



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



YANDRA KAORI ITIKI

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DO AMINOÁCIDO 5-HIDROXITRIPTOFANO EM
FÁRMACOS**

Campo Grande – MS

2025

YANDRA KAORI ITIKI

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DO AMINOÁCIDO 5-HIDROXITRIPTOFANO EM
FÁRMACOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Gabriel Lucca

Campo Grande – MS

2025

RESUMO

O L-5-hidroxitriptofano (5-HTP) é um aminoácido aromático produzido no organismo humano a partir do L-triptofano, proveniente das proteínas alimentares. No entanto, a suplementação de L-triptofano não eleva significativamente os níveis de 5-HTP, sendo este obtido principalmente das sementes de *Griffonia simplicifolia* Baill., amplamente utilizado como suplemento alimentar. Devido à sua aplicação terapêutica no tratamento de condições como depressão, fibromialgia, insônia, obesidade e cefaleias crônicas, a determinação precisa do 5-HTP é essencial para garantir a qualidade de produtos suplementares e farmacêuticos. Neste trabalho, foi desenvolvido um método colorimétrico simples e de baixo custo para a determinação de 5-HTP, baseado na reação com o reagente de Folin–Ciocalteu e na análise de imagens digitais obtidas por smartphone. As reações foram realizadas em micropoços de um dispositivo miniaturizado fabricado por impressão 3D, com aquisição de imagens sob condições controladas de iluminação, posicionamento e distância. A intensidade de cor do produto formado foi avaliada por meio do sistema de cor RGB utilizando o aplicativo *Colorimeter*. Estudos de otimização envolvendo volume, tempo de reação e concentração dos reagentes foram realizados, sendo estabelecidas as seguintes condições ideais: volume total de 40 µL (24 µL de solução de 5-HTP, 8 µL de reagente Folin–Ciocalteu 0,10 mol·L⁻¹ e 8 µL de solução de Na₂CO₃ a 7,5%), tempo de reação de 20 minutos. Uma curva analítica foi construída na faixa de concentração de 1,5 a 12,0 mg·L⁻¹, com coeficiente de determinação de 0,9948, demonstrando ajuste linear satisfatório, e apresentando valores de RSD inferiores a 13 %. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) alcançados foram de 0,346 mg·L⁻¹ e 1,155 mg·L⁻¹ respectivamente. No estudo de interferentes, íons inorgânicos comuns não afetaram significativamente o sinal colorimétrico do 5-HTP, enquanto espécies redutoras, como ácido ascórbico e catecolaminas, promoveram interferência acentuada. O método colorimétrico proposto foi aplicado à quantificação de 5-HTP em amostras farmacêuticas. A exatidão do método foi verificada por comparação com a espectrofotometria UV-Vis, sendo observada boa concordância entre os resultados, com erros relativos inferiores a 10 %. Todas as amostras farmacêuticas analisadas atenderam aos critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira para teor de princípio ativo. Os resultados indicam que o método proposto é preciso, confiável e apresenta potencial para aplicação em análises de rotina e no controle de qualidade de suplementos comerciais de 5-HTP.

Palavras-chave: L-5-hidroxitriptofano (5-HTP); Método colorimétrico; Dispositivos miniaturizados; Impressão 3D; Análise por imagem digital.

ABSTRACT

L-5-hydroxytryptophan (5-HTP) is an aromatic amino acid produced in the human body from L-tryptophan, derived from dietary proteins. However, supplementation with L-tryptophan does not significantly increase 5-HTP levels, which is mainly obtained from the seeds of *Griffonia simplicifolia* Baill. and widely used as a dietary supplement. Due to its therapeutic application in the treatment of conditions such as depression, fibromyalgia, insomnia, obesity, and chronic headaches, the accurate determination of 5-HTP is essential to ensure the quality of pharmaceutical and dietary supplement products. In this work, a simple and low-cost colorimetric method was developed for the determination of 5-HTP, based on the reaction with the Folin–Ciocalteu reagent and the analysis of digital images acquired using a smartphone. The reactions were carried out in microwells of a miniaturized device fabricated by 3D printing, with image acquisition performed under controlled lighting, positioning, and distance conditions. The color intensity of the reaction product was evaluated using the RGB color system with the aid of the *Colorimeter* application. Optimization studies involving reaction volume, reaction time and reagent concentration were conducted, establishing the following optimal conditions: total volume of 40 μL (24 μL of 5-HTP solution, 8 μL of 0.10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Folin–Ciocalteu reagent, and 8 μL of 7.5% Na_2CO_3 solution) and a reaction time of 20 minutes. An analytical curve was constructed over the concentration range from 1.5 to 12.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, with a determination coefficient of 0.9948, indicating satisfactory linearity and RSD values below 13 %. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) achieved were 0.346 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and 1.155 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. In the interference study, common inorganic ions did not significantly affect the colorimetric signal of 5-HTP, whereas reducing species, such as ascorbic acid and catecholamines, promoted pronounced interference. The proposed colorimetric method was applied to the quantification of 5-HTP in pharmaceutical samples. Method accuracy was verified by comparison with UV–Vis spectrophotometry, showing good agreement between the results, with relative errors below 10%. All analyzed pharmaceutical samples complied with the specifications established by the Brazilian Pharmacopoeia for active ingredient content. The results indicate that the proposed method is precise, reliable, and presents potential for application in routine analyses and quality control of commercial 5-HTP supplements.

Keywords

5-hydroxytryptophan; colorimetric method; miniaturized devices; 3D printing; digital image analysis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
CCF	Cromatografia de camada fina
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPR	Desvio padrão relativo
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
RGB	Red, green and blue
μPAD	Microdispositivos Analíticos de Papel
PAD	Dispositivos Analíticos de Papel

SUMÁRIO

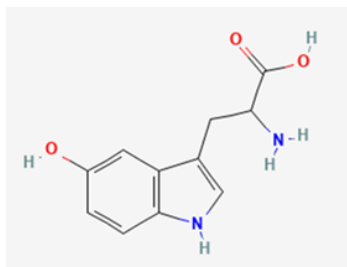
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. L-5-Hidroxitriptofano	7
1.2. Plataformas miniaturizadas e impressão 3D	10
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Materiais e reagentes	14
3.2. Fabricação do dispositivo impresso em 3D	14
3.3. Sistema de captura de imagens	15
3.3.1. Processamento e análise de imagens	16
3.4. Procedimento analítico para determinação do 5-hidroxitriptofano	19
3.5. Análise de amostras farmacêuticas	20
3.6. Análises por espectrofotometria UV-Vis	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Reação colorimétrica	22
4.2. Testes preliminares	23
4.2.1. Definição das condições iniciais do método	24
4.3. Otimização do método	24
4.3.1. Avaliação do tempo de reação	25
4.3.2. Avaliação da concentração do reagente Folin-Ciocalteu	26
4.3.3. Avaliação da concentração de carbonato de sódio	28
4.3.4. Determinação da faixa linear	30
4.4. Estudo da estabilidade do produto colorido	31
4.5. Repetibilidade	34
4.6. Reprodutibilidade	35
4.7. Figuras de mérito analíticas	38
4.8. Estudo de interferentes	41
4.9. Determinação do 5-HTP em amostra farmacêutica e comparação com espectrofotometria UV-Vis	44
5. CONCLUSÃO	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. L-5-Hidroxitriptofano

O L-5-Hidroxitriptofano (5-HTP) é um aminoácido aromático produzido naturalmente pelo corpo humano a partir do aminoácido essencial L-triptofano, por ação da enzima triptofano hidroxilase (1,2). Sua estrutura molecular, apresentada na **Figura 1**, evidencia a presença do anel indólico e dos grupos funcionais característicos desse metabólito, os quais influenciam diretamente sua atividade biológica. Embora o L-triptofano seja o precursor primário, sua suplementação isolada não promove um aumento significativo na formação desse metabólito. Por isso, o referido composto, extraído principalmente das sementes de *Griffonia simplicifolia* Baill, tornou-se uma alternativa importante, sendo amplamente incorporado em suplementos nutricionais (3).

Figura 1 – Estrutura molecular do 5-hidroxitriptofano (5-HTP).



Fonte: PubChem (4)

Como intermediário direto na rota de biossíntese da serotonina, essa molécula participa da regulação de processos fisiológicos relacionados ao humor, sono, apetite e dor. Assim, sua administração tem sido associada ao manejo de diversas condições, como depressão, ansiedade, fibromialgia, insônia, obesidade e cefaleias crônicas, o que justifica o crescente interesse clínico e nutracêutico por este composto (1,2,5). Diante desse cenário, torna-se essencial a padronização das formulações contendo o ingrediente ativo para garantir qualidade, segurança e eficácia terapêutica.

Diversas técnicas analíticas têm sido empregadas para a determinação de 5-HTP, incluindo espectroscopia UV-vis (3), espectrometria de fluorescência (6) cromatografia líquida de alta eficiência (7), cromatografia líquida de ultra eficiência (8) e eletroforese capilar (2).

Entretanto, algumas dessas técnicas apresentam restrições importantes, como necessidade de instrumentação sofisticada e elevado custo operacional (2,7,8). Além disso, muitas delas requerem procedimentos elaborados de preparo de amostra, envolvendo etapas de extração, separação ou remoção de interferentes, o que aumenta o tempo de análise e a complexidade experimental (9). Tais limitações fortalecem o interesse em métodos alternativos que conciliem simplicidade, baixo custo e rapidez analítica, possibilitando a obtenção de resultados confiáveis sem a necessidade de infraestrutura laboratorial complexa.

Assim, observa-se um crescente interesse no desenvolvimento de métodos analíticos alternativos baseados em abordagens simples e acessíveis, que conciliem baixo custo, rapidez analítica e confiabilidade dos resultados. Entre essas estratégias destacam-se os métodos baseados em detecção colorimétrica, os quais oferecem vantagens significativas em termos de viabilidade prática, facilidade de aplicação e potencial uso fora de ambientes laboratoriais convencionais. A simplicidade experimental, o baixo custo dos reagentes e a possibilidade de leitura na região do visível tornam essa estratégia particularmente adequada para o desenvolvimento de métodos analíticos simples, portáteis e compatíveis com plataformas miniaturizadas.

A detecção colorimétrica constitui uma das abordagens analíticas mais tradicionais e amplamente empregadas na química, fundamentando-se na formação de espécies coloridas cuja intensidade da cor é proporcional à concentração do analito.

No caso do L-5-hidroxitriptofano (5-HTP), a reação colorimétrica com o reagente de Folin–Ciocalteu destaca-se pela capacidade desse reagente em ser reduzido pelo analito, resultando na formação de complexos polimolibdênio-politungstênio de coloração azul intensa (3). O reagente de Folin–Ciocalteu é uma mistura de heteropoliácidos à base de molibdênio e tungstênio em alto estado de oxidação (Mo^{6+} e W^{6+}) (10). A intensidade da cor formada está diretamente relacionada ao grau de redução dos heteropoliânions presentes no reagente, permitindo a quantificação do composto tanto por métodos espectrofotométricos quanto por análise de imagem.

Diferentemente das técnicas espectrofotométricas UV–Vis tradicionais, que operam pela medida da transmitância ou absorbância da radiação através da amostra, os métodos baseados em imagem digital baseiam-se majoritariamente no princípio da reflectância. Nesse caso, avalia-se a radiação refletida pela superfície da amostra colorida, sendo esta dependente da intensidade da cor formada após a reação química (11). Essa resposta cromática torna o sistema particularmente adequado para abordagens analíticas

rápidas e de fácil visualização.

A disponibilidade de respostas colorimétricas visíveis possibilita que a detecção analítica seja realizada com o auxílio de dispositivos de aquisição de imagem. Os produtos formados nas reações colorimétricas podem ser registrados por webcams, scanners, câmeras digitais e, especialmente, *smartphones* (12).

Nos últimos anos, o avanço tecnológico e a ampla disseminação de *smartphones* ampliaram significativamente sua aplicação em diferentes contextos, incluindo o científico (12). Esse cenário foi intensificado a partir de 2020, em decorrência da pandemia de COVID-19, período no qual esses dispositivos passaram a desempenhar papel central em atividades remotas, educacionais e profissionais. Paralelamente, os avanços na resolução das câmeras, na capacidade de processamento e na diversidade de aplicativos contribuíram para consolidar os smartphones como ferramentas promissoras para a realização de análises químicas qualitativas e quantitativas (13,14).

Nesse cenário, a ampla disponibilidade de smartphones impulsionou o desenvolvimento de métodos baseados em imagem digital (*Digital Image-Based*, DIB), os quais têm se consolidado como alternativas aos métodos instrumentais convencionais. Essas abordagens baseiam-se na captura e análise de imagens dos produtos formados em reações colorimétricas, extraindo informações qualitativas e quantitativas a partir das variações de cor observadas. Entre suas principais vantagens destacam-se o baixo custo, a acessibilidade, a rapidez analítica, a portabilidade e a possibilidade de aplicação em diferentes áreas, como na determinação de compostos fenólicos totais via reagente de Folin–Ciocalteu (15), na quantificação de etanol em bebidas (12) e na determinação de amônia e nitrogênio total em amostras ambientais e alimentícias (16).

A análise quantitativa das imagens digitais requer a decomposição das cores em modelos matemáticos de representação cromática. De forma geral, um modelo de cor define um sistema de coordenadas e um espaço específico no qual cada cor é representada por um ponto único. Entre os sistemas mais utilizados estão o modelo RGB (vermelho, verde e azul), CMY, CMYK, bem como aqueles baseados na percepção humana, como HSV e HSL (11).

O modelo RGB é o mais empregado em análises DIB. Nesse sistema, cada cor é descrita pela combinação das intensidades dos canais vermelho, verde e azul, cujos valores variam individualmente de 0 a 255. A combinação desses canais permite representar até 16.777.216 cores diferentes. Valores nulos nos três canais correspondem à cor preta, enquanto valores máximos resultam na cor branca (17).

A obtenção dos valores numéricos associados aos canais de cor pode ser realizada por meio de softwares e aplicativos específicos de análise de imagem, tais como Color Grab, PhotoMetrix®, PhotoMetrix UVC (18), ImageJ Software (12), entre outros. Essas ferramentas possibilitam a conversão da informação visual em dados quantitativos, permitindo a construção de curvas analíticas e a quantificação de espécies químicas a partir da intensidade da cor gerada.

