

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FERNANDO HENRIQUE RINCÃO

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO DO TIPO *POINT-OF-CARE* PARA QUANTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINA EM SANGUE CAPILAR

São Carlos, SP

2024

Fernando Henrique Rincão

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO MICRO FLUÍDICO DO TIPO *POINT-OF-CARE* PARA QUANTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINA EM SANGUE CAPILAR

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Química da Universidade de São Paulo como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador(a): Prof. Dr. Emanuel Carrilho.

São Carlos, SP

2024

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Fernando Henrique Rincão

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO MICRO FLUÍDICO DO TIPO *POINT-OF-CARE* PARA QUANTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINA EM SANGUE CAPILAR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Química, como requisito parcial
para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Aprovado em: ___/___/___.

Prof. Dr. Emanuel Carrilho _____

Prof. Dra. Fernanda Canduri _____

Dr. Marcos Lázaro Moreli _____

Prof. Dr. Sérgio Antônio Spinola Machado _____

Dr. Filipe Sampaio Reis da Silva Benvenuto _____

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq e ao PUBE, por financiarem o meu projeto. Agradeço à minha família e minha companheira, pilares fundamentais para minha jornada, tão serena e abençoada. Agradeço também à Mariana, minha querida amiga, sem teu apoio, orientação e dedicação, este trabalho não seria o que é. Agradeço ao Tao, por me ensinar a amar.

Resumo

Países em desenvolvimento apresentam prevalência de anemia em crianças de até cinco anos e mulheres grávidas; embora não tenha sido feito levantamento nacional, no Brasil, estima-se que 4,8 milhões de pré-escolares são vitimados pela anemia. Pesquisas nacionais indicaram prevalência de 20,9% de anemia, em crianças, embora com alta variação regional. Testes laboratoriais podem ser realizados para quantificar a hemoglobina, embora estes encareçam o custo da análise. Propôs-se desenvolvimento de dispositivo microfluídico de papel para quantificar a hemoglobina em sangue capilar, através de análise colorimétrica. Dispositivo apresentou estabilidade para os valores de vermelho ao longe de 1 mês, e a variação do volume de amostra não afetou o resultado de vermelho. Houve baixa correlação entre o sangue capilar e o venoso, e entre os valores de RGB e de hemoglobina. Faz-se necessário utilizar modelos matemáticos mais complexos, capazes de descrever a correlação entre os valores de RGB e a concentração de hemoglobina.

Palavras-chave: Hemoglobina, colorimétrico, RGB, Drabkin, μ PAD, capilar.

Abstract

Developing countries exhibit a high prevalence of anemia in children under five years old and pregnant women; although no national survey has been conducted, in Brazil, it is estimated that 4.8 million preschoolers are affected by anemia. National studies have indicated a prevalence of 20.9% of anemia in children, although with significant regional variation. Laboratory tests can be performed to quantify hemoglobin, although they increase the cost of the analysis. The development of a paper-based microfluidic device was proposed to quantify hemoglobin in capillary blood through colorimetric analysis. The device showed stability for red color value over the course of one month, and the variation in sample volume did not affect the red color result. There was low correlation between capillary and venous blood, and between the RGB values and hemoglobin levels. More complex mathematical models are needed, capable of describing the correlation between RGB values and hemoglobin concentration.

Keywords: Hemoglobin, colorimetric, RGB, Drabkin, μ PAD, capillary.

Sumário

1. Introdução.....	Página 7
2. Objetivos.....	Página 15
3. Materiais e Métodos.....	Página 15
4. Resultados e Discussões.....	Página 19
5. Conclusão.....	Página 42
6. Referências.....	Página 42

1. INTRODUÇÃO

O ferro cumpre papel fundamental em diversos processos biológicos, como a respiração, a proliferação celular e a produção de energia no organismo, sendo elemento essencial para a produção de hemoglobina (Hb), uma proteína encontrada nos glóbulos vermelhos do sangue.¹ A hemoglobina encontrada em adultos (Hb A) é formada por duas partes, o grupo heme e a cadeia globínica; duas subunidades globínicas, denominadas α e β , se unem, formando os dímeros $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$, que então se unem formando um tetrâmero.² Cada uma das quatro subunidades enrola-se sobre sua própria estrutura, assumindo uma conformação esferoidal; ao centro de cada uma dessas estruturas, encontra-se um agrupamento heme.² O envolvimento do grupo heme pela cadeia globínica propicia um sítio de ligação hidrofóbico para o oxigênio, que acaba por favorecer a interação Heme-O₂.² O grupo heme é constituído por um átomo metálico de ferro, coordenado com quatro anéis pirrólicos; o quinto sítio de coordenação é ocupado por um aminoácido histidina, enquanto que o sexto sítio de coordenação do ferro consiste justamente no sítio reacional do grupo heme, em que ocorre a coordenação do oxigênio, orientada com o auxílio de outro aminoácido histidina.^{3,4} A hemoglobina é construída de forma a facilitar o carregamento de oxigênio nos pulmões, onde a pressão parcial de oxigênio é relativamente alta, e facilitar o descarregamento de oxigênio nos tecidos, onde a pressão parcial de oxigênio é consideravelmente menor; isso se dá pelas suas características alostéricas.⁴ Uma proteína alostérica é aquela que é capaz de mudar sua estrutura terciária ao ocorrer a ligação de alguma molécula (substrato, produto, etc.) em um sítio distinto de seu sítio reacional (sítio alostérico); no caso de uma proteína formada por múltiplas subunidades, a ligação de um substrato em um sítio reacional de uma das subunidades pode ocasionar mudanças conformacionais nos sítios reacionais das outras subunidades. Isto é, de fato, o que ocorre com a hemoglobina, segundo propõe o modelo de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF), de tal modo que a ligação de uma molécula de O₂ a um grupo heme aumenta a afinidade dos outros grupos heme ao oxigênio.⁴

Estima-se que diariamente o consumo de ferro necessário seja de 25 mg. No entanto, altos níveis de ferro podem causar intoxicação, de modo que existe um limite para

quanto ferro o organismo é capaz de absorver diariamente, sendo este de 1 mg a 2 mg por dia.¹ Dada a sua importância, o corpo humano evoluiu no sentido de priorizar a conservação do ferro no organismo, desenvolvendo mecanismos de reciclagem das hemácias após a hemólise, além da ausência de mecanismo para sua excreção.^{1,5} Boa parte do ferro necessário é obtido através do processo de reciclagem dos eritrócitos pelos macrófagos, sob regulação do hormônio chamado hepcidina.¹ Desse modo, as causas mais comuns para a redução do conteúdo de ferro do organismo são a perda de sangue e o desprendimento de células da superfície do nosso corpo, como células epiteliais.⁵ Certas condições, no entanto, demandam um aumento da quantidade de hemácias, como por exemplo o aumento da massa tecidual, em crianças, e o crescimento fetal durante a gravidez; e com o aumento da demanda de eritrócitos, existe o aumento da demanda de ferro pelo organismo.⁵ Nesse contexto, a deficiência de ferro pode vir a se desenvolver conforme a quantidade de ferro obtida através da alimentação e da suplementação é inferior à demanda de ferro do organismo, levando a um esgotamento das reservas de ferro, podendo à longo prazo levar à uma redução na produção de hemácias.⁵ Compreende-se, portanto, que a redução na concentração de hemoglobina no sangue é indicativo de estado crítico quanto à disponibilidade de ferro no organismo, uma vez que a reposição das reservas de ferro é limitada pela quantidade do elemento que pode ser absorvida diariamente.

Outro fator importante a ser considerado é a biodisponibilidade do ferro presente nos alimentos que consumimos devido a suas diferentes formas, sendo estas a forma “heme” e a “não-heme”.⁵ O ferro é absorvido pela mucosa do jejuno, promovido pelo ácido ascórbico, de modo que parte do ferro é incorporado pelas mitocôndrias das células intestinais, enquanto que parte do ferro atravessa o citoplasma, e entra na corrente sanguínea.² A forma “heme” pode ser absorvida como tal, pela mucosa intestinal, onde sofre a ação da enzima hemeoxigenase, que separa o grupo heme do ferro; o elemento metálico segue a via de absorção padrão, após a separação.^{2,5} Paralelamente, a forma “não-heme”, diz respeito ao ferro que pode ser encontrado em vegetais e cereais.⁵ É importante ressaltar que a absorção do ferro “não-heme” é dependente da digestão ácida, e a sua efetividade pode variar largamente, com base na concentração de compostos que auxiliem o processo de absorção, como é o caso do ácido ascórbico (vitamina C), e também de compostos que inibem essa absorção, como é o caso do elemento cálcio.⁵

Para além dos mecanismos de absorção do ferro, é importante levar em conta os processos fisiológicos que levam à perda excessiva deste nutriente. É notado que em países em desenvolvimento, como o Brasil, a população é vítima recorrente de infecções parasitárias devido à precariedade do saneamento básico. Parasitas como o *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose, podem levar à perda crônica de sangue, através do desenvolvimento de processos hemorrágicos dentro do intestino.¹ Adicionalmente, dietas baseadas em cereais podem reduzir a biodisponibilidade do ferro ingerido, uma vez que a presença do ácido fítico, contidos em grãos, têm a capacidade de sequestrar o ferro, resultando em um complexo de difícil absorção pelo organismo.¹ Neste contexto, pode-se afirmar que grupos de pessoas que, que naturalmente já exibem uma maior demanda de ferro, tais como crianças e gestantes, quando em condições de desnutrição ou de uma dieta não balanceada, e na ausência de saneamento básico adequado, podem experienciar quadros severos de anemia.

Paralelamente, a Organização Mundial de Saúde (OMS), do inglês (WHO), define a anemia como “condição na qual a concentração de hemoglobina está abaixo do normal”, possuindo causas multifatoriais e com diferentes denominações. Uma das causas mais comuns para a anemia é a já mencionada deficiência em ferro, uma vez que o ferro é um componente fundamental na formação da hemoglobina. Esta forma específica da anemia é classificada como *anemia ferropriva*.⁶ A OMS classifica como pessoa anêmica aquela que apresenta valores de hemoglobina abaixo de 11 g/dL, sendo ainda classificada como anemia grave quando os valores de Hb estão abaixo de 9,5 g/dL.⁷ É importante ressaltar, no entanto, que a concentração de hemoglobina no sangue varia naturalmente conforme a idade e gênero (Tabela 1), além de poder variar em função de gravidez ou ciclo menstrual.⁶

Tabela 1. Valores de referência para Hemoglobina (Hb) de acordo com a faixa etária e gênero.⁷

	Sexo		Crianças	
	M	F	2 - 6 anos	6 - 12 anos
Hb (g/dL)	13,0 – 17,0	12,0- 15,0	11,1 - 14,1	11,0 - 14,0

Fonte: Autoria Própria.

