

ALICE MARIA ALMEIDA FÉLIX

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
ASSOCIADO AO USO DE μ PAD PARA DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE
Cr(VI) E Hg(II)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Bacharelado, da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial à obtenção do título de Bacharela em Química.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos

Coorientador: Me. José Guimarães Ferreira de Lima Júnior

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Cláudio César Temóteo Galvino – CRB/4 - 1459

F316da Félix, Alice Maria Almeida.

Desenvolvimento e aplicação de metodologia analítica associado ao uso de μ PAD para determinação colorimétrica de Cr(VI) e Hg (II) / Alice Maria Almeida Félix. - 2019.

55 f. : il.

Orientadora: Diógenes Meneses Santos.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química : Bacharelado) – Instituto de Química e Biotecnologia. Curso de Química. Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 46-50.

1. Celulose microfluídica. 2. μ PADs. 3. 1,5-difenilcarbazida. 4. Colorimetria. 5. Cr(VI). I. Título.

CDU: 543

Folha de Aprovação

ALICE MARIA ALMEIDA FÉLIX

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA ASSOCIADO AO USO DE μ PAD PARA DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE Cr(VI) E Hg(II)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Química Bacharelado, da Universidade
Federal de Alagoas como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharela em Química.

Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos
Universidade Federal de Alagoas
Orientador

Me. José Guimarães Ferreira de Lima Júnior
Universidade Federal de Alagoas
Coorientador

Prof. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Universidade Federal de Alagoas

Dra. Emanuella Gomes da Silva
Universidade Federal de Alagoas



ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB

1. Data da apresentação do TCC: 11/03/2019

2. Aluno / matrícula: Alice Maria Almeida Felix - 141126035

3. Orientador(es) / Unidade Acadêmica:

Diógenes Menezes dos Santos - Penedo

4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):

<u>DIÓGENES MENESES DOS SANTOS</u>	(Presidente)	Nota: <u>9,0</u>
<u>Emmanuelle Gomes de Silva</u>	(1º avaliador)	Nota: <u>8,5</u>
<u>Fabryane Cavico de Abreu Godim</u>	(2º avaliador)	Nota: <u>8,5</u>
<u>JOY Guimarães Ferreira de Lima Júnior</u>	(3º avaliador)	Nota: <u>9,0</u>

5. Título do Trabalho:

Desenvolvimento e aplicação de metodologia analítica associada ao uso de UPAD para determinação colorimétrica de Cr(VI) e Hg(II).

6. Local: Sala da pós

7. Apresentação: Horário início: 9:06 Horário final: 9:36
Arguição: Horário início: 9:36 Horário final: 12:24

8. Nota final: 8,75

9. Justificativa da nota. Em caso de APROVAÇÃO COM RESTRIÇÕES, indicar as principais alterações que devem ser efetuadas no trabalho para que o mesmo venha a ser aprovado.

(Empty space for justification)

Em sessão pública, após exposição do seu trabalho de TCC por cerca de 30 minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca por 168 minutos, tendo como resultado:

APROVADO

APROVADO COM RESTRIÇÕES – mediante modificações no trabalho que foram sugeridas pela banca como condicional para aprovação.

NÃO APROVADO.



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)

Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.

www.iqb.ufal.br // Tel: (82) 3214-1384/1189



Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo candidato:

Maceió, ____ de _____ de 201 ____

Presidente: Diogenes Alves dos Santos
1º Avaliador: Antonella Jones de Silva
2º Avaliador: Fulgencio Cavalcanti de Almeida
3º Avaliador: Jose Guimaraes Ferreira de Lima Junior
Candidato: _____

“Que darei eu ao Senhor, por todos os
benefícios que me tem feito?

Meu ser inteiro, continue confiando em Deus, o
Senhor, pois ele tem sido bom pra mim!
Oferecer-te-ei sacrifícios de louvor, e invocarei
o nome do Senhor.”

Salmos 116: 12, 7, 17

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser a razão da minha existência e por ser o amor que habita em mim, por ser minha força e meu socorro na angústia, gratidão eterna.

Aos meus pais e a minha irmã, que são espelhos de como a vida deve ser vivida, são minha fortaleza e meu Porto Seguro, são fonte de sabedoria e experiência.

Aos meus amigos, em especial ao meu melhor amigo e namorado Carlos Henrique, por ter sido tudo ao longo desses anos de universidade, por ter me apoiado e escutado, por ter se alegrado e por ter se entristecido comigo nos momentos mais importante.

Aos amigos de curso: Allana, Amanda, Eduardo, Karol e Natali, que foram o alicerce no meio das dificuldades que é cursar química. Aos amigos de infância que até hoje permanecem presentes, gratidão!

Ao Programa de Educação Tutorial, sem dúvidas a melhor experiência que eu poderia ter vivido na universidade, minha gratidão pela pluralidade, pelas viagens, pela empatia, pela liderança, doação, pelos amigos verdadeiros que fiz e pelos tutores que conheci, em especial Prof. PhD Roberaldo Carvalho de Souza e Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim pelos ensinamentos e tutorias.

Aos professores do Instituto de Química e Biotecnologia, por terem participado da minha formação, a todos que fazem parte do LEMAN pela acolhida e gentileza no último ano, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos, pela disponibilidade, pela doação, pelos diálogos e pelos ensinamentos.

E aos governos Lula e Dilma, por terem se preocupado e investido na qualidade do ensino superior do Brasil nos últimos anos e pelos investimentos na pesquisa científica. Continuaremos e resistiremos!

RESUMO

Nos últimos anos, dispositivos microfluídicos à base de papel (*do inglês microfluidic paper-based devices, μ PADs*), fabricados através da aplicação de materiais hidrofóbicos em papel hidrofílico, surgiram como uma plataforma promissora para diagnósticos do tipo *point-of-care* (teste no local), onde a disponibilidade de recursos é limitada. Neste trabalho foi possível comparar metodologias diferentes para a fabricação dos μ PADs para a determinação de metais como cromo e mercúrio. Esses dispositivos apresentam características atraentes, como baixo custo, facilidade de uso, baixo consumo de reagente e de amostra, portabilidade e descartabilidade. Este trabalho descreve métodos alternativos para fabricação e utilização de μ PADs utilizando materiais de baixo custo, como parafina, PDMS (Polidimetilsiloxano) e cera. Os μ PADs foram avaliados na determinação colorimétrica através da 1,5- difenilcarbazida reagindo com o Cr(VI) e com o Hg(II), respectivamente, no intervalo de 5 a 100 μ M de concentração. Nesse estudo, os melhores resultados se deram com ensaios feitos com barreiras hidrofóbicas de PDMS nos μ PADs, permitindo para Cr(VI) LD igual a 0,01 μ M e LQ igual a 0,03 μ M. E para Hg(II) LD de 0,004 μ M e LD de 0,015 μ M. Para isso, curvas analíticas foram construídas com intervalos de concentrações de 5 a 100 μ M de Cr (VI) e Hg(II), obtendo melhor coeficiente de correlação (R) para Cr(VI) de 0,969 e para Hg(II) R = 0,900. Assim, pôde-se obter resultados para esses dois metais, apesar de alguns LD e LQ não estarem nas faixas adequadas.

Palavras-chaves: microfluídica, μ PADs, 1,5-difenilcarbazida, colorimetria, Cr(VI).

ABSTRACT

In the last years, paper-based microfluidic devices (μ PADs), manufactured by applying hydrophilic materials on hydrophobic paper, have emerged as a promising platform for point-of-care diagnostics in developing countries, where the availability of resources is limited. These devices have attractive features such as low cost, ease of use, low consumption of reagents and sample, portability, and disposability. This paper describes alternative methods for manufacturing and using μ PADs using low cost materials such as paraffin, PDMS (polydimethylsiloxane) and wax. The μ PADs were evaluated in the colorimetric determination by the 1,5-diphenylcarbazide reacting with Cr(VI) and with Hg(II), respectively, in the range of 5 to 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ concentration. In this study, the best results were obtained with assays made with hydrophobic barriers of PDMS in the μ PADs, allowing for Cr(VI) LD equal to 0.01 μM and LQ equal to 0.03 μM . For Hg(II) LD of 0.004 μM and LQ of 0.015 μM . For this, analytical curves were constructed with concentrations ranging from 5 to 100 μM Cr (VI) and Hg (II), obtaining a better correlation coefficient (R) for Cr(VI) of 0.969 and for Hg(II) R = 0.900.

