors Machine*) apresentou resultados superiores aos outros, com uma acurácia de 0,915 e curva ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*) de 0,679. A Curva ROC representa a relação entre a sensibilidade e a especificidade de um teste diagnóstico quantitativo.

No aprendizado profundo utilizou-se a função de perda para cada parâmetro de treinamento, com o modelo apresentando boa relação entre o aprendizado, e acurácia como apresentado na Figura 55. Épocas é um parâmetro de treinamento de uma rede neural, sendo basicamente a quantidade de vezes que os dados são apresentados para a rede, ajustando os pesos internos conforme a necessidade.

Figura 55. Resultados do aprendizado profundo. A) Número de vezes de treinamento da rede e B) acurácia da rede.



Fonte: Autoria própria.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo explorar a potencial de aplicação e desenvolvimento de um μ PAD para realizar a triagem de anemia através da quantificação de hemoglobina, hematócrito e ferritina.

O desenvolvimento do μ PAD para determinação de hematócrito apresentou boa correlação com os resultados obtidos junto ao HemoBanco. Utilizou-se papel cromatográfico Whatman nº 1 em sua construção, material que apresenta um valor elevado quando comparado a concorrentes e que influenciará no custo final do μ PAD. Porém, este maior custo é abatido quando analisamos a qualidade do material quando comparado com outras marcas de valor inferior, respaldado principalmente ao risco reduzido da empresa Cytiva, proprietária da Whatman, em descontinuar sua produção, visto que este papel cromatográfico é um material muito empregado e já estabelecido na química.

Os resultados para quantificação de hematócrito são promissores, mesmo se tratando de uma matriz complexa, onde a variabilidade regional, alimentação, hidratação, idade e gênero influenciam diretamente no comportamento sanguíneo. Verificamos que fatores de hidratação, horário de coleta de sangue, gênero e idade oferecem distorções nos resultados, tanto na quantificação de hemoglobina, quanto na quantificação de hematócrito.

Parâmetros na determinação de hematócrito foram controlados com sucesso, reduzindo o desvio padrão e aumentando a acurácia da determinação. Parâmetros como de adição da amostra sanguínea no papel, calibração de tamanho e cor no μ PAD, tempo para realizar a aquisição de imagem, construção do suporte de acrílico para aquisição de imagens pelo *smartphone*, iluminação controlada e distância focal fixa foram decisivos para o andamento e aproveitamento do projeto.

O aplicativo de celular mostrou-se uma ferramenta para análise interessante, visto a automação do processo, integrando os dados do paciente com a possibilidade de integrar a localização através de GPS (*Global Positioning System*). Os dados poderão ser utilizados como parâmetros de tomadas de decisão do governo para controle de saúde da população. O modelo matemático para obtenção de resultado do hematócrito poderá ser otimizado com a alimentação de mais resultados, podendo inclusive aumentar sua acurácia dividindo os resultados em função de idade e gênero.

Esta divisão não foi realizada devido a quantidade de amostras de conseguimos durante a realização do estudo.

Assim, observamos que os resultados demonstraram a possível substituição de equipamentos utilizados para determinação de hematócrito e hemoglobina pelo nosso μ PAD. Além do papel ser um material biodegradável, de fácil acesso e ocupar pouco espaço em conjunto com um aplicativo *Android* acessível e aplicável para qualquer *smartphone*, reduziria consideravelmente o custo destas análises, com emprego em locais até remotos.

A quantificação de ferritina com AuNPs conjugadas tiveram resultados promissores. A etapa crucial para sucesso deste teste foi a obtenção do plasma *in situ*, com reprodutibilidade, ausência de hemólise e de maneira passiva com a utilização de membrana Vivid Plasma da Marca Cytiva.

Os dados para quantificação de ferritina sérica foram realizados com padrões, não sendo aplicado em campo com amostras de sangue. Porém os resultados demonstrados até o momento foram satisfatórios, com aumento do sinal de intensidade quando secos. Notamos que o aumento de AuNPs conjugadas no disco de papel cromatográfico não aumentaram o sinal de intensidade, assim como a distribuição das AuNPs não foi homogêneo como demonstrado na imagem de microscopia eletrônica de transmissão. Todavia, a aplicação de amostra real ao dispositivo poderá distorcer os resultados aqui apresentados, visto que o sangue apresenta uma miríade de biomarcadores bioquímicos, imunológicos e moleculares.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1 SCHULENKORF, N.; SIEFKEN, K. Managing sport-for-development and healthy lifestyles : the sport-for-health model. **Sport Management Review**, Oxon, v. 22, n. 1, p. 96–107, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1441352318304157>. Acesso em: 03 jun. 2023.
- 2 MARQUES, A.; LOUREIRO, N.; AVELAR-ROSA, B.; NAIA, A.; MATOS, M. G. DE. Adolescents' healthy lifestyle. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 217–224, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2255553618302088>. Acesso em: 03 jun. 2023.
- 3 YANG, H.; AN, R.; CLARKE, C. V.; SHEN, J. Impact of economic growth on physical activity and sedentary behaviors: a systematic review. **Public Health**, London, v. 215, p. 17–26, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0033350622003419>. Acesso em: 03 jun. 2023.
- 4 HU, S. W.; QIAO, S.; XU, B. Y.; PENG, X.; XU, J. J.; CHEN, H. Y. Dual-functional carbon dots pattern on paper chips for Fe³⁺ and ferritin analysis in whole blood. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 89, n. 3, p. 2131–2137, 2017. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b04891>. Acesso em: 03 jun. 2023.
- 5 PASRICHA, S.-R.; DRAKESMITH, H.; BLACK, J.; HIPGRAVE, D.; BIGGS, B. A. Control of iron deficiency anemia in low-and middle-income countries. **Blood**, Washington, DC, v. 121, n. 14, p. 2607–2617, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120473586>. Acesso em: 07 jun. 2023.
- 6 JOHNSON-WIMBLEY, T. D.; GRAHAM, D. Y. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, London, v. 4, n. 3, p. 177–184, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3105608/>. Acesso em: 06 jun. 2023.
- 7 SHARMA, H.; SINGH, S. K.; SRIVASTAVA, S. Socio-economic inequality and spatial heterogeneity in anaemia among children in India: evidence from NFHS-4 (2015–16). **Clinical Epidemiology and Global Health**, New Delhi, v. 8, n. 4, p. 1158–1171, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213398420301056>. Acesso em: 05 jun. 2023.

8 YANG, X.; PIETY, N. Z.; VIGNES, S. M.; BENTON, M. S.; KANTER, J.; SHEVKOPLYAS, S. S. Simple paper-based test for measuring blood hemoglobin concentration in resource-limited settings. **Clinical chemistry**, Cary, v. 59, n. 10, p. 1506–1513, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3880468/>. Acesso em: 10 jun. 2023.

9 NEOGI, S. B.; NEGANDHI, H.; KAR, R.; BHATTACHARYA, M.; SEN, R.; VARMA, N.; BHARTI, P.; SHARMA, J.; BHUSHAN, H.; ZODPEY, S.; SAXENA, R. Diagnostic accuracy of haemoglobin colour strip (HCS-HLL), a digital haemoglobinometer (TrueHb) and a non-invasive device (TouchHb) for screening patients with anaemia. **Journal of clinical pathology**, London, v. 69, n. 2, p. 164–170, 2016. Disponível em: <https://jcp.bmj.com/content/69/2/164.long>. Acesso em: 21 jun. 2023.

10 LI, C. G.; JOUNG, H. A.; NOH, H.; SONG, M. B.; KIM, M. G.; JUNG, H. One-touch-activated blood multidagnostic system using a minimally invasive hollow microneedle integrated with a paper-based sensor. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 15, n. 16, p. 3286–3292, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/279864961_One-Touch-Activated_Blood_Multidiagnostic_System_using_a_Minimally_Invasive_Hollow_Microneedle_Integrated_with_a_Paper-Based_Sensor. Acesso em: 11 jun. 2023.

11 TONER, M.; IRIMIA, D. Blood-on-a-Chip. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 7, n. 1, p. 77–103, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3779643/>. Acesso em: 27 jun. 2023.

12 GONG, M. M.; SINTON, D. Turning the page: advancing paper-based microfluidics for broad diagnostic application. **Chemical Reviews**, Washington, DC, v. 117, n. 12, p. 8447–8480, 2017. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.7b00024>. Acesso em: 15 jun. 2023.

13 YAMADA, K.; SHIBATA, H.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. Toward practical application of paper-based microfluidics for medical diagnostics: state-of-the-art and challenges. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 17, n. 7, p. 1206–1249, 2017. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/28251200>. Acesso em: 13 jun. 2023.

14 WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, Berlin, v. 442, n. 7101, p. 368–373, 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature05058>. Acesso em: 13 jun. 2023.

15 DAW, R.; FINKELSTEIN, J. Lab on a chip. **Nature**, Berlin, v. 442, n. 7101, p. 367–367, 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/442367a>. Acesso em: 13 jun. 2023.

16 YAMADA, K.; SHIBATA, H.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. Toward practical application of paper-based microfluidics for medical diagnostics: state-of-the-art and challenges. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 17, n. 7, p. 1206–1249, 2017. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/28251200>. Acesso em: 17 jun. 2023.

17 YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 13, n. 12, p. 2210–2251, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/236653884_Paper-based_microfluidic_point-of-care_diagnostic_devices. Acesso em: 17 jun. 2023.

18 CRAIGHEAD, H. Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. **Nature**, Berlin, v. 442, n. 7101, p. 387–393, 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature05061>. Acesso em: 21 jun. 2023.

19 JANASEK, D.; FRANZKE, J.; MANZ, A. Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. **Nature**, Berlin, v. 442, n. 7101, p. 374–380, 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature05059>. Acesso em: 19 jun. 2023.

20 LISOWSKI, P.; ZARZYCKI, P. K. Microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) and micro total analysis systems (μ TAS): development, applications and future trends. **Chromatographia**, Heidelberg, v. 76, n. 19–20, p. 1201–1214, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3779795/>. Acesso em: 13 jun. 2023.

21 YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 13, n. 12, p. 2210–2251, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/236653884_Paper-based_microfluidic_point-of-care_diagnostic_devices. Acesso em: 13 jun. 2023.

22 YANG, X.; FOROUZAN, O.; BROWN, T. P.; SHEVKOPLYAS, S. S. Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 274–280, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22094609/>. Acesso em: 13 jun. 2023.

23 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S. W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G. M. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 80, n. 10, p. 3699–3707, 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac800112r>. Acesso em: 27 jun. 2023.

24 SECHI, D.; GREER, B.; JOHNSON, J.; HASHEMI, N. Three-dimensional paper-based microfluidic device for assays of protein and glucose in urine. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 85, n. 22, p. 10733–10737, 2013. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac4014868>. Acesso em: 25 jun. 2023.

25 LI, M.; TIAN, J.; AL-TAMIMI, M.; SHEN, W. Paper-based blood typing device that reports patient's blood type "in writing". **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 51, n. 22, p. 5497–5501, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201201822>. Acesso em: 02 jul. 2023.

- 26 KHAN, M. S.; THOUAS, G.; SHEN, W.; WHYTE, G.; GARNIER, G. Paper diagnostic for instantaneous blood typing. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 82, n. 10, p. 4158–4164, 2010. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac100341n#:~:text=The%20concept%20of%20blood%20typing,of%20colloids%20and%20surface%20chemistry..> Acesso em: 02 jul. 2023.
- 27 THEN, W. L.; LI, M.; MCLIESH, H.; SHEN, W.; GARNIER, G. The detection of blood group phenotypes using paper diagnostics. **Vox Sanguinis**, Hoboken, v. 108, n. 2, p. 186–196, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vox.12195> Acesso em: 25 jun. 2023.
- 28 YANG, X.; PIETY, N. Z.; VIGNES, S. M.; BENTON, M. S.; KANTER, J.; SHEVKOPLYAS, S. S. Simple paper-based test for measuring blood hemoglobin concentration in resource-limited settings. **Clinical chemistry**, Cary, v. 59, n. 10, p. 1-12, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3880468/>. Acesso em: 23 jun. 2023.
- 29 ROHRMAN, B. A.; RICHARDS-KORTUM, R. R. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 12, n. 17, p. 3082–3088, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3569001/>. Acesso em: 25 jun. 2023.
- 30 CATE, D. M.; ADKINS, J. A.; METTAKOONPITAK, J.; HENRY, C. S. Recent developments in paper-based microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 87, n. 1, p. 19–41, 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac503968p>. Acesso em: 25 jun. 2023.
- 31 TSAI, T.; SHEN, S.; CHENG, C.; CHEN, C. Paper-based tuberculosis diagnostic devices with colorimetric gold nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, Oxon, v. 14, n. 4, p. 1–7, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5090315/>. Acesso em: 05 jul. 2023.
- 32 UNITED NATIONS. Department of Economics and Social Affairs. **World population prospects: the 2017 revision, key findings and advance tables**. New York: United Nations, 2017. Disponível em: https://population.un.org/wpp/publications/files/wpp2017_keyfindings.pdf. Acesso em: 01 jul. 2023.
- 33 FUKASE, E.; MARTIN, W. Economic growth, convergence, and world food demand and supply. **World Development**, Oxford, v. 132, p. 104954, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305750X20300802>. Acesso em: 29 jun. 2023.
- 34 HEMATHILAKE, D. M. K. S.; GUNATHILAKE, D. M. C. C. Agricultural productivity and food supply to meet increased demands. In: BHAT, R. (ed.). **Future foods: global trends, opportunities, and sustainability challenges**. London: Elsevier, 2022, p. 539–553. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323910019000165>. Acesso em: 07 jul. 2023.

- 35 DAVIS, K. F.; GEPHART, J. A.; EMERY, K. A.; LEACH, A. M.; GALLOWAY, J. N.; D'ODORICO, P. Meeting future food demand with current agricultural resources. **Global Environmental Change-Human and Policy Dimensions**, Oxon, v. 39, p. 125–132, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959378016300632>. Acesso em: 07 jul. 2023.
- 36 FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA. **Para cada criança, nutrição, estratégia de nutrição 2020–2030**. New York: UNICEF, 2020. Disponível em: <https://www.unicef.org/media/111351/file/Nutrition%20Strategy%2020-2030.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2023.
- 37 EGBON, O. A.; BELACHEW, A. M.; BOGONI, M. A. Modeling spatial pattern of anemia and malnutrition co-occurrence among under-five children in Ethiopia: a bayesian geostatistical approach. **Spatial and Spatio-temporal Epidemiology**, Oxon, v. 43, p. 100533, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877584522000569>. Acesso em: 21 jun. 2023.
- 38 GODFRAY, H. C. J. Food for thought. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 108, n. 50, p. 19845–19846, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3250159/>. Acesso em: 01 jul. 2023.
- 39 BIRADAR, R. A. Association between poverty and anaemia among mother–child pairs in India. **Children and Youth Services Review**, Oxford, v. 144, p. 106719, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190740922003553>. Acesso em: 07 jul. 2023.
- 40 MATHAD, V.; BADIGER, S.; MANJUNATH, N. Assessment of anemia and malnutrition among adolescent in Kalyan Karnataka region of Karnataka. **Clinical Epidemiology and Global Health**, New Delhi, v. 21, p. 101307, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213398423000945>. Acesso em: 25 jun. 2023.
- 41 BISWAS, S. K.; BANDYOPADHYAY, S.; KAR, S.; SOM, N. K.; CHAKRABORTY, S. Anemia diagnosis on a simple paper-based assay. **BioRxiv**, Huntington, p. 439224, 2018. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/439224v1.full>. Acesso em: 27 jun. 2023.
- 42 DEAN, L.; DEAN, L. **Blood groups and red cell antigens**. Bethesda: NCBI, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/>. Acesso em: 27 jun. 2023.
- 43 MAHDI, A.; CORTESE-KROTT, M. M.; KELM, M.; LI, N.; PERNOW, J. Novel perspectives on redox signaling in red blood cells and platelets in cardiovascular disease. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 168, p. 95–109, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584921001799>. Acesso em: 29 jun. 2023.

- 44 WANG, S.; HAN, K.; MA, S.; QI, X.; GUO, L.; LI, X. Blood cells as supercarrier systems for advanced drug delivery. **Medicine in Drug Discovery**, Shanghai, v. 13, p. 100119, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590098621000403>. Acesso em: 03 jul. 2023.
- 45 BERRY, S. B.; FERNANDES, S. C.; RAJARATNAM, A.; DECHIARA, N. S.; MACE, C. R. Measurement of the hematocrit using paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 16, n. 19, p. 3689–3694, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27604182/>. Acesso em: 05 jul. 2023.
- 46 BLEICHER, A. V.; UNGER, H. W.; ROGERSON, S. J.; AITKEN, E. H. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of human plasma ferritin. **MethodsX**, Amsterdam, v. 5, p. 648–651, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6038846/>. Acesso em: 05 jul. 2023.
- 47 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2022. Disponível em: <https://vdoc.pub/documents/principios-de-bioquimica-de-lehninger-2bgf3mgbiqlg>. Acesso em: 05 jul. 2023.
- 48 NADHIROH, S. R.; MICHEALA, F.; HUI, S. T. E. The association between maternal anemia and stunting in children aged 0-60 months : a systematic literature review. **Nutrition**, New York, p. 112094, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900723001235>. Acesso em: 29 jun. 2023.
- 49 ZHAO, W.; ZONG, C.; LEI, T.; TIAN, W.; SUN, M.; LIU, X.; ZHANG, Q.; GAI, H. Ultrasensitive free bilirubin detection in whole blood via counting quantum dots aggregates at single nanoparticle level. **Sensors & Actuators B: chemical**, Lausanne, v. 275, n. 1, p. 95–100, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092540051831462X>. Acesso em: 29 jun. 2023.
- 50 KNOVICH, M. A.; STOREY, J. A.; COFFMAN, L. G.; TORTI, S. V.; TORTI, F. M. Ferritin for the clinician. **Blood Reviews**, Edinburgh, v. 23, n. 3, p. 95–104, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2717717/>. Acesso em: 05 jul. 2023.
- 51 NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. S. Spectrometric measurement of methemoglobin without interference of chemical or enzymatic reagents. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 19–22, 2004. Disponível em: <https://www.readcube.com/articles/10.1590%2Fs1516-84842004000100004>. Acesso em: 05 jul. 2023.
- 52 RAMM, G. A.; DUPLOCK, L. R.; POWELL, L. W.; HALLLDAY, J. W. Sensitive and rapid colorimetric Immunoenzymometric assay of ferritin in biological samples. **Clinical Chemistry**, Cary, v. 36, n. 6, p. 837–840, 1990. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=8c48c235b0212e0f5d1db811043e8bfa6c90628a>. Acesso em: 15 jun. 2023.

53 SRINIVASAN, B.; O'DELL, D.; FINKELSTEIN, J. L.; LEE, S.; ERICKSON, D.; MEHTA, S. IronPhone: mobile device-coupled point-of-care diagnostics for assessment of iron status by quantification of serum ferritin. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxon, v. 99, p. 115–121, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566317304864?via%3Dihub>. Acesso em: 08 jul. 2023.

54 LU, Z.; O'DELL, D.; SRINIVASAN, B.; REY, E.; WANG, R.; VEMULAPATI, S.; MEHTA, S.; ERICKSON, D. Rapid diagnostic testing platform for iron and vitamin A deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 114, n. 51, p. 13513–13518, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5754775/>. Acesso em: 02 jul. 2023.

55 SEIDEL, R. A.; KAHNES, M.; BAUER, M.; POHNERT, G. Simultaneous determination of the bilirubin oxidation end products Z-BOX A and Z-BOX B in human serum using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences**, Amsterdam, v. 974, p. 83–89, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023214006680>. Acesso em: 21 jun. 2023.

56 MARTELANC, M.; ŽIBERNA, L.; PASSAMONTI, S.; FRANKO, M. Application of high-performance liquid chromatography combined with ultra-sensitive thermal lens spectrometric detection for simultaneous biliverdin and bilirubin assessment at trace levels in human serum. **Talanta**, Amsterdam, v. 154, p. 92–98, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914016301801>. Acesso em: 29 jun. 2023.

57 SANTHOSH, M.; CHINNADAYYALA, S. R.; KAKOTI, A.; GOSWAMI, P. Selective and sensitive detection of free bilirubin in blood serum using human serum albumin stabilized gold nanoclusters as fluorometric and colorimetric probe. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxon, v. 59, p. 370–376, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566314002577>. Acesso em: 10 jul. 2023.

58 TAURINO, I.; VAN HOOFF, V.; MAGREZ, A.; FORRÓ, L.; DE MICHELI, G.; CARRARA, S. Efficient voltammetric discrimination of free bilirubin from uric acid and ascorbic acid by a CVD nanographite-based microelectrode. **Talanta**, Amsterdam, v. 130, p. 423–426, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014005621>. Acesso em: 01 jul. 2023.

59 TAN, W.; ZHANG, L.; DOERY, J. C. G.; SHEN, W. Three-dimensional microfluidic tape-paper-based sensing device for blood total bilirubin measurement in jaundiced neonates. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 20, n. 2, p. 394–404, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Weirui-Tan/publication/337866730_Three-dimensional_microfluidic_tape-paper-based_sensing_device_for_blood_total_bilirubin_measurement_in_jaundiced_neonates/links/5e43899c299bf1cdb9210595/Three-dimensional-microfluidic-tape-paper-based-sensing-device-for-blood-total-bilirubin-measurement-in-jaundiced-neonates.pdf. Acesso em: 01 jun. 2023.

60 ROSENBLIT, J.; ABREU, C. R.; FRUTUOSO, P.; REGINA, T.; STRACIERI, S.; SERVICE, H.; ISRAELITA, H.; EINSTEIN, A.; PAULO, S. Evaluation of three methods for hemoglobin measurement in a blood donor setting. **Sao Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 117, n. 3, p. 108–112, 1999. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/spmj/a/hVB8J7PG9LbmRGw95h9zfWQ/?lang=en>. Acesso em: 23 mai. 2023.

61 BERRY, S. B.; FERNANDES, S. C.; RAJARATNAM, A.; DECHIARA, N. S.; MACE, C. R. Measurement of the hematocrit using paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 16, n. 19, p. 3689–3694, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27604182/>. Acesso em: 05 jul. 2023.

62 MANNINO, R. G.; MYERS, D. R.; TYBURSKI, E. A.; CARUSO, C.; BOUDREAUX, J.; LEONG, T.; CLIFFORD, G. D.; LAM, W. A. Smartphone app for non-invasive detection of anemia using only patient-sourced photos. **Nature Communications**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 4924, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-07262-2>. Acesso em: 29 mai. 2023.

63 THOMPSON, B. L.; GILBERT, R. J.; MEJIA, M.; SHUKLA, N.; HAVERSTICK, D. M.; GARNER, G. T.; LANDERS, J. P. Hematocrit analysis through the use of an inexpensive centrifugal polyester-toner device with finger-to-chip blood loading capability. **Analytica Chimica Acta**, Berlin, v. 924, p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326701630486X?via%3Dihub>. Acesso em: 29 mai. 2023.

64 SALENTIJN, G. I. J.; GRAJEWSKI, M.; VERPOORTE, E. Reinventing (Bio)chemical. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 90, n. 23, p. 13815–13825, 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.8b04825>. Acesso em: 09 jul. 2023.

65 SHIN, J. H.; PARK, J.; KIM, S. H.; PARK, J. K. Programmed sample delivery on a pressurized paper. **Biomicrofluidics**, Melville, v. 8, n. 5, p. 1–8, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4290598/>. Acesso em: 28 jun. 2023.

66 POLLOCK, N. R.; ROLLAND, J. P.; KUMAR, S.; BEATTIE, P. D.; JAIN, S.; NOUBARY, F.; WONG, V. L.; POHLMANN, R. A.; RYAN, U. S.; WHITESIDES, G. M. A paper-based multiplexed transaminase test for low-cost, point-of-care liver function testing. **Science Translational Medicine**, Washington, DC, v. 4, n. 152, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624093/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

67 XIA, Y.; SI, J.; LI, Z. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: a review. **Biosensors and Bioelectronics journal**, Oxon, v. 77, p. 774–789, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566315304966>. Acesso em: 29 mai. 2023.

68 COLTRO, W. K. T.; JESUS, D. P.; SILVA, J. A. F.; LAGO, C. L.; CARRILHO, E. Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. **Electrophoresis**, Hoboken, v. 31, n. 15, p. 2487–2498, 2010. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201000063>. Acesso em: 09 jul. 2023.

69 LI, M.; TIAN, J.; AL-TAMIMI, M.; SHEN, W. Paper-based blood typing device that reports patient's blood type "in writing". **Angewandte Chemie - international edition**, Weinheim, v. 51, n. 22, p. 5497–5501, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.201201822>. Acesso em: 15 jul. 2023.

70 ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: a review. **Talanta**, Amsterdam, v. 184, p. 537–556, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914018302054>. Acesso em: 15 mai. 2023.

71 KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, Amsterdam, v. 12, n. 7, p. 908–931, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535217300990>. Acesso em: 27 jun. 2023.

72 HU, X.; ZHANG, Y.; DING, T.; LIU, J.; ZHAO, H. Multifunctional gold nanoparticles: a novel nanomaterial for various medical applications and biological activities. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 8, p. 990, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00990/full>. Acesso em: 21 jul. 2023.

73 RAMALINGAM, V. Multifunctionality of gold nanoparticles: plausible and convincing properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 271, p. 101989, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868619300235>. Acesso em: 09 jun. 2023.

74 MATERÓN, E. M.; GÓMEZ, F. R.; ALMEIDA, M. B.; SHIMIZU, F. M.; WONG, A.; TEODORO, K. B. R.; SILVA, F. S. R.; LIMA, M. J. A.; ANGELIM, M. K. S. C.; MELENDEZ, M. E.; PORRAS, N.; VIEIRA, P. M.; CORREA, D. S.; CARRILHO, E.; OLIVEIRA, O. N.; AZEVEDO, R. B.; GONCALVES, D. Colorimetric detection of SARS-CoV-2 using plasmonic biosensors and smartphones. **ACS Applied Materials and Interfaces**, Washington, DC, v. 14, n. 49, p. 54527–54538, 2022. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.2c15407>. Acesso em: 21 jul. 2023.

75 HERIZCHI, R.; ABBASI, E.; MILANI, M.; AKBARZADEH, A. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, Oxon, v. 44, n. 2, p. 596–602, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/21691401.2014.971807>. Acesso em: 08 jul. 2023.

76 BART, J.; TIGGELAAR, R.; YANG, M.; SCHLAUTMANN, S.; ZUILHOF, H.; GARDENIERS, H. Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 9, n. 24, p. 3481-3488, 2009. Disponível em: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/42649268/Room-temperature_intermediate_layer_bond20160213-7335-fwmf7o-libre.pdf?1455384173=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DRoom_temperature_intermediate_layer_bond.pdf&Expires=1690476862&Signature=JCSYOU~vtBmIPIODK49H9b9rrNMvq3O7JXRaz6CEvqLljTfHGGuUOZFI~m5Yc9jbBgHh0bvqTyFk8NYLJyXZqiozavaqTgCushijX7VVLU5zW2jFU6D6XsVkhVTB37xAEm8rE6ZezjM~q0Dxh0eyfBydplCG2SlatmYF8JKminppiqB5BIIIKhfeiBoVpyDw5PESMmcTy4jySRNiDc7qxHal817alGtpgwt1HoSmfVhoiEs1lqR1Qcs6GbtqnFSjNvK2nYhmKv~0W25I5axYZ71FgYgW-h5euLWrkDGdSTOpwj0SjtL9WmfkPmasptMjDRxZhiB7b7CUb~lhtE0M1FQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA. Acesso em: 11 jul. 2023.

77 LOMANT, A. J.; FAIRBANKS, G. Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). **Journal of Molecular Biology**, London, v. 104, n. 1, p. 243–261, 1976. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283676900115?via%3Dihub>. Acesso em: 11 jul. 2023.

78 STAROS, J. V.; WRIGHT, R. W.; SWINGLE, D. M. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 156, n. 1, p. 220–222, 1986. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269786901764>. Acesso em: 15 jul. 2023.

79 CUATRECASAS, P.; PARIKH, I. Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 11, n. 12, p. 2291–2299, 1972. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/bi00762a013>. Acesso em: 15 jul. 2023.

80 MORBIOLI, G. G.; MAZZU-NASCIMENTO, T.; STOCKTON, A. M.; CARRILHO, E. Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) - a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 970, p. 1-22, 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267017303483>. Acesso em: 07 jul. 2023.

81 CATE, D. M.; ADKINS, J. A.; METTAKOONPITAK, J.; HENRY, C. S. Recent developments in paper-based microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 87, n. 1, p. 19–41, 2015. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac503968p>. Acesso em: 13 jul. 2023.

82 RANGANATHAN, H.; GUNASEKARAN, N. Simple method for estimation of hemoglobin in human blood using color analysis. **IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine**, Piscataway, v. 10, n. 4, p. 657–662, 2006. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/document/1707678/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

83 PLEBANI, M. Does POCT reduce the risk of error in laboratory testing? **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 404, n. 1, p. 59–64, 2009. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898109001442?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jun. 2023.

84 NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Hematologia laboratorial**. Leucócitos. 2. ed. São José do Rio Preto: Editora Academia de Ciência e Tecnologia, 2006. Disponível em: <https://doceru.com/doc/85c18n>. Acesso em: 21 jun. 2023.

85 NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Hematologia laboratorial**. Eritrócitos. 2. ed. São José do Rio Preto: Editora Academia de Ciência e Tecnologia, 2008. Disponível em: https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/livros/aceso_gratuito/Livro_completo%20-%20Hematologia%20Eritrocitos.pdf. Acesso em: 23 jun. 2023.

86 LI, H.; HAN, D.; PAULETTI, G. M.; HEGENER, M. A.; STECKL, A. J. Correcting the effect of hematocrit in whole blood coagulation analysis on paper-based lateral flow device. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 10, n. 24, p. 2869–2874, 2018. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/325649084_Correction_Correcting_the_effect_of_hematocrit_in_whole_blood_coagulation_analysis_on_paper-based_lateral_flow_device. Acesso em: 28 jun. 2023.


87 WARD, J. M.; CHERIAN, S.; LINDEN, M. A. Hematopoietic and lymphoid tissues. *In*: TREUTING, P. M.; DINTZIS, S. M.; MONTINE, K. S. (ed.). **Comparative Anatomy and Histology**: a mouse, rat, and human atlas. 2. ed. London: Elsevier, 2017. p. 570. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123813619000196#:~:text=The%20hematopoietic%20and%20lymphoid%20tissues%20are%20found%20throughout%20the%20body,injury%2C%20and%20other%20various%20conditions>. Acesso em: 05 jul. 2023.

88 MOVASSAGHIAN, S.; TORCHILIN, V. P. Long-circulating therapies for cancer treatment. *In*: SINGH, M.; SALNIKOVA, M. (ed.). **Novel approaches and strategies for biologics, vaccines and cancer therapies**. London: Elsevier, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124166035000183>. Acesso em: 03 jul. 2023.

7. ANEXOS

ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

	Universidade de São Paulo Instituto de Química de São Carlos Serviço de Pós-Graduação Caixa Postal 780 13560-970 São Carlos – SP Te.: (16) 3373-9909
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE	
1. Informações do Participante da Pesquisa	
Nome:	
Documento de Identidade (tipo):	Nº.: Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /
Endereço:	Nº.:
Complementos:	Bairro:
Cidade:	Estado:
CEP:	Telefones:
2. Informações do Responsável Legal	
Nome:	
Documento de Identidade (tipo):	Nº.: Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /
Endereço:	Nº.:
Complementos:	Bairro:
Cidade:	Estado:
CEP:	Telefones:
3. Título do Projeto de Pesquisa	
Desenvolvimento de um dispositivo microfluidico baseado em papel (μ PAD) para diagnóstico rápido em amostras de sangue no local de atendimento (POC)	
4. Duração da Pesquisa	
4 anos	
5. Nome do Pesquisador Responsável	
Cleyton Nascimento Makara	
Cargo/ Função: Doutorando	Nº de registro do Conselho Regional:
6. Instituição/Instituições	
Universidade de São Paulo	



Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
Serviço de Pós-Graduação

Caixa Postal 780 13560-970 São Carlos – SP Te.: (16) 3373-9909

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre "Desenvolvimento de um dispositivo microfluidico baseado em papel (μ PAD) para diagnóstico rápido em amostras de sangue no local de atendimento (POC)" e está sendo desenvolvida pelo pesquisador doutorando Cleyton Nascimento Makara do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP), sob a orientação do Prof Dr. Emanuel Carrilho. Os objetivos do estudo são desenvolver um dispositivo portátil e de baixo custo em papel para auxiliar no diagnóstico e controle de anemia, glicemia, hemoglobina glicada, colesterol, bilirrubina, ferritina e intolerância a lactose. A finalidade deste trabalho é contribuir para o desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo e de fácil manuseio, que poderá futuramente ser implementado pelo governo e oferecer o resultado em tempo real ao paciente. Gostaríamos de solicitar sua colaboração e autorização para que seja realizada uma coleta de 05 ml de sangue através de punção de uma veia periférica (antebraço ou braço) e apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto. Informamos que essa pesquisa poderá ocasionar desconforto passageiro no local da picada para coleta de sangue. O resultado dos exames será devolvido e, caso os resultados se apresentem fora dos valores de referência, o voluntário será orientado para procurar o adequado acompanhamento médico via SUS ou medicina privada. Qualquer dúvida, favor entrar em contato com o pesquisador responsável através Cleyton Nascimento Makara através do e-mail cleytonmakara@gmail.com, ou pelo número (16) 3373-8279 / (16) 98142-4664. Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, sendo-lhe resguardado o direito de sigilo e privacidade durante toda pesquisa. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Carlos, _____ de _____ de _____.



Assinatura do Participante ou Responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones 3091-3622 e 3091-3677, e-mail: cepcf@usp.br.

Página 2 de 2

ANEXO II – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

	IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO CARLOS	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
Elaborado pela Instituição Coparticipante		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Desenvolvimento de um dispositivo microfluidico baseado em papel (μ PAD) para diagnóstico rápido em amostras de sangue no local de atendimento (POC)		
Pesquisador: CLEYTON NASCIMENTO MAKARA		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 15478519.1.3001.8148		
Instituição Proponente: IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE SAO CARLOS		
Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 4.314.463		
Apresentação do Projeto: O projeto apresenta-se bem estruturado e justificado, de fácil compreensão.		
Objetivo da Pesquisa: O objetivo da pesquisa está claro e bem especificado		
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos ao paciente que constam no projeto estão claros e bem esclarecidos.		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa e seus objetivos estão claros e bem apresentados.		
A questão abaixo foi levantada pelo CEP a respeito da metodologia, mas não comprometem o estudo do ponto de vista ético.		
- A análise dos exames será feita através de imagem (reações colorimétricas). Como o pesquisador vai avaliar as amostras cuja resposta será dado em tons de vermelho e marrom (glicose), uma vez que pode se confundir com a coloração do sangue?		
Endereço: R. Paulino Botelho de Abreu Sampaio, 573		
Bairro: Vila Pureza	CEP: 13.573-284	
UF: SP	Município: SAO CARLOS	
Telefone: (16)3509-1305	E-mail: cep@santacasasaocarlos.com.br	
Página 01 de 03		



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO CARLOS



Continuação do Parecer: 4.314.463

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta-se bem redigido e claro. O pesquisador apresenta o projeto com clareza e explica a motivação do estudo. Também esclarece que os dados pessoais serão mantidos em sigilo e que o paciente tem liberdade para deixar o estudo se assim desejar, sem prejuízos à sua parte. O pesquisador esclarece os riscos de forma objetiva ("Informamos que essa pesquisa poderá ocasionar desconforto passageiro no local da picada para coleta de sangue")

Sugiro algumas modificações para tornar o TCLE mais convidativo ao participante:

- Evitar convocações e trocar os termos por convites. Exemplo: Trocar o trecho "Solicitamos a sua colaboração" por "Gostaríamos de solicitar a sua colaboração"

Acrescentar um telefone de contato pessoal do pesquisador (celular) ao TCLE

Recomendações:

Recomendamos pequenas modificações para tornar o TCLE ainda mais convidativo ao participante, como trocar o termo "Solicitamos a sua colaboração" por "Gostaríamos de solicitar a sua colaboração".

Também recomendamos que o pesquisador adicione um número de contato pessoal (Celular) no TCLE

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado com sugestão de pequenas modificações

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1517392.pdf	17/09/2020 22:41:34		Aceito
Declaração de concordância	CartadeAnuenciadaInstituicaoSantaCasa.pdf	17/09/2020 22:40:54	CLEYTON NASCIMENTO MAKARA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoComiteEticaAlterado_VS03.docx	10/06/2020 14:12:25	CLEYTON NASCIMENTO MAKARA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_05.pdf	04/10/2019 10:30:47	CLEYTON NASCIMENTO MAKARA	Aceito

Endereço: R. Paulino Botelho de Abreu Sampaio, 573

Bairro: Vila Pureza

CEP: 13.573-284

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3509-1305

E-mail: cep@santacasasaocarlos.com.br



IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICÓRDIA DE SÃO
CARLOS



Continuação do Parecer: 4.314.463

Ausência	TCLE_05.pdf	04/10/2019 10:30:47	CLEYTON NASCIMENTO MAKARA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoComiteEtica_VS02.pdf	02/10/2019 13:22:30	CLEYTON NASCIMENTO MAKARA	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_ CEP_3489000.pdf	02/10/2019 13:22:20	CLEYTON NASCIMENTO MAKARA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_03.pdf	23/05/2019 13:35:37	CLEYTON NASCIMENTO MAKARA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoComiteEtica.docx	26/03/2019 13:17:02	CLEYTON NASCIMENTO MAKARA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO CARLOS, 01 de Outubro de 2020

Assinado por:
rodrigo bezerra de menezes reiff
(Coordenador(a))

Endereço: R. Paulino Botelho de Abreu Sampaio, 573

Bairro: Vila Pureza

CEP: 13.573-284

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3509-1305

E-mail: cep@santacasasaocarlos.com.br