A anemia ferropriva possui prevalência em crianças de até cinco anos de idade, principalmente em países em desenvolvimento, sendo que crianças entre 6 a 24 meses têm cerca de duas vezes mais chances de desenvolver esta forma de anemia do que crianças entre 25 a 60 meses.⁸ Segundo descrito por Killip et al. (2007), diversos estudos mostraram que a deficiência em ferro durante a infância pode impactar no desenvolvimento mental e psicomotor da criança, ressaltando a importância do diagnóstico e do controle da anemia.⁵

Paralelamente, a gravidez consome cerca de 700 mg de ferro durante toda sua duração, o que consiste em cerca de 2,5 mg de ferro por dia, fazendo com que a gestante necessite de uma ingestão de ferro balanceada.⁵ A gestação leva ao aumento do volume do sangue, enquanto que o desenvolvimento fetal aumenta a demanda nutricional; adicionalmente, é importante considerar que a maioria das mulheres não inicia o período gestacional disposta de reservas adequada de ferro.⁹ Diversos estudos mostram, nesse contexto, que a deficiência em ferro, principalmente nos quadros mais críticos, está associada ao aumento do risco de insuficiência cardíaca da gestante, ao nascimento prematuro e ao baixo peso do recém-nascido, aumentando inclusive o risco de mortalidade para a mãe e o feto.^{1,9}

O Brasil apresenta quadros de anemia em vários estados do território nacional, e como espelho do mundo, não se limita a condições socioeconômicas, tendo causas diversas a depender da classe social.⁹ Entretanto, não há ainda um levantamento nacional sobre a prevalência de anemia, tendo somente alguns estudos em diferentes regiões, que estimam que cerca de 4,8 milhões de pré-escolares sejam vitimados pela anemia.^{8,10} Foi realizada uma pesquisa à nível nacional no ano de 2008, e outras nacionais localizadas, entre os anos de 2000 à 2010.¹⁰ De modo geral, tais pesquisas estimaram a prevalência de 20,9% de anemia entre crianças menores de cinco anos à nível nacional, porém os índices regionais apontaram uma variação mais elevada, estando entre 36,4% a 47,8%, na mesma faixa etária.¹⁰ Entre crianças menores de três anos, a prevalência nacional oscilou entre 47,8% a 54%.¹⁰

Um estudo de revisão realizado por Jordão et al. (2008)¹⁰ avaliou que 52,8% das pesquisas apresentadas em suas fontes foram realizadas com coleta de amostra por punção capilar, com o auxílio do hemoglobinômetro para obter os resultados de concentração de hemoglobina e relacioná-los à anemia.⁸ Esta pesquisa baseou-se em 53 artigos, que compreendem cerca de 21 mil crianças, com prevalência mediana

de 53% de anemia; com maior prevalência nos territórios do Norte e Centro-Oeste. Parte considerável dos estudos foi realizado na região Sudeste. Dentre os trabalhos citados, destaca-se um estudo realizado na região Nordeste, que avaliou 777 crianças de faixa etária de 6 à 59 meses. O espaço amostral esteve dividido entre as zonas metropolitanas, urbanas (interior) e rural, resultando em prevalência de 40,9% de anemia.⁸ A maior prevalência foi observada na zona rural, com valor de 51,4%, seguido da região metropolitana com 39,6% e, zona urbana, com 35,9% ($p < 0,001$). Ainda, de acordo com os pesquisadores, foi observada uma correlação entre maior a prevalência dos quadros de anemia e baixo consumo de ferro heme, um baixo consumo de alimentos de origem animal e alto risco de parasitoses.^{8,11}

No que concerne a gestantes brasileiras, um estudo realizado no início da década de 1990 resultou que 30,3% das gestantes admitidas durante o pré-natal estavam anêmicas; ao longo do estudo, avaliou-se que 17,2% das gestantes em primeiro trimestre eram anêmicas, e esse valor subiu para 29,1% e 44,3% ao longo do segundo e terceiro trimestre.^{9,11} Houve correlação positiva entre a presença de anemia e presença de parasitas intestinais, nível educacional e estado nutricional; menores níveis educacionais apresentaram maior índice de anemia, enquanto que baixo peso da gestante foi associado a maior incidência de anemia.⁹ A concentração média de hemoglobina obtida foi de 11,4 g/dL.⁹

Ao consultar a literatura, pode-se encontrar o trabalho realizado por Rondó et al. (1999), que comparou 356 parturientes cujos bebês tiveram retardo no crescimento intrauterino (IUGR), com 356 parturientes cujos bebês obtiveram peso e ideal (ADA). Este estudo foi realizado em quatro hospitais de Campinas, São Paulo, e identificou-se que 47% das mães estavam anêmicas. A média de hemoglobina para mães com filhos IUGR foi maior do que para mães com filhos ADA, $11,2 \pm 1,73$ g/dL e $10,96 \pm 1,7$ g/dL, respectivamente, com $p = 0,004$. Neste estudo foi observado ainda a correlação entre a hemoglobina no sangue fetal e a hemoglobina no sangue materno.¹²

Segundo o estudo realizado por Côrtes et al. (2009),⁹ boa parte dos estudos realizados sobre a prevalência de anemia durante a gravidez, entre as décadas de 1970 e 2000, tiveram enfoque no estado de São Paulo, território em que a prevalência de anemia pode ser considerada de nível epidemiológico moderado à severo. Entretanto,

segundo o Índice de Desenvolvimento da Família (IDF), São Paulo é o estado mais desenvolvido do Brasil, de acordo com o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA). Com isso, pode-se induzir que a situação em estados mais pobres do Brasil deve ser ainda mais severa. Para além disso, os estudos realizados carecem de uma padronização metodológica, de modo que é difícil comparar os dados obtidos até então. Esses dados, em síntese, evidenciam a inequívoca necessidade do apoio nutricional que comunidades de baixa renda demandam, em prol da saúde da gestante e do feto.

Segundo o trabalho de Jordão et al. (2008), a partir dos seis meses de idade, esgotam-se as reservas de ferro adquiridas intraútero da criança, de modo que o ferro deve ser obtido através da alimentação. Adicionalmente, a substituição do leite materno pelo leite de vaca *in natura* pode contribuir para o esgotamento das reservas de ferro, uma vez que o íon cálcio inibe a absorção de ferro, quando o leite substitui as refeições adequadas. O estudo sintetiza a importância do acompanhamento nutricional para as crianças, durante sua fase de crescimento, além dos fatores essenciais como saneamento básico de qualidade.¹⁰

Os tratamentos atuais menos invasivos consistem na administração oral de ferro, através de sais de ferro,¹⁰ entretanto, conforme já dito anteriormente, existe um limite para a quantidade deste elemento que pode ser absorvida diariamente, pelo organismo. A medula óssea está limitada à absorção de 20 mg de ferro elemental por dia.⁵ Desse modo, leva cerca de duas a três semanas, sob terapia com ferro via oral, para observar o aumento da concentração de hemoglobina em 1 g/dL; com isso, são necessários até 4 meses para que as reservas de ferro retornem ao valor padrão.⁵ Ainda, a absorção gastrointestinal do ferro depende de condições ácidas, além de ocorrer mais rapidamente quando em jejum, porém essas condições favorecem possíveis danos causados ao estômago pela terapia de ferro via oral, como a destruição da microbiota intestinal.⁵

Tendo como contexto os efeitos da anemia ferropriva descritos acima, principalmente no que diz respeito aos países em desenvolvimento, cujas condições de saúde pública são escassas, busca-se um método barato e eficaz para a quantificação da hemoglobina no sangue, em prol do acompanhamento de grupos de risco.

A OMS determinou sete metas para o desenvolvimento de diagnósticos voltados para regiões pobres em recursos de saúde. Os testes devem corresponder à sigla “ASSURED”, que significa que o teste deve ser de baixo-custo, com sensibilidade e especificidades satisfatórias, além disso, deve levar em conta o bem estar do usuário, ser rápido e robusto, sem a necessidade de equipamentos externos e deve ser possível de ser entregue àqueles que precisam do teste.^{13,14} Neste sentido, o desenvolvimento de um teste “Point-Of-Care” (POC) para a quantificação da hemoglobina no sangue deve seguir tão bem quanto possível estas metas internacionais. Os testes devem ser capazes de manter a alta sensibilidade, lidando com volumes pequenos de amostra, sem o auxílio de equipamentos e/ou pessoal especializado.

Diversos estudos, como os apresentados por Pandey et al. (2017), exploram os usos de dispositivos micro fluídicos como potenciais soluções para a produção de métodos de diagnóstico do tipo POC.¹⁴ Além destes dispositivos trabalharem com pequenos volumes de amostra, é possível construir sistemas intrincados, que podem tratar a amostra antes da realização da análise, minimizando o número e a complexidade dos passos tomados pela pessoa que realiza o teste; em suma, os dispositivos micro fluídicos são plataformas de alta versatilidade. O preparo da amostra é um dos pontos mais complexos no que concerne os dispositivos POC; nesta etapa, podemos encontrar problemas quanto a homogeneidade da amostra, ou quanto a presença de interferentes ou inibidores.¹³ O objetivo com o preparo da amostra é aumentar a concentração do analito de interesse enquanto reduz o ruído causado pelos interferentes presentes na matriz.¹³

Os dispositivos microfluídicos podem ser confeccionados a partir de uma série de substratos, como termoplásticos, policarbonatos, silicone, vidro e papel.¹⁵ A diversidade de substratos é fundamental para que seja possível trabalhar com uma variedade de combinações envolvendo as propriedades físico-químicas do analito de interesse e do solvente, de modo geral.¹⁵ A vantagem dos dispositivos baseados em papel é que não há a necessidade do uso de bombas para dispersar os reagentes e amostra pelo sistema; os poros do papel são capazes de drenar as soluções através do efeito de capilaridade.^{13,14} Para além disso, a estrutura porosa tridimensional do papel, aliada à construção de barreiras hidrofóbicas¹⁴ utilizando impressão em cera, permite à realização de diversos testes simultâneos, utilizando a mesma amostra.¹³

Nesse sentido, diversos sistemas podem ser construídos, em que a amostra pode passar por uma série de processos, dentro do próprio dispositivo. O papel também se mostra um excelente substrato para análises de amostras biológicas, uma vez que seu descarte pode ser realizado pela incineração.¹³

Entretanto, não basta construir um dispositivo apenas com uma boa plataforma, como o papel; uma análise quantitativa típica também necessita de um volume de amostra previamente determinado, um tempo de análise padronizado, um detector (que por vezes demanda uma fonte de energia), e reagentes que permitam sensibilidade e especificidade; o dispositivo micro fluídico de papel ideal, portanto, deveria ser um “teste autocontido”, ou seja, um teste no qual o usuário apenas insere a amostra e lê o resultado obtido.¹³

No que diz respeito à análise da concentração de hemoglobina, o padrão-ouro é o método de Drabkin. Este método consiste em reagir a hemoglobina, presente no sangue, com o reagente de Drabkin, composto por ferricianeto de potássio e cianeto de potássio, de modo a formar um complexo estável com absorbância bem definida em 540 nm. A hemoglobina, que apresenta o ferro no estado Fe^{2+} , pode ser oxidada ao estado Fe^{3+} , sendo chamada de metahemoglobina; o cianeto apresenta maior afinidade à forma Fe^{3+} , reagindo para formar o complexo cianometahemoglobina.¹⁶ Com o valor de absorbância lido, é possível encontrar a concentração de hemoglobina na amostra. Uma vez que o cianeto compete com o oxigênio para a complexação com a hemoglobina, pode ser possível transferir o teste de Drabkin para o papel, evitando assim o uso de espectrofotômetros.

Grande parte dos aparelhos celulares são construídos com uma câmera, de modo que estes podem ser utilizados em técnicas colorimétricas; entretanto, mesmo com o uso de uma tabela de calibração, a interpretação dos celulares baseada em cor e intensidade ainda é subjetiva, e pode ser influenciada pela luz ambiente, além de muitos modelos não serem a prova d’água, impossibilitando análises em cenários mais extremos.¹³ Tendo isso em conta, os celulares smartphones ainda são uma alternativa de baixo custo e alta acessibilidade, quando comparados a algo como um espectrofotômetro.

Ranganathan e Gunasekaran (2006) utilizaram uma rede neural para correlacionar as concentrações de hemoglobina, medidas com auxílio de um hemoglobinômetro, com

os valores de RGB medidos, através do tratamento de imagens das amostras de sangue em lâminas de vidro, capturadas com o auxílio de uma câmera digital.¹⁷ Os resultados mostraram forte correlação entre os valores de RGB e a concentração de hemoglobina no sangue capilar.¹⁷ Nesse contexto, seria proveitoso avaliar o efeito individual de cada parâmetro do RGB, com relação à concentração de hemoglobina no sangue capilar.

Com base em tudo o que foi discutido, propõe-se o desenvolvimento de um dispositivo micro fluídico baseado em papel, funcionalizado com o reagente de Drabkin, para quantificação da concentração de hemoglobina em amostra de sangue capilar, através da leitura do valor de RGB, obtido através do tratamento da imagem da mancha de sangue capilar sobre o papel, sendo a imagem capturada por smartphone. O objetivo é o desenvolvimento de um dispositivo simples, de baixo custo, do tipo “autocontido”, cujo resultado seja lido com o auxílio de um Smartphone, tendo em vista o atendimento de grupos de risco em comunidades pobres em recursos de saúde.

2. OBJETIVOS

Desenvolver dispositivo microfluídico do tipo “Point-Of-Care” para diagnóstico de anemia ferropriva pela quantificação da hemoglobina no sangue capilar.

3. Materiais e Métodos

3.1. COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de sangue (capilar ou venoso) utilizadas nos testes, foram coletadas dentro do laboratório BioMicS, seguindo as normas da NBR 14785. Todas as amostras foram obtidas somente após o consentimento dos voluntários, e assinatura da TCLE (CAAE 15478519.1.3001.8148). O modelo de TCLE utilizado está representado no Anexo I (via do pesquisador). As amostras de sangue venoso foram

coletadas por agente técnico especializado, enviado pelo laboratório de análise clínicas que realizou o hemograma.

As amostras de sangue capilar transcutâneas foram obtidas e analisadas imediatamente, variando entre análise por μ PAD e pelo Método de Drabkin. Já as amostras de sangue venoso foram coletadas em tubo de EDTA e utilizadas para obtenção de um Hemograma, análise por μ PAD e pelo Método de Drabkin. As amostras de sangue venoso foram armazenadas em geladeira (4 °C) e utilizadas em até 7 dias.

3.2. PREPARO DO μ PAD PARA ANÁLISE DE HEMOGLOBINA

Para a realização dos experimentos, foram cortados pedaços de papel filtro Whatman nº 1, de dimensões 30 x 40 mm, sobre os quais foi depositado 200 μ L do reagente de Drabkin (Sigma-Aldrich). Os testes foram realizados com os papéis já secos, e cuja secagem foi realizada à temperatura ambiente.

3.3. AQUISIÇÃO DE IMAGEM E TRATAMENTO DE DADOS

A captura da imagem das manchas formadas pelas amostras sobre o papel foi realizada utilizando um Smartphone Galaxy A32 (Samsung). A captura das imagens foi realizada com o auxílio de uma caixa impressa em 3D que contém um suporte para o celular, e é equipada com um sistema de iluminação LED energizado por pilhas, de modo a evitar variações na medida de RGB causadas pela instabilidade da iluminação do ambiente de testes. A caixa utilizada foi emprestada por um membro do Grupo BioMicS, membro da linha de pesquisa que originou este trabalho. Esta foi projetada com uma entrada para alocar o dispositivo de papel sempre na mesma posição, e para que a captura da imagem seja feita na ausência de luz externa. As imagens foram posteriormente processadas utilizando o software “ImageJ”, que possibilitou a aquisição dos valores de área e de RGB referentes à mancha formada.

Os dados obtidos foram analisados pelo Excel, e foram obtidos dados de média, desvio padrão e coeficiente de variação. Foram realizados testes de média utilizando o software Statistica (Tibco) e análises de correlação entre os diferentes procedimentos.

3.4. ADIÇÃO DE COMPOSTO TENSOATIVO AO μ PAD

Os compostos tensoativos utilizados foram a glicerina (Synth), o Triton X-100 (Sigma-Aldrich), o Tween-20 (Synth) e o Tween-80 (Synth). As diluições utilizadas para o Tween-20 e para o Tween-80 foram realizadas com água Milli-Q nas proporções de 10%, 2% e 1% (v/v), enquanto para a glicerina, utilizou-se as proporções de 20%, 10% e 1% (v/v). Para o Triton X-100, utilizou-se as concentrações de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5% (v/v).

Pipetou-se sobre o papel 150 μ L da solução de composto tensoativo e, após secagem, pipetou-se 200 μ L do reagente de Drabkin. Uma vez secos, pipetou-se 15 μ L de sangue capilar sobre o μ PAD.

3.5. TEMPO DE AQUISIÇÃO DE IMAGEM

Pipetou-se 10 μ L de sangue capilar sobre o dispositivo, já funcionalizado com o reagente de Drabkin, e a imagem da mancha sobre o papel foi capturada ao longo de 30 min, com intervalos de 1 min. O teste foi realizado com base em três amostras distintas de sangue capilar, fornecida por voluntários.

3.6. TESTE DA VARIAÇÃO DE VOLUME DA AMOSTRA

Foram avaliados os volumes 10, 15 e 20 μ L de sangue, sendo estes coletados com auxílio de micropipeta. Adicionalmente, realizou-se a deposição da gota de sangue sobre o papel sem o uso de uma micropipeta; a transferência da amostra para o dispositivo foi realizada pelo toque direto do dedo perfurado do voluntário sobre o

papel, de modo que o volume transferido é incerto. Comparou-se os valores de área e RGB medidos para o sangue capilar de cinco voluntários.

3.7. ANÁLISE DE HEMOGLOBINA PELO MÉTODO DE DRABKIN

Realizou-se o teste para quantificação de hemoglobina (Hb), tanto em sangue venoso quanto sangue capilar, utilizando o Método de Drabkin (M.D.) por espectrofotometria. Para isso foi necessário medir a absorbância para uma solução de hemoglobina padrão (Labtest) em Drabkin, com concentração de 0,4% (v/v). Após medido o controle, preparou-se solução das amostras de sangue em Drabkin, na mesma concentração utilizada para o controle.

3.8. ESTABILIDADE DO μ PAD

Para avaliar a estabilidade do reagente de Drabkin sobre o papel, foi preparada grande quantidade de μ PAD's, e que foram armazenados juntos, após secagem. Os papéis foram testados semanalmente, através da deposição de 10 μ L de Hb padrão sobre o dispositivo, seguida de aquisição dos dados 5 min após a aplicação da amostra.

3.9. ANÁLISE DE DADOS

Para realizar uma análise estatística dos resultados obtidos pelo μ PAD, foi realizada a coleta de amostras de sangue venoso e capilar para 16 voluntários. As amostras foram utilizadas para a realização do teste de RGB pelo μ PAD, bem como utilizadas para medir a concentração de Hb no sangue, utilizando o Método de Drabkin; as amostras de sangue venoso também foram utilizadas para a realização de um hemograma. Com os resultados obtidos, realizou-se testes estatísticos buscando

encontrar correlação entre os métodos de quantificação da hemoglobina, através de gráficos de dispersão.

Para os testes de RGB, pipetou-se 10 μL de amostra sobre o papel, cuja imagem foi capturada em intervalo de tempo de 5 a 10 min após a deposição da amostra.

Os valores de desvio padrão (δ) associados para cada um dos valores de média, apresentados ao longo deste documento, foram calculados com base na Equação 1, enquanto que os valores de coeficiente de variação (α) associados foram calculados com base na Equação 2.

Equação 1. Cálculo de desvio padrão.

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum(x_i - x_{m\acute{e}dio})^2}{n}}$$

Onde:

x_i = valor medido (área, RGB, Hb) para determinada replicata;

$x_{m\acute{e}dio}$ = valor médio (área, RGB, Hb) para uma amostra;

n = número de replicatas;

Equação 2. Cálculo do coeficiente de variação.

$$\alpha = \left(\frac{\delta}{x_{m\acute{e}dio}} \right) \times 100$$

Onde:

δ = desvio padrão (área, RGB, Hb) calculado para uma amostra;

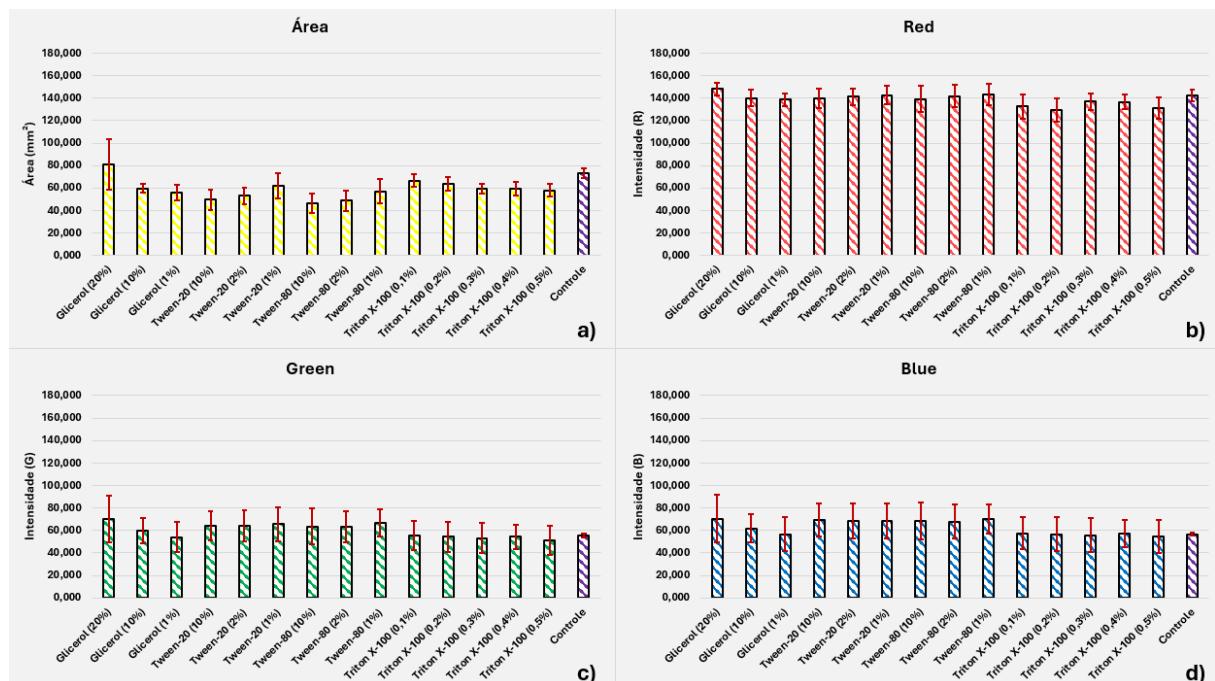
$x_{m\acute{e}dio}$ = valor médio (área, RGB, Hb) para uma amostra;

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. EFEITO DO COMPOSTO TENSOATIVO

Com base no estudo realizado por Biswas et al (2021),¹⁸ que avaliou o efeito de dispersão do sangue sobre papel recoberto por composto tensoativo, avaliou-se o efeito da deposição de compostos tensoativos sobre o papel antes da deposição do reagente de Drabkin sobre o papel. Esperava-se que os compostos testados favorecessem o espalhamento da amostra de sangue, facilitando a obtenção de manchas lisas e uniformes. Os compostos testados foram a glicerina, o Triton X-100, o Tween-20 e o Tween-80. Para a realização dos testes, variou-se a concentração dos compostos de interesse, enquanto os resultados obtidos foram comparados com os resultados referentes ao controle, que consistiu em papéis em que houve apenas a deposição do reagente de Drabkin, antes da deposição da amostra. Os valores de área e RGB médios medidos, para cada concentração de cada composto tensoativo, foram plotados no gráfico da Figura 1, junto de seus respectivos erros associados, em comparação com o controle, representado em roxo hachurado.

Figura 1. Comparação entre valores de (a) área (mm^2); (b) vermelho; (c) verde) e; (d) azul, para papéis funcionalizados com Glicerina, Triton-X100, Tween-20 e Tween-80, em diversas diluições. O Controle, em roxo, consiste do papel apenas com o reagente de Drabkin.

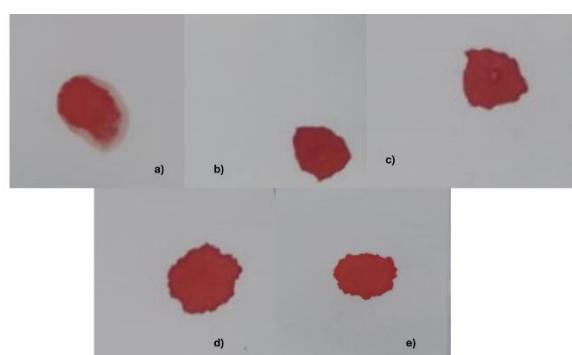


Fonte: Autoria Própria.

Ao analisar o item (a), na Figura 1, percebe-se valores de área consideravelmente variados, para os diversos compostos tensoativos testados. Todos os compostos apresentaram valores de área inferior à área obtida com o controle, com exceção da *glicerina 20%*; entretanto, o erro associado à essa medida é o maior de todos os compostos testados. Ao analisar os itens (c) e (d), percebe-se alto erro associado às medidas de *verde* e *azul*, quando comparados aos resultados obtidos para o controle; ao analisar o item (b), é possível avaliar que o erro para o valor de *vermelho* medido para os compostos tensoativos é bastante próximo do erro obtido para o controle. Foi realizado teste estatístico do tipo ANOVA, tukey ($p < 0,05$) para a área e RGB; destes, apenas o valor de *vermelho* não apresentou variação significativa.

Embora o valor de *vermelho* tenha sido consideravelmente consistente, para todos os compostos, os baixos valores de área e os valores incertos de *verde* e *azul* desencorajam o uso dos compostos tensoativos. Para além disso, os compostos testados dificultaram o espalhamento da amostra sobre o papel, resultando em mancha pouco uniformes, conforme mostra a Figura 2. Com base nestes complicadores, decidiu-se por manter o μ PAD contendo apenas o reagente de Drabkin.

Figura 2. Manchas obtidas pela deposição da amostra de sangue capilar em papéis funcionalizados com Drabkin e (a) Glicerina 10%; (b) Triton-X100 0,5%; (c) Tween-20 10%; (d) Tween-80 10% e; (e) Controle, apenas Drabkin.



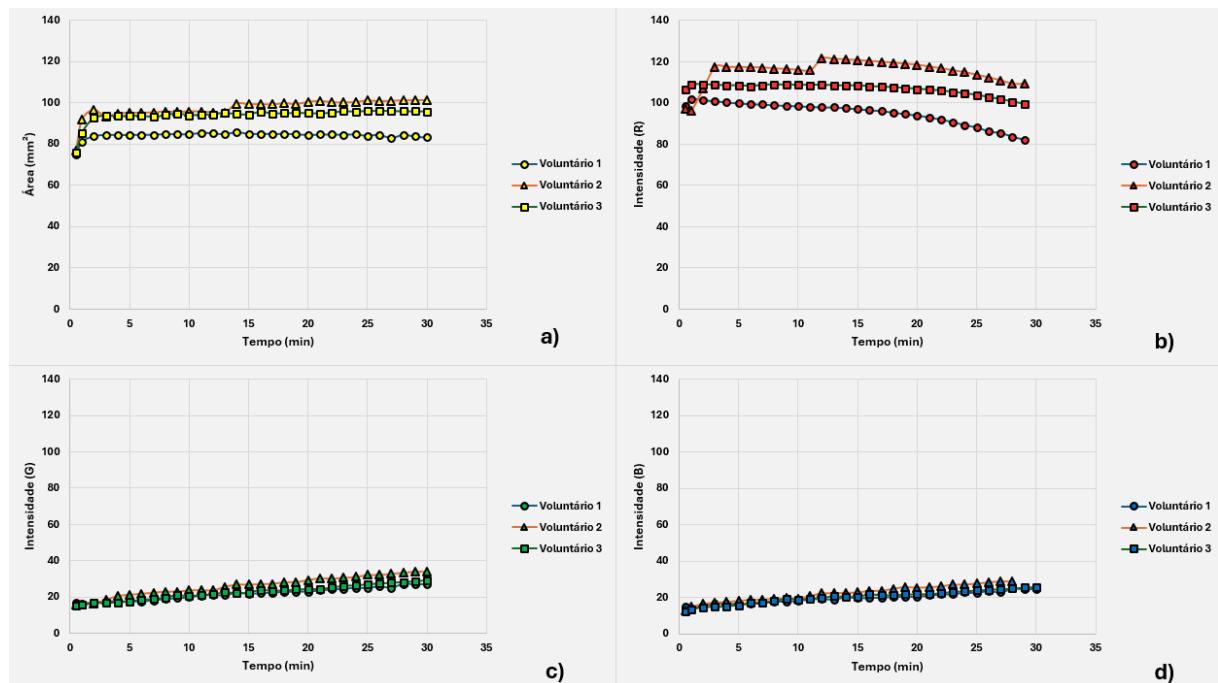
Fonte: Autoria Própria.

4.2. TEMPO DE AQUISIÇÃO DE DADOS

Uma vez que o sangue consiste em uma amostra biológica, cuja degradação é rápida, faz-se necessário conhecer o melhor intervalo de tempo após a deposição da amostra sobre o dispositivo, para que seja realizada uma leitura acurada dos valores de área e RGB. Além da estabilidade da amostra, deve-se avaliar o tempo necessário para que ocorra a completa reação da hemoglobina com o reagente de Drabkin, uma vez que para a realização dos testes espectrofotométricos, é necessário esperar um intervalo de cinco minutos, entre a deposição da amostra e a leitura da absorbância. A Figura 3 representa as curvas geradas, ao avaliar a variação da área e do RGB em função do tempo entre a deposição de 10 μL de sangue capilar sobre o papel e a aquisição da imagem.

Embora a variação ao longo dos 30 minutos seja bastante significativa, é possível perceber a existência de uma janela de tempo, entre 5 e 10 minutos, na qual há baixa variação dos valores de área (**a**) e vermelho (**b**) lidos; para os valores de verde (**c**) e de azul (**d**), a intensidade continua a variar, dentro deste intervalo.

Figura 3. Comparaçao entre resultados obtidos para três amostras de voluntários distintos, em função do tempo, para (a) área (mm^2); (b) vermelho; (c) verde e; (d) azul.



Fonte: Autoria Própria.

Entretanto, uma vez que o composto formado pela hemoglobina complexada com o cianeto absorve em 540 nm, espera-se que a cor cuja contribuição será majoritária, em relação à concentração de hemoglobina, seja o *vermelho*.

Os dados médios de área e RGB lidos ao longo dos 30 minutos estão reunidos na Tabela 2, junto dos dados médios lidos no intervalo de 5 a 10 min.

Tabela 2. Valores de média, desvio padrão (D.P.) e coeficiente de variação (C.V.) para os dados de área (mm^2) e RGB (u.a.), para intervalo de 5 a 10 min e para intervalo total, de 0 a 30 min.

0 a 30 min		Área (mm^2)			Vermelho (u.a.)			Verde (u.a.)			Azul (u.a.)		
Amostra		Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.
V.1		84,12	1,88	2,23	95,20	5,50	5,77	21,71	3,30	15,18	19,72	3,00	15,21
V.2		97,26	4,71	4,84	114,64	6,51	5,68	26,13	5,48	20,98	21,69	4,86	22,42
V.3		93,84	3,89	4,14	106,62	2,69	2,52	22,56	4,08	18,09	20,16	3,68	18,26
5 a 10 min		Área (mm^2)			Vermelho (u.a.)			Verde (u.a.)			Azul		
Amostra		Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.
V.1		84,64	0,16	0,19	99,47	0,62	0,62	18,64	0,93	4,99	17,26	0,75	4,37
V.2		95,38	0,32	0,34	116,95	0,39	0,33	22,48	0,89	3,95	18,34	0,83	4,54
V.3		93,84	0,61	0,65	108,50	0,27	0,25	19,42	1,27	6,53	17,73	1,31	7,37

Fonte: Autoria Própria.

Ao comparar o desvio padrão (D.P.) e o coeficiente de variação (C.V.) associados a cada valor médio obtido, tanto para o intervalo completo de 30 min quanto para o intervalo menor, entre 5 e 10 min, nota-se que a janela de tempo proposta realmente apresenta baixa variabilidade, no que diz respeito aos valores médios de área e *vermelho*, que apresentam C.V. inferior a 1 (0,19 e 0,62, respectivamente). Comparativamente, os valores médios de *verde* e *azul*, dentro da janela proposta, apresentaram C.V. pouco acima de 4 (4,99 e 4,37, respectivamente). Embora a variação do *verde* e do *azul* seja consideravelmente maior do que a da área e *vermelho*, esta mesma variação é um avanço considerável, quando comparada com a variação para o intervalo completo de 30 minutos. Ao longo de todo o intervalo, a área e o *vermelho* apresentaram C.V. de 2,33 e 5,77, enquanto o *verde* e o *azul* apresentaram C.V. próximo de 15.

Desse modo, comprehende-se que o intervalo de 5 a 10 minutos após a deposição da amostra sobre o μ PAD é o mais indicado para que seja realizada a captura da imagem, uma vez que dentro deste intervalo, há pouca variação nos valores de área e RGB medidos.

4.3. TESTE DA VARIAÇÃO DE VOLUME

Os dados obtidos para os testes da variação de volume de sangue capilar utilizado sobre o papel estão contidos nas tabelas a seguir, sendo que os valores médios de área e *vermelho*, *verde* e *azul* estão reunidos na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação para os dados de área (mm^2) e *vermelho*, *verde* e *azul* (u.a.) obtidos para cinco voluntários, considerando os volumes de 10 μL , 15 μL e 20 μL , e dedo (gota).

Área (mm ²)	10 µL			15 µL			20 µL			Dedo		
Amostra	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.
V.1	57,25	1,74	3,04	50,49	1,23	2,44	77,19	9,25	11,98	50,00	0,25	0,50
V.2	64,44	0,14	0,21	99,14	1,96	1,98	119,30	1,27	1,06	71,74	1,41	1,97
V.3	58,77	3,13	5,33	101,55	6,01	5,92	86,00	6,93	8,06	106,10	11,90	11,22
V.4	48,49	16,68	34,40	84,87	3,92	4,61	110,18	2,50	2,27	68,31	8,66	12,68
V.5	71,87	1,75	2,43	82,55	2,67	3,23	103,02	3,59	3,49	52,79	1,65	3,13
Vermelho (u.a.)	10 µL			15 µL			20 µL			Dedo		
Amostra	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.
V.1	99,98	2,24	2,24	82,04	3,48	4,25	84,60	1,36	1,61	96,74	0,81	0,84
V.2	120,50	0,24	0,20	117,15	0,16	0,13	118,89	0,35	0,30	119,25	0,61	0,51
V.3	107,38	1,02	0,95	110,00	1,61	1,47	100,52	0,53	0,53	116,94	3,78	3,23
V.4	97,22	0,73	0,75	91,78	1,11	1,21	92,57	0,13	0,14	95,05	0,34	0,35
V.5	96,23	0,63	0,66	94,98	0,59	0,62	92,12	0,30	0,32	95,12	0,17	0,18

Green (u.a.)	10 µL			15 µL			20 µL			Dedo		
Amostra	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.
V.1	19,19	1,14	5,96	13,00	0,18	1,36	13,69	0,80	5,82	26,39	0,42	1,59
V.2	26,34	0,59	2,22	22,46	1,01	4,51	24,93	0,01	0,04	27,75	3,03	10,93
V.3	18,55	0,59	3,20	18,26	0,46	2,53	14,62	1,80	12,28	25,25	4,95	19,61
V.4	22,66	1,18	5,21	15,95	0,08	0,53	15,49	0,40	2,57	17,23	0,66	3,83
V.5	17,62	0,14	0,80	18,03	0,52	2,86	14,90	0,48	3,25	22,50	0,51	2,25
Blue (u.a.)	10 µL			15 µL			20 µL			Dedo		
Amostra	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.
V.1	17,78	0,88	4,94	10,29	0,31	2,97	11,34	1,09	9,62	23,11	0,78	3,36
V.2	21,57	0,47	2,16	18,31	0,91	4,99	20,40	0,29	1,42	23,01	2,91	12,65
V.3	17,14	0,49	2,88	15,83	0,11	0,72	12,61	3,64	28,85	20,83	3,79	18,18
V.4	19,20	1,25	6,48	12,72	0,08	0,61	12,11	0,38	3,11	14,02	0,64	4,60
V.5	15,36	0,18	1,19	15,75	0,43	2,74	12,57	0,48	3,78	19,65	0,42	2,13

Fonte: Autoria Própria.

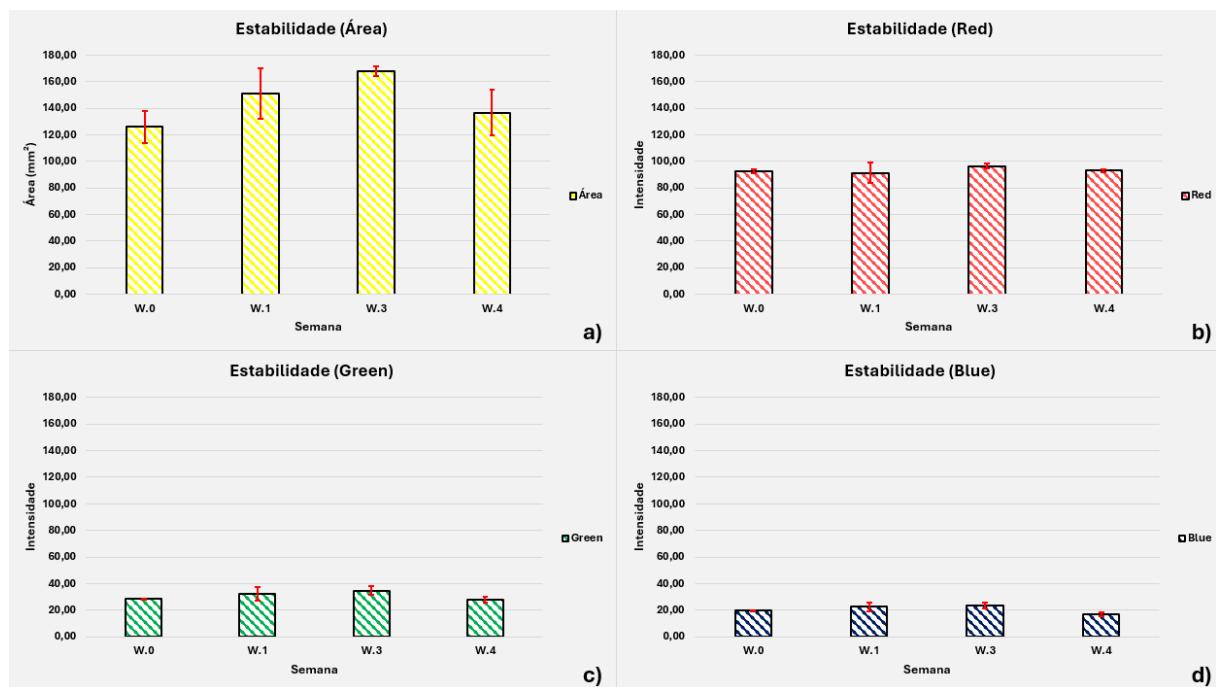
Ao variar o volume de sangue depositado sobre o μ PAD, esperava-se ver um aumento da área da mancha formada, acompanhado de certa estabilidade para os valores de RGB medidos. Ao avaliar os valores médios obtidos, pode-se perceber baixa variabilidade para os valores de RGB, enquanto se observa a variabilidade esperada para a área, no que concerne à amostra depositada com volume controlado. Os resultados no que concerne a deposição através da gota de sangue, no entanto, não parecem indicar qualquer correlação, a primeiro momento.

Ao avaliar os dados reunidos na Tabela 3, podemos perceber que houve consistência para os valores de RGB obtidos para todos os volumes de sangue capilar testados (de 10 μ L a 20 μ L e gota), sendo que os resultados que apresentaram alta variação não mostraram nenhum padrão significativo; a área apresentou alta variabilidade em amostras diversas, para todos os volumes. Desse modo, comprehende-se que o volume de sangue depositado sobre o papel não está diretamente associado ao valor de RGB lido, enquanto houve variação de valores de área para todos os volumes. O único cuidado necessário, nesse sentido, é que o volume seja padronizado. Com base nestes resultados, adotou-se o valor de 10 μ L de sangue para os testes posteriores, apenas por convenção.

4.4. ESTABILIDADE DO μ PAD

Ao avaliar os valores de área e RGB, ao longo do tempo, pode-se buscar uma compreensão maior sobre o tempo de validade do dispositivo funcionalizado com o reagente de Drabkin. A Figura 4 mostra os valores médios obtidos para área (a), *vermelho* (b), *verde* (c) e *azul* (d). A semana zero, ou semana inicial, foi representada como W.0, de modo que, de semana a semana, conta-se W.1, W.3 e W.4.

Figura 4. Comparação dos resultados semanais obtidos para (a) área (mm^2); (b) vermelho; (c) verde e; (d) azul.



Fonte: Autoria Própria.

É possível perceber que os valores de área, *verde* e *azul* apresentam uma variação similar, apresentando crescimento de W.0 para W.1, e de W.1 para W.3, seguido de queda de W.3 para W.4. Para o *vermelho*, houve uma pequena queda, entre W.0 e W.1; no entanto, o erro associado à medida é consideravelmente alto, de modo que este resultado é inconclusivo. Ainda assim, o valor médio de *vermelho* lido em W.4 é bastante próximo do valor medido em W.0, apresentando desvio padrão também bastante similar. Desse modo, percebe-se que embora os resultados para área, *verde* e *azul* tenham variado consideravelmente, os resultados de *vermelho* apresentaram certa estabilidade, ao longo de um mês.

4.5. ANÁLISE COMPARATIVA

Os testes comparativos foram realizados com o objetivo de avaliar a correlação entre o valor de RGB obtidos com os valores de hemoglobina (Hb) medidos, tanto através

do hemograma quanto através do Método de Drabkin (M.D.). O Método de Drabkin consiste na mistura entre a amostra de sangue e o reagente de Drabkin, que leva à formação de um complexo de cor estável, com absorbância bem definida em 540 nm; o valor de absorbância medido pode ser convertido em concentração de Hb, em g/dL, utilizando a absorbância de um padrão, de concentração de Hb de 10 g/dL.¹⁹ O hemograma foi realizado com uma amostra de sangue venoso, enquanto que o Método de Drabkin foi realizado, tanto para as amostras de sangue capilar quanto para as amostras de sangue venoso. Em ambos os casos, o sangue venoso foi armazenado em tubos de EDTA, para evitar coagulação.

Os testes envolvendo o dispositivo micro fluídico foram realizados utilizando tanto amostras de sangue capilar quanto amostras de sangue venoso. Para o sangue venoso, utilizou-se o volume definido de 10 µL, enquanto para os testes envolvendo o sangue capilar, utilizou-se dois volumes distintos de sangue, sendo um fixo (10 µL) e o outro variável; para gerar este último, recolheu-se a gota de sangue diretamente sobre o papel, de modo que o volume de sangue transferido é incerto. Os valores de hemoglobina e hematócrito informados pelo hemograma, bem como os valores de hemoglobina medidos utilizando o Método de Drabkin, e os valores de RGB e área medidos estão todos reunidos na Tabela 4.

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão obtidos para os valores de Hb medida por hemograma, hematócrito, Hb medida por M.D., para sangue venoso e capilar, e valores de área (mm²) e RGB (u.a.) (método proposto), para sangue venoso e sangue capilar (10 µL e gota).

Código	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Capilar								Venoso					
			Hb (Abs)	Volume Fixo				Volume Variável								
				R (u.a.)	G (u.a.)	B (u.a.)	Área (mm ²)	R (u.a.)	G (u.a.)	B (u.a.)	Área (mm ²)	Hb (Abs)	R (u.a.)	G (u.a.)	B (u.a.)	Área (mm ²)
A.1	16,5	45	11,31±0,05	104,24±1,59	20,04±0,79	16,59±0,7	66,98±0,72	101,34±5,84	19,15±3,65	15,88±3,23	46,75±2,59	7,63±0,12	111,76±6,46	27,73±2,34	21,6±1,79	79,14±2,68
A.2	15	42	11,65±0,24	102,33±0,22	17,12±0,65	14,11±0,54	69,33± 5,26	94,11±3,19	22,2±5,44	18,24±4,93	40,23±8,43	9,06±1,83	107,45±1,52	20,35±1,2	16,41±1	76,01±5,18
A.3	15,8	43	11,27±1,36	100,48±1,33	16,68±1,72	13,41±1,61	64,56±4,96	106,95±0,68	24,48±0,31	19,41±0,26	50,62±2,55	10,31±1,84	96,05±1,63	16,2±0,69	13,36±0,79	59,17±3,02
A.4	13,3	38	-	101,24±10,65	21,96±2,77	17,3±2,22	75,66±2,06	95,61±0,95	23,93±1,62	19,19±1,45	49,07±1,27	9,89±0,44	111,09±4,56	22,44±2,06	17,86±1,97	78,22±2,7
A.5	16,3	45	-	105,73±1,05	24,11±0,28	19,29±0,33	70,32±4,44	103,62±7,19	30,6±4,59	24,64±3,43	45,81±4,69	5,38±0,37	122,39±3,36	46,58±1,3	36,57±1,21	85,14±13,46
A.6	15	42	10,72±0,97	105,32±0,82	20,99±1,28	17,46±0,23	65,63±1,16	115,8±0,59	38,44±3,19	30,59±3,68	36,68±8,3	9,46±0,2	117,76±7,09	37,43±5,26	29,06±4,93	91,66±6,57
A.7	17,6	50	11,44±0,05	104±0,82	19,17±1,58	15,76±1,71	64,46±1,11	101,94±11,92	28,24±7,76	23±6,19	44,95±2,74	6,54±0,04	118,41±2,67	34,87±2,33	29,94±1,81	82,18±6,54
A.8	15,4	43	13,26±0,68	98,05±6,19	17,43±2,62	14,32±2,72	60,82±9,3	95,06±1,16	17,2±1,45	14,39±1,15	46,33±10,86	11,83±0,39	105,82±2,78	19,37±0,44	15,91±0,75	69,43±5,02

Fonte: Autoria Própria.

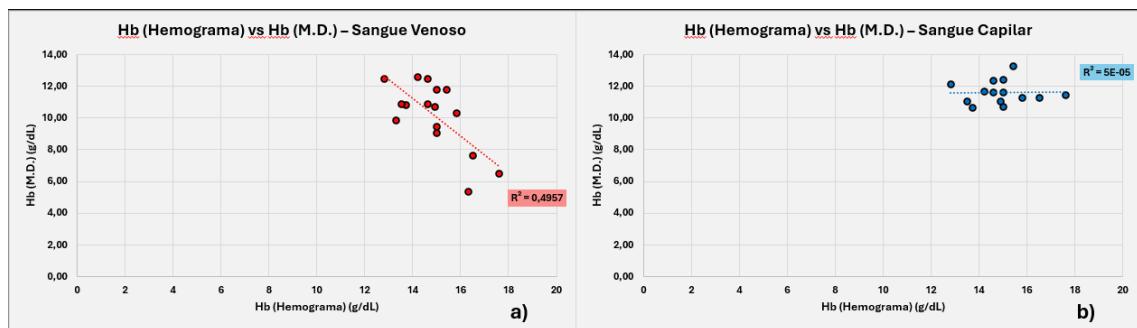
Código	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Hb (Abs)	Capilar								Venoso				
				Volume Fixo				Volume Variável								
				R (u.a.)	G (u.a.)	B (u.a.)	Área (mm ²)	R (u.a.)	G (u.a.)	B (u.a.)	Área (mm ²)	Hb (Abs)	R (u.a.)	G (u.a.)	B (u.a.)	Área (mm ²)
A.9	12,8	38	12,13±0,15	103,29±1,32	19,96±0,21	17,04±0,2	63,91±0,07	100,88±0,94	21,72±6,16	17,72±4,9	45,69±20,47	12,48±0,74	102,62±4,68	16,47±1,74	13,23±1,55	65,28±5,71
A.10	14,6	41	11,65±0,15	103,68±1,84	21,35±0,58	18,08±1	61,75±0,8	102,38±0,42	27±0,33	22,04±0,2	42,12±5,15	10,89±0,22	114,36±2,32	25,9±2,67	20,42±2,01	80,58±4,88
A.11	14,9	42	11,07±0,1	104,56±2,13	21,21±2,2	17,62±1,77	65,5±6,05	108,18±0,38	34,9±0,7	27,69±0,73	50,77±2,94	10,71±0,18	109,95±3,07	23,61±2,71	18,99±2,55	75,47±2,64
A.12	13,7	40	10,65±0,58	104,01±1,46	19,87±1,91	16,4±1,61	62,31±3,86	109,05±2,2	36,58±6,29	29,52±5,75	35,27±10,99	10,85±0,48	118,62±2,27	29,68±1,05	23,18±0,75	81,97±2,87
A.13	15	42	12,41±0,05	100,8±0,67	16,17±0,57	13,44±0,61	65,13±0,23	108,58±5,8	24,3±5,17	19,36±3,54	70,83±10,5	11,83±0,04	105,7±3,07	17,92±1,02	14,79±0,86	65,83±8,42
A.14	14,6	41	12,37±0,49	100,89±2,01	18,41±0,82	15,22±0,78	64,22±2,74	111,9±0,21	27,72±18,13	22,07±15,1	102,72±40,89	12,5±0,19	116,76±4,19	29,81±2,34	23,15±1,9	80,36±7,09
A.15	13,5	39	11,07±0,1	103,83±0,6	19,62±1,6	16,3±1,22	65,9±1,63	104,91±1,55	27,59±7,71	22,33±5,95	57,03±18,51	10,92±0,29	110,53±3,51	18,06±0,66	14,41±0,57	74,13±4,45
A.16	14,2	40	11,72±0,15	100,97±4,74	17,02±1,84	13,48±1,66	62,82±9,01	112,43±3,32	32,36±1,75	25,92±0,89	69,4±8,86	12,61±0,14	105,2±4,24	16,11±0,76	13,22±0,32	66,01±3,76

Fonte: Autoria Própria.

Em um gráfico de dispersão, costuma-se considerar a variável em y como a variável dependente, e a variável em x como a variável independente.²⁰ Neste contexto, ao gerar uma linha de tendência linear, temos a informação sobre o valor de R^2 associado à dispersão, que pode nos levar ao coeficiente de correlação, r .²⁰ Este coeficiente indica duas coisas: o quanto fortemente as variáveis estão associadas, e se a associação é positiva ou negativa, *i.e.*, se o aumento do valor da variável independente aumenta ou diminui o valor da variável dependente.²⁰

A Figura 5 representa a correlação entre o método de Drabkin (M.D.) e o hemograma, para o sangue venoso (a) e para o sangue capilar (b), considerando a Hb indicada no hemograma como a variável independente e a Hb calculada a partir do método de Drabkin como a variável dependente. Desse modo, o esperado seria que maiores valores de Hb indicados pelo hemograma deveriam resultar em maiores valores de Hb medidos por absorbância; isso se dará pelo sinal de r , se positivo ou negativo. Esperava-se também que os valores de Hb medidos por ambos os métodos (hemograma e espectrofotometria) fossem próximos, com coeficiente de correlação próximo a 1.

Figura 5. Diagramas de dispersão comparando de hemoglobina medidos por hemograma com hemoglobina medida por Método de Drabkin, para (a) sangue venoso e; (b) sangue capilar.



Fonte: Autoria Própria.

Para o sangue venoso (a), obteve-se $r = -0,7040$, que é moderadamente próximo a 1, em módulo; ser negativo, no entanto, é contrário ao esperado. Os pontos obtidos formaram agrupamento considerável em torno de 13 a 16 g/dL, para x , e em torno de

9 a 13 g/dL, para *y*. Isso implica que os resultados obtidos para concentração de Hb foram sistematicamente menores, para o método de Drabkin. Uma vez que este método é tido como “padrão-ouro” para quantificação de Hb em sangue venoso, e uma vez que os erros foram globais, sistemáticos. Uma explicação plausível para este resultado são erros cometidos durante a homogeneização da amostra, para a realização dos testes por espectrofotometria.

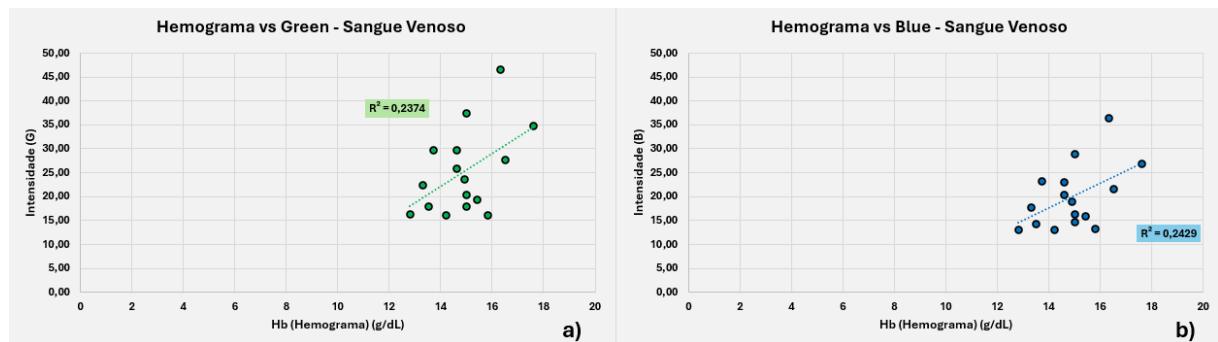
Por outro lado, ao avaliar os resultados para o sangue capilar (b), percebe-se ausência de correlação entre os valores de Hb apresentados no hemograma e os valores de Hb medidos pelo Método de Drabkin; isso condiz com os resultados obtidos por Kupke (1981), que encontraram variação significativa entre os componentes do sangue venoso e capilar. Segundo os pesquisadores, a quantidade de proteínas totais no sangue capilar foi cerca de 3,3 % menor do que a quantidade presente no sangue venoso, para amostras coletadas em jejum. Embora a variação tenha sido pequena, ela foi altamente significativa ($p < 0,0005$).²¹ Desse modo, seria esperado que houvesse uma diferença na concentração de hemoglobina entre uma amostra de sangue venoso e uma de sangue capilar.

No que diz respeito aos dados de RGB, esperava-se encontrar uma alta correlação entre o valor de *vermelho* lido e o valor de Hb medido, tanto quanto comparado ao hemograma quanto quando ao método de Drabkin; essa correlação indicaria a viabilidade de associar o teste espectrofotométrico com um teste colorimétrico, podendo este ser utilizado como alternativa de baixo custo.

Ao comparar os resultados obtidos, tendo a concentração de Hb informada pelo hemograma como a variável independente, e o valor de RGB obtido como a variável dependente, obtém-se uma miríade de gráficos de dispersão. Para os valores de RGB, utilizou-se os resultados obtidos para o sangue venoso, bem como os resultados obtidos para o sangue capilar, seja os obtidos para o volume fixo de sangue, seja os obtidos para a gota. Ao realizar todas estas comparações, esperava-se obter uma alta correlação entre os valores de *vermelho* lidos e a concentração de Hb; quanto melhor a correlação, maior o indicativo de que os métodos utilizados são equivalentes. Em realidade, após o tratamento dos dados, percebeu-se que apenas os resultados de *verde* e *azul*, para o sangue venoso, apresentaram valor de *r* minimamente satisfatório, embora não tenham sido superiores a 0,5. A Figura 6 mostra ambas as

correlações obtidas para o valor de *verde* (a), com $r = 0,4872$, e para o valor de *azul* (b), com $r = 0,4923$.

Figura 6. Diagrama de dispersão comparando valores de hemoglobina medidos por hemograma e os valores de (a) verde e; (b) azul, amostra de sangue venoso.



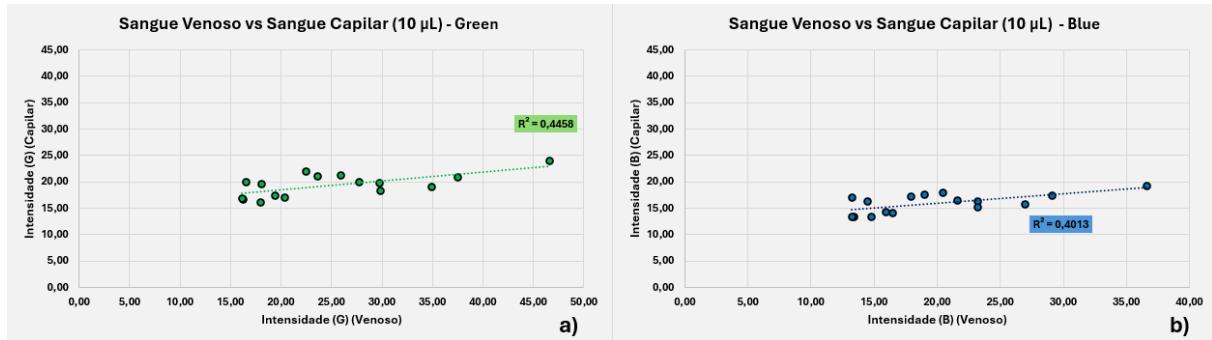
Fonte: Autoria Própria.

Os resultados obtidos indicam que não há forte correlação entre os valores de RGB medidos e a concentração de Hb medida pelo hemograma.

Podemos, entretanto, estudar a correlação entre o sangue venoso e o sangue capilar. Dada sua composição distinta, foi necessário realizar estudos comparativos, entre os resultados de RGB para amostras de sangue venoso e capilar, em busca de encontrar uma correlação entre os valores obtidos; isso indicaria que, embora tenham uma composição diferente, ambas as composições teriam certa proporcionalidade constante, que permita relacionar os resultados obtidos com um tipo de sangue para com o outro. A mesma análise se segue para os testes correlacionando a concentração de Hb medida, através do Método de Drabkin, para ambos os tipos de sangue.

A partir dos dados obtidos, não foi possível encontrar qualquer correlação meramente efetiva, com exceção dos resultados de *verde* e *azul* obtidos, ambos sendo resultado do volume fixo de sangue capilar (10 μ L), e com valores de $r < 0,7$. A Figura 7 representa as correlações entre os valores de *verde* (a) lidos, e entre os valores de *azul* (b) lidos, tendo o sangue capilar em y e o sangue venoso em x; os valores de r medidos foram, respectivamente, $r = 0,6677$ e $r = 0,6335$.

Figura 7. Diagrama de dispersão comparando valores de (a) verde e; (b) azul, obtidos para amostras de sangue venoso e de sangue capilar.

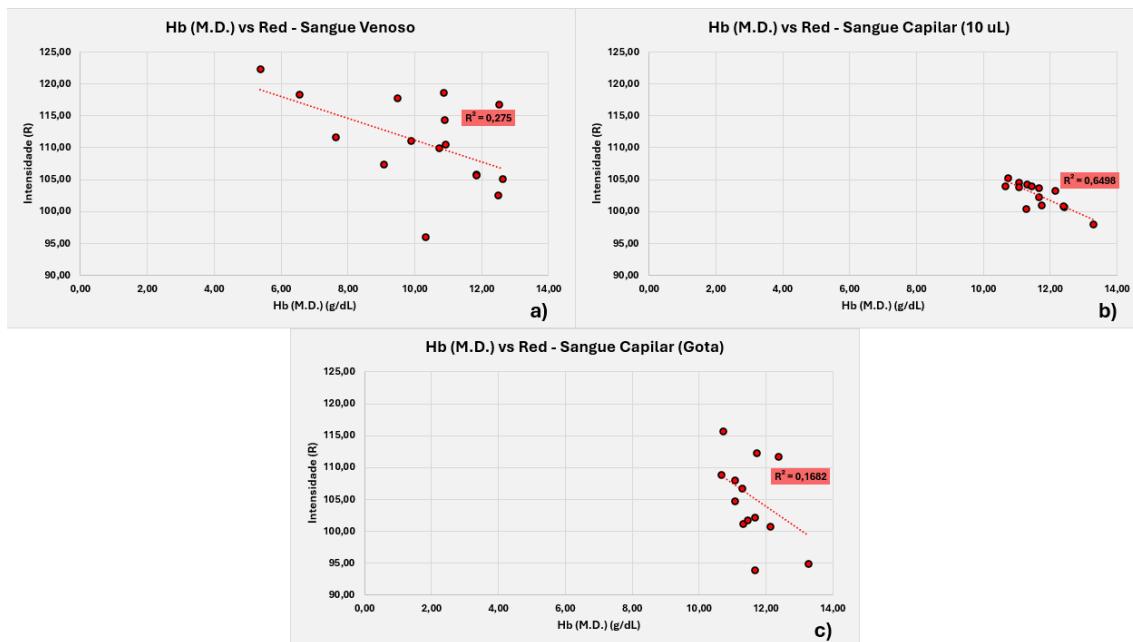


Fonte: Autoria Própria.

Paralelamente, em busca de encontrar uma correlação entre os valores de RGB lidos e a concentração de Hb medida pelo método de Drabkin, para ambos os tipos de sangue, foi realizada a comparação dos valores obtidos.

O estudo realizado por Ranganathan (2006), treinou uma rede neural para que esta associasse os valores de RGB medidos com as concentrações de Hb informadas, criando uma correlação. Para isso, os pesquisadores colocaram as amostras de sangue entre duas lâminas de vidro, e capturaram a imagem do sangue, controlando parâmetros como iluminação, distância da câmera etc. Esse estudo encontrou forte correlação entre os valores de RGB e a concentração de Hb. Desse modo, embora o método proposto por este trabalho seja consideravelmente mais simples, esperava-se poder encontrar um coeficiente de correlação negativo e próximo de 1, ao correlacionar os valores de RGB e de Hb propostos.¹⁷ Ao realizar a comparação dos resultados, apenas o valor de *vermelho* lido apresentou correlação minimamente moderada com a concentração de Hb; os resultados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8. Diagrama de dispersão comparando valores de vermelho e Hb medida por M.D., para (a) sangue venoso, (b) sangue capilar (10 μ L) e; (c) sangue capilar (gota).



Fonte: Autoria Própria.

Ao avaliar a correlação entre o *vermelho* e a concentração de Hb, ambos para o sangue venoso (a), encontra-se $r = -0,5244$. A correlação entre o valor de *vermelho* e a concentração de Hb, para o sangue capilar, resulta em dois gráficos, um que mantém o volume de sangue constante (b) e outro que trabalha com a gota de sangue (c). Os resultados mostram boa correlação para o volume constante (b), com $r = -0,8061$; em contraponto, os resultados da gota apresentaram $r = -0,4315$. Essa discrepância de resultados, obtidos apenas pela variação do volume de amostra, indica que o controle do volume de sangue depositado sobre o papel é crucial para que seja possível estabelecer qualquer correlação entre o Método de Drabkin tradicional e o uso do reagente de Drabkin como reagente colorimétrico, para detecção por RGB.

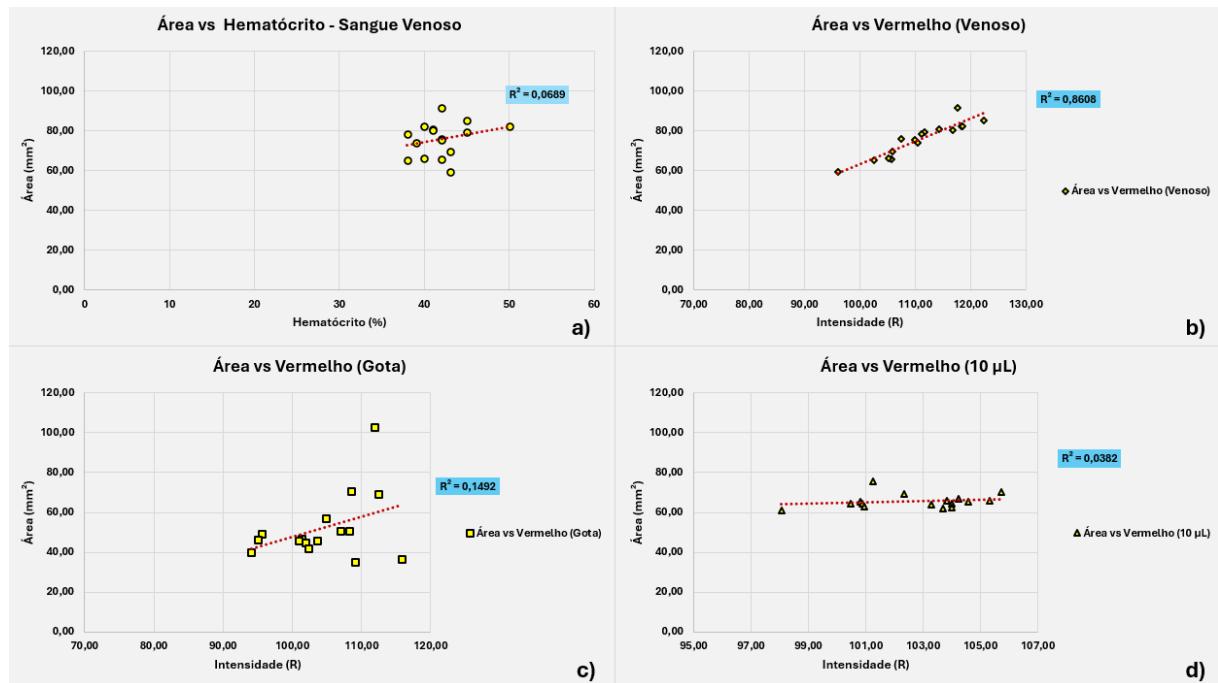
É importante ressaltar que faz sentido que todos os coeficientes de correlação obtidos sejam negativos, indicando que conforme aumenta a concentração de Hb, menor o valor de *vermelho*; dentro da escala RGB, os valores mais escuros se encontram mais próximos de zero, de modo que quanto menor o valor de *vermelho*, mais forte a cor. Isso condiz com a previsão de que a concentração de Hb esteja ligada

majoritariamente à cor vermelha, dado o comprimento de onda de absorção do complexo resultante da reação.

Os testes realizados por Ranganathan avaliaram o efeito das três cores simultaneamente, enquanto nossas análises avaliam o efeito de cada cor isoladamente; os resultados indicam que a correlação entre os valores de RGB e a concentração de Hb é complexa, e demanda a construção de um modelo matemático de regressão, capaz de fazer uma análise levando em conta múltiplas variáveis, conforme proposto por Ranganathan.¹⁷

No que diz respeito ao valor de área lido, um trabalho realizado por Nakamura (2023),²² indicava que a área da mancha do sangue sobre o papel deveria ter correlação com o valor de hematócrito do sangue do paciente. Entretanto, ao realizar o teste com espaço amostral de 107 voluntários, obteve-se um coeficiente de correlação $r = 0,5990$. Baseado nesse estudo, realizou-se uma comparação entre os valores de área medidos para o sangue venoso, e o valor de hematócrito (%) informado no hemograma. Avaliou-se também se havia correlação entre o valor de área e de *vermelho* medidos, também para o sangue venoso. A Figura 9 mostra as correlações obtidas entre: (a) área vs hematócrito, (b) área vs *vermelho* (sangue venoso), (c) área vs *vermelho* (gota de sangue capilar) e, (d) área vs *vermelho* (10 μL sangue capilar).

Figura 9. Diagramas de dispersão comparando os valores de área (mm^2) com os valores de (a) hematócrito; e valores de vermelho, para amostras de sangue (b) venoso; (c) capilar (gota) e; (d) capilar ($10 \mu\text{L}$).



Fonte: Autoria Própria.

A correlação obtida entre a área e o hematócrito, através do método proposto, resultou em $r = 0,2625$, valor consideravelmente inferior ao valor obtido por Nakamura²²; entretanto, mesmo a correlação encontrada pelo pesquisador é moderadamente fraca. A correlação obtida para os valores de área vs. vermelho, através do método proposto, diverge, a depender do tipo de sangue; ambos os testes envolvendo o sangue capilar apresentaram $r < 0,4$. Os testes envolvendo o sangue venoso, em contraponto, apresentaram uma forte correlação entre área e vermelho, com valor de $r = 0,9278$.

4.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes envolvendo os compostos tensoativos mostrou que a presença de ditos compostos levou ao aumento da incerteza quando aos valores de área, verde e azul, embora não tenha causado variações significativas nos valores de vermelho lidos.

Uma vez que os resultados obtidos para o controle foram mais estáveis que os obtidos com os compostos testados, optou-se por utilizar apenas o reagente de Drabkin sobre o papel. Paralelamente, o estudo sobre o tempo de aquisição dos dados mostrou que há uma janela de estabilidade, no intervalo de 5 a 10 min após a deposição da amostra sobre o dispositivo; desse modo, garante-se maior acurácia sobre os valores de área e RGB medidos.

Os experimentos envolvendo a variação do volume de amostra mostraram que não há variação significativa para os valores de *vermelho* medidos, embora tenha havido uma variação considerável para os valores de área, de *verde* e de *azul*, para todos os volumes testados. Desse modo, é possível utilizar qualquer volume dentro do intervalo testado (10 μL a 20 μL), desde que haja a padronização do volume usado ao longo dos testes. Os testes de estabilidade do reagente sobre o papel ao longo do tempo apresentaram baixa variação no valor de *vermelho* lido, ao longo de um mês, embora tenha havido certa variabilidade para os resultados de área, *verde* e *azul*.

A análise comparativa, envolvendo o hemograma, o Método de Drabkin e o uso do μPAD , indicou que não houve correlação entre o hemograma e o Método de Drabkin (M.D.), quando M.D. foi realizado utilizando sangue capilar. Quando comparados os resultados para o sangue venoso, os valores de Hb medidos por M.D. foram sistematicamente menores, indicando possível erro durante a condução das medidas, como por exemplo durante a homogeneização das amostras. Ao comparar os valores do hemograma com os valores de RGB, encontrou-se correlação moderadamente fraca apenas para os valores de *verde* e *azul*, para o sangue venoso, enquanto os demais resultados indicaram correlação praticamente nula. Ao comparar os resultados para o sangue venoso com os referentes ao sangue capilar, obteve-se fraca correlação, novamente apenas para os valores de *verde* e *azul* medidos, para o sangue venoso correlacionado com o sangue capilar (volume de 10 μL). Correlacionando os dados medidos por M.D. com os resultados obtidos de RGB, notou-se correlação fraca para o *vermelho* obtido para o sangue venoso e para o sangue capilar (gota), enquanto obteve-se uma correlação forte entre os valores de Hb medidos por M.D. e o valor de *vermelho* medido para o sangue capilar (10 μL); as comparações para as demais cores resultaram em correlação praticamente nula. Ao avaliar a relação entre os valores de área medidos e os valores de hematócrito, encontrou-se correlação inferior à obtida na literatura,¹⁸ possivelmente causado pela

complexidade da amostra. Os valores de área apresentaram forte correlação com o valor de *vermelho* lido para o sangue venoso, embora tenha apresentado correlação praticamente nula quando a área foi comparada aos valores de *vermelho* obtidos para os sanguess capilares (gota e 10 μ L), conforme mostrado na Figura 9.

Os resultados obtidos e sua comparação indicam não ser possível uma correlação tão direta entre o valor de *vermelho* lido e a concentração de hemoglobina; seria necessário construir um modelo preditivo, capaz de associar acuradamente os valores de *vermelho* obtidos com os valores de Hb devidos. Ainda assim, ao comparar a Hb medida pelo M.D. com o *vermelho* lido, considerando o sangue capilar (10 μ L), encontrou-se correlação moderadamente forte. Em contrapartida, não foi possível identificar uma associação direta entre os resultados obtidos para os sanguess capilar e venoso, uma vez que tanto os resultados obtidos pelo uso do μ PAD quanto os obtidos pelo M.D. não apresentaram forte correlação. Esses problemas constituem obstáculos a serem superados, para que seja possível desenvolver um dispositivo microfluídico para quantificação de hemoglobina em sangue capilar, primeiro porque obstam contra o uso do reagente de Drabkin como reagente colorimétrico, pela dificuldade da associação entre os valores de Hb e os valores de RGB; segundo porque o M.D. foi inicialmente proposto tendo em vista o uso de sangue venoso, e parece ainda não haver possibilidade de substituí-lo pelo sangue capilar.

Entretanto, conforme os resultados obtidos para a variação do volume de amostra, seria viável a elaboração de um dispositivo microfluídico no qual houvesse um controle do volume de amostra que chega ao reagente de Drabkin, utilizando as propriedades microfluídicas do próprio papel, e utilizando barreiras hidrofóbicas de cera. Tendo em consideração, também, a natureza simples do dispositivo proposto, torna-se viável a busca por reagentes adicionais, que possam auxiliar na construção do sistema proposto.

5. CONCLUSÃO

Foi encontrada fraca correlação, de modo geral, entre a concentração de hemoglobina no sangue, tanto capilar quanto venoso, e o valor de RGB correspondente. Não houve correlação entre o volume de sangue testado e a variação dos valores de *vermelho* obtidos. Não foi possível encontrar forte correlação entre os resultados de RGB obtidos para o sangue venoso e o capilar. É necessário utilizar sistemas de análise mais complexos, como redes neurais, para encontrar correlação satisfatória entre valores de RGB e concentração de hemoglobina.

6. REFERÊNCIAS

- 1 **CAMASCHELLA, C.** Iron-deficiency anemia. *The New England Journal of Medicine*, Massachusetts, v. 372, n. 19, p. 1832-1843, maio 2015. doi: 10.1056/NEJMra1401038.
- 2 **NATALINO, Roberta R.** Anemia Ferropriva: Uma revisão. *Anais da Academia de Ciências e Tecnologia de São José do Rio Preto*, São José do Rio Preto, v. 1, n. 1, jul. 2007.
- 3 **WIKIPEDIA.** *Heme*. Disponível em: <https://en.wikipedia.org/wiki/Heme>. Acesso em: 12 nov. 2024.
- 4 **YUAN, Yue; TAM, Ming F.; SIMPLACEANU, Virgil; HO, Chien.** New Look at hemoglobin allostery. *Chemical Reviews*, Pennsylvania, v. 115, p. 1702-1724, 2015. DOI: 10.1021/cr500495x.
- 5 **KILLIP, Shersten; BENNETT, John M.; CHAMBERS, Mara D.** Iron Deficiency Anemia. *American Family Physician*, v. 75, n. 5, p. 671-678, 1 mar. 2007. Disponível em: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2007/0301/p671.html>. Acesso em: 12 nov. 2024.

- 6 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines on integrated care for older people (ICOPE): a manual for nurses and allied health professionals. Genebra: WHO, 2017. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/259425/9789241513067-eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 13 nov. 2024.
- 7 PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE (PNCQ). *Manual de orientação para a realização de ensaio de proficiência*. Rio de Janeiro: PNCQ, 2019. Disponível em: <https://www.pncq.org.br/uploads/2019/VNH2019.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2024.
- 8 **JORDÃO, Regina Esteves; BERNARDI, Júlia Laura D.; BARROS FILHO, Antônio de Azevedo.** Prevalência de anemia ferropriva no Brasil: uma revisão sistemática. *Revista Paulista de Pediatria*, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 90-98, 2009.
- 9 **CÔRTES, Mariana Helcias; VASCONCELOS, Ivana Aragão Lira; COITINHO, Denise Costa.** Prevalência de anemia ferropriva em gestantes brasileiras: uma revisão dos últimos 40 anos. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 22, n. 3, p. 409-418, maio/jun. 2009.
- 10 **BORGES, Rosanea Beatriz; WEFFORT, Virgínia Resende Silva.** Anemia no Brasil – revisão. *Revista Médica de Minas Gerais*, Belo Horizonte, v. 21, n. 3 Supl. 1, p. 78-81, 2011.
- 11 **OSÓRIO, M. M.; LIRA, P. I. C.; BATISTA-FILHO, M.; ASHWORTH, A.** Prevalence of anemia in children 6–59 months old in the state of Pernambuco, Brazil. *Revista Panam Salud Pública*, v. 10, n. 2, p. 101-107, 2001. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/rpss/v10n2/5863.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2024.
- 12 **ROND, P. H. C.; TOMKINS, A. M.** Maternal iron status and intrauterine growth retardation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, p. 423-426, 1999.

- 13 **YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R.** Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *The Royal Society of Chemistry*, 2013. DOI: 10.1039/c3lc50169h.
- 14 **PANDEY, C. M.; AUGUSTINE, S.; KUMAR, S.; KUMAR, S.; NARA, S.; SRIVASTAVA, S.; & MALHOTRA, B. D.** Microfluidics based point-of-care diagnostics. *Biotechnology journal*, v. 13, n. 1, p. 1700047, 2018
- 15 **BATTAT, Sarah; WEITZ, David A.; WHITESIDES, George M.** An outlook on microfluidics: the promise and the challenge. *Lab on a Chip*, v. 22, n. 3, p. 530-536, 2022
- 16 **TERESO, João S. M.** Intoxicações por cianeto: riscos e estratégias terapêuticas. out. 2013.
- 17 INSTITUTE OF ELECTRICAL AND ELECTRONICS ENGINEERS. IEEE Standard for Information Technology—Telecommunications and Information Exchange Between Systems—Local and Metropolitan Area Networks—Specific Requirements—Part 11: Wireless LAN Medium Access Control (MAC) and Physical Layer (PHY) Specifications. *IEEE Xplore Digital Library*, 2007. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=1707678>. Acesso em: 15 nov. 2024.
- 18 **BISWAS, Sujay K., CHATTERJEE, Subhamoy; BANDYOPADHYAY, Soumya; KAR, Shantimoy; SOM, Nirmal K.; SAHA, Satadal; CHAKRABORTY, Suman.** Smartphone-Enabled Paper-Based Hemoglobin Sensor for Extreme Point-of-Care Diagnostics. *ACS Sensors*, v. 6, n. 3, p. 1077–1085, 2021. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssensors.0c02361>. Acesso em: 17 nov. 2024.
- 19 **LABTEST.** Padrão de Hemoglobina. 2016. Disponível em: https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Padr%C3%A3o_de_Hemoglobina_47_Port.pdf. Acesso em: 17 nov. 2024.

- 20 **KRIKORIAN, Renato.** Manual de redação acadêmica e científica. *Editora Univates*, 2012. Disponível em: https://www.univates.br/editora-univates/media/publicacoes/105/pdf_105.pdf. Acesso em: 20 nov. 2024.
- 21 SCIENCE DIRECT. Relationships between maternal and neonatal iron status and intrauterine growth. *Clinica Chimica Acta*, 1981. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(81\)90376-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90376-4). Acesso em: 20 nov. 2024.
- 22 **MAKARA, Cleyton Nascimento.** Desenvolvimento de um dispositivo microfluídico baseado em papel (μ PAD) para diagnóstico rápido em amostras de sangue no local de atendimento (POC). 2023. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre "Desenvolvimento de um dispositivo microfluídico baseado em papel (µPAD) para diagnóstico rápido em amostras de sangue no local de atendimento (POC)" (CAAE: 15478519.1.3001.8148) e está sendo desenvolvida sob orientação e supervisão do Prof. Dr. Emanuel Carriño do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP). Os objetivos do estudo são desenvolver um dispositivo portátil e de baixo custo em papel para auxiliar no diagnóstico e controle de anemia. Solicitamos a 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/ou a coleta de sangue capilar (ponta do dedo) e apresentar os resultados deste estudo em eventos científicos e publicar os resultados obtidos. 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 Emanuel Carriño através do e-mail emanuel@iqsc.usp.br. 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 atuantes no projeto 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

Código de coleta para controle interno: _____

Página 1 de 1

Via do Pesquisador