1.2. Plataformas miniaturizadas e impressão 3D

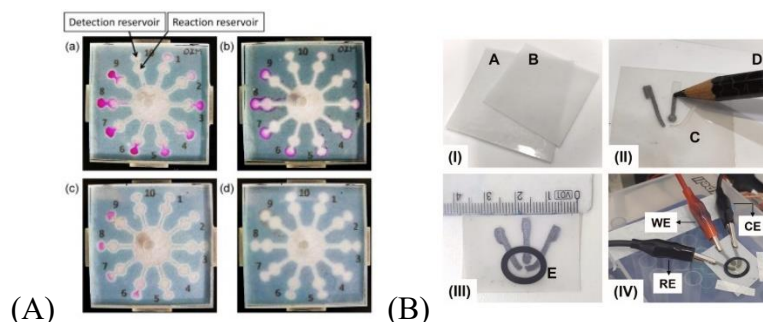
A simplicidade e a resposta visual proporcionadas pelos métodos colorimétricos tornam essa abordagem particularmente atrativa para a integração com plataformas analíticas miniaturizadas, visando à redução do consumo de reagentes, à portabilidade e à possibilidade de análises rápidas. Nesse cenário, os microdispositivos analíticos de papel (μ PADs) têm sido amplamente explorados como suportes para reações colorimétricas, em razão de sua fácil fabricação, baixo custo, estrutura simples, possibilidade de produção em larga escala e reduzido consumo de amostras e reagentes (19–21).

Nesse sentido, a miniaturização dessas plataformas representa uma vantagem para o desempenho analítico, pois permite alcançar maior sensibilidade, acelerar processos de separação e aumentar a velocidade das reações químicas (20). Além disso, a versatilidade estrutural dos μ PADs favorece a incorporação de diferentes estratégias de detecção, ampliando seu potencial de aplicação.

Abordagens eletroquímicas de baixo custo também têm sido incorporadas a esses dispositivos, como demonstrado no estudo que empregou sensores impressos para a determinação eletroquímica de 5-HTP, resultando em um dispositivo portátil, econômico e com boa sensibilidade analítica (22). Esse avanço evidencia a capacidade dos dispositivos miniaturizados de atender a demandas analíticas específicas, reforçando seu papel como alternativas promissoras às técnicas convencionais.

Além da determinação de 5-HTP, os PADs têm sido aplicados em diferentes áreas, como monitoramento ambiental (23,24), diagnóstico clínico (25), análises de alimentos (24) e aplicações forenses (26). Adicionalmente, também têm sido explorados em procedimentos analíticos específicos, como titulações ácido-base (27) e ensaios enzimáticos (20). Essa diversidade de aplicações reforça a adaptabilidade e relevância dos dispositivos de papel no contexto da química analítica moderna. A **Figura 2** apresenta exemplos de dispositivos analíticos baseados em papel (PADs) descritos na literatura.

Figura 2 - Exemplos de dispositivos analíticos baseados em papel (PADs): (A) dispositivo empregado em titulação ácido–base. (B) dispositivo com sensor eletroquímico para a determinação de 5-HTP.



Fonte: Adaptado de (22,27)

Entretanto, a eficiência da integração entre reações colorimétricas e plataformas de papel depende fortemente da estabilidade da resposta colorimétrica e da interação do sistema químico com o substrato celulósico. Em sistemas nos quais ocorre absorção excessiva, difusão ou instabilidade da cor formada, limitações analíticas podem comprometer a reprodutibilidade e a confiabilidade das medições.

Diante dessas limitações, torna-se necessário avaliar plataformas alternativas que preservem as vantagens da miniaturização, mas ofereçam maior controle estrutural e melhor estabilidade da resposta colorimétrica. Nesse sentido, a impressão 3D surge como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de dispositivos analíticos miniaturizados, permitindo a construção de suportes personalizados, com geometrias bem definidas e superfícies adequadas à leitura óptica.

A aplicabilidade da impressão 3D em química analítica tem crescido rapidamente, com utilização em biossensores, dispositivos microfluídicos, células de fluxo e plataformas de detecção diversas (28,29), incluindo aplicações em eletroquímica (30).

A impressão 3D, também conhecida como manufatura aditiva, consiste na construção de objetos tridimensionais por deposição sucessiva de camadas de material a partir de um modelo digital. O processo tem início com a elaboração do modelo virtual em softwares de desenho assistido por computador (CAD), cujo arquivo é posteriormente fatiado (slicing) e reproduzido camada a camada pela impressora (31).

Dentre as técnicas disponíveis, a modelagem por deposição fundida (Fused Deposition Modeling — FDM) é a mais amplamente utilizada devido à simplicidade operacional e ao baixo custo dos equipamentos. Nesse método, materiais termoplásticos aquecidos são extrudados e depositados sequencialmente, permitindo a construção

gradual da peça tridimensional (28,29,32).

Os polímeros mais empregados no processo FDM são o ácido polilático (PLA) e o acrilonitrila butadieno estireno (ABS), disponibilizados na forma de filamentos e selecionados conforme a necessidade mecânica, térmica ou estrutural do dispositivo (28,32).

A ampla disponibilidade desses materiais, associada à acessibilidade e ao custo reduzido das impressoras FDM, tem favorecido a adoção da impressão 3D em diferentes contextos industriais e laboratoriais, como nos setores automotivo, aeroespacial, arquitetura, defesa, moda e indústria alimentícia, evidenciando seu potencial tecnológico e sua adaptabilidade a múltiplas finalidades e consolidando a impressão 3D como ferramenta estratégica para o desenvolvimento de dispositivos analíticos (28,29,32).

Adicionalmente, técnicas baseadas em fotopolimerização, como a estereolitografia, têm sido destacadas na literatura por possibilitarem maior resolução geométrica e melhor acabamento superficial em comparação às técnicas baseadas em extrusão, tornando-se particularmente adequadas para a fabricação de dispositivos analíticos miniaturizados que exigem controle dimensional e leitura óptica confiável (29).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver um método colorimétrico simples, portátil e de baixo custo para a determinação de L-5-hidroxitriptofano (5-HTP), baseado na reação com o reagente de Folin–Ciocalteu e na aquisição e análise de imagens digitais por smartphone, utilizando um dispositivo miniaturizado impresso em 3D.

Objetivos específicos

- Otimizar as condições experimentais do método proposto, visando maximizar a resposta colorimétrica.
- Desenvolver e empregar um dispositivo miniaturizado impresso em 3D para a realização das reações colorimétricas, reduzindo o consumo de reagentes e o tempo de análise.
- Avaliar a aplicação da análise de imagens digitais por smartphone, por meio da extração dos canais de cor, para a quantificação do 5-HTP.
- Avaliar o desempenho analítico do método proposto quanto à linearidade, precisão e reprodutibilidade
- Aplicar o método proposto à análise de amostras farmacêuticas contendo 5-HTP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e reagentes

O padrão L-5-hidroxitriptofano (pureza $\geq 99,0$ %) foi fornecido pela Infinity Pharma (Campinas, SP, Brasil). O reagente Folin-Ciocalteu 2M, utilizado como agente cromogênico foi obtido da Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brasil). O carbonato de sódio anidro (pureza $\geq 99,5$ %) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todas as soluções foram preparadas com água purificada (resistividade $\geq 14,3 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$), obtida por meio de um sistema de purificação por osmose reversa, modelo RO0310 (Permutation, Curitiba, PR, Brasil).

A solução estoque de L-5-hidroxitriptofano ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) foi preparada pela dissolução de 5 mg do padrão em balão volumétrico de 100,00 mL. A solução estoque de carbonato de sódio 20% (m/v) foi preparada pela dissolução de 2.02 g do sal em balão volumétrico de 10,00 mL. A partir destas soluções estoque, foram obtidas, por diluições apropriadas, as concentrações de trabalho utilizadas nos estudos de otimização, preparadas diariamente.

Os seguintes reagentes também foram utilizados para avaliar potenciais interferências: Cloreto de potássio (pureza $\geq 99,0$ %) e cloreto de sódio (pureza $\geq 99,0$ %) adquiridos da Neon Comercial (Suzano, SP, Brasil), nitrato de sódio (pureza $\geq 99,0$ %) adquirido da Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brasil), ácido ascórbico (pureza $\geq 99,0$ %), ácido úrico (pureza $\geq 99,0$ %) obtidos da Sigma-Aldrich (Buchs, Suíça), cloridrato de dopamina adquirido da Teuto (Anápolis, GO, Brasil) e epinefrina ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) adquirida da Hipolabor (Sabará, MG, Brasil).

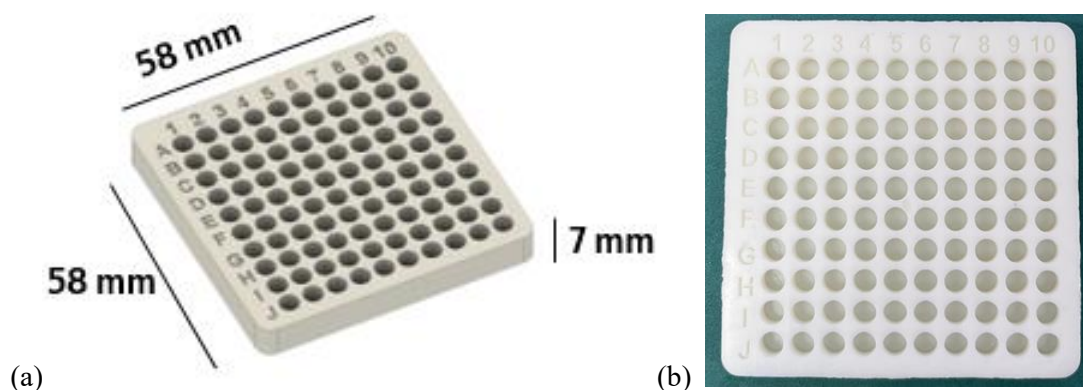
3.2. Fabricação do dispositivo impresso em 3D

Para a realização das microrreações colorimétricas foi projetado um dispositivo em software CAD e fabricada por estereolitografia (MSLA) em impressora 3D (Elegoo Mars 3 4K, Elegoo, Shenzhen, Guangdong, China) utilizando resina opaca branca (Elegoo Standard 2.0 White), escolhida por favorecer a visualização das variações de cor.

A peça final apresenta dimensões de $58 \times 58 \times 7 \text{ mm}$, e contém 100 micropoços organizados em matriz de 10 linhas (A–J) por 10 colunas (1–10). Cada poço possui 4 mm de diâmetro e comporta até 60 μL , possibilitando a realização de reações na escala de

microlitros com economia de reagentes. As marcações alfanuméricas auxiliam na identificação dos micropoços durante os ensaios (**Figura 3**).

Figura 3 - (a) Modelo digital do dispositivo desenvolvido em CAD; (b) Dispositivo físico.

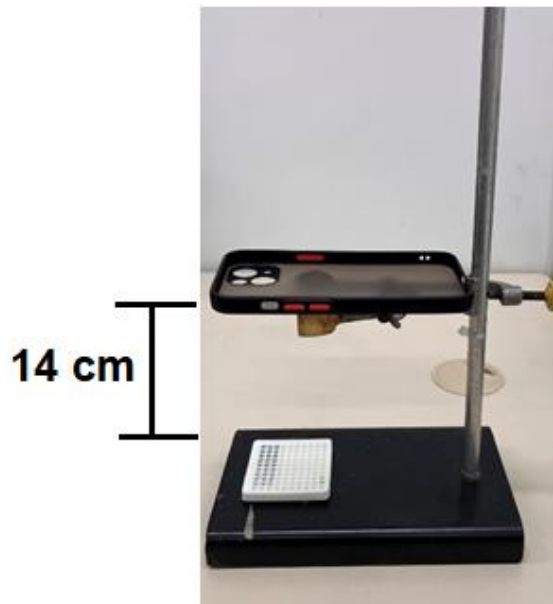


Fonte: Autora

3.3. Sistema de captura de imagens

As imagens foram adquiridas com o auxílio de um suporte universal de laboratório acoplado a uma garra metálica para fixação do smartphone. A distância entre a câmera e a superfície da placa foi mantida em 14 cm, valor previamente otimizado para garantir foco e enquadramento constantes. As capturas foram realizadas sob iluminação ambiente controlada, sem uso de flash ou zoom, mantendo-se a placa sempre na mesma posição (**Figura 4**). Testes preliminares com sistemas fechados de iluminação também foram avaliados; no entanto, observou-se saturação da resposta colorimétrica do produto formado, mesmo com controle da intensidade luminosa, motivo pelo qual essa abordagem foi descartada. A descrição detalhada do processamento das imagens é apresentada na Seção 3.3.1.

Figura 4 – Foto ilustrativa do sistema projetado para a captura das imagens composto por placa com micropoços posicionada na base e smartphone fixado a uma distância de 14 cm entre a lente da câmera e a superfície da placa.



Fonte: Autora

3.3.1. Processamento e análise de imagens

As imagens adquiridas conforme descritas na Seção 4.3 foram analisadas por smartphone modelo iPhone 13 (Apple), com sistema iOS 17.6.1 e câmera de 12 megapixels (resolução de 4000×3000 pixels).

3.3.1.1. Escolha do aplicativo de leitura de cor

Foram testados diferentes aplicativos e softwares para leitura colorimétrica, como *What a Color*, *Photometrix* e o *Corel*. O aplicativo *Colorimeter* (Serhii Smyk) foi selecionado por sua compatibilidade com a proposta e pela facilidade de extração dos dados RGB diretamente da imagem, estando disponível para dispositivo iOS. Após a seleção do aplicativo, estabeleceu-se o protocolo de padronização da leitura (Seção 3.3.1.2).