Keywords: microfluidics, μ PADs, 1,5-diphenylcarbazide, colorimetry, complexation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de fluxo lateral na determinação de glicose e proteínas.....	15
Figura 2 - Exemplos de moldes de μ PADs impressos à cera utilizados atualmente.....	16
Figura 3 - Reação da difenilcarbazida com o cromo.....	21
Figura 4 - Reação da difenilcarbazida com o mercúrio.....	22
Figura 5 - Complexo formado na reação entre a difenilcarbazida e os íons de mercúrio.....	23
Figura 6 - Carimbo usado na confecção dos μ PADs de teste.....	28
Figura 7 - Folha contendo μ Pad de cera.....	28
Figura 8 - μ PADs prontos para realizar os experimentos.....	29
Figura 9 - Esquema do método proposto para fabricação de μ PADs.....	30
Figura 10 - Teste com DFC. (a) Cromo; (b) Mercúrio.....	32
Figura 11 - μ Pads de parafina.....	33
Figura 12 - Ensaio colorimétrico para Cr(VI) nas concentrações de 5 a 50 μ M. (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μ PAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = -0,196 + 0,0086 X$; $R = 0,911$	34
Figura 13 - Ensaio colorimétrico para Cr(VI) nas concentrações de 5 a 100 μ M. (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μ PAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = 0,002 + 2854 X$; $R = 0,96733$	35
Figura 14 - Ensaio colorimétrico para Cr(VI) nas concentrações de 1 a 5 μ M. (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μ PAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = 181,6 + 2,6x$; $R = 0,969$	37
Figura 15 - Soluções de 1,5-Difenilcarbazida: (a) pronta para uso imediato; (b) depois de 30 minutos exposta ao ar.....	38
Figura 16 - μ PADs de parafina para testes com mercúrio.....	39
Figura 17 - Ensaio colorimétrico para Hg(II) nas concentrações de 5 a 50 μ M. (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μ PAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = 82,08 + 0,175x$; $R = 0,885$	39
Figura 18 - Ensaio colorimétrico para Hg(II) nas concentrações de 5 a 100 μ M. (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μ PAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = -0,148 + 10576X$; $R = 0,900$	40

Figura 19 - Ensaio colorimétrico para Hg(II) nas concentrações de 1 a 5 μ M. (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μ PAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = 86,44 + 5,23x$; $R = 0,650$41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Soluções com concentrações diferentes de cromo já diluídas.....	26
Tabela 2- Comparativos entre as metodologias utilizadas e os resultados obtidos.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ PADs - Dispositivos microfluídicos de papel (do inglês *microfluidic paperbased analytical devices*)

PDMS - Polidimetilsiloxano

FLASH - *Fast Litographic Activation of Sheets*

DFC - 1,5-difenilcarbazida

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

NMC - Nível máximo de contaminantes

EPA - Estados Unidos Agência de Proteção

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

V – Variância

DP – Desvio Padrão

Hg – Mercúrio

Cr – Cromo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.	Dispositivos microfluídicos de baixo custo	13
1.1.1	Papel como substrato microfluídico	14
1.1.2	Confecção de dispositivos microfluídicos a base de papel.....	15
2.	Métodos de detecção	17
1.2.1	Detecção colorimétrica	17
3.	Aplicações dos μ PADs	18
1.3.1	Determinação de Metais	19
2	OBJETIVOS.....	24
1.	Objetivo Geral	24
2.	Objetivos Específicos	24
3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	24
1.	EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS	24
2.	REAGENTES	25
3.	PREPARO DE SOLUÇÕES	26
3.3.1	MEDIÇÃO COLORIMÉTRICA.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
1.	CROMO.....	32
4.1.1	μ PADs de parafina para testes iniciais	33
4.1.2	μ PADs de cera para a determinação de Cr(VI)	33
4.1.3	μ PADs de PDMS para a determinação de Cr(VI)	35
2.	MERCÚRIO	38
4.2.1	μ PADs de parafina para testes iniciais.	39
4.2.2	μ PADs de cera para a determinação de Hg(II)	39
4.2.3	μ PADs de PDMS para a determinação de Hg(II).....	40
5	CONCLUSÃO	44
6	PERSPECTIVAS	45
7	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A microfluídica é a tecnologia e a ciência que manipula e processa pequenas quantidades de volumes, utilizando canais na ordem de micrômetros, com aplicações em diversas áreas como química, medicina, eletrônica e biológica. Destaca-se devido a sua capacidade de utilizar pequenas quantidades de amostras e reagentes, e realizar operações e detecções em alta resolução e sensibilidade. (CREVILLÉN *et al.*, 2007; WHITESIDES, 2006).

Na década de 70, quatro pilares impulsionaram o desenvolvimento da microfluídica, foram eles: análise molecular, bio-defesa, biologia molecular e microeletrônica. A origem da microfluídica se dá a partir das técnicas de separação de cromatografia. O sucesso desses métodos desenvolvidos em microcanais estimulou o desenvolvimento de sistemas microfluídicos ainda mais compactos e mais versáteis, com aplicações em química e bioquímica. (WHITESIDES, 2006)

Os primeiros trabalhos em microfluídica usaram *microchips* de silício e vidro, sendo que esses materiais foram, em algumas aplicações, substituídos por plásticos. O silício, em particular, é caro e opaco a luz visível e ultravioleta, por isso não pode ser utilizado em métodos ópticos de detecção convencionais. Além disso, é mais fácil fabricar os componentes requeridos para sistemas de microanálises - especialmente bombas e válvulas – em elastômeros do que em materiais rígidos. (WHITESIDES, 2006)

Baseado em todos os avanços científicos acerca da aplicação da microfluídica na análise de espécies químicas de interesse ambiental, este trabalho baseou-se em determinar Cr(VI) e Hg(II) através da técnica de detecção colorimétrica, pois sabe-se que são dois metais potencialmente tóxicos e nocivos à saúde humana e por isso é de suma importância o monitoramento ambiental desses metais.

1. Dispositivos microfluídicos de baixo custo

Nos últimos anos, a utilização de dispositivos microfluídicos de baixo custo tem recebido grande atenção, especialmente no que se refere a ampla variedade de aplicações analíticas e bioanalíticas. Com isso, o foco de muitos pesquisadores tem sido estudar formas para o desenvolvimento de plataformas de baixo custo para a fabricação destes dispositivos e que sejam dispositivos portáteis, visando a aplicação do *point-of-care*, que é o local onde são feitas as análises. Alguns substratos vêm recebendo grande atenção, os que merecem mais

destaques são plásticos, tecido e papel. (YAGER *et al.*, 2006; COLTRO *et al.*, 2014; FOUDEH *et al.*, 2012).

O papel, substrato escolhido para a realização deste trabalho, é descartável e vem sendo amplamente utilizado para a fabricação de dispositivos microfluídicos, envolvendo aplicações em diversas áreas, utilizando inúmeros métodos de detecção. Assim, haverá uma seção neste trabalho para se discutir as vantagens e as possibilidades de uso desse substrato.

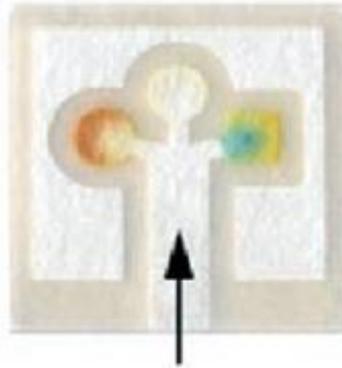
1.1.1 Papel como substrato microfluídico

Constituído basicamente de celulose, que é um polímero de cadeia longa de um só monômero (D-glicose), as fibras do papel são originadas através das interações entre as inúmeras moléculas de D-glicose. (LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. 1993). Vários tipos de papel podem ser utilizados para a fabricação de μ PADs, como o de filtro, o cromatográfico ou sulfite. O papel possui grande aplicabilidade e vantagem sobre os outros substratos por possuir baixo custo, elevada porosidade, excelente compatibilidade química, alta biodegradabilidade, peso leve, flexibilidade, disponibilidade de diferentes formatos e cores, acessibilidade global e apresentar facilidade de armazenamento e transporte. Desta forma, por possuir alta porosidade e ser hidrofílico, um fluido pode ser transportado através de suas fibras e isto é conhecido como fluxo lateral. (PELTON, 2009)

1.1.1.1 Fluxo lateral

Chama-se de fluxo lateral o transporte espontâneo microfluídico que ocorre em superfícies planares, porosas e hidrofílicas, sob ação de força capilar. O ordenamento das fibras do papel permite a realização desse transporte, bem como a separação ou pré-tratamento da amostra. Sendo assim, não requer a utilização de bombas, válvulas ou fontes de alta tensão para realizar o manuseio da amostra. (SONGJAROEN *et al.*, 2012)

Figura 1 - Exemplo de fluxo lateral na determinação de glicose e proteínas



Fonte: MARTINEZ *et al.*, 2007.

1.1.2 Confeção de dispositivos microfluídicos a base de papel

A fabricação de μ PADs requer basicamente a criação de barreiras hidrofóbicas para definir regiões onde o fluido será transportado. A primeira utilização do substrato de papel foi realizada por Yagoda (YAGODA, 1937) para fabricar microzonas de parafina para determinações de níquel e cobre. Algum tempo depois, os pesquisadores Muller e Clegg (MULLER, R. H; CLEGG, D. L. 1949) utilizaram o papel para separar analiticamente alguns corantes, mostrando assim a potencialidade deste substrato principalmente para a área da Química Analítica.

Em 2007, o grupo de pesquisa do Prof. George M. Whitesides, da Universidade de Harvard, propôs a fabricação do primeiro μ PAD através da técnica de fotolitografia e mostraram aplicações microfluídicas (MARTINEZ *et al.*, 2007). O método usado na fabricação dos μ PADs se baseia na delimitação por uma máscara, de barreiras hidrofóbicas de fotorresiste (material sensível à radiação ultravioleta), exposição a luz ultravioleta, seguida por etapas do material não polimerizado. Este método é bastante laborioso e demorado.

Outra técnica que surgiu logo em seguida como alternativa à técnica de fotolitografia e que apresenta um melhor custo, foi o método de impressão à cera, que se baseia na fabricação de μ PADs delimitados por barreiras hidrofóbicas de cera, que são depositadas por uma impressora à cera. Usando um *software* gráfico desenha-se o molde desejado do μ PAD, em seguida, com a impressora à cera, imprime-se no papel o *layout* previamente determinado no *software* e por fim, aquece-se este papel para fundir a cera e assim obter as barreiras hidrofóbicas. Nesta metodologia é necessário o uso de uma impressora (com custo estimado

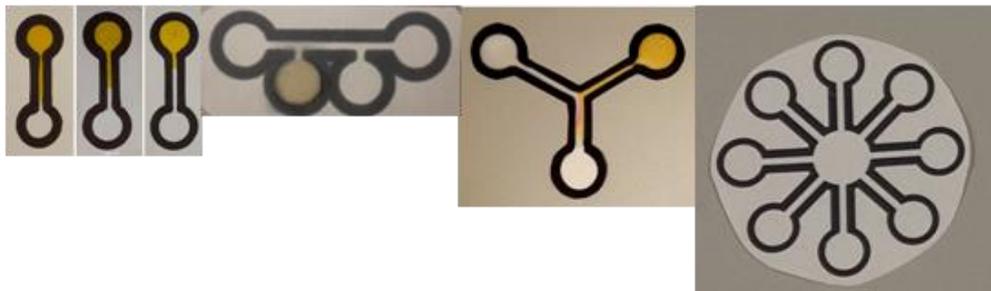
em R\$ 4.000,00) e uma chapa aquecedora, além dos cartuchos de cera (com custo estimado em R\$ 100,00 um *kit* com quatro bastões) (MARTINEZ *et al.*, 2007; MARTINEZ, *et al.*, 2008; CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M., 2009).

Atualmente, pode-se dizer que as tecnologias mais difundidas e utilizadas para fabricação de μ PADs são os métodos de fotolitografia e impressão a cera porém, inúmeros pesquisadores já desenvolveram metodologias mais alternativas, tais como a utilização de tintas permanentes hidrofóbicas (CURTO *et al.*, 2013), o tratamento a laser (CHITNIS *et al.*, 2011), criação de barreiras de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) (BRUZEWICZ; RECHES; WHITESIDES, 2008), corrosão de placas de circuito impresso para delimitar regiões para deposição de parafina (ZHANG e ZHA, 2012), cortes a *laser* para formação de *paper-spray*, impressão via “*screen printing*” (YANG *et al.*, 2012), e a técnica de *Fast Litographic Activation of Sheets* (FLASH), que é baseada em uma litografia rápida. (MARTINEZ, *et al.*, 2008)

1.1.2.1 Construção de dispositivos à base de papel

O primeiro passo na construção de microdispositivos analíticos à base de papel (μ PADs) consiste em estabelecer regiões hidrofílicas delimitadas por barreiras hidrofóbicas que direcionem o fluxo para um local ou zona de detecção desejada, caso contrário, o líquido irá se espalhar radialmente pelo papel, como pôde ser visto na Figura 2. Após a incorporação das paredes hidrofóbicas, o dispositivo pode ser devidamente cortado e modificado com os reagentes cromóforos visando o ensaio de diferentes analitos. Cores mais intensas são observadas nas zonas de detecção à medida que as concentrações vão aumentando.

Figura 2 - Exemplos de moldes de μ PADs impressos à cera utilizados atualmente.



Fonte: AKYAZI, *et al.*, 2016.

As barreiras hidrofóbicas mais utilizadas são com impressão a cera, PDMS, canetas hidrofóbicas e parafina.

2. Métodos de detecção

Existem diferentes métodos de detecção associados a diversas aplicações, como por exemplo a detecção eletroquímica, a quimiluminescência, a espectrometria de massas, a fluorescência e a colorimétrica, esta última será discutida em uma seção a seguir sobre as possibilidades de utilização deste método para análises químicas, bem como as suas vantagens.

1.2.1 Detecção colorimétrica

O método de detecção colorimétrica vem sendo muito utilizados nos μ PADs por apresentar metodologia simples, rápida e barata, pois basicamente é a medida de intensidade da cor em função da concentração da substância analisada.

As vantagens instrumentais que esse método propõe incluem a fácil acessibilidade aos equipamentos necessários para realizar a detecção, como câmeras e impressoras, o baixo custo e a portabilidade. Para análises de *point-of-care*, a detecção colorimétrica se enquadra como o principal método a ser utilizado.

Para fazer medidas colorimétricas é necessário a utilização de reagentes cromógenos nos μ PADs para promover reações químicas com analitos alvo, no caso deste trabalho é Cr(VI) e Hg(II) que, conseqüentemente, promovem mudança de coloração dentro das zonas de detecção dos dispositivos. Para este trabalho utilizou-se o cromóforo 1,5-difenilcarbazida que será discutido nas próximas seções. A partir disso, a área colorida pode ser capturada por um dispositivo de captura de imagens e a intensidade de cor pode ser correlacionada com a concentração do analito. Logo após a etapa de captura da intensidade de cor, utiliza-se um *software* gráfico capaz de fornecer uma resposta da intensidade de cor gerada e assim o analista é capaz de construir curvas analíticas para posteriores determinações quantitativas. (MARTINEZ, *et al.*, 2008).

Para obtenção das imagens, pode-se utilizar diferentes equipamentos para tal finalidade, como câmeras de celular, câmeras digitais, scanner e microscópios. (SHEN, L.; HAGEN, J. A.; PAPAUTSKY, I. 2012). De Souza e colaboradores realizaram a avaliação destes dispositivos de captura de imagens como detectores colorimétricos em microzonas impressas em Poliéster-Toner. Os autores demonstraram que dentre os equipamentos avaliados, o *scanner* foi o que forneceu melhor precisão, uma vez que parâmetros como a luminosidade externa e o ajuste do foco são facilmente controlados com a utilização deste dispositivo. (DE SOUZA *et al.*, 2014).

As vantagens da detecção colorimétrica com os μ PADs estimula a utilização para conduzir análises em locais de difícil acesso, por ser um método que utiliza equipamentos de fácil acessibilidade para a captura das imagens e por apresentarem baixo custo. Entretanto, uma de suas desvantagens é a falta de uniformidade da cor.

Após a realização dos ensaios em μ PADs é normalmente notada uma falta de uniformidade da cor para medidas colorimétricas no interior de suas zonas de detecção. Alguns pesquisadores da área, como o Yetisen e colaboradores discutiram sobre as principais dificuldades na determinação das cores na detecção colorimétrica. (YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R., 2013). Uma das dificuldades da falta de uniformidade é decorrente do efeito de pré-concentração dos reagentes nas bordas das zonas de detecção dos μ PADs. Esse efeito ocorre quando a amostra chega na zona de detecção e entra em contato com os cromogênios previamente adicionados que não estão “aprisionados” à superfície do papel. Com isso, gera um espalhamento dos reagentes para as bordas, ocasionando um gradiente de cor que é observado por colorações mais intensas nas bordas das zonas. Este efeito foi recentemente reportado na literatura como “efeito de lavagem” (EVANS, *et al.*, 2014).

Com a falta de uniformidade da cor, a análise pelo usuário é dificultada uma vez que gera uma inexatidão na medida colorimétrica quando a imagem é transferida para o *software* gráfico. A partir disso, muitos pesquisadores começaram a trabalhar para uma melhor uniformidade da cor que permita uma análise quantitativa mais precisa e de maior confiabilidade. Pesquisadores como Evans e colaboradores (EVANS, *et al.*, 2014) demonstraram que se for feita uma seleção de substratos de papel com base na diferença de porosidade ou espessura pode ser uma estratégia para resolver os problemas associados com a falta de uniformidade de cor nas medidas colorimétricas.

3. Aplicações dos μ PADs

Como já dito anteriormente, os papéis apresentam-se como uma boa alternativa para substratos microfluídicos porque são relativamente baratos, descartáveis, fáceis de usar, armazenar e transportar. Dentre os papéis mais utilizados estão os papéis cromatográfico por possuírem boa estrutura, porosidade e por apresentar bom potencial para modificação e o sulfite, utilizado neste trabalho, por apresentar um grau de porosidade melhor para amostras que são mais hidrofílicas, além das vantagens já citadas anteriormente para o papel cromatográfico. Por serem plataformas promissoras os μ PADs podem ser utilizados para

aplicação em diversas áreas, se destacando principalmente em diagnósticos clínicos e no monitoramento ambiental.

Em análises ambientais, as condições da amostra podem variar ao longo do dia e também durante o tempo de coleta e transporte para o laboratório. Assim, existe uma necessidade no desenvolvimento de dispositivos que realizem análise em campo. Os μ PADs com detecções colorimétrica e eletroquímica atendem bem a essa demanda. No monitoramento ambiental utilizando μ PADs destacam-se os trabalhos que envolvem a determinação de metais (ZHANG *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2012; RATNARATHON *et al.*, 2012).

Como já foi dito anteriormente, o papel é constituído basicamente de celulose e sua química é bem conhecida. Estes fatores favorecem a investigação de diferentes metodologias para modificar a superfície do papel e assim realizar o aprisionamento dos reagentes nas zonas de detecção, para minimizar o efeito de pré-concentração e obter uma melhor uniformidade de cor.

1.3.1 Determinação de Metais

Dentre as diversas técnicas utilizadas para a determinação de metais, o presente trabalho optou por fazer o uso da detecção colorimétrica por ser uma técnica relativamente fácil de ser executada e apresentar baixo custo de manutenção.

O método utilizado neste trabalho foi com o cromogênio 1,5-difenilcarbazida (DFC). Esse método não é oficial para o Hg(II), mas que se mostra bastante interessante para a determinação do Cr(VI) e Hg(II), pois a DFC é um reagente que interage com os analitos em estudo. A DFC é um sólido branco que apresenta pouca solubilidade em água, e uma boa solubilidade em álcool, acetona e outros solventes orgânicos, as soluções de DFC ao entrarem em contato com o ar torna-se de cor castanha pela oxidação que ocorre, e devem ser protegidas da luz, pois são fotossensíveis. Por ser muito instável recomenda-se que a solução seja utilizada no mesmo dia de preparo, para que haja garantia dos resultados.

1.3.1.1 Cromo

O cromo é um metal de transição, localizado no grupo VIA da tabela periódica. A química do cromo envolve os estados de oxidação de +I a +VI. O Cr(VI), depois do Cr(III), é considerado o estado de valência mais estável. O cromo hexavalente é um elemento altamente

tóxico e carcinogênico que é frequentemente encontrado como um contaminante no solo, comida e água devido às suas largas aplicações. É amplamente utilizado em galvanoplastia, produção de aço inoxidável, curtimento de couro, fabricação de têxteis, e preservação da madeira, também é útil para a aplicação industrial; no entanto, é classificado como carcinogênico humano. A ingestão humana de cromo hexavalente ocorre tanto por via oral quanto por inalação. Conforme a resolução 357/2005 do CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente), o nível máximo de contaminantes (NMC) do cromo hexavalente em água portátil é $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto os Estados Unidos Agência de Proteção (EPA) recomendam um NMC de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Sendo assim, a quantificação de Cr(VI) no monitoramento ambiental e para a saúde humana é necessária (WALEED *et al*, 2018).

1.3.1.2 Determinação de Cr(VI) usando Difenilcarbazida como reagente cromóforo

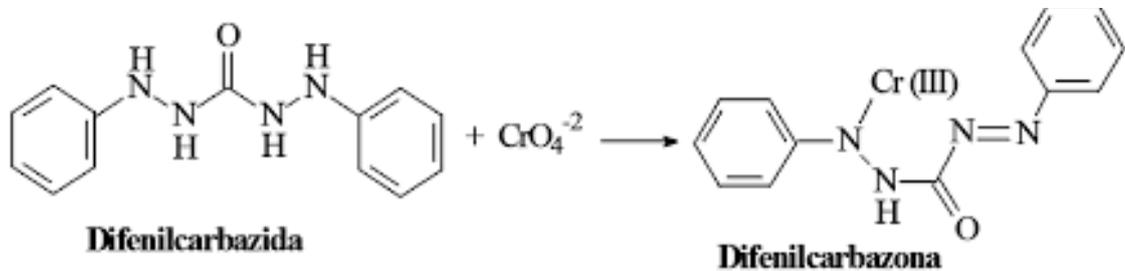
Em meio ácido, pH entre 1 e 2, a DFC reage com Cr(VI) e um complexo de cor violeta é produzido. A hipótese encontrada na literatura é que um complexo catiônico entre Cr(III) e difenilcarbazona é formado durante o processo da DFC pelo Cr(VI). A absorvidade molar baseada em cromo é $40.000 \text{ L / g / cm}$ no comprimento de onda de 540 nm, sendo cerca de 100 vezes mais sensível do que o método do cromato. Este método pode sofrer interferências de Fe(II), Fe(III), V(V), Mo(VI), Cu(II), Hg(II) e NO_2^- em quantidades maiores que do analito. (MARCZENKO, 1976).

Molibdênio e mercúrio reagem com a difenilcarbazida, porém a intensidade de suas colorações é inferior à do cromo, no pH especificado pelo método. Concentrações desses metais até 200 mg/l podem ser toleradas. Vanádio também interfere fortemente, mas pode estar presente em concentrações até 10 vezes maiores que a do cromo sem causar problemas. Ferro em concentração maior que 1 mg/l produz uma coloração amarela, mas se oxidado a íon férrico não causa dificuldade desde que a absorvância seja medida no comprimento de onda apropriado. (ARNOLD, J.; RUPERT, D., 2008).

A eliminação dessas interferências é feita por extração dos cupferratos metálicos em clorofórmio. Este procedimento deve ser utilizado somente se necessário, pois o resíduo de cupferron e clorofórmio complica o desenvolvimento da cor, devendo ser eliminado por tratamento posterior. (ARNOLD, J.; RUPERT, D., 2008).

A figura 3 descreve a reação da 1,5 – Difenilcarbazida com os íons de Cr(VI) que formam um complexo, que em mais altas concentrações apresenta coloração violeta e em baixas concentrações coloração lilás.

Figura 3 - Reação da difenilcarbazida com o cromo.



Fonte: Herrera, Gloria. *et al*, 2013.

1.3.1.3 Mercúrio

O mercúrio é um dos elementos mais tóxicos e nocivos à saúde humana e aos ecossistemas, apresentando uma característica de bioacumulação em organismos vivos. Sua presença na natureza deve-se tanto a processos naturais e desgaseificação da crosta terrestre quanto, a processos industriais e queima de combustíveis fósseis (LEOPOLD *et al.*, 2010).

O mercúrio pode ser encontrado nos estados de oxidação 0 (estado elementar), +1 ou +2. Possui certa versatilidade por poder fazer parte da composição tanto de compostos orgânicos quanto inorgânicos como por exemplo metil-mercúrio $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$, que pode causar perda de visão, audição, paralisia e malformações em fetos, e cloreto de mercúrio (HgCl_2), que ocasiona graves dermatites, diarreia intensa e se ingerida 1 g de uma só vez pode ser fatal, respectivamente. (TRINDADE. L., 2010).

As principais fontes de contaminação por mercúrio são a ingestão de alimentos contaminados, inalação e exposição ocupacional em atividades que o envolvam. Em virtude disso, a determinação de mercúrio em amostras de alimentos e ambientais é de grande importância para avaliar o grau de exposição humana a este elemento e os níveis de contaminação ambiental. (CAVICCHIOL, A; GUTZ, I. G. R., 2003).

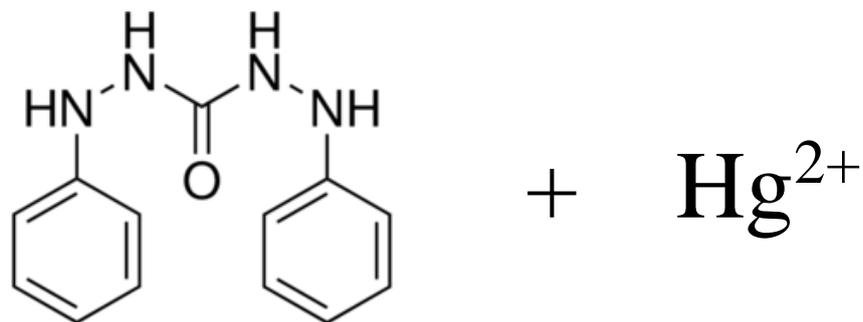
Devido suas características físico-químicas o mercúrio encontra-se líquido a temperatura e pressão ambiente, possui alta densidade, baixo calor específico, pouco compressível, de alta tensão superficial (CANO, S. E. 2001).

1.3.1.4 Determinação de Hg (II) usando Difenilcarbazida como reagente cromóforo

O método utilizado neste trabalho é o método da 1,5-difenilcarbazida (DFC), não é o método oficial para determinação de mercúrio, mas pode ser utilizado como um método alternativo. O método analítico mais usual para a determinação de mercúrio em amostras biológicas é a técnica de vapor frio acoplada a um espectrômetro de absorção atômica (HERBER, R.; STOEPLER, M., 1994). Apesar de simples, necessita de técnicos qualificados e infraestrutura não compatível com a realidade da maioria das localidades afetadas pela poluição mercurial, por isso, essa nova metodologia utilizando a DFC tem como vantagem o baixo custo e a acessibilidade. A reação entre os íons de Hg(II) e a DFC ocorre em meio básico, essa reação produz um composto de cor magenta/violeta. Sendo este um método simples e bastante eficaz, por ser seletivo e consideravelmente sensível, esta reação é influenciada por muitos fatores, tais como o pH da solução, a exposição com o ar e à proporção do reagente do metal. (SMITH, F. W. L. A. S. A., 1938)

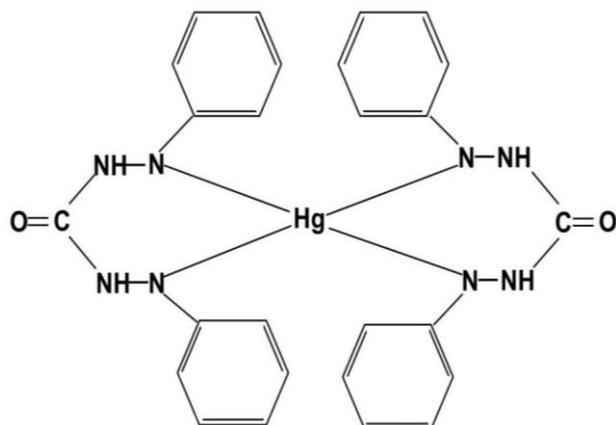
A figura 4 descreve como se dá reação da 1,5 – Difenilcarbazida com os íons de Hg(II) formando um complexo, que em mais altas concentrações apresenta coloração violeta e em baixas concentrações coloração magenta. A figura 5 representa o complexo que é formado a partir da reação entre a DFC e os íons de Hg(II). (DUSSKY, J. V.; TRTILEK, J., 1936) (SMITH, F. W. L. A. S. A., 1938).

Figura 4 - Reação da difenilcarbazida com o mercúrio.



Fonte: Sigma, 2019.

Figura 5 - Complexo formado na reação entre a difenilcarbazida e os íons de mercúrio.



Fonte: apud BASTOS, 2015.

2 OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho visa o desenvolvimento de μ PADs com superfície para aplicações no monitoramento de Cr(VI) e Hg(II) em amostras de interesse ambiental.

2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e aplicar um microfluídico dispositivo analítico baseado em papel (μ PAD) para detecção colorimétrica rápida *in situ* das espécies em estudo.
- Empregar a 1,5-difenilcarbazida, como reagente colorimétrico para determinação e quantificação de Cr(VI) e Hg(II).
- Construir curvas analíticas para todos os microchips e correlacionar intensidade de cor com concentração.
- Comparar os resultados obtidos a partir da utilização dos μ PADs com barreiras hidrofóbicas de cera e de PDMS.

3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS

- Algodão
- Almofariz
- Balança analítica
- Bastão de vidro
- Vidro de Relógio
- Balão volumétrico de 5 e 10 mL
- Béqueres
- Cronômetro;
- Espátula
- Estufa de secagem e esterilização
- Fita adesiva
- Funil de vidro

- Luvas látex
- Manta de aquecimento
- Papel filtro
- Pipeta automáticas
- Pistilo
- Ponteiras

2. REAGENTES

- 1,5 – Difenilcarbazida
- Cromato de Potássio
- Ácido Sulfúrico
- Água Destilada
- Álcool Etílico
- Hidróxido de Potássio
- Sulfato de Mercúrio

3. PREPARO DE SOLUÇÕES

Para CROMO:

Solução estoque de íons Cr(VI) 0,01M – Para o preparo da solução de K_2CrO_4 , foram dissolvidos 9,7 miligramas do Cromato de Potássio em água destilada. Para as soluções posteriores com concentrações mais diluídas, diluiu-se a solução estoque acrescentando água destilada e armazenadas em fracos âmbar, sob temperatura ambiente.

Tabela 1 - Soluções com concentrações diferentes de cromo já diluídas.

Solução	Concentração (μM)
1	5
2	10
3	15
4	20
5	30
6	40
7	50
8	60
9	70
10	80
11	90
12	100

Fonte: Autor, 2019.

Solução 1,5 difenilcarbazida para Cromo – Para o preparo da solução de DFC foram pesados 0,025 gramas da 1,5-Difenilcarbazida, 5 mL de álcool etílico e 1 gota de Ácido Sulfúrico. Por fim a solução foi transferida para um frasco de âmbar e guardado na geladeira. (ANDREIS, F., 2011)

Para MERCÚRIO:

Solução estoque de íons Hg(II) 0,01M - Para o preparo da solução de HgSO_4 , foram dissolvidos 1 g do Sulfato de Mercúrio em água destilada e adicionados 0,56 mL de H_2SO_4 concentrado em um balão volumétrico de 10 mL. As outras soluções de concentrações mais baixas foram preparadas a partir da solução estoque após diluição. A solução foi armazenada em frasco âmbar, sob temperatura ambiente. (DUSSKY, J. V.; TRTILEK, J., 1936) As concentrações são correspondentes a tabela 1, já citada anteriormente.

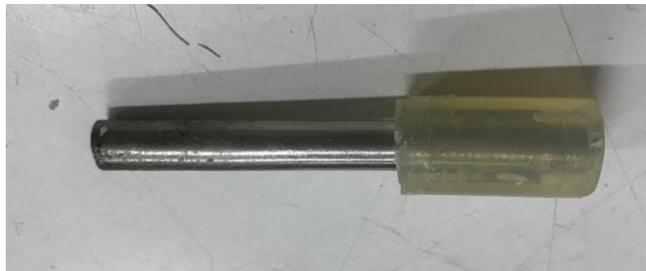
Solução 1,5 difenilcarbazida para Mercúrio – Para o preparo da solução de DFC foi pesados 0,1 g da 1,5-Difenilcarbazida, 0,1 g de Hidróxido de Potássio, essas quantidades foram dissolvidas em álcool etílico PA, a solução foi então colocada na chapa de aquecimento até que a mesma começasse a ferver, após a solução começar a ferver marcou-se 10 min no cronômetro. Depois dos 10 min a solução foi retirada da chapa de aquecimento onde a mesma atingiu a temperatura ambiente. Por fim a solução de difenilcarbazida foi filtrada e armazenada em um frasco âmbar e guardada na geladeira. (DUSSKY, J. V.; TRTILEK, J., 1936)

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

- *Confecção de μ PADs de parafina para testes iniciais:*

Para os testes iniciais, os dispositivos microfluídicos à base de papel (μ PADs) foram construídos utilizando carimbos convencionais fabricados com um pedaço de ferro e fixos em suporte de borracha (Figura 6), papel sulfite tamanho A4 e, para a formação das barreiras hidrofóbicas, a parafina da vela. O carimbo foi colocado sobre a parafina derretida e depois pressionado sobre o papel até a secagem da parafina. Por fim, adicionou-se uma fita adesiva por baixo dos μ PADs, afim de evitar possíveis vazamentos (CARDOSO, T. M. G. et al., 2013).

Figura 6 - Carimbo usado na confecção dos μ PADs de teste.



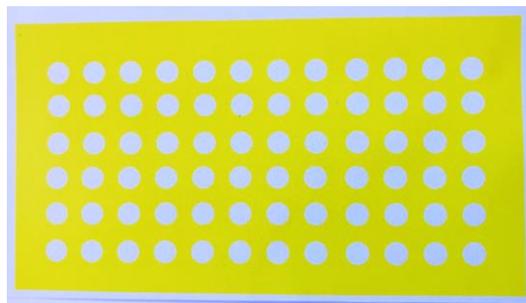
Fonte: Autor, 2019.

-**Preparo dos μ PAD para análises oficiais de cromo e mercúrio:**

Microdispositivo com cera:

Para os testes oficiais, o padrão desejado para o microdispositivo, foi desenhado no *software* Corel Draw (Corel Corporation, Ottawa, Canadá), e obtidos em parceria com o Prof. Dr. Bruno Gabriel Lucca da UFMS, a partir de uma impressora à cera ColorQube 8870 da marca Xerox em sua maior resolução (2400 FinePoint™) com padrões de doze círculos com diâmetros de 5 mm.

Figura 7 - Folha contendo μ Pad de cera.



Fonte: Autor, 2019.

Os dispositivos foram cortados em fitas com 12 reservatórios e em seguida levadas ao aquecimento onde permaneceram até o derretimento da cera, cerca de 30 a 40 segundos, logo após o papel foi resfriado e colou-se uma fita adesiva na parte inferior, afim de evitar vazamentos (Figura 8).

Figura 8 - μ PADs prontos para realizar os experimentos.

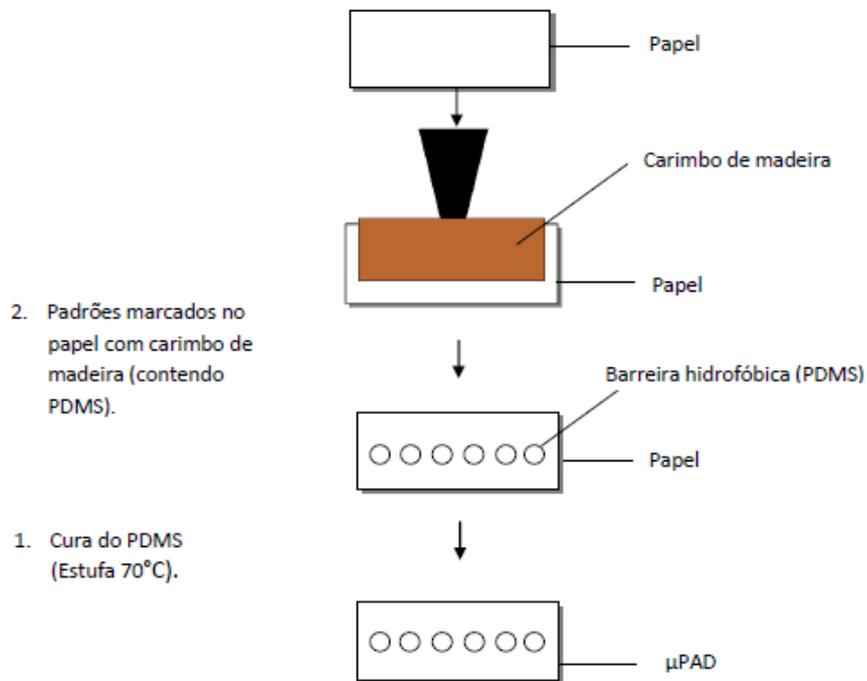


Fonte: Autor, 2019.

Microdispositivo com PDMS:

Em primeiro lugar, foram utilizados carimbos convencionais fabricados em borracha e fixos em suporte de madeira, para a formação das barreiras hidrofóbicas, com seis reservatórios. Uma mistura contendo o pré-polímero do PDMS e seu catalisador, na proporção de 10:1 (m/m), foi misturada com hexano 98,5%, na proporção de 10 g do pré-polímero de PDMS para 1,5 g de hexano (10:1,5 (m/m)) (DORNELAS, K. L; DOSSI, N.; PICCIN, E., 2015). Essa mistura foi aplicada sobre uma espuma polimérica (esponja) comercial e utilizando o carimbo contendo o modelo do dispositivo, foi transferida para a superfície do papel sulfite. Após 30 segundos, tempo necessário para a mistura penetrar no papel, o PDMS foi curado por 1 hora em 70 °C na estufa (Figura 9). Logo em seguida, o papel foi resfriado e colou-se uma fita adesiva para evitar vazamentos, por fim foram inseridas hastes de madeiras fixadas também com fita adesiva para facilitar o manuseio e o microdispositivo estava pronto para uso (Figura 10).

Figura 9 - Esquema do método proposto para fabricação de μ PADs.



Fonte: DORNELAS, K. L.; DOSSI, N.; PICCIN, E, 2015.

Antes dos primeiros testes serem feitos, necessitou-se realizar uma otimização de volume, afim de avaliar a quantidade de solução, tanto de DFC como dos reagentes, que os μ PADs suportariam. Nesta otimização utilizou-se as próprias soluções já preparadas e variou-se o volume adicionado em cada zona de detecção de 2 a 10 μ L, com incrementos de 2 μ L.

Com a otimização do volume, foi possível observar que a área ficou totalmente preenchida com a adição de 2 μ L de DFC e 2 μ L de Cr(VI) ou Hg(II), ou seja, na proporção de 1:1.

Para as duas metodologias de fabricação de μ PADs, os testes se deram analisando concentrações em μ M no intervalo de 5 a 100 μ M. Em cada reservatório foram adicionadas primeiramente 2 μ L da DFC, correspondente ao analito, e logo depois 2 μ L do analito (cromo/mercúrio), totalizando um volume para cada reservatório de 4 μ L. E a partir disso foram construídas curvas de calibração para o Cr(VI) e Hg(II), respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.1 MEDIÇÃO COLORIMÉTRICA

Com o objetivo de quantificar a cor produzida pelos ensaios de Cr(VI) e Hg(II), foram obtidas imagens digitais dos μ PADs pelo iPhone 7 Plus com resolução de imagem de 1920 x 1080 pixels e câmera com 12 megapixels, acoplado a uma lente macro chinesa. As imagens foram obtidas imediatamente após a aplicação das soluções e foram tratadas e quantificadas matematicamente utilizando o programa computacional Corel Photo Paint 2018.

Após a digitalização, com o auxílio do programa computacional Corel Photo Paint, delimitou-se a zona de detecção do μ PAD com a ferramenta máscara de seleção com dimensões de 50,8 x 50,8 mm. Em seguida, utilizou-se uma ferramenta chamada histograma do *software* gráfico, esta ferramenta fornece um valor médio da intensidade de *pixels* da região selecionada e esse valor é correlacionado com a concentração do analito em questão. Com o uso desta ferramenta gráfica, foi possível construir as curvas de calibração para cada ensaio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Teste com DFC para Cromo

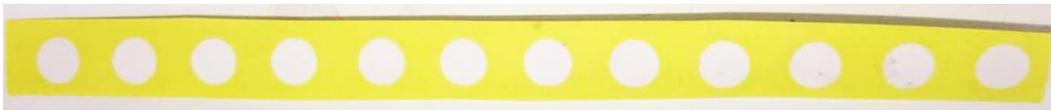
A DFC para o determinação do Cr(VI) não apresenta coloração. Os testes se deram a partir da aplicação de 2 µL da DFC nos µPADs e observou-se por horas a estabilidade, percebeu-se que com o tempo ela oxida no papel e forma uma coloração rosa. Sua capacidade de reagir colorimetricamente com o analito é perdida. (Figura 10).

Teste com DFC para Mercúrio

A DFC para o determinação do Hg(II) não apresenta coloração. Os testes se deram a partir da aplicação de 2 µL da DFC nos µPADs e observou-se por horas a estabilidade, percebeu-se que com o tempo ela oxida no papel e forma uma coloração rosa. Sua capacidade de reagir colorimetricamente com o analito é perdida. (Figura 12).

Figura 10 - Teste com DFC. (a) Cromo; (b) Mercúrio.

(a)



(b)



Fonte: Autor, 2019.

1. CROMO

A reação entre o cromato ou o dicromato e a DFC (H_4L), resulta na formação de um quelato de coloração violeta intensa ($[Cr(HL)_2]^+$). Esse quelato é constituído em Cr(III) e 1,5-difenilcarbazona (H_2L). A reação é representada pela equação [1]:



Equação 1

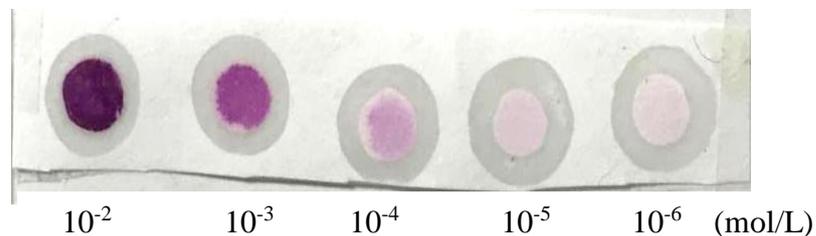
Essa reação ocorre em meio ácido, no qual o cromo está na forma de cromato e, assim, o Cr(VI) é reduzido e complexado pela DFC. O pH ideal para tal reação ocorrer é reportado na literatura como sendo igual a 2,0 e, portanto, o estudo do efeito do pH na otimização do método não foi necessário. (MATOS, W. O. *et al*, 2008)

A difenilcarbazida é o principal reagente usado para determinação de Cr(VI). Embora a alta sensibilidade do complexo formado da reação da difenilcarbazida com Cr(VI) seja conhecida desde 1900, a natureza das espécies coloridas permaneceram desconhecidas até parte da década de 50. Sabe-se hoje que a difenilcarbazida é oxidada a difenilcarbazona e o Cr(VI) é reduzido para Cr(III) em meio ácido, e que ocorre a formação de um complexo de difenilcarbazona e Cr(III), o qual tem máximo de absorção próximo a 540 nm.

4.1.1 μ PADs de parafina para testes iniciais

Os testes iniciais de reação foram realizados com concentrações de cromo a mol/L para analisar o poder revelador da DFC, e o resultado se mostrou satisfatório como pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 - μ Pads de parafina.



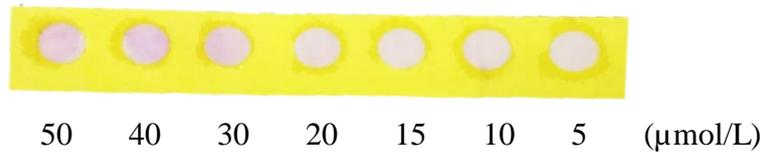
Fonte: Autor, 2019.

4.1.2 μ PADs de cera para a determinação de Cr(VI)

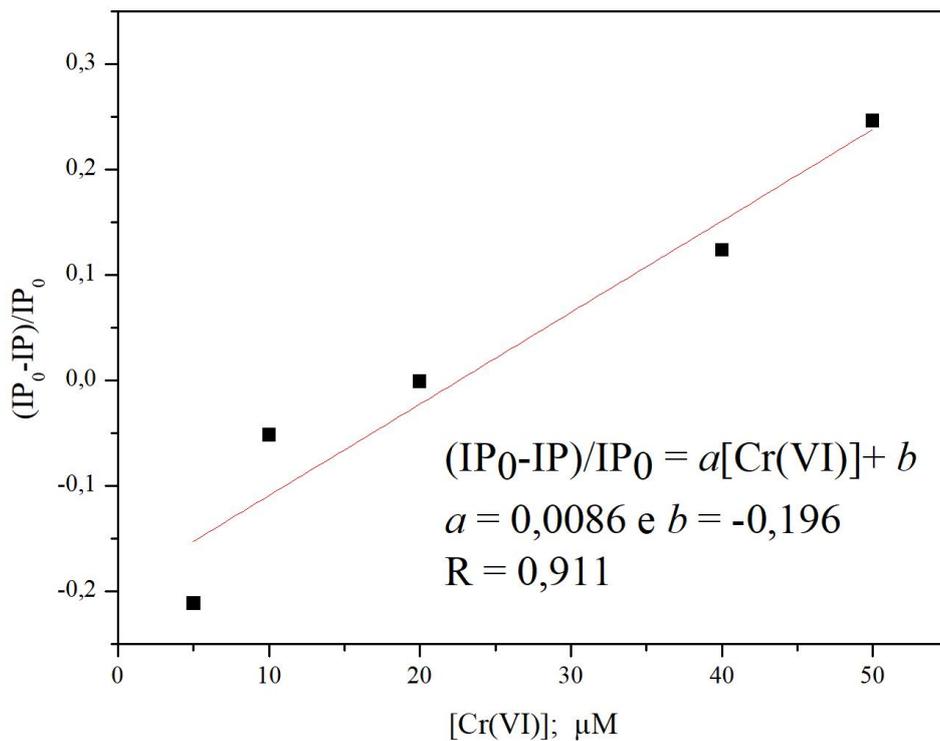
Os primeiros testes foram realizados nos μ PADs com cera, as concentrações variaram de 5 a 50 μ M. A variação na intensidade da coloração violeta produzida pela reação com concentrações crescentes de cromo, permite uma análise quantitativa para Cr(VI) totais, como pode ser visto na Figura 12 – (b), porém percebe-se um vazamento da solução dissolvendo as barreiras hidrofóbicas. Isso se dá pelo fato da DFC ser solubilizada em álcool, e o álcool etílico consegue dissolver a cera que foi depositada no papel (Figura 12 – (a)).

Figura 12 - Ensaio colorimétrico para Cr(VI) nas concentrações de 5 a 50 μM . (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μPAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = -0,196 + 0,0086 X$; $R = 0,911$.

(a)



(b)



Fonte: Autor, 2019

Os ensaios complexométricos realizados são caracterizados por uma variação de cor específica para cada um. No caso do ensaio de cromo, ocorre o aparecimento de uma coloração roxa, indicando assim, a presença do analito.

Para cada reservatório foi calculada a média aritmética a partir da intensidade de pixel da região onde aconteceu a reação, a partir disso foi possível construir a curva de calibração onde o eixo y refere-se aos valores dessa média e o eixo x corresponde as respectivas concentrações de Cr(VI). As análises para as amostras de cromo apresentaram boa linearidade para a utilização dos μPADs com a cera, apesar do vazamento. O valor do coeficiente de

correlação foi de 0,91145, considerado um excelente qualitativo. Para determinar o limite de detecção (LD), que é a menor quantidade ou concentração de um analito que pode ser estabelecida como diferente, admitindo-se um intervalo de confiança, em relação a um branco, foi calculado baseado na relação entre três vezes desvio padrão do branco (S) e o coeficiente angular da respectiva curva analítica, conforme Equação 2.

$$LD = 3S/m \quad \text{Equação 2}$$

O valor de LD obtido para a faixa de concentração 5 a 50 μM foi de 3614,37 μM .

Para as análises dos limites de quantificação (LQ), que é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecida, foi calculado baseado na relação entre dez vezes o desvio padrão do branco (S) e o coeficiente angular da respectiva curva analítica, conforme Equação 3.

$$LQ = 10S/m \quad \text{Equação 3}$$

O valor de LQ obtido para a faixa de concentração 5 a 50 μM foi de 12047,91 μM .

Para os cálculos de LD e LQ foram necessários primeiramente calcular a Variância (V), que é uma medida de dispersão que mostra quão distante os valores estão da média, e o Desvio Padrão (DP), que é outra medida de dispersão é o resultado positivo da raiz quadrada da variância. Os resultados obtidos foram os seguintes:

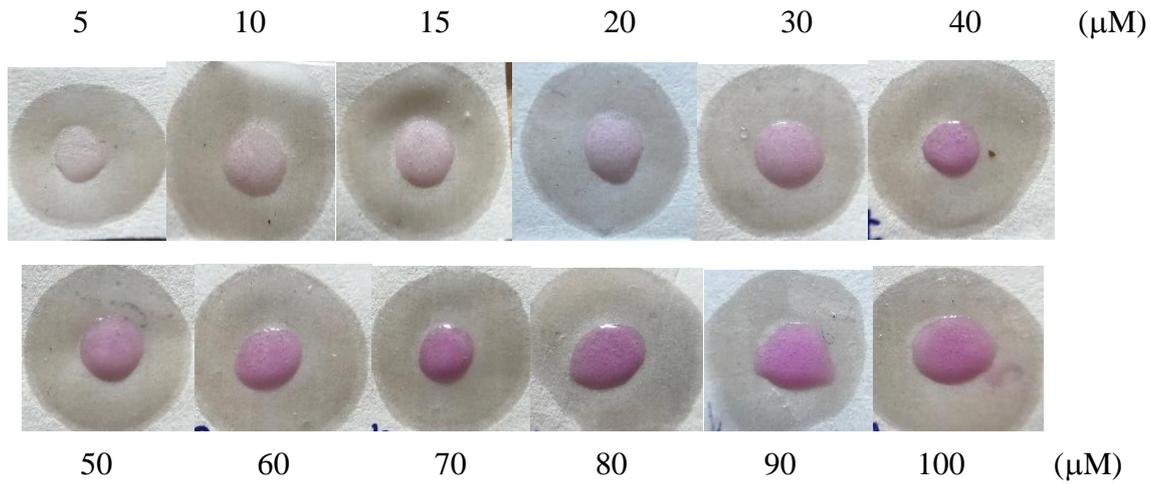
$$V = 107,354 \text{ e o DP} = 10,36$$

4.1.3 μPADs de PDMS para a determinação de Cr(VI)

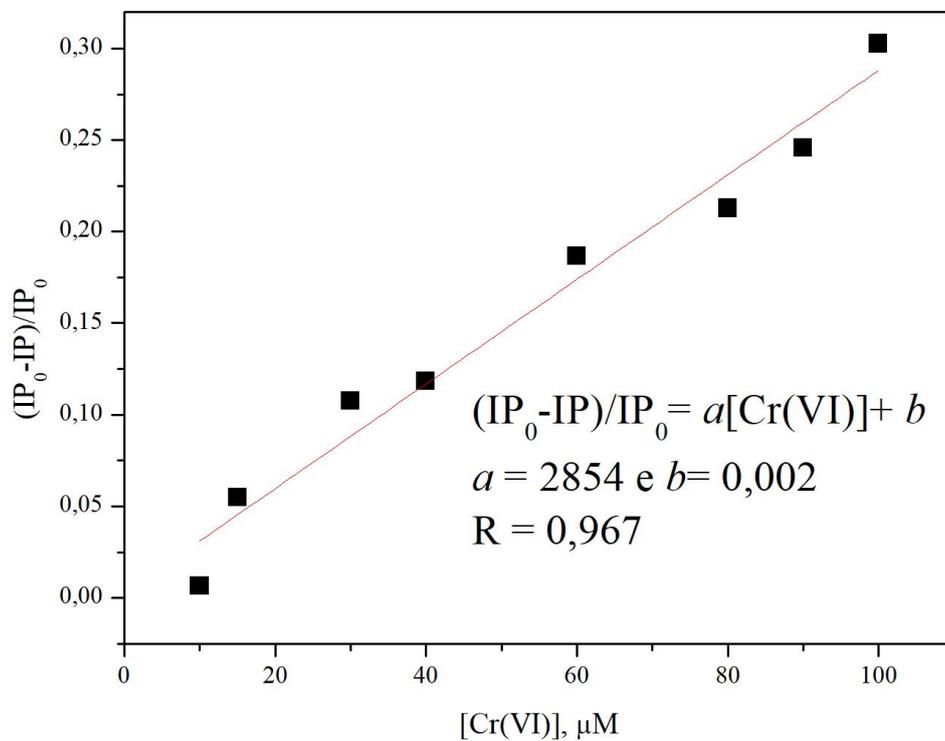
Já para a realização dos ensaios com μPADs feitos com barreiras hidrofóbicas de PDMS, as concentrações variaram de 5 a 100 μM , porém não ocorreu vazamento. O PDMS é um polímero bastante resistente que não solubiliza álcool etílico. A variação na intensidade da cor também pode ser notada, com a mesma característica de cor violeta indicando a presença de Cr(VI) como pode ser visto na Figura 13 (a).

Figura 13 - Ensaio colorimétrico para Cr(VI) nas concentrações de 5 a 100 μM . (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μPAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = 0,002 + 2854 X$; $R = 0,96733$.

(a)



(b)



Fonte: Autor, 2019

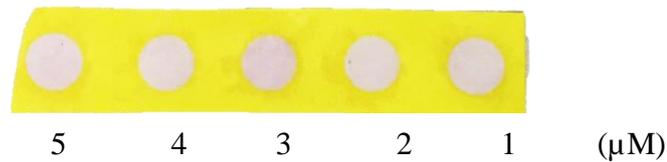
Logo, percebe-se que com o PDMS, o coeficiente de correlação deu mais próximo do ideal e pode-se associar isso ao fato do não vazamento de solução com a utilização do PDMS. Os limites de LD e LQ também foram calculados e apresentaram os seguintes valores.

$$LD = 0,01 \mu\text{M} \quad LQ = 0,03 \mu\text{M}$$

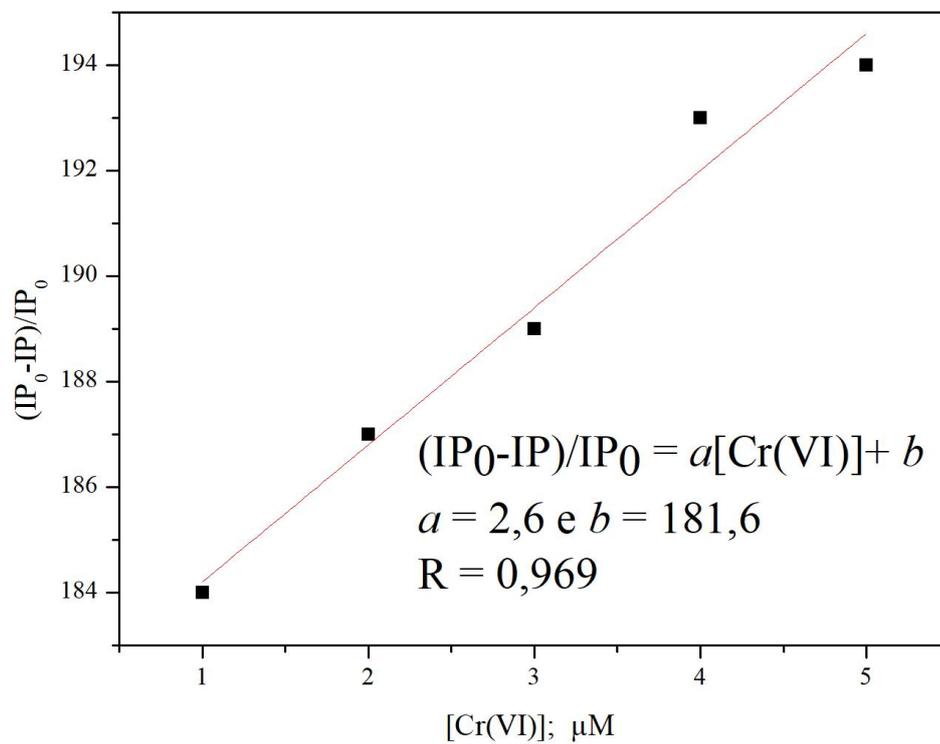
Para finalizar fez-se um ensaio com concentrações muito menores, de 1 a 5 μM , utilizando μPAD com cera.

Figura 14 - Ensaio colorimétrico para Cr(VI) nas concentrações de 1 a 5 μM . (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μPAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = 181,6 + 2,6x$; $R = 0,969$.

(a)



(b)



Fonte: Autor, 2019.

Para concentrações menores, obteve-se os seguintes valores para LD e LQ, 11,95 μM e 39,85 μM , respectivamