Desenvolvimento de metodologia analítica baseada em µPAD Para determinação de metais pesados em águas naturais

Jéssica da Conceição da Silva[1], Diógenes Meneses dos Santos[2], Fabiane Caxico de Abreu Galdino[3], José Guimarães Ferreira de Lima Júnior[4] , Edla Íris Vieira do Nascimento[5] e Maria Helena Gomes Soares[6]

[1]Mestranda em Química e biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brasil (jessicavidamais@hotmail.com)
[2]Profº Dr. Do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia - PPGQB/UFAL, Maceió, Brasil
[3]Profª Dra. Do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia - PPGQB/UFAL, Maceió, Brasil
[4]Doutorando em Química e biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brasil
[5]Graduanda em Licenciatura na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brasil
[6]Graduanda em Licenciatura na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brasil

Resumo: Neste trabalho, um dispositivo analítico baseado em papel de teste local para a determinação do Hg^{2+} em amostras de águas naturais é apresentado. Os µPADs foram acoplados a detecção colorimétrica, baseada na reação entre o Hg^{2+} e a sonda colorimétrica ditizona na presença do CTAB, gerando uma cor proporcional à concentração deste metal. O limite de detecção determinado foi 0,99 µg.mL^{-1} e o limite de quantificação foi de 3,0 µg.mL^{-1} , com faixa linear de 1 – 25 µgl.mL^{-1}.

Palavras-chave: Sistemas Microfluídicos; Detecção colorimétrica; metais pesados ; µPAD.

INTRODUÇÃO

Os metais pesados são constituintes naturais da crosta terrestre, no entanto as atividades humanas alteram drasticamente os ciclos biogeoquímicos naturais destes elementos, como, o uso excessivo nas indústrias que realizam os descartes no meio ambiente, resultando em riscos de contaminação global, uma vez que, estes metais não se degradam, mas ficam acumulados em corpos d'água como resultado da bioacumulação(Ruchi et al., 2021). O envenenamento por metais pesados tem recebido considerável atenção devido à sua alta toxicidade e seus efeitos nocivos sobre a saúde, genética, nutrição e ecossistemas1(Larbi et al., 2019).

Dentre todas as contaminações da água, os íons de metais pesados, como Hg^{2+} têm alta toxicidade e não são biodegradáveis , podendo causar graves problemas de saúde em animais e seres humanos, como câncer, disfunção hepática, distúrbios nos sistemas endócrino e nervoso, dentre outros problemas. O mercúrio pode se acumular em órgãos e tecidos vitais para danificar o sistema nervoso central e outros órgãos (Sall et al., 2020 ; Monisha et al., 2021). Portanto, o mercúrio no meio ambiente é um importante produto químico que precisa ser monitorado continuamente devido à sua natureza extremamente tóxica. Uma série de métodos foram relatados para a detecção de Hg^{2+} em várias amostras, incluindo espectrofotometria ultravioleta-visível,espectrofluorimetria, espectrometria de absorção atômica de vapor frio,espectrometria de fluorescência atômica e espectrometria de massa com alta precisão e sensibilidade (Clevenger; Smith; Winefordner, 1997; Gao; Huang, 2013; 7. Martín-Yerga; González-García; Costa-García, 2013; Isquibola e Rodrigues 2021). No entanto, esses métodos geralmente são limitados pelo alto custo, grandes quantidades de amostra e reagentes, operações demoradas e trabalhosas. Além disso, profissionais treinados são necessários para operar e manter esses caros instrumentos analíticos.

Essas limitações apresentam dificuldades para a detecção local e em tempo real de íons de mercúrio,

especialmente naquelas regiões com recursos limitados. Nos últimos anos, os dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (µPADs) receberam muita atenção devido às vantagens de baixo custo, fabricação fácil e rápida, facilidade de uso, velocidade de análise rápida, baixo consumo de amostras e reagentes (Firdaus et al., 2019; Zhang h.; Yang f-q, 2021) . Como resultado, a última década testemunhou aplicações generalizadas de µPADs em testes de diagnóstico no local de atendimento, monitoramento ambiental e análise de alimentos, desde que Whitesides e colegas de trabalho introduziram esse conceito em 2007. Consequentemente, o µPAD tem sido usado como plataformas para detecção de íons de mercúrio de forma econômica e fácil de usar (Cai et al., 2017).

Nesse cotexto, muitas cidades ribeirinhas fazem o uso da água do rio para consumo doméstico, lazer e pesca de subsistência, sendo assim, ver-se a importância de um monitoramento periódica e constante da concentração de espécies químicas, segundo a Resolução n.º 357 de 17 de março de 2005 do CONAMA, as quais podem estar presentes nas águas do referido rio em níveis de concentração superior ao permitida pela legislação brasileira vigente. Dessa forma, neste trabalho, um dispositivo analítico baseado em papel de teste local para a determinação do Hg^{2+} em amostras de águas naturais do Rio São Francisco da cidade ribeirinha de Penedo é apresentada. Os µPADs foram acoplados a detecção colorimétrica, baseada na reação entre o Hg^{2+} e a sonda colorimétrica ditizona, acoplada com o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) , gerando uma cor proporcional à concentração deste metal.

Portando, os objetivos para desenvolvimento deste trabalho consistiu em desenvolver, avaliar e aplicar layout usado na confecção dos µPAD para detecção colorimétrica rápida in situ da espécie em estudo; Avaliar a adequação dos µPAD em proposta qualitativa para espécie em estudo; Avaliar volume e tempo de reação no µPAD; Empregar a ditizona, como reagente colorimétrico para determinação e quantificação de Hg^{2+} acoplado ao CTAB; Estudar as condições de aplicação da amostra, envolvendo parâmetros como: volume dos reagentes, pH; e sistema de cor, canais de cor e concentração dos analitos e dos reagentes colorimétricos e por fim avaliar algumas figuras de mérito do método de quantificação dos metais em µPAD a partir dos parâmetros: linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.

MATERIAL E MÉTODOS

A. Material e reagentes

Todas as substâncias utilizadas durante os procedimentos experimentais foram de grau analítico de pureza, não sendo necessária qualquer purificação adicional . Foi preparada uma de 10,0 $g.L^{-1}$ de ditizona-CCl_4 , dissolvendo 0,5 g de ditizona em 50 mL de CCl_4. Logo em seguida, 250 µL de ditizona-CCl_4 e 1250 µL de NaOH (1,0 $mol.L^{-1}$) foram misturados (na proporção de 1:5) em um frasco de vidro marrom de 2 mL seguido de agitação por 40 s. A ditizona foi extraída em solução de NaOH e a solução de ditizona em líquido aquoso foi então usada como reagente cromogênico. Os reagentes cromogênicos também podem ser preparados dissolvendo diretamente a ditizona em solução aquosa de NaOH. No entanto, a ditizona deve ser preparada diariamente porque a ditizona em líquido aquoso é instáve. Soluções tampão de ácido bórico foi preparada (0,12 $mol.L^{-1}$), então ajustando o pH para um valor de pH desejável com 0,2 $mol.L^{-1}$ NaOH. Uma solução padrão estoque de Hg (1,0 $g.L^{-1}$) foi preparada dissolvendo 0,1480 g $HgSO_4$ em 10 mL de água, seguido pela adição de 0,83 mL de H_2SO_4 concentrado e depois diluído para 100 mL. As soluções padrão de trabalho de Hg(II) foram preparadas por diluição apropriada da solução padrão estoque de Hg(II) com tampão. O CorelDRAW X3 foi usado para projetar a barreira hidrofóbica em µPADs. As barreiras hidrofóbicas de cera foram impressas no papel de filtro (102, Hangzhou Xinhua Paper Limited, Hangzhou, China) usando uma impressora de cera comercial (Xerox ColorQube 8580) (adaptação de Cai et. al.,2017).

B. Fabricação dos dispositivos baseados em papel

Utilizando o software Adobe Illustrator® , os layouts de spot test de 5 mm de diâmetro foram escolhidos para o experimento e assim foram gerados e impressos em uma impressora de cera Xerox ColorQube® (Xerox, Norwalk, CT) usando papel de filtro como substrato. Logo em seguida, um procedimento de aquecimento foi utilizado nos dispositivos em uma chapa térmica a 90 ° C por 2 minutos, para permitir que a cera derretesse e criasse barreiras hidrofóbicas. Por fim, para evitar vazamento e contaminação da solução, uma fita adesiva foi colocada na parte inferior dos spot test, que depois é aplicado a uma placa de vidro (previamente limpa) para facilitar o manuseio.

C. Procedimento para determinação do Hg^{2+}

Com os µPADs prontos, sob condições otimizadas, o procedimento de determinação do Hg^{2+} foi realizado da seguinte forma: 1,0 µL da solução de DT (10 g/L, em solução de tetracloreto de carbono) foi aplicada no spot test e deixado secar ao ar por 15 min. Em seguida, 1,0 µL de solução de amostra ou solução padrão contendo íons de mercúrio (Foram feitas

varias diluições da solução estoque), foi pipetada no reservatório e o dispositivo baseado em papel foi deixado secar ao ar, novamente, cerca de mais 15 min e então as imagens foram capturadas para a análise. A detecção colorimétrica foi realizada utilizando uma scanner Samsung Xpress M2070W para a aquisição de imagens e resolução de 600 dpi. A intensidade RGB (Red, Green, Blue) foi analisada com o software Corel Draw x7 e aplicada para quantificar os parâmetros analíticos de intensidade de cor. Os íons de mercúrio reagem com a ditizona depositada no canal anteriormente para formar um complexo colorido, o produto precipita no canal devido à insolubilidade em líquido aquoso.

A otimização da metodologia proposta foi realizada utilizando a inclinação da curva de calibração (sensibilidade analítica) como principal parâmetro de comparação das condições avaliadas. Eventualmente, outros parâmetros analíticos como sinal do branco, faixa linear e limites de detecção e quantificação foram utilizados como ferramentas avaliação das condições experimentais no desenvolvimento da metodologia proposta. Assim, a Equação 1 apresenta a equação utilizada para a avaliação dos parâmetros analíticos:

$$\left[\frac{M_b - M_r}{M_b}\right] = aC_{\text{ranitidina}} + b \qquad (1)$$

D. Procedimento para avaliação da influência do CTAB na determinação do Hg^{2+}

Após as condições otimizadas, foi realizado um teste para analisar a influência Baseado nessa estratégia, CTAB foi avaliado neste trabalho para verificar se uma melhoria significativa na intensidade de cor pudesse ser observada na presença desse tensoativo catiônico. Para tanto, duas diferentes concentrações de CTAB (6 mM e 12mM) foram adicionadas ao meio reacional e curvas analíticas foram construídas para avaliar a influência desse composto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. Extração e aplicação da Ditizona

O método espectrofotométrico baseado em ditizona é um método analítico padrão que tem sido amplamente utilizado para detecção de íons de mercúrio/ íons de chhumbo com alta precisão. A ditizona reage com íons de mercúrio para formar um complexo e então é extraída para a fase orgânica. A absorbância da fase orgânica foi então medida para detectar os teores de Hg. No entanto, este método é limitado pela operação trabalhosa e demorada. Além disso, são necessários instrumentos caros e grandes quantidades de solvente orgânico. A técnica de detecção colorimétrica, baseada na analise dos sinais da cor apresentada no dispositivo analíticos de papel vem recebendo considerável atenção para detecção dos metais pesados. Dessa forma , nos experimentos iniciais foi utilizada a ditizona-CCl_4 como reagente colorimetrico e depositada no canal, no entanto, a barreira hidrofóbica de cera foi rompido pelo reagente devido ao uso de solvente orgânico (Figura 1A), além disso, se fosse diminuída a quantidade do volume de 1µL para 0,5 µL não preenchia a totalidade do espaço no reservatório. Para resolver este problema, a ditizona foi preparada em líquido aquoso, onde uma solução de NaOH 1,0 $mol.L^{-1}$ e uma ditizona-CCl_4 10,0 $g.L^{-1}$ foram misturadas de modo que a ditizona foi extraída para solução aquosa.

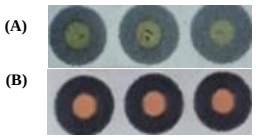

Figura1. µPAD na presença de Ditizona dissolvida em CCl_4 (A) e solução de NaOH (B)

Após a extração da ditizona para solução aquosa, o agente colorimétrico foi utilizado para no reservatório do dispositivo, evitando assim a quebra da barreira de cera pelo reagente (Figura 1B), uma quantidade adequada de reagentes cromogênicos foi depositada no canal e foi colocada para secar ao ar à temperatura ambiente (Figura 2B) . Uma solução contendo íons de mercúrio/íons de chumbo é então colocada no reservatório circular por pipetagem. À medida que a solução se espalhava no canal devido à ação capilar, os íons de mercúrio reagiam com a ditizona depositado no canal para formar um complexo colorido insolúvel, que precipitaria no dispositivo para formar uma faixa colorida (Figura 2B). Quanto mais analito era adicionado, ou seja, quanto maior a concentração dos metais, mais reagentes colorimétricos (ditizona) no canal seriam consumidos, logo maior a intensidade da cor apresentada no reservatório. A quantificação visual foi obtida medindo-se a cor por meio dos parâmetros derivados dos canais RGB.



Figura 2. µPAD na presença de Ditizona dissolvida em CCl_4 em solução de NaOH (A) reação colorimétrica na presença do Hg^{2+} (B).

B. Avaliação da Concentração do Hg^{2+}

Inicialmente foi avaliada a concentração do mercúrio na presença da ditizona extraída presente no reservatório do dispositivo. A correlação avaliada foi o valor de média de intensidade de pixel corrigido (IPC), obtida através de um tratamento matemático a fim de converte-los a um comportamento ascendente (equação 1). Sendo assim, visando um sistema de cor que pudesse descrever melhor a variação de IPC, foi avaliado os resultados para a escala RGB. Os Canais RGB, vermelho, verde e azul foram estudados separadamente pelo método colorimétrico. Como pode ser visto na figura 3.

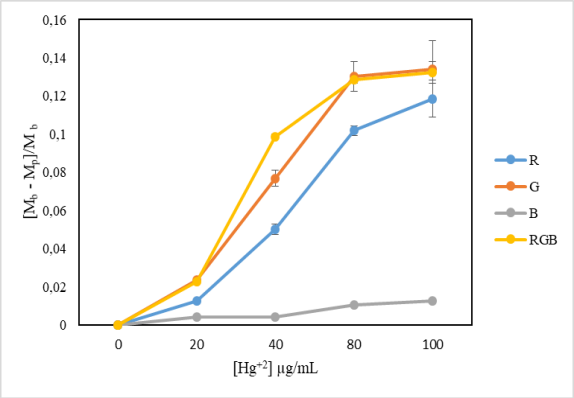

Figura 3: variação de concentração do Hg^{2+} em solução tampão de ácido bórico (1 µL) , pH=9, na presença da solução de ditizona-CCl_4 (10 g/L), analisada nos canais R,G,B e RGB.

Tabela 1 - Comparação entre os coeficientes de correlação de Pearson e inclinação da reta para os canais de cor da escala RGB.

CANAIS	RGB	R	G	B
R	0,9109	0,9625	0,95	0,9375
INCLINAÇÃO DA RETA	0,037	0,0326	0,0375	0,0032

O comportamento na escala de cor RGB pode ser melhor avaliado pelos valores da Tabela 1, pois encontra-se os valores de inclinação da reta e coeficiente de correlação de Pearson para os canais supracitados. Com um valor de R= 0,9625 e inclinação da reta de 0,0326 o canal vermelho foi escolhido como o mias satisfatório. No entando, após a obtenção destes primeiros resultados, foi realizado um segundo teste com uma faixa maior de concentração para os íons de mercúrio conforme é apresentado na figura 4.

Analisando os valores de cada canal de cor individualmente, na escala RGB, observou-se que apenas o canal vermelho apresentou todos os valores positivos, como pode ser visto na Tabela 2. Observando graficamente, na Figura 4, a correlação da intensidade do sinal com a concentração nos dados provenientes dos canais RGB, verde e azul são insatisfatórios quando comparados com os dados apresentados no canal vermelho, com maior valor de coeficiente e maior sensibilidade para o dispositivo em questão.

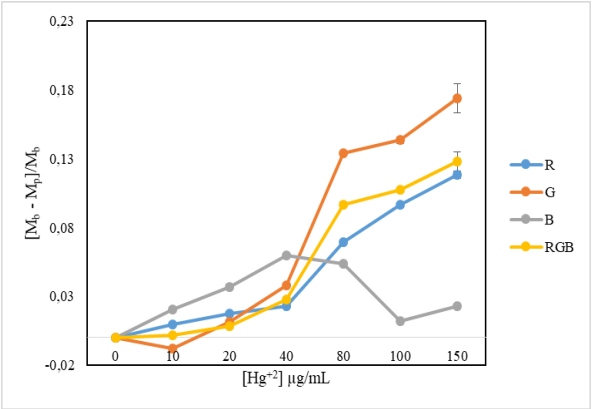

Figura 4: variação de concentração do Hg^{2+} em solução tampão de ácido bórico (1 µL) , pH=9, na presença da solução de ditizona-CCl_4 (10 g/L), analisada nos canais R,G,B e RGB.

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

CANAIS	RGB	R	G	B
R	0,8994	0,9207	0,8976	0,0581
INCLINAÇÃO DA RETA	0,0244	0,020	0,033	0,0024

C. Teste de estabilidade de cor

A estabilidade da cor gerada nos dispositivos foi avaliada. Assim, mantendo fixa uma concentração de íons de mercúrio (100 µg/mL) e utilizando os parâmetros otimizados nas etapas anteriores, a intensidade de pixels foi utilizada como parâmetro analítico para comparar os dados obtidos (Figura 5). Medições foram efetuadas inicialmente de 15 em 15 minutos e após a primeira hora, as medições foram efetuadas em intervalos de 30min, após duas horas de analise , as medições foram feitasem intervalos de 60min com uma duração total do experimento de 4 horas.

Evidencia-se pelo gráfico que nos primeiros 4 horas de experimento e observação a cor obtida nos dispositivos não apresenta alteração expressiva, com variação de apenas 5% nesse intervalo de tempo, no entando foi necessário limitar um tempo para realizar as medições e obter um padrão de cor. Sendo assim,

para padronizar a medição de cor e evitar possíveis erros definiu-se o tempo para medição da cor dos dispositivos em 15min. Este tempo possibilita a análise e avaliação dos dispositivos sem comprometer a frequência analítica, o que é um parâmetro importante para dispositivos baseados em papel. Não obstante, a utilização de estratégias para melhorar a estabilidade e homogeneidade da cor dos µPADs foram realizadas na etapa subsequente da otimização do método proposto.

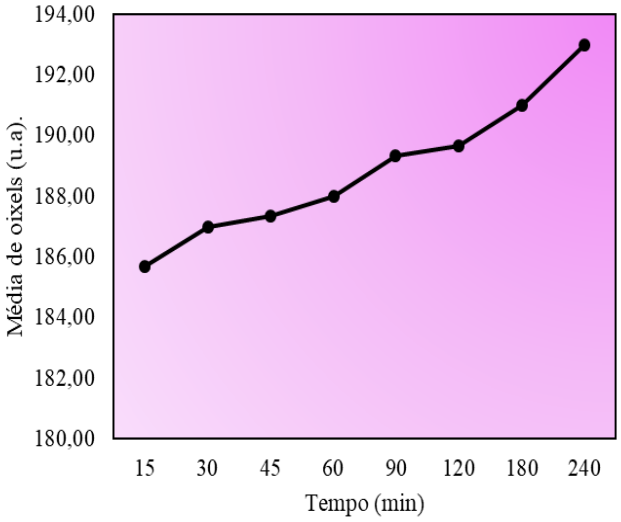

Figura 5 - Gráfico com os resultados obtidos para o teste de variação da cor ao longo do tempo na presença do mercúrio com concentração de 100µg/mL em solução tampão de ácido bórico , pH= 9,0. Analisado apenas no canal vermelho (R).

D. Avaliação da influência do CTAB

Tensoativos são bastante utilizados em química analítica devido à possibilidade de modificar o meio reacional e melhorar tanto a sensibilidade quando a seletividade analítica (JÚNIOR, 2019). Entre esses tensoativos, destaca-se o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), um tensoativo catiônico que é constantemente utilizado em aplicações em eletroforese capilar e sistemas microfluídicos, por facilitar a separação de analitos (MANIASSO, 2001; TAVARES, 1996).

No desenvolvimento de metodologias colorimétricas baseadas em dispositivos de papel o CTAB também apresenta papel importante na estabilidade e homogeneidade da cor. Silva e colaboradores (2018) utilizaram CTAB para aprimorar a resposta analítica do sistema desenvolvido para a determinação de fenacetina. Os autores reportaram que a formação de micelas no meio reacional proporcionou uma melhor intensidade na cor.

Baseado nessa estratégia, CTAB foi avaliado neste trabalho para verificar se uma melhoria significativa na intensidade de cor pudesse ser observada na presença desse tensoativo catiônico. Para tanto, duas diferentes concentrações de CTAB (6Mm e 12mM) foram adicionadas ao meio reacional e curvas analíticas foram construídas para avaliar a influência desse composto (Figura 6).

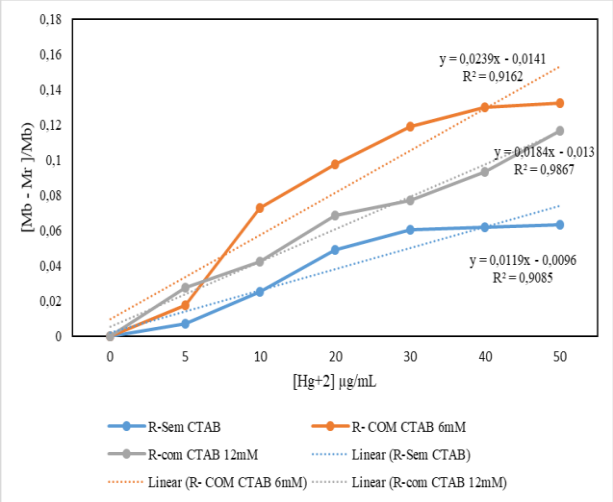

Figura 6- Gráfico com os resultados referentes à avaliação da influência de CTAB na determinação de íons de mercúrio (II) utilizando ditizona como sonda colorimétrica . Analisada apenas no canal vermelho (R).

Como pode ser observado no gráfico acima, a presença de CTAB no meio reacional proporcionou um ganho significativo na inclinação das curvas analíticas quando comparado com a curva de referência e, por conseguinte, na sensibilidade analítica. Desta forma, optou-se por utilizar CTAB na concentração de 12mM no meio reacional já que foi obtido um ganho significativo na sensibilidade alcançado com a inclusão do tensoativo catiônico no sistema. Sendo assim, foi possível realizar teste com mercúrio acoplado ao CTAB em menores cocentrações, como é apresentado na figura 7.

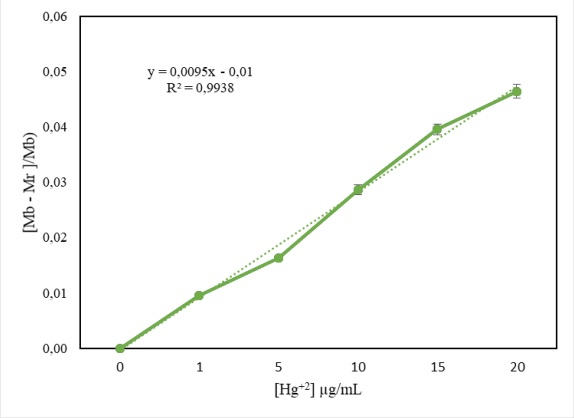

Figura 7- Utilização do CTAB na determinação de íons de mercúrio (II) em menores concentrações, tendo a ditizona como sonda colorimétrica , Analisada apenas no canal vermelho (R).

Na avaliação da linearidade, os valores do canal vermelho tiveram correlação superior a 0,991. O limite de detecção determinado foi 0,99 µg.mL^{-1} e o limite de quantificação foi de 3,0 µg.mL^{-1} , com faixa linear de 1 – 20 µgl.mL^{-1}.

CONCLUSÃO

Neste presente estudo foi abordado desenvolvimento de uma metodologia de determinação do Hg^{2+} que utilizou de detecção colorimetria. Apresentando resultados satisfatório para determinação deste metal. Na obtenção dos dados a partir de diferentes canais de cor da escala RGB obteve-se resultados diferentes para esses canais de cor onde, para esta metodologia proposta, com canal R apresentou um comportamento mais satisfatório. O volume otimizado para este dispositivo foi de 1µL tanto para o analito quanto para o agente colorimétrico. Além disso este layout testado constituído por barreira hidrofóbica de 2mm apresentou um comportamento satisfatório.

A utilização da metodologia proposta para futuras analises e determinação do Hg^{2+}em amostras águas naturais será possível, tendo em vista todos os resultados obtidos no procedimento de avaliação e desenvolvimento dessa metodologia. Parâmetros como pH, tampão, temperatura e concentração de ditizona foram otimizados e evideciaram que a resposta analítica mensurada é dependente desses parâmetros. A metodologia apresentou faixa linear de 1 – 20 µg.mL^{-1}., O limite de detecção determinado foi 0,99 µg.mL^{-1} e o limite de quantificação foi de 3,0 µg.mL^{-1} .

De modo geral, os µPADs com detecção colorimétrica empregados, neste trabalho apresentaram potencialidade elevada para a análises futuras em amostras reais de águas naturais do Rio são frasncisco da cidade ribeirinha de Penedo, pois o método proposto supera incovenientes como alto custo, procedimento laborioso, alto consumo de amostra e reagentes e outros problemas comuns para metodologias já estabelecidas na literatura. Portanto, a metodologia proposta é simples, barata, rápida e eficaz para a determinação deste metal em amostras águas naturais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Cnpq, bem como ao Laboratório de eletroquímica e microssistemas de análise (LEMAN) por contribuir para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço meus orientadores e colaboradores por todo apoio e ajuda.

REFERÊNCIAS

Cai, L. et al. Visual quantification of Hg on a microfluidic paper-based analytical device using distance-based detection technique. Aip Advances, v. 7, n. 8, p. 085214, 2017.

Clevenger, W. L.; Smith, B. W.; Winefordner, J. D. Trace determination of mercury: A review. Critical Reviews in Analytical Chemistry, v. 27, n. 1, p. 1–26, 1997.

Firdaus, M. L. et al. Smartphone coupled with a paper-based colorimetric device for sensitive and portable mercury ion sensing. Chemosensors, v. 7, n. 2, 1 jun. 2019.

Gao, C.; Huang, X. J. Voltammetric determination of mercury(II). TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 51, p. 1–12, 2013.

Júnior, J. G. F. Desenvolvimento de um dispositivo microfluídico híbrido pdms/vidro para a detecção e separação de glifosato e ampa em amostras ambientais. [S.l.]: Universidade Federal de Alagoas, 2019.

Larbi O. et al. Preparation of novel nanocomposite consisting of bismuth particles, polypyrrole and multi-walled carbon nanotubes for simultaneous voltammetric determination of cadmium(II) and lead(II). Synthetic Metals, v-253, p. 1-8, 2019.

Maniasso, N. Ambientes micelares em química analítica. Quimica Nova, v. 24, n. 1, p. 87–93, 2001.

Martinez, A. W. et al. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. Angewandte Chemie - International Edition, v. 46, n. 8, p. 1318–1320, 2007.

Martín-yerga, D.; González-garcía, M. B.; costa-garcía, A. Electrochemical determination of mercury: A review. Talanta, v. 116, p. 1091–1104, 2013.

Monisha et al. Inkjet-printed paper-based colorimetric sensor coupled with smartphone for determination of mercury (Hg^{2+}). Journal of Hazardous Materials, v. 414, 2021.

Ruchi D. S. et al.. Drumstick activated charcoal tablets: Potential biosorbent material and its application to remove heavy metals via MATLAB assisted paper based sensor. Materials Today: Proceedings,v. 46, p. 6382-6387, 2021.

Sall, m. l et.. Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. Environmental Science and Pollution Research, v. 27, 2020

Silva, G. O. ; Araujo, W. R. ; Paixão, T. R. L. C. Portable and low-cost colorimetric office paper-based device for phenacetin detection in seized cocaine samples. Talanta, v. 176, p. 674–678, 2018.

Tavares, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos.pdf. Química Nova, v. 19, n. 2, p. 173–181, 1996.

Zhang H.; Yang F-Q. Equipment-free quantitative determination of urea based on paper-based sensor via urease-mediated chitosan viscosity change. Enzyme and Microbial Technology, v. 148, 2021.