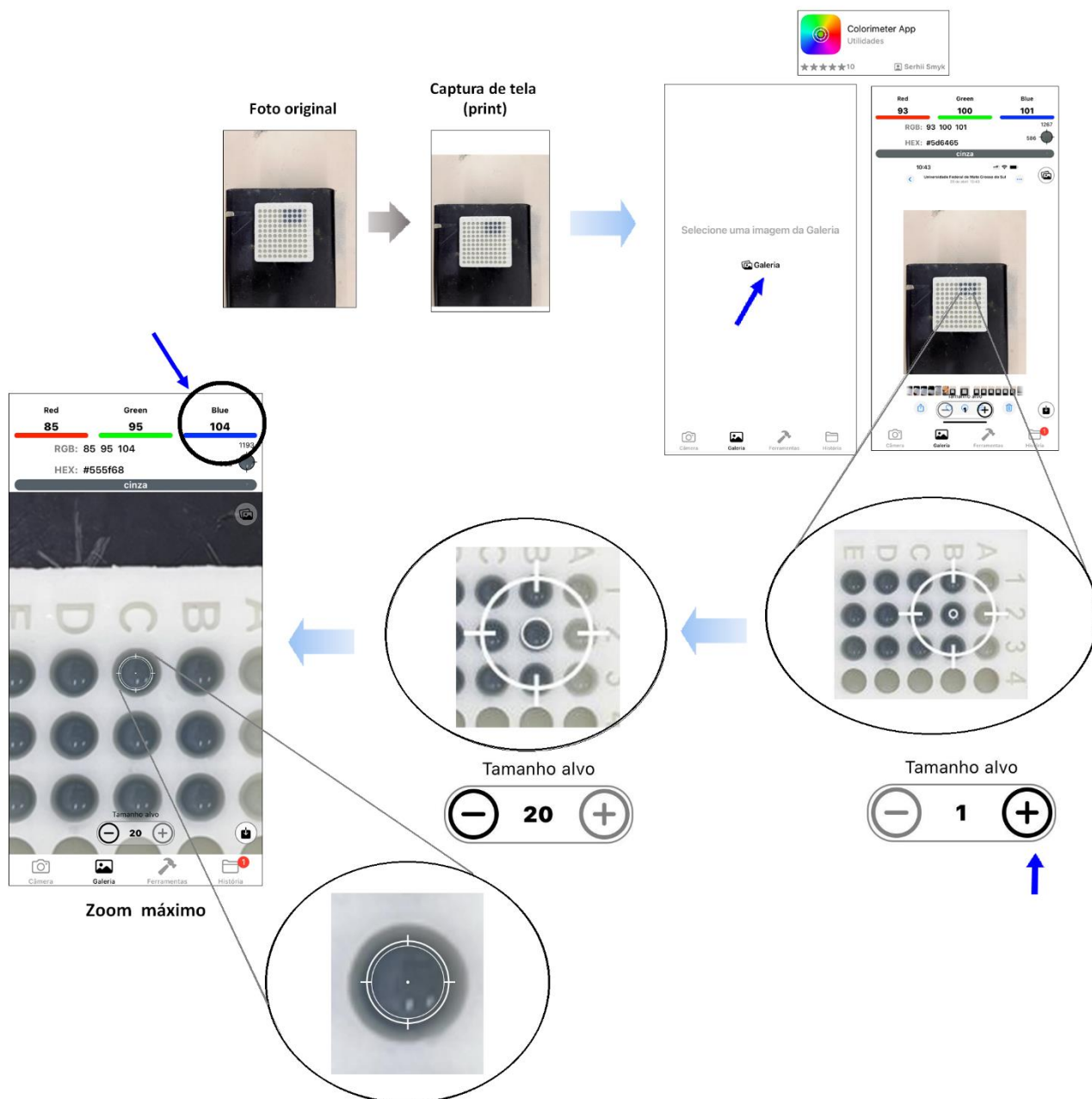
3.3.1.2. Padronização da leitura

Para a padronização da leitura no aplicativo *Colorimeter* (iOS), após a captura da imagem foi realizada uma captura de tela (*print*), com o objetivo de reduzir a escala da imagem e permitir a adequada correspondência entre o tamanho do alvo e a área do

micropoço. O *print* foi carregado no aplicativo por meio da função *Galeria*. O alvo foi ajustado ao tamanho máximo permitido (20), aplicou-se o zoom máximo disponível no próprio aplicativo, para fins de visualização, de modo a possibilitar sua centralização sobre o micropoço, cobrindo integralmente sua área útil. Em seguida, registrou-se o valor do canal *B* (azul) do sistema RGB, conforme ilustrado na **Figura 5**.

Esse protocolo foi aplicado em todas as medições, garantindo padronização experimental e reprotutibilidade dos resultados. Os dados obtidos foram então tratados matematicamente, conforme descrito na Seção 3.3.1.3.

Figura 5 – Procedimento de padronização da leitura no aplicativo Colorimeter para obtenção do valor do canal B (RGB) no micropoço.



Fonte: Elaborado pela autora

3.3.1.3. Tratamento matemático

Para a seleção do canal a ser utilizado, foram avaliadas as respostas dos canais do sistema RGB por meio de curvas analíticas do analito em função da intensidade de cor. O canal B (azul) foi adotado para a quantificação do sinal colorimétrico devido à coloração azul do produto da reação. O valor bruto da intensidade foi transformado em sinal analítico por meio de tratamento matemático, conforme a Equação 1:

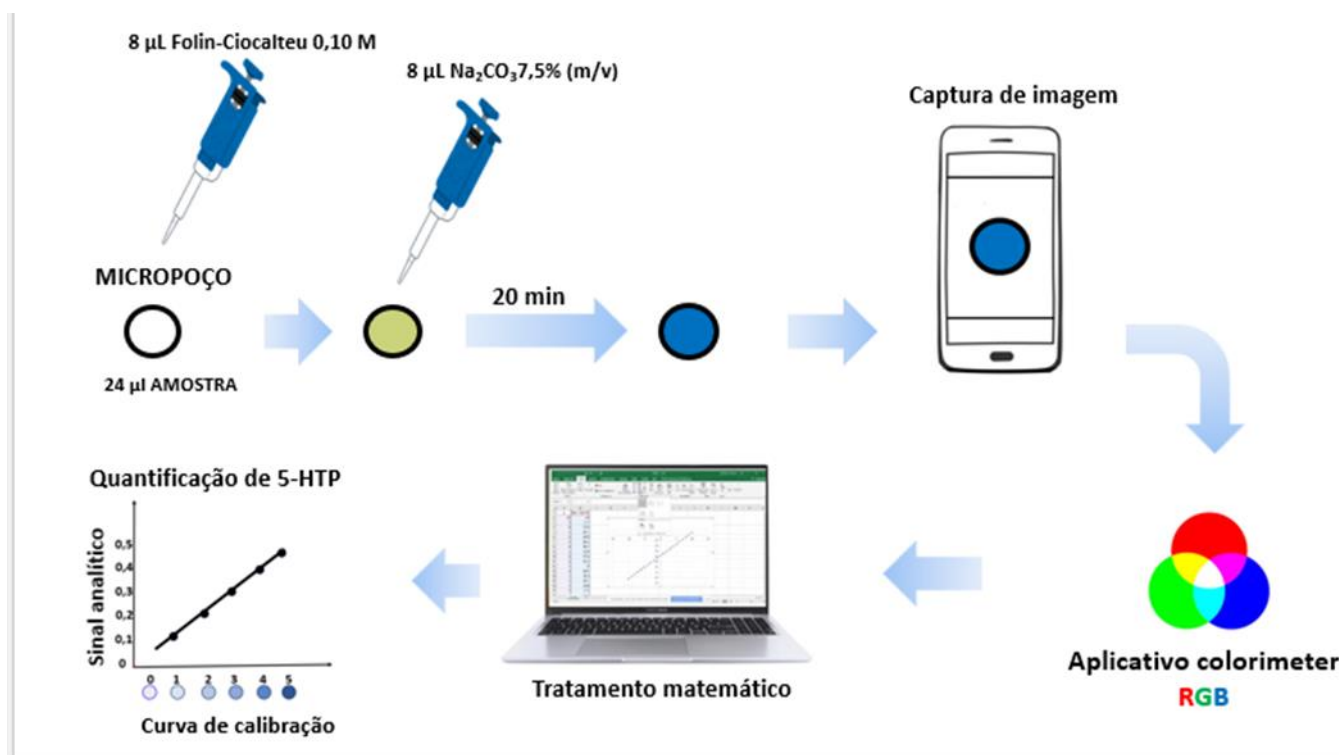
$$\text{Sinal analítico} = (255 - B_{\text{ANALITO}}) - (255 - B_{\text{BRANCO}}) \quad (\text{Eq. 1})$$

Essa abordagem permitiu correção em relação ao branco, garantindo maior reprodutibilidade nas medições. Os valores obtidos foram utilizados na análise estatística e na construção dos gráficos dos estudos experimentais.

3.4. Procedimento analítico para determinação do 5-hidroxitriptofano

A reação colorimétrica entre o 5-HTP e o reagente de Folin-Ciocalteu foi baseada no método descrito por Subbaraju et al. (33), com adaptações para microplaca e detecção por imagem digital. A representação esquemática do procedimento analítico é apresentada na **Figura 6**. Em cada micropoço, foram adicionados 24 µL da amostra ou solução padrão de 5-hidroxitriptofano, 8 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,10 M e 8 µL da solução de carbonato de sódio a 7,5% (m/v). Após 10 minutos de reação, a resposta colorimétrica foi registrada pelo sistema de captura (Seção 3.3). O mesmo procedimento foi aplicado ao branco (água ultrapura).

Figura 6 – Esquema representativo das etapas do método colorimétrico desenvolvido para a quantificação de 5-hidroxitriptofano (5-HTP).



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

3.5. Análise de amostras farmacêuticas

Cápsulas farmacêuticas comerciais utilizadas nas análises foram adquiridas em uma farmácia de manipulação local, contendo 100 mg de 5-HTP por unidade. O conteúdo de duas cápsulas foi transferido para um balão volumétrico de 100,00 mL, solubilizado em água purificada e homogeneizado. A solução obtida foi filtrada com auxílio de uma seringa equipada com filtro de membrana de 0,22 µm e, posteriormente, diluída em balão volumétrico de 50,00 mL, obtendo-se uma concentração final de 10 mg·L⁻¹. A solução preparada foi utilizada tanto no sistema colorimétrico por imagem digital quanto nos ensaios de comparação por espectrofotometria UV-Vis.

3.6. Análises por espectrofotometria UV-Vis

Para validar o método proposto, as amostras também foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis, com base no procedimento descrito por Subbaraju *et al.* (33). Aliquotas da solução padrão de 5-HTP (50 mg·L⁻¹) foram transferidas para balões volumétricos de 10,00 mL, seguidas da adição de 2,0 mL de água purificada, 2 mL do

reagente de Folin-Ciocalteu ($0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (7,5 %, m/v). O volume de cada balão foi então completado com água purificada. Após o tempo de reação estabelecido, as soluções foram transferidas para cubetas de 3 mL e submetidas à leitura a 736 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

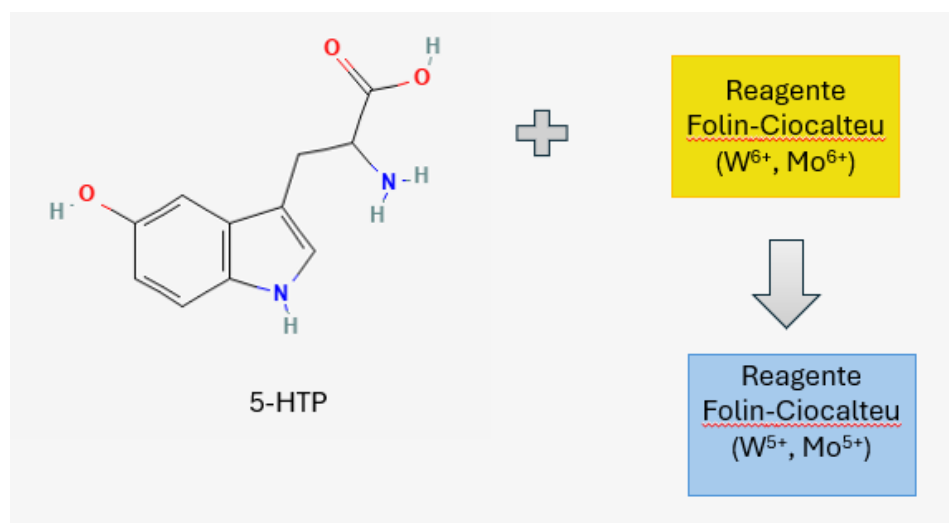
4.1. Reação colorimétrica

O reagente Folin-Ciocalteu é amplamente utilizado para a determinação do teor total de grupos fenólicos em diferentes matrizes. Em meio básico, esses compostos fenólicos atuam como agentes redutores, promovendo a redução do complexo fosfomolibdato-fosfotungstato presente no reagente, composto principalmente por íons de molibdênio (Mo^{6+}) e tungstênio (W^{6+}) organizados em estruturas heteropoliácidas (10). Na presença de carbonato de sódio, o meio torna-se alcalino, favorecendo a reação e resultando na formação de um complexo de coloração azul (3), cuja intensidade é proporcional à concentração de grupos fenólicos na amostra.

No presente trabalho, este princípio foi utilizado para detecção colorimétrica do 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que por conter um grupo fenólico em sua estrutura, pode reagir com o reagente Folin-Ciocalteu formando o produto colorido. Embora o mecanismo específico de reação para cada composto não seja completamente elucidado na literatura, sabe-se que moléculas contendo grupos fenólicos, como é o caso do 5-hidroxitriptofano (5-HTP), promove a redução de um dos átomos de oxigênio dos oxianions de tungstato ou molibdato presentes no reagente de Folin-Ciocalteu ($3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ e $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (34), resultando na formação de uma ou mais espécies responsáveis pela coloração azul intensa característica (3). O esquema ilustrativo do princípio da reação colorimétrica é apresentado na **Figura 7**.

Com base nesse princípio, o método colorimétrico foi aplicado neste trabalho para a detecção do 5-HTP.

Figura 7 - Esquema ilustrativo do princípio da reação colorimétrica baseada no reagente Folin–Ciocalteu, envolvendo a redução dos heteropoliácidos de Mo(VI)/W(VI) para suas formas reduzidas na presença de 5-hidroxitriptofano (5-HTP).



Fonte: Estrutura molecular obtida de PubChem (CID 135) (4); esquema elaborado pela autora.

4.2. Testes preliminares

Inicialmente, avaliou-se a aplicação da reação colorimétrica do 5-HTP com o reagente de Folin–Ciocalteu em microdispositivos analíticos de papel (μ PADs), visando explorar as vantagens associadas à miniaturização e à portabilidade desse tipo de plataforma. No entanto, observou-se que, após o processo de secagem do papel, a coloração formada apresentava perda significativa de intensidade, comprometendo a estabilidade do sinal analítico e a reprodutibilidade das leituras.

Diante dessa limitação, optou-se pela adoção de um dispositivo impresso em 3D, o qual permitiu manter a amostra em meio líquido durante a etapa de detecção, assegurando maior estabilidade da resposta colorimétrica e melhor controle das condições experimentais.

A técnica de estereolitografia por máscara (MSLA) foi selecionada em razão do melhor acabamento superficial e da maior resolução geométrica do dispositivo obtido, caracterizados por menor rugosidade e maior uniformidade da superfície, além de maior densidade do material polimerizado, o que evita a infiltração das soluções nos micropoços. Em contraste, dispositivos fabricados por modelagem por deposição fundida (FDM) apresentaram maior rugosidade superficial, a qual interferia na leitura da resposta colorimétrica e comprometia a reprodutibilidade analítica.

Observou-se ainda que o dispositivo impresso em 3D não apresentou manchamento permanente após a realização das reações colorimétricas. Após a lavagem

com água, os micropoços retornaram ao aspecto original, permitindo a reutilização do dispositivo em ensaios subsequentes, sem comprometimento visual ou funcional. Essa característica elimina a necessidade de fabricação contínua de novos dispositivos, contribuindo para a redução de custos, do consumo de materiais e da geração de resíduos, além de reforçar a praticidade e a sustentabilidade do método proposto.

4.2.1. Definição das condições iniciais do método

Após a fabricação do dispositivo, foram realizados ensaios preliminares adicionais com o objetivo de estabelecer as condições iniciais de trabalho do método, as quais serviram de base para os estudos sistemáticos de otimização descritos na seção seguinte. Embora os micropoços suportem volumes de até 60 μL , estabeleceu-se o volume total de 40 μL como ideal, por oferecer maior segurança contra transbordamentos, facilitar a aplicação dos reagentes e garantir melhor acomodação da solução na região de leitura.

Considerando esse volume total, avaliou-se a proporção entre a solução de 5-HTP, o reagente de Folin–Ciocalteu e a solução de carbonato de sódio, com base em ensaios preliminares exploratórios realizados em tubos do tipo Eppendorf, tomando como referência o método espectrofotométrico descrito por Subbaraju et al. (3). Nessa condição, a proporção de 24 μL de 5-HTP, 8 μL de reagente de Folin–Ciocalteu e 8 μL de carbonato de sódio mostrou-se adequada do ponto de vista operacional e compatível com a aplicação no dispositivo impresso em 3D, sendo adotada como condição inicial para os estudos de otimização apresentados na Seção 4.3.

4.3. Otimização do método

A partir das condições iniciais previamente estabelecidas, a otimização do método foi conduzida por meio da avaliação individual dos principais parâmetros que influenciam a formação do produto colorido.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados são apresentados como a média das repetições, seguindo o método de captura e processamento de imagens descrito em Materiais e Métodos. Em cada ensaio, apenas um parâmetro foi variado, mantendo-se os demais constantes, de modo a permitir a avaliação isolada de sua influência sobre a resposta analítica. Os resultados obtidos são discutidos nas subseções a seguir.

4.3.1. Avaliação do tempo de reação

A fim de determinar o tempo necessário para o desenvolvimento completo da coloração na reação entre o 5-hidroxitriptofano (5-HTP) e o reagente de Folin–Ciocalteu, foram avaliados tempos de reação de 3, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Para esse ensaio, foram adotadas concentrações de trabalho de 5-HTP ($6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), reagente de Folin–Ciocalteu ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e carbonato de sódio [1,5 % (m/v)], mantidas constantes durante o estudo.

Tempos superiores a 60 minutos não foram considerados devido à evaporação da amostra, que poderia comprometer a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados.

As misturas foram preparadas em intervalos pré-estabelecidos, de modo que cada linha do dispositivo correspondesse a um intervalo específico: A (3 min), B (10 min), C (20 min), D (30 min), E (40 min), F (50 min) e G (60 min) (**Figura 8**).

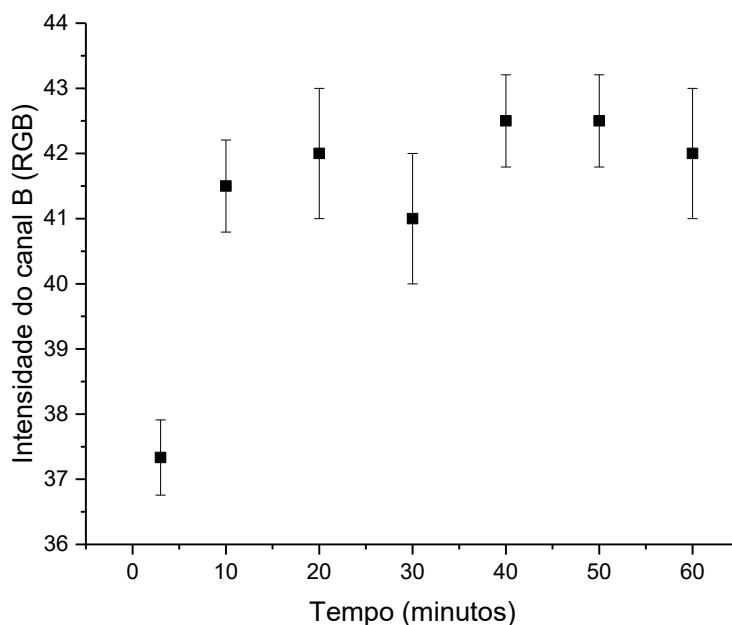
Figura 8 – Imagem do dispositivo contendo as misturas reacionais após diferentes tempos de reação: A (3 min), B (10 min), C (20 min), D (30 min), E (40 min), F (50 min) e G (60 min).



Fonte: Autora

Nos resultados, observou-se que aos 3 minutos a solução apresentava coloração esverdeada, indicando reação incompleta devido à presença residual do reagente Folin–Ciocalteu. Aos 10 minutos, houve intensificação do azul, ainda com leve tonalidade esverdeada, sugerindo que o equilíbrio não havia sido totalmente atingido. A partir de 20 minutos, a coloração azul tornou-se bem definida, evidenciando a estabilização da reação e a formação predominante do produto (**Figura 9**).

Figura 9 - Variação da intensidade do canal B (RGB) em função do tempo de reação entre o 5-hidroxitriptofano e o reagente de Folin-Ciocalteu. Resultados para n = 3 medidas

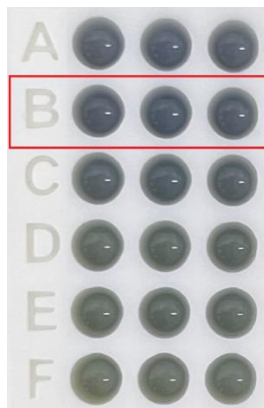


Verificou-se um aumento progressivo na intensidade da cor nos primeiros intervalos de tempo, mas não foram observadas variações significativas após os 20 minutos, conforme ilustrado na **Figura 8** (imagem do dispositivo) e na **Figura 9** (gráfico dos valores obtidos). Assim, o tempo de 20 minutos foi estabelecido como ideal para a leitura, por representar o ponto de estabilização da reação, sendo este adotado para os próximos experimentos.

4.3.2. Avaliação da concentração do reagente Folin-Ciocalteu

A influência da concentração do reagente Folin-Ciocalteu sobre a resposta colorimétrica foi avaliada nas seguintes concentrações: (A) 0,007; (B) 0,020; (C) 0,040; (D) 0,060; (E) 0,080 e (F) 0,100 M (**Figura 10**). Nessa etapa, mantiveram-se fixas as concentrações de trabalho no micropoço de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) em $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e de carbonato de sódio em 1,5 % (m/v).

Figura 10 - Imagem do dispositivo contendo micropoços com diferentes concentrações do reagente Folin–Ciocalteu. Condições experimentais: 5-hidroxitriptofano (5-HTP) a $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, reagente Folin–Ciocalteu em concentrações variando de 0,007 a 0,100 M e carbonato de sódio a 1,5 % (m/v).

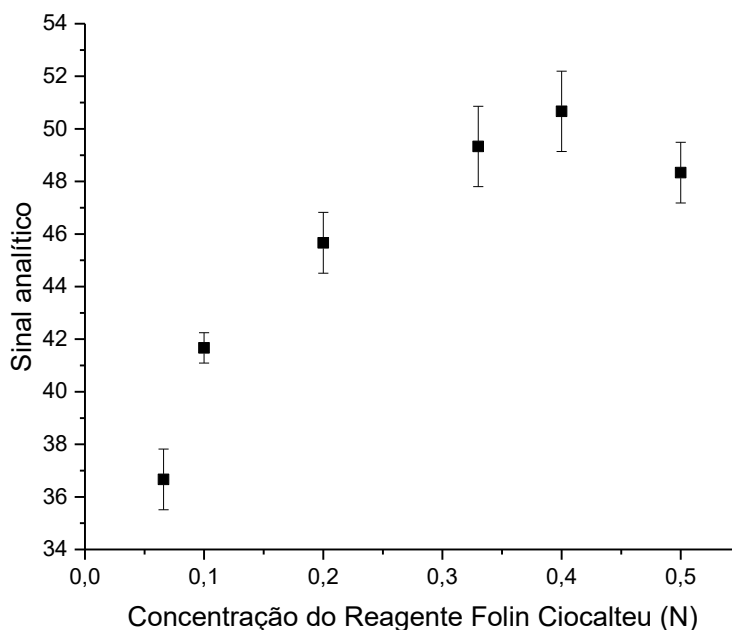


Fonte: Autora

Como mostra a **Figura 10**, a condição B (0,020 M) apresentou coloração azul mais intensa e definida, evidenciando a formação adequada do produto. Concentrações mais elevadas (C a F) resultaram em tonalidades esverdeadas, atribuídas à mistura entre o azul do produto formado e o amarelo residual do reagente em excesso, o que compromete a leitura colorimétrica. Por sua vez, a condição A (0,007 M) apresentou coloração mais fraca, sugerindo quantidade insuficiente de reagente para promover a reação de forma eficiente.

Observa-se aumento do sinal do canal B com o incremento da concentração do reagente Folin–Ciocalteu (**Figura 11**), entretanto, nessas condições, a resposta colorimétrica passa a apresentar coloração esverdeada, indicando interferência cromática associada ao excesso de reagente. Assim, o aumento do sinal numérico não representa exclusivamente a formação do produto azul da reação. Dessa forma, a concentração final de $0,020 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi selecionada como a mais adequada e adotada nos experimentos subsequentes, por garantir excesso suficiente de reagente sem comprometer a resposta colorimétrica.

Figura 11 - Variação da intensidade do canal B do sistema RGB em função da concentração do reagente Folin–Ciocalteu: (A) 0,007; (B) 0,020; (C) 0,040; (D) 0,060; (E) 0,080 e (F) 0,100 M Resultados expressos como média de três medidas (n = 3).



4.3.3. Avaliação da concentração de carbonato de sódio

Para a formação do produto colorido azul, a reação deve ocorrer em meio alcalino. Assim, a concentração de carbonato de sódio foi otimizada no intervalo de 0 a 2,5 % (m/v), sendo avaliadas as concentrações de (A) 0,0; (B) 0,5; (C) 1,0; (D) 1,5; (E) 2,0 e (F) 2,5 % (m/v) (**Figura 12**). As concentrações de trabalho de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) ($6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e do reagente de Folin–Ciocalteu ($0,02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) foram mantidas constantes durante o ensaio.

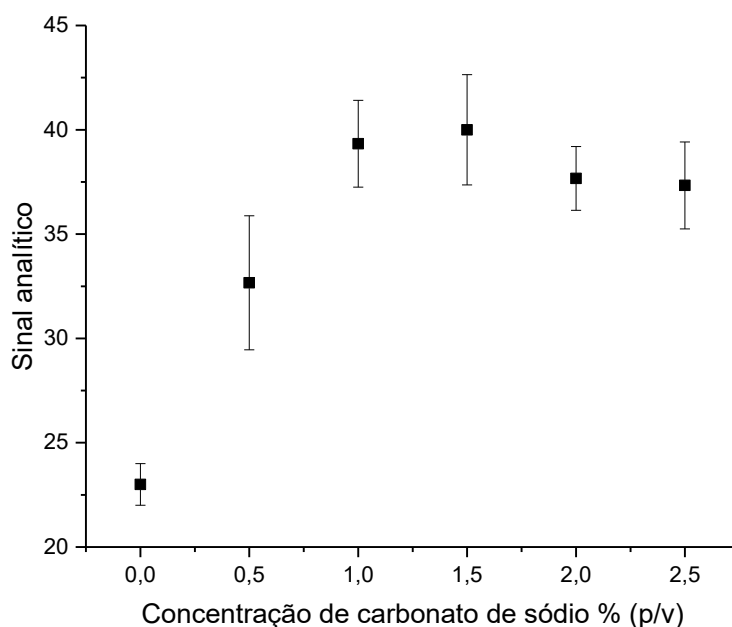
Figura 12 –Imagem do dispositivo com diferentes concentrações finais de carbonato de sódio no micropoço: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5% (m/v), correspondentes às linhas A a F, respectivamente.



Fonte = Autora

Houve um aumento acentuado do sinal com o incremento da concentração de carbonato de sódio até 1,5 % (m/v) **Figura 13** (gráfico dos valores obtidos).

Figura 13 – Variação da intensidade do canal B do sistema RGB em função da concentração do carbonato de sódio: (A) 0,0; (B) 0,5; (C) 1,0; (D) 1,5; (E) 2,0 e (F) 2,5 % (m/v). Resultados expressos como média de três medidas ($n = 3$).



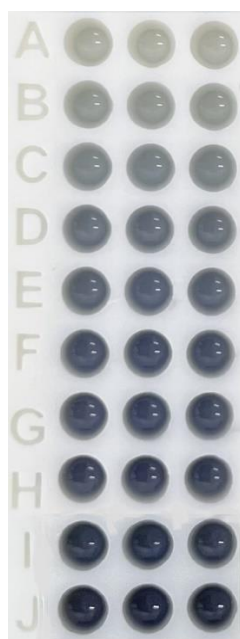
Essa condição foi selecionada para os testes subsequentes por resultar na coloração azul mais intensa e bem definida, indicando melhor formação do produto

colorido conforme ilustrado na **Figura 13**. Essa concentração garante o pH ideal para a reação de oxidação, favorecendo a conversão completa do analito. Concentrações inferiores resultaram em colorações fracas ou acinzentadas, enquanto concentrações superiores não proporcionaram aumento significativo na intensidade da cor.

4.3.4. Determinação da faixa linear

A fim de determinar o intervalo de concentrações de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) que apresentasse resposta proporcional à intensidade da coloração desenvolvida na reação colorimétrica, foram avaliadas nove concentrações distintas do analito no micropoço, correspondentes a 1,5; 3,0; 5,0; 6,0; 9,0; 10,0; 12,0; 18,0 e 30,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, conforme ilustrado na **Figura 14**. Durante esse estudo, as concentrações de trabalho do reagente de Folin–Ciocalteu ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e do carbonato de sódio [1,5 % (m/v)] foram mantidas constantes, variando-se apenas a concentração de 5-hidroxitriptofano.

Figura 14 – Imagem dos micropoços com diferentes concentrações de 5-hidroxitriptofano: 0,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (branco, representado pela linha A), 1,5; 3,0; 5,0; 6,0; 9,0; 10; 12,0; 18,0 e 30,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (linhas B a J, respectivamente)

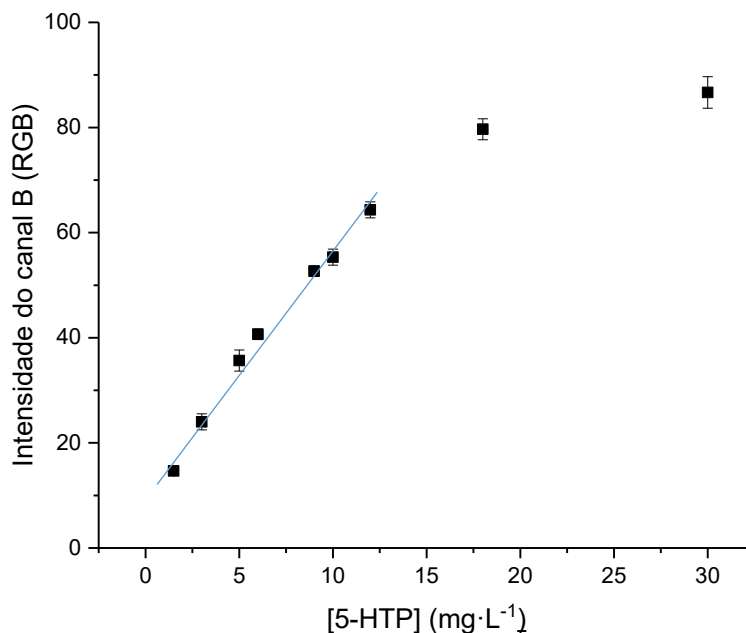


Fonte: Autora

Os sinais analíticos obtidos foram plotados em função da concentração de 5-HTP, conforme apresentado na **Figura 15**. Observou-se comportamento linear satisfatório no intervalo de 1,5 a 12,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, evidenciado por um coeficiente de determinação ($R^2 =$

0,9946), indicando proporcionalidade adequada entre o sinal analítico e a concentração do analito nessa faixa. A relação linear entre as variáveis foi descrita pela equação $y = (5,02701 \pm 0,16558) \times C_{5\text{-HTP}} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) + (7,12727 \pm 0,2481)$, em que y representa o sinal analítico e x a concentração de 5-HTP ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Figura 15 - Variação da intensidade do canal B do sistema RGB em função da concentração do 5-hidroxitriptofano: 1,5; 3,0; 5,0; 6,0; 9,0; 10,0; 12,0; 18,0 e 30,0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $n = 3$ medidas.



Para concentrações superiores a 12,0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, verificou-se a ausência de aumento proporcional do sinal analítico, caracterizando desvio da linearidade, possivelmente associado à saturação do sistema reacional ou a limitações inerentes ao método colorimétrico empregado. Em razão disso, essas concentrações foram excluídas do intervalo útil.

Dessa forma, a faixa de 1,5 a 12,0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ foi selecionada como intervalo linear do método e adotada nos estudos subsequentes, incluindo a construção da curva de calibração.

4.4. Estudo da estabilidade do produto colorido

A estabilidade do produto colorido foi avaliada ao longo de diferentes períodos de armazenamento. Para isso, as reações foram preparadas em microtubos do tipo Eppendorf em datas pré-estabelecidas e mantidas sob refrigeração. Em uma única data de análise, alíquotas de 40 μL correspondentes a cada período foram transferidas para os micropoços

do dispositivo para a leitura colorimétrica. O intervalo de tempo avaliado variou de 0 a 17 dias.

A **Figura 16** apresenta os micropoços contendo o produto da reação entre o 5-hidroxitriptofano e o reagente de Folin-Ciocalteu, armazenados por diferentes períodos (20 minutos; 1; 2; 3; 4; 7; 10; 14 e 17 dias).

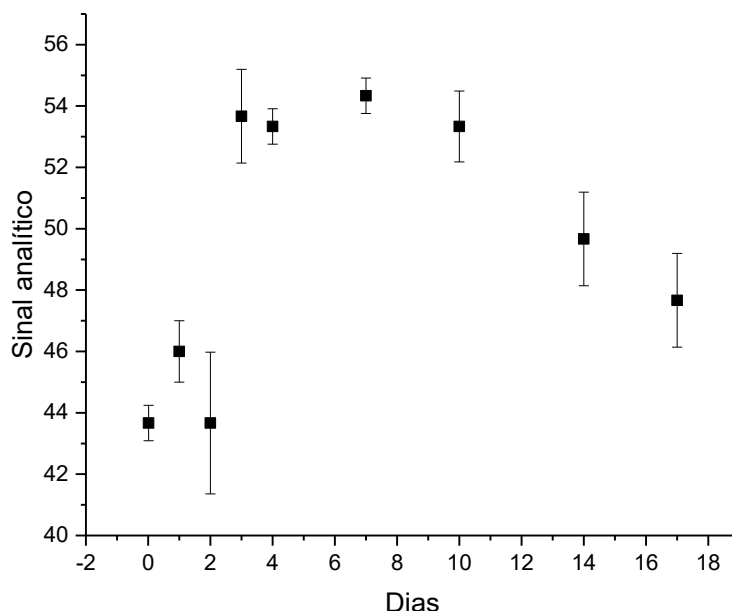
Figura 16 –Imagem do dispositivo utilizada na avaliação da estabilidade do produto colorido formado na reação entre o 5-hidroxitriptofano (5-HTP) e o reagente de Folin–Ciocalteu. Micropoços contendo o produto da reação após (A) 20 min e armazenados por diferentes períodos: (B) 1; (C) 2; (D) 3; (E) 4; (F) 7; (G) 10; (H) 14 e (I) 17 dias.



Fonte: Autora

Visualmente, observa-se boa estabilidade da coloração azul ao longo de todo o intervalo avaliado, sem perda significativa de intensidade mesmo após 17 dias sob refrigeração como mostra a **Figura 17** (Gráfico dos valores obtidos).

Figura 17 –Variação da intensidade do canal B do sistema RGB em função do período de armazenamento, considerando os intervalos de 20 minutos; 1; 2; 3; 4; 7; 10; 14 e 17 dias (n = 3). Resultados expressos como média de três medidas (n = 3).



Os dados quantitativos apresentados na **Figura 17** (Gráfico dos valores obtidos) reforçam essa observação, evidenciando que o sinal analítico permaneceu elevado ao longo do tempo. Nota-se um leve aumento da intensidade no terceiro dia, seguido de um comportamento estável nas leituras posteriores. Esse padrão indica que o produto formado apresenta boa estabilidade química, sendo adequado para ensaios colorimétricos.

É importante ressaltar que o tempo de reação adotado na metodologia (20 min) foi previamente definido com base no estudo de otimização do tempo de reação, descrito anteriormente. Essa escolha fundamenta-se na necessidade de evitar perdas por evaporação nos micropoços do dispositivo, bem como em manter a proposta de análise rápida e de baixo consumo de reagentes. Além disso, a realização direta das reações no dispositivo mostrou-se mais prática e econômica, reduzindo o consumo de amostra, reagentes e tempo operacional. Embora tenha sido observado aumento do sinal após dias de armazenamento, essa condição não representa uma vantagem metodológica para o procedimento analítico, pois implicaria prolongar a análise e/ou transferir a reação para outros recipientes, aumentando etapas de manipulação e o potencial de variabilidade. Assim, o estudo de estabilidade comprova que o produto colorido formado após 20 min mantém sua integridade ao longo do tempo, reforçando a confiabilidade da metodologia

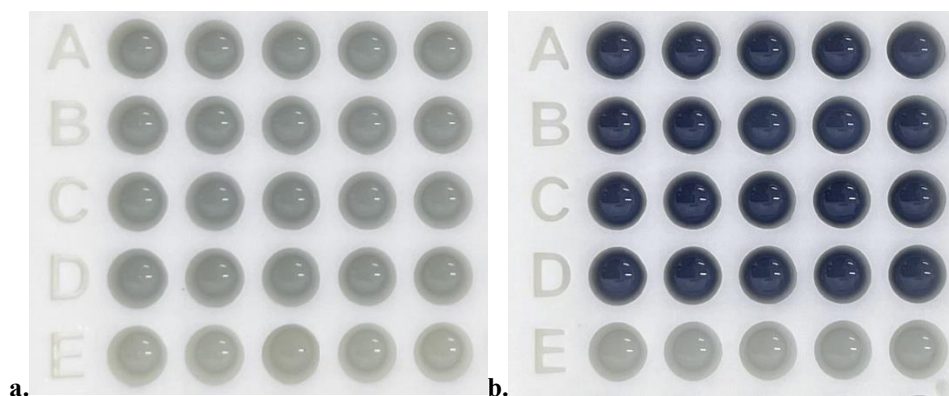
desenvolvida.

4.5. Repetibilidade

A avaliação da repetibilidade é essencial no processo de validação analítica, pois permite verificar a precisão do método sob condições experimentais controladas, assegurando a obtenção de resultados consistentes em medições sucessivas realizadas no mesmo sistema. Assim, a repetibilidade do método foi avaliada a partir de 20 medições independentes realizadas em duas microplacas distintas, correspondentes às concentrações às concentrações extremas da faixa linear estabelecida (1,5 e 12,0 mg·L⁻¹).

A **Figura 18** apresenta as imagens dos dispositivos utilizados, evidenciando coloração azul homogênea e bem definida entre os micropoços.

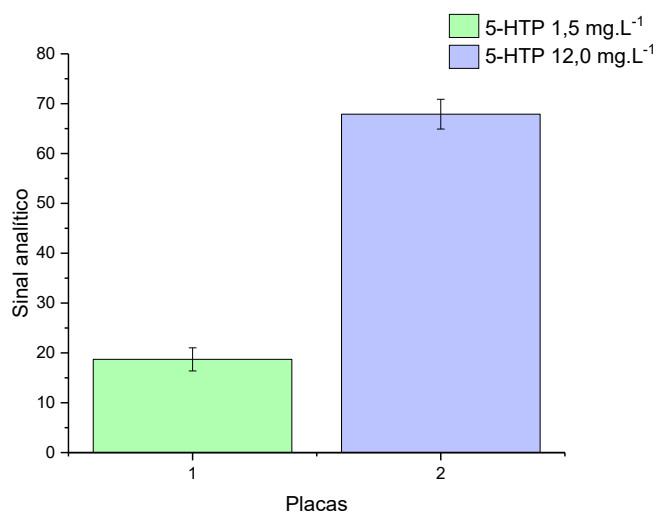
Figura 18 - Estudo de repetibilidade. Imagem dos dispositivos com concentração de 5-HTP nos micropoços (linhas A-D): **(a)** 1,5 mg·L⁻¹; **(b)** 12 mg·L⁻¹. Linha E: branco



Fonte: Autora

Os sinais analíticos obtidos são apresentados na **Figura 19**.

Figura 19 - Estudo de repetibilidade (n = 20). Concentração de 5-HTP nos micropoços: Placa1- 1,5 mg.L⁻¹; Placa 2- 12,0 mg.L⁻¹.

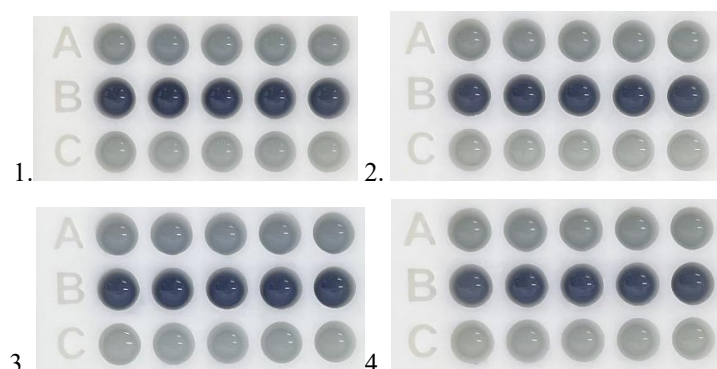


Para 1,5 mg·L⁻¹, obteve-se uma média de $18,7 \pm 2,32$ (DPR = 12,4%), enquanto para 12 mg·L⁻¹ a média foi de $67,9 \pm 2,98$ (DPR = 4,4%). Esses valores encontram-se dentro dos limites aceitáveis para métodos colorimétricos (35), considerando a maior variabilidade típica em concentrações mais baixas. Os resultados confirmam a precisão e repetibilidade do método proposto, evidenciando desempenho consistente e confiável para a quantificação colorimétrica de 5-HTP.

4.6. Reprodutibilidade

A avaliação da reprodutibilidade é essencial no processo de validação analítica, pois permite verificar a precisão do método sob condições experimentais distintas, como variações entre dispositivos, assegurando que resultados consistentes sejam obtidos mesmo na presença de mudanças inerentes à execução experimental. Esse parâmetro é fundamental para demonstrar a confiabilidade do método e sua aplicabilidade em condições práticas de análise. Assim, a reprodutibilidade inter-dispositivo do método foi avaliada em quatro microplacas distintas, com leituras realizadas em cinco micropoços para cada uma das duas concentrações de 5-HTP previamente definidas. A **Figura 20** apresenta as imagens das quatro microplacas utilizadas no estudo, nas quais se observa a uniformidade da coloração dos micropoços em cada linha.

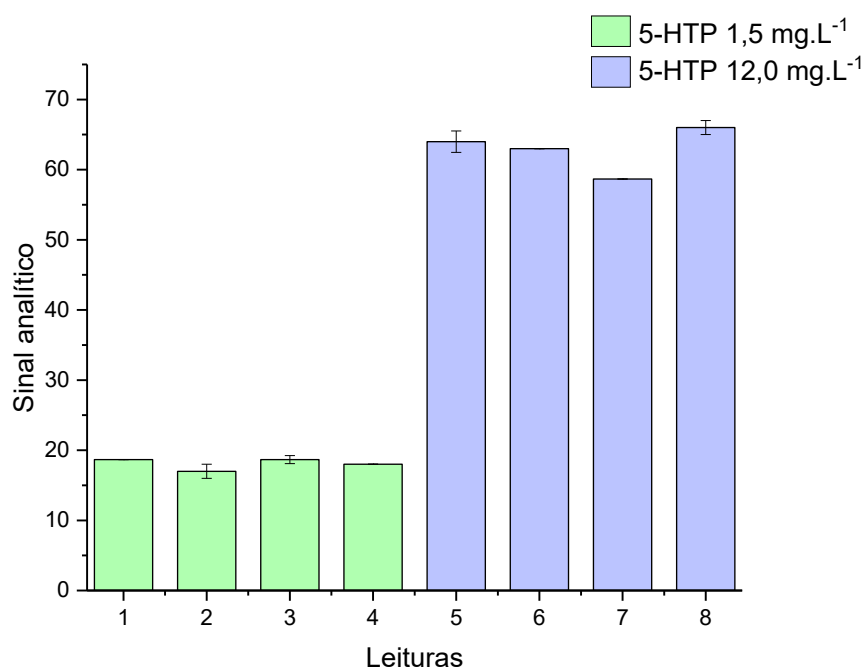
Figura 20 - Estudo de reprodutibilidade com 4 placas. Imagem dos dispositivos com concentração de 5-HTP nos micropoços: linha A - 1,5 mg.L⁻¹; linha B - 12 mg.L⁻¹; linha C - branco



Fonte: Autora

Os valores do sinal analítico (**Figura 21**) evidenciam baixa dispersão intra-placa e boa consistência inter-placas para cada concentração.

Figura 21 – Estudo de reprodutibilidade. Leituras 1 a 4 correspondem à concentração de 1,5 mg.L⁻¹, e leituras 5 a 8 à concentração de 12 mg.L⁻¹ de 5-HTP.



A **Tabela 1** resume as estatísticas descritivas (média, DP e DPR) obtidas a partir de cinco micropoços por placa e por concentração.

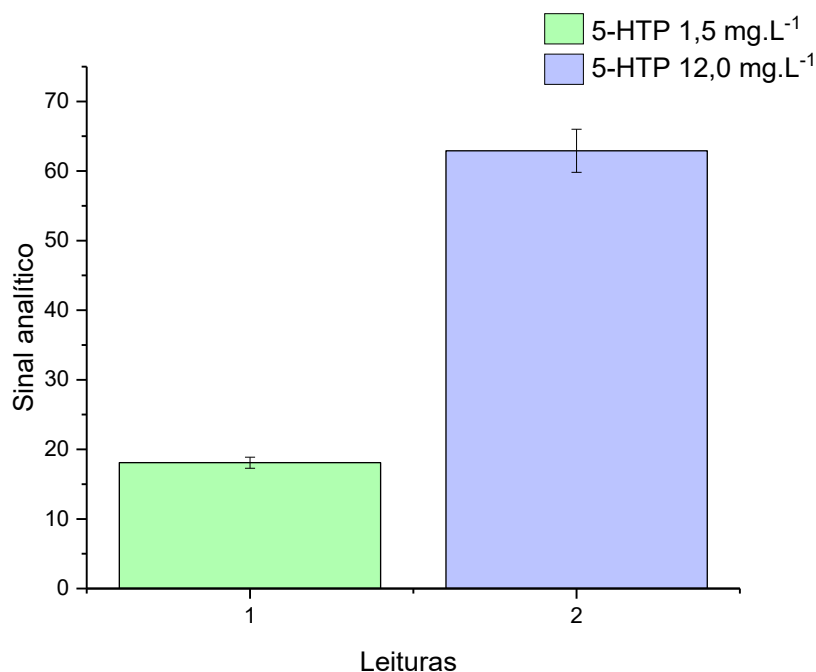
Tabela 1 - Reprodutibilidade do método para 5-HTP nas concentrações de 1,5 e 12,0 mg·L⁻¹. Média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR%) obtidos em quatro microplacas (n = 5 por placa).

Concentração (mg·L ⁻¹)	Placa	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
1,5	1	18,67	0,00	0,00
	2	17,00	1,00	5,88
	3	18,67	0,58	3,09
	4	18,00	0,00	0,00
12,0	1	64,00	1,53	2,39
	2	63,00	0,00	0,00
	3	58,67	0,00	0,00
	4	66,00	1,00	1,52

A análise dos valores de DPR reforça a boa consistência interna dos dados. Para 1,5 mg·L⁻¹, os valores de DPR variaram entre 0,00% e 5,88%, com três das quatro placas apresentando dispersões iguais ou inferiores a 3,1%. Já para 12,0 mg·L⁻¹, os valores variaram entre 0,00% e 2,39%, com duas placas apresentando DPR nulo.

As médias inter-placa foram de $18,08 \pm 0,79$ (DPR 4,36%) para 1,5 mg·L⁻¹ e $62,92 \pm 3,10$ (DPR 4,92%) para 12,0 mg·L⁻¹ (**Figura 22**). Esses resultados demonstram que o método apresenta baixa variabilidade entre réplicas em condições idênticas, tanto intra quanto interplacas, assegurando sua reprodutibilidade e consistência entre execuções para análise colorimétrica de 5-HTP.

Figura 22 - Sinais médios obtidos para as concentrações de 1,5 (leitura 1) e 12,0 mg·L⁻¹ (leitura 2) de 5-hidroxitriptofano, com barras de erro representando o desvio padrão entre quatro microplacas (n = 4 por concentração).



4.7. Figuras de mérito analíticas

Sob as condições otimizadas, procedeu-se à construção da curva analítica para a quantificação do 5-HTP.

A **Figura 23** apresenta a imagem dos micropoços correspondentes às soluções padrão de 5-HTP e à solução branco, utilizadas na construção da curva analítica.

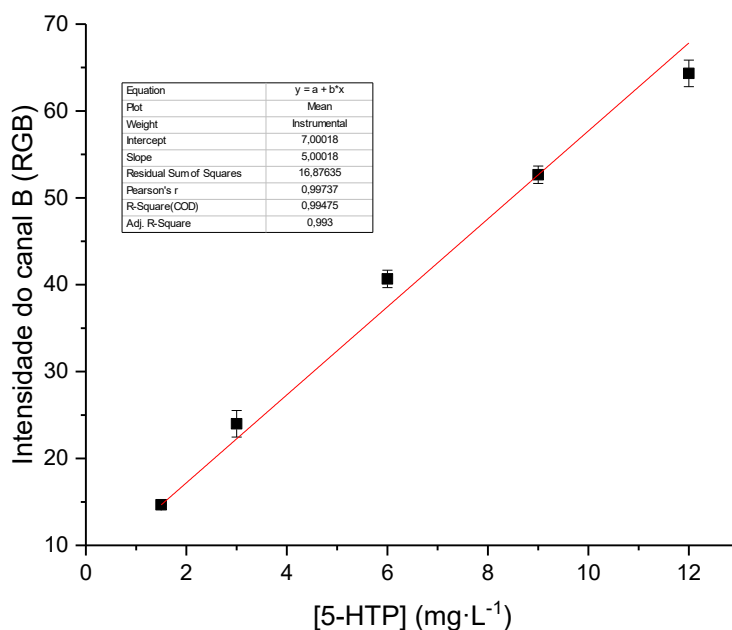
A curva analítica (**Figura 24**) foi construída com cinco pontos na faixa linear previamente determinada (1,5 a 12,0 mg·L⁻¹). O modelo apresentou excelente ajuste linear, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9948$ e equação da reta $y = 5,0002 \times C_{5-HTP} (mg \cdot L^{-1}) + 7,0002$.

Figura 23 - Imagem dos micropoços com diferentes concentrações de 5-hidroxitriptofano: 0,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (branco, representado pela linha A), 1,5; 3,0; 5,0; 6,0; 9,0 e 12,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (linhas B a G, respectivamente)



Fonte: Autora

Figura 24 - Curva de calibração obtida para o 5-hidroxitriptofano nas concentrações finais de 1,5; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.



O limite de detecção (LD) foi calculado pela expressão $LD = \frac{3 \times s}{b}$ (36), em que s corresponde ao desvio padrão do branco e b ao coeficiente angular da curva de calibração.

O desvio padrão do branco (s) foi obtido a partir de 20 medições independentes do sinal analítico do branco, realizadas sob as mesmas condições experimentais do método.

O limite de quantificação (LQ) foi determinado pela relação $LQ = \frac{10 \times s}{b}$ (36). Com s igual

a 0,5776 e b igual a 5,0002, foram obtidos valores de $0,346 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,155 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para LD e LQ, respectivamente.

Em conjunto, os resultados obtidos permitiram a determinação dos principais parâmetros de desempenho analítico do método desenvolvido, incluindo faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação, fornecendo subsídios para a comparação com métodos previamente descritos na literatura.

Com o objetivo de contextualizar o desempenho analítico do método proposto, a **Tabela 2** reúne os métodos identificados na literatura que apresentam valores de LOD e faixa linear para 5-HTP, possibilitando a comparação direta com os parâmetros obtidos no presente estudo.

Tabela 2 - Comparação dos limites de detecção (LOD) e faixa linear para determinação de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) reportados na literatura

Metodologia	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Referência/Ano
Folin–Ciocalteu (espectrofotometria)	Não informado	4,54 – 45,4 ¹	Subbaraju et al. 2005 (3)
DPV – GR-MIP/GCE (sensor eletroquímico com grafeno + MIP)	0,006	0,05–7,0	Chen et al. 2017 (37)
Eletroforese capilar (detecção UV)	3,10	0 – 500	Coelho et al. 2014 (2)
Sensor eletroquímico Pd–MWCNT	0,077	2 – 400	Kumar et al. 2017 (1)
ePAD modificado com graphene nanoribbons (GNR-ePAD)	7,60	25 – 1000	Canhete et al. 2022 (22)
UV-Vis (método simples para cápsulas)	2136,00	9080 – 27 250	Tunna et al. 2013 (5)
UPLC (detecção UV)	0,045	0,45 – 2270	Kavuri et al. 2010 (8)
Colorimetria em microplaca	1,57	6,81 – 54,5	Este trabalho, 2025

¹ Conversão realizada a partir da faixa original de $1\text{--}10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ usando $M = 220,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Mesmo sendo baseado em leitura por imagem colorimétrica, o método apresentou sensibilidade adequada para distinguir e quantificar baixas concentrações de 5-hidroxitriptofano de forma confiável. Além disso, o dispositivo desenvolvido destaca-se pelo baixo custo, simplicidade, portabilidade e reduzido consumo de amostras e reagentes, demonstrando potencial para aplicação em análises rápidas e acessíveis.

Suplementos comerciais de 5-hidroxitriptofano são usualmente formulados com teores na faixa de 50 a 200 mg por dose, conforme informações declaradas em rótulos de produtos disponíveis comercialmente (38). Considerando essa faixa de concentração e a etapa de preparo das amostras por dissolução seguida de diluições apropriadas, as concentrações finais tornam-se compatíveis com a faixa linear do método proposto ($1,5\text{--}12\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), permitindo a detecção e quantificação confiável do analito.

4.8. Estudo de interferentes

Estudos prévios demonstram que excipientes utilizados em formulações sólidas, como amido, talco, gelatina, dióxido de silício coloidal e vitamina B6 utilizados em cápsulas não interferem na determinação de L-5-HTP, mesmo quando presentes em grande excesso, enquanto ácidos orgânicos e compostos fenólicos promovem interferência significativa em procedimentos colorimétricos (3).

Dessa forma, o estudo de interferentes deste trabalho foi realizado para avaliar a seletividade do método na presença de íons inorgânicos e biomoléculas comumente associadas ao 5-HTP, selecionadas em função de seu potencial de serem encontrados junto ao analito.

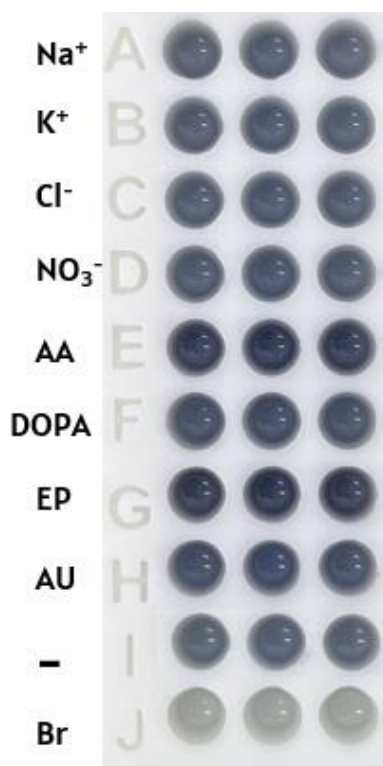
A seleção dessas espécies considerou, inicialmente, a possibilidade de aplicação do método em amostras biológicas, como urina. No entanto, essa abordagem não foi adotada, uma vez que o 5-HTP é rapidamente metabolizado no organismo, não sendo excretado em concentrações compatíveis com métodos colorimétricos, inferiores ao limite de detecção do sistema desenvolvido. Dessa forma, os interferentes foram escolhidos com base em sua relevância química e em seu potencial de participar de reações de oxirredução semelhantes à do analito, permitindo a avaliação da seletividade do método independentemente da matriz biológica.

A concentração de 5-HTP foi mantida em $2,72 \times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e a dos interferentes ajustada para uma proporção molar de 1:5 (analito:interferente), correspondente a $1,36 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Excepcionalmente, para o ácido úrico, foi adotada uma proporção molar de

1:2 (analito:interferente), em razão de sua baixa solubilidade em água ($15,52 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, equivalente a $9,2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, a 20°C), conforme informações técnico-analíticas disponibilizadas na respectiva Ficha de Segurança (39).

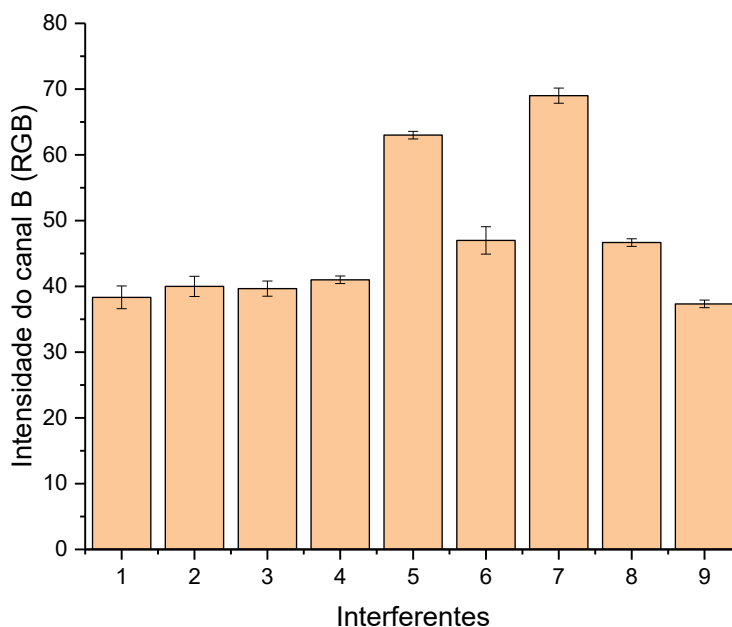
Foram avaliados os seguintes interferentes: Na^+ , K^+ , Cl^- , NO_3^- , ácido ascórbico (AA), dopamina (DOPA), epinefrina (EP) e ácido úrico (UA). A **Figura 25** mostra os micropoços colorimétricos utilizados nos ensaios de interferência, e a **Figura 26** (gráfico dos valores obtidos) apresenta os sinais analíticos médios obtidos.

Figura 25 – Imagem dos micropoços colorimétricos contendo 5-HTP na presença de diferentes interferentes: A – 5-HTP + Na^+ ; B – 5-HTP + K^+ ; C – 5-HTP + Cl^- ; D – 5-HTP + NO_3^- ; E – 5-HTP + ácido ascórbico (AA); F – 5-HTP + dopamina (DOPA); G – 5-HTP + epinefrina (EP); H – 5-HTP + ácido úrico (AU); I – 5-HTP sem interferente ; J – Branco (sem 5-HTP, sem interferente).



Fonte: Autora

Figura 26 - Sinais analíticos médios obtidos para o 5-HTP na presença de diferentes interferentes (1 a 8), e na ausência de interferente (9). Condições testadas: (1) 5-HTP + Na⁺; (2) 5-HTP + K⁺; (3) 5-HTP + Cl⁻; (4) 5-HTP + NO₃⁻; (5) 5-HTP + ácido ascórbico (AA); (6) 5-HTP + dopamina (DOPA); (7) 5-HTP + epinefrina (EP); (8) 5-HTP + ácido úrico (AU); (9) 5-HTP sem interferente. As barras de erro representam o desvio padrão de três replicatas por condição.



A **Tabela 3** reúne os valores médios de sinal, desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e a variação percentual em relação ao controle (5-HTP sem interferente), permitindo a comparação entre os compostos avaliados.

Tabela 3 - Média, desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (RSD) e variação percentual do sinal obtido para cada interferente em relação ao controle (5-HTP puro). Cada valor representa a média de três replicatas por condição.

Interferente	Sinal médio	DP	RSD (% , n = 3)	Variação (%)
Na ⁺	38,33	1,73	4,52	+2,7%
K ⁺	40,00	1,53	3,82	+7,1%
Cl ⁻	39,67	1,15	2,91	+6,3%
NO ₃ ⁻	41,00	0,58	1,41	+9,8%
Ácido ascórbico	63,00	0,58	0,92	+68,8%
Dopamina	47,00	2,08	4,43	+25,9%
Epinefrina	69,00	1,15	1,67	+84,9%
Ácido úrico	46,67	0,58	1,24	+25,0%
Controle (5-HTP)	37,33	1,00	2,68	—

De modo geral, Na⁺, K⁺, Cl⁻ e NO₃⁻ não afetaram significativamente o sinal colorimétrico do 5-HTP, apresentando variação inferior a 10% em relação ao controle. Em contraste, ácido ascórbico e epinefrina promoveram interferência acentuada, com

aumento expressivo na intensidade da coloração (+68,8% e +84,9%, respectivamente), enquanto dopamina e ácido úrico também elevaram o sinal de forma relevante (+25,9% e +25,0%).

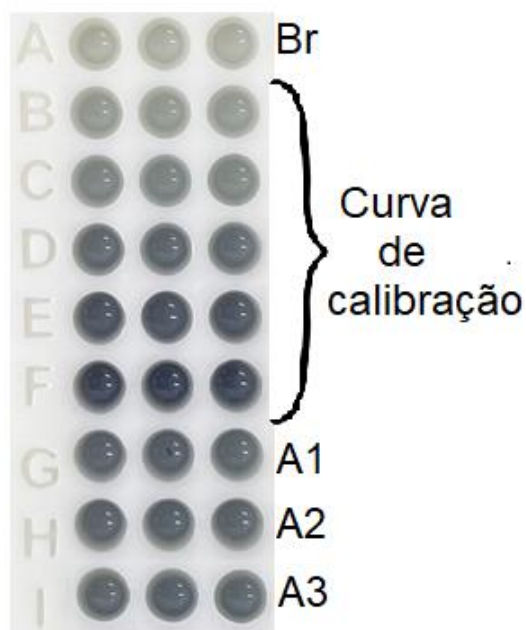
A resposta colorimétrica do 5-HTP na presença dos interferentes variou entre +2,7% e +84,9% em relação ao sinal obtido na ausência dessas espécies, indicando interferência mínima para os íons inorgânicos e acentuada para compostos redutores. Essas variações são coerentes com o caráter redutor das biomoléculas testadas frente ao reagente Folin-Ciocalteu, o que constitui uma limitação intrínseca de métodos colorimétricos baseados nesse reagente. Os interferentes foram intencionalmente selecionados por apresentarem potencial redox semelhante ao do analito, de modo a avaliar o método sob condições desafiadoras e observar seu comportamento diante de possíveis interferências químicas. Diante da estabilidade da resposta para os íons inorgânicos e do desempenho consistente observado, o método demonstrou seletividade satisfatória para a quantificação de 5-HTP em suplementos comerciais, nos quais é improvável a presença de biomoléculas redutoras como dopamina, epinefrina e ácido ascórbico.

4.9. Determinação do 5-HTP em amostra farmacêutica e comparação com espectrofotometria UV-Vis

O método colorimétrico proposto foi aplicado à quantificação de 5-HTP em amostras farmacêuticas a fim de avaliar sua aplicabilidade em análises de rotina.

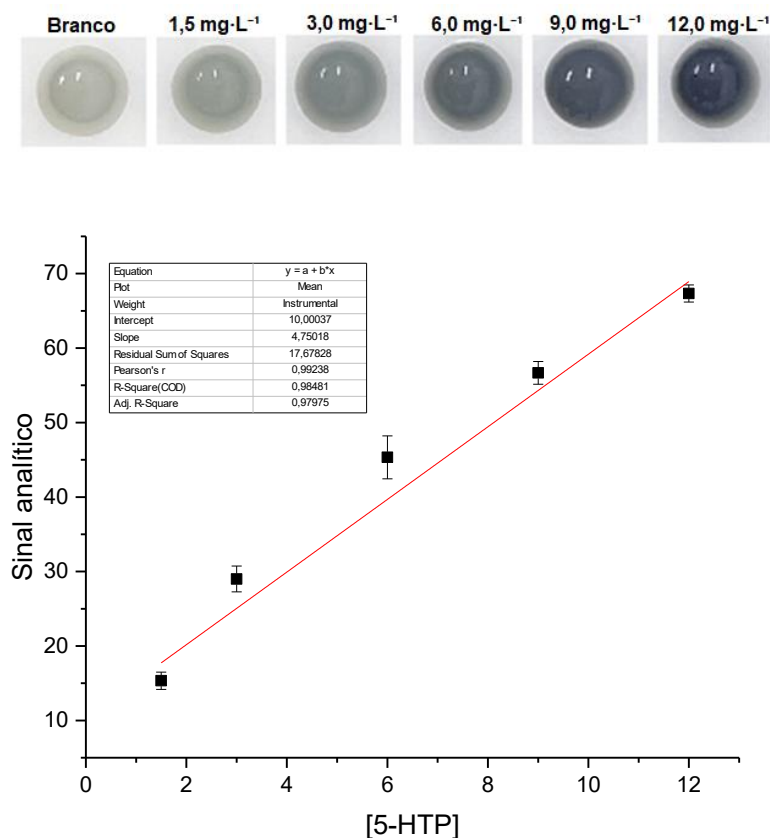
Para validação dos resultados, as mesmas amostras foram analisadas por espectrofotometria UV-vis, utilizada como método de referência, usando o método proposto por Subbaraju et al. (3). A curva de calibração foi construída a partir de soluções padrão de 5-HTP nas concentrações de 1,5 a 12,0 mg·L⁻¹ (**Figura 27**) resultando na equação $y = 4,7502 x + 10,0004$, $R^2=0,9848$ (**Figura 28**). As linhas G, H, e I do dispositivo corresponderam às três amostras farmacêuticas, preparadas a partir de cápsulas rotuladas com 100 mg de 5-HTP por unidade (**Figura 27**).

Figura 27 – Imagem do dispositivo utilizado na análise colorimétrica do 5-HTP. A linha **A** corresponde ao branco, enquanto as linhas **B a F** referem-se às soluções padrão de 5-HTP nas concentrações de 1,5; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg·L⁻¹, respectivamente. As linhas **G, H e I** correspondem às amostras farmacêuticas analisadas.



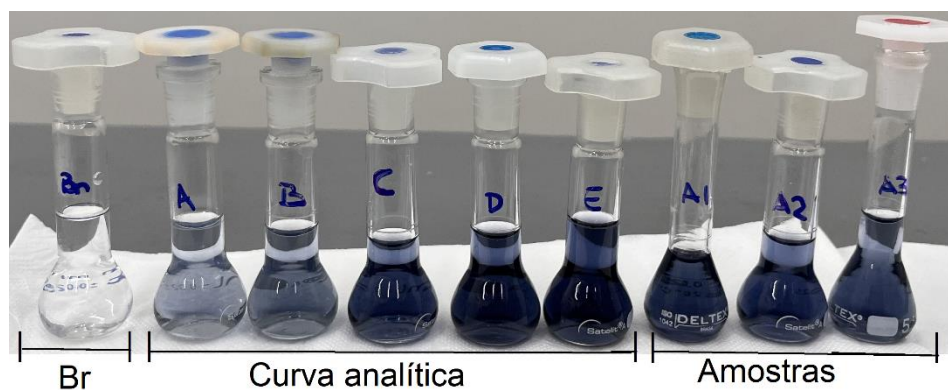
Os sinais analíticos obtidos foram aplicados à equação da curva para estimar o teor por cápsula (**Figura 28**).

Figura 28 - Curva de calibração construída com soluções padrão de 5-HTP, utilizada para determinar as amostras farmacêuticas (n = 3 medidas).



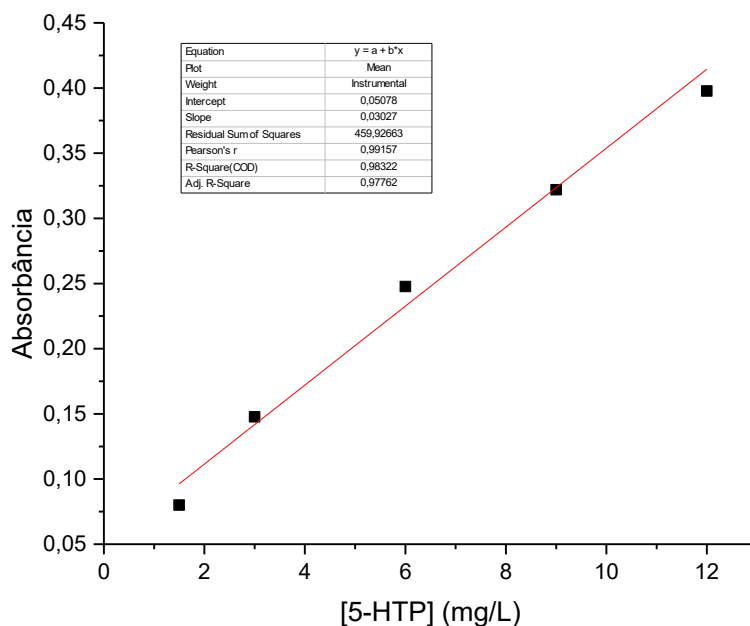
Com o objetivo de verificar a exatidão, as mesmas amostras foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis (**Figura 29**), cuja curva de calibração apresentou a equação $y = 0,0303x + 0,0508$ ($R^2 = 0,9832$), demonstrando linearidade satisfatória na mesma faixa de concentração (**Figura 30**)

Figura 29 - Soluções padrão de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) preparadas em balões volumétricos e utilizadas na construção da curva de calibração pelo método espectrofotométrico UV-Vis



Fonte: Autora

Figura 30 - Curva de calibração construída com soluções padrão de 5-HTP, utilizada para determinar as amostras farmacêuticas por espectrofotometria UV-Vis. A equação da reta foi $y = 0,0303x + 0,0508$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9832$, indicando boa linearidade no intervalo de 1,5 a 12,0 mg·L⁻¹.



A **Tabela 4** apresenta os resultados obtidos pelos dois métodos, expressos como média de três determinações independentes ($\pm$ desvio padrão) e os respectivos erros relativos calculados em relação ao UV-Vis.

No método espectrofotométrico, os valores de DPR foram 0,40 %, 1,07 %, e 0,43 %, reforçando sua consistência como técnica de referência.

Observou-se boa concordância entre os métodos, com erros relativos inferiores a 10 %. Adicionalmente, os resultados obtidos pelo método proposto apresentaram excelente precisão, com valores de DPR inferiores a 1,5 %.

Os resultados obtidos pelos dois métodos (**Tabela 4**) foram comparados por meio de testes estatísticos (teste t pareado e teste F), ao nível de confiança de 95 % (40). O valor de t calculado foi inferior ao valor crítico ($|t_{\text{calculado}}| = 1,97 < t_{\text{crítico}} = 4,30$, para $n = 3$). Da mesma forma, o valor de F calculado foi inferior ao valor crítico ($F_{\text{calculado}} = 1,42 < F_{\text{crítico}} = 19,0$, para $n = 3$). Esses resultados indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os dois métodos em relação à exatidão e à precisão.

Tabela 4 – Resultado da quantificação de 5-HTP em amostras por dispositivo colorimétrico por imagem digital e por espectrofotometria UV-Vis

Amostra	Método proposto^(a)	UV-Vis^(a)	Erro relativo (%)^(b)
Amostra 1	107,93 mg/cápsula ± 0,44	108,98 mg/cápsula	-0,96
Amostra 2	104,51 mg/cápsula ± 0,45	108,43 mg/cápsula	-3,62
Amostra 3	118,19 mg/cápsula ± 1,26	119,06 mg/cápsula	-0,73

^a Média de n = três determinações. As cápsulas foram adquiridas comercialmente da marca *Essentia Pharma*, contendo 100 mg de 5-HTP por unidade, conforme descrito na embalagem

^b $[(\text{Método proposto}) - (\text{UV-Vis})]/(\text{UV-Vis}) \times 100\%$

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (6^a edição)(41), o teor de princípio ativo em formas sólidas deve estar entre 90 % e 110 % do valor declarado. Com base nesse critério, as amostras 1 e 2 encontram-se dentro do intervalo especificado, enquanto a amostra 3 apresentou teor acima do limite superior estabelecido.

A não conformidade observada para a amostra 3 foi confirmada tanto pelo método proposto quanto pelo método espectrofotométrico UV-Vis, indicando que o desvio está associado à composição da amostra comercial analisada e não a limitações analíticas do método desenvolvido.

Esses resultados demonstram que o método colorimétrico por imagem digital é preciso, confiável e eficiente para a determinação de 5-HTP em amostras farmacêuticas. Em comparação com métodos convencionais, a estratégia desenvolvida destaca-se por ser simples, de baixo custo ($\approx$ R\$ 3,10 por dispositivo) e de fácil execução, utilizando pequenos volumes de reagentes e captura de imagem por smartphone para o processamento analítico dos dados. O uso do dispositivo impresso em 3D proporciona boa reprodutibilidade e aplicabilidade prática, dispensando o uso de instrumentação sofisticada. Assim, o método apresenta grande potencial para análises rotineiras de controle de qualidade de suplementos comerciais de 5-HTP, podendo ser adaptado à determinação de outras espécies bioativas ou compostos farmacêuticos de interesse.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou a viabilidade da determinação de L-5-hidroxitriptofano (5-HTP) por meio de um método colorimétrico baseado na reação com o reagente de Folin–Ciocalteu, utilizando leitura analítica por imagens digitais capturadas por smartphone. A resposta cromática obtida apresentou relação direta com a concentração do analito, permitindo sua quantificação por análise dos canais de cor.

A utilização do smartphone como ferramenta de aquisição de dados confere ao método características vantajosas, como portabilidade, praticidade, simplicidade e acessibilidade, favorecendo sua aplicação em ambientes com recursos limitados e sem a necessidade de equipamentos analíticos sofisticados.

A integração da impressão 3D possibilitou o desenvolvimento de um dispositivo miniaturizado, personalizado e adequado à realização da reação colorimétrica, contribuindo para a redução do consumo de reagentes, do volume de amostra e do tempo de análise. Essa abordagem elimina a necessidade de instrumentação analítica convencional, aumentando a acessibilidade e a portabilidade do método.

Os resultados obtidos indicam que a abordagem proposta representa uma alternativa simples, de baixo custo e eficiente para a análise de 5-HTP, com potencial aplicação no controle de qualidade de suplementos farmacêuticos. Dessa forma, o método desenvolvido contribui para o avanço de estratégias analíticas acessíveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kumar N, Rosy, Goyal RN. Palladium nano particles decorated multi-walled carbon nanotubes modified sensor for the determination of 5-hydroxytryptophan in biological fluids. *Sens Actuators B Chem.* 1o de fevereiro de 2017;239:1060–8.
2. Coelho AG, Aguiar FPC, De Jesus DP. A rapid and simple method for determination of 5-hydroxytryptophan in dietary supplements by capillary electrophoresis. *J Braz Chem Soc.* 2014;25(4):783–7.
3. Subbaraju G V, Kannababu S, Vijayakumar K, Murthy PBS, Vanisree M, Tsay HS. Spectrophotometric Estimation of L-5-Hydroxytryptophan in Griffonia simplicifolia Extracts and Dosage Forms. *International Journal of Applied Science and Engineering.* 2005;3(2):111–6.
4. PubChem. 5-Hydroxy-L-tryptophan. 2025.
5. Tunna IJ, Patel BA. Analysis of 5-hydroxytryptophan in the presence of excipients from dietary capsules: Comparison between cyclic voltammetry and UV visible spectroscopy. *Analytical Methods.* 21 de maio de 2013;5(10):2523–8.
6. Tachiki KH, Aprison MH. Fluorometric assay for 5-hydroxytryptophan with sensitivity in the picomole range. *Anal Chem.* 1975;47(1):7–11.
7. Lemaire PA, Adosraku RK. An HPLC method for the direct assay of the serotonin precursor, 5-hydroxytryptophan, in seeds of Griffonia simplicifolia. *Phytochemical Analysis.* 2002;13(6):333–7.
8. Kavuri SR, Mukkamala SB. Estimation of L-5-Hydroxytryptophan in West African medicinal plant Griffonia simplicifolia Baill. by Ultra Performance Liquid Chromatography. 2010; Disponível em: <http://indexmedicus.afro.who.int>
9. Rosa S, Lazzarotto S, Stasyszen De Freitas Scherruth M, Calixto PS, De M, Carraro M, et al. Método de folin ciocalteau adaptado para quantificar polifenóis em extratos de erva-mate. *Revista Movimenta*, v. 13, n. 3, p. 419–426, 2020.
10. Pérez M, Dominguez-López I, Lamuela-Raventós RM. The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. Vol. 71, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* American Chemical Society; 2023. p. 17543–53.
11. da Silva Oliveira CR, Suarez WT, dos Anjos Nahas HR, Novaes FJM, de Almeida JPB, dos Santos VB. Methods Based on Digital Image: from General Considerations to Chemistry Teaching. Vol. 16, *Revista Virtual de Química.* Sociedade Brasileira de Química; 2024. p. 307–26.
12. Dos Santos Benedetti LP, Dos Santos VB, Silva TA, Filho EB, Martins VL, Fatibello-Filho O. A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. *Analytical Methods.* 21 de maio de 2015;7(10):4138–44.
13. Firdaus ML, Saputra E, Ginting SM, Wyantuti S, Eddy DR, Rahmidar L, et al. Smartphone-based digital image colorimetry for non-enzymatic detection of glucose using gold nanoparticles. *Sens Biosensing Res.* 1o de fevereiro de 2022;35.
14. Lucas BN, Dalla Nora FM, Boeira CP, Verruck S, Da Rosa CS. Determination of total phenolic compounds in plant extracts via Folin-Ciocalteu's method adapted to the usage of digital images. *Food Science and Technology (Brazil).* 2022;42.
15. Lucas BN, Dalla Nora FM, Boeira CP, Verruck S, Da Rosa CS. Determination of total phenolic compounds in plant extracts via Folin-Ciocalteu's method adapted to the usage of digital images. *Food Science and Technology (Brazil).* 2022;42.

16. Jahangard S, Jahangard S, Saraji M. Combination of headspace single-drop microextraction with smartphone-based on-drop colorimetric detection for determination of ammonia and total nitrogen in environmental and food samples. *Microchemical Journal*. 1o de abril de 2024;199.
17. de Oliveira LMA, dos Santos VB, da Silva EKN, Lopes AS, Dantas-Filho HA. An environment-friendly spot test method with digital imaging for the micro-titration of citric fruits. *Talanta*. 1o de janeiro de 2020;206.
18. Da Costa AB, Helfer GA, Barbosa JLV, Teixeira ID, Santos RO, Dos Santos RB, et al. Photometrix uvc: A new smartphone-based device for digital image colorimetric analysis using pls regression. *J Braz Chem Soc*. 1o de março de 2021;32(3):675–83.
19. López-Marzo AM, Merkoçi A. Paper-based sensors and assays: A success of the engineering design and the convergence of knowledge areas. Vol. 16, *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry; 2016. p. 3150–76.
20. Liu C, Gomez FA. A microfluidic paper-based device to assess acetylcholinesterase activity. *Electrophoresis*. 1o de abril de 2017;38(7):1002–6.
21. Gałuszka A, Migaszewski ZM, Konieczka P, Namieśnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. Vol. 37, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2012. p. 61–72.
22. Canhete de Moraes N, Marques Petroni J, de Lima F, Souza Ferreira V, Gabriel Lucca B. Paper-based electrochemical platform modified with graphene nanoribbons: A new and affordable approach for analysis of 5-hydroxy-L-tryptophan. *Microchemical Journal*. 1o de dezembro de 2022;183.
23. Marquez S, Liu J, Morales-Narváez E. Paper-based analytical devices in environmental applications and their integration with portable technologies. Vol. 10, *Current Opinion in Environmental Science and Health*. Elsevier B.V.; 2019. p. 1–8.
24. Busa LSA, Mohammadi S, Maeki M, Ishida A, Tani H, Tokeshi M. Advances in microfluidic paper-based analytical devices for food and water analysis. *Micromachines (Basel)*. 2016;7(5).
25. Kuswandi B, Ensafi AA. Perspective—Paper-Based Biosensors: Trending Topic in Clinical Diagnostics Developments and Commercialization. *J Electrochem Soc*. 2020;167(3):037509.
26. Peters KL, Corbin I, Kaufman LM, Zreibe K, Blanes L, McCord BR. Simultaneous colorimetric detection of improvised explosive compounds using microfluidic paper-based analytical devices (μPADs). *Analytical Methods*. 7 de janeiro de 2015;7(1):63–70.
27. Karita S, Kaneta T. Acid-base titrations using microfluidic paper-based analytical devices. *Anal Chem*. 16 de dezembro de 2014;86(24):12108–14.
28. Pohanka M. Three-Dimensional Printing in Analytical Chemistry: Principles and Applications. Vol. 49, *Analytical Letters*. Taylor and Francis Inc.; 2016. p. 2865–82.
29. Agrawaal H, Thompson JE. Additive manufacturing (3D printing) for analytical chemistry. Vol. 3, *Talanta Open*. Elsevier B.V.; 2021.
30. de Moraes NC, da Silva ENT, Petroni JM, Ferreira VS, Lucca BG. Design of novel, simple, and inexpensive 3D printing-based miniaturized electrochemical platform containing embedded disposable detector for analytical applications. *Electrophoresis*. 1o de março de 2020;41(5–6):278–86.
31. Ambrosi A, Pumera M. 3D-printing technologies for electrochemical applications. Vol. 45, *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry; 2016. p. 2740–

- 55.
32. Gross BC, Erkal JL, Lockwood SY, Chen C, Spence DM. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Anal Chem.* 1o de abril de 2014;86(7):3240–53.
33. Subbaraju G V, Kannababu S, Vijayakumar K, Murthy PBS, Vanisree M, Tsay HS. Spectrophotometric Estimation of L-5-Hydroxytryptophan in Griffonia simplicifolia Extracts and Dosage Forms †. *International Journal of Applied Science and Engineering.* 2005;3(2):111–6.
34. Garikapati DR. Development and validation of spectrophotometric method for the determination of anti-HIV drug. *Asian Journal of Chemistry.* 2004;16(2):1217–9.
35. Ferreira SLC, Caires AO, Borges T da S, Lima AMDS, Silva LOB, dos Santos WNL. Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. Vol. 131, *Microchemical Journal.* Elsevier Inc.; 2017. p. 163–9.
36. Mocaka-' J, Bonda AM, Mitchella S, Scollaryb G. International union of pure and applied chemistry analytical chemistry division commission on electroanalytical chemistry* a statistical overview of standard (iupac and acs) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stopping techniques. Prepared for publication by. Vol. 69, *Pure & Appl. Chern.* 1997.
37. Chen L, Lian HT, Sun XY, Liu B. Sensitive detection of L-5-hydroxytryptophan based on molecularly imprinted polymers with graphene amplification. *Anal Biochem.* 1o de junho de 2017;526:58–65.
38. UNICPHARMA. Unicpharma. 2025. 5-hidroxitriptofano (5-HTP) cápsulas.
39. Sigma-Aldrich. Merck/Sigma-Aldrich. 2024. Uric Acid - Safety Data Sheet (Product Number U2625).
40. Eduardo da Silva Ferreira M, Canhete de Moraes N, Souza Ferreira V, Amorim Bezerra da Silva R, Marques Petroni J, Gabriel Lucca B. A novel 3D-printed batch injection analysis (BIA) cell coupled to paper-based electrochemical devices: A cheap and reliable analytical system for fast on-site analysis. *Microchemical Journal.* 1o de agosto de 2022;179.
41. Brasil AN de VS. Farmacopéia Brasileira. 6. ed.Far. Vol. 1. Brasília: ANVISA; 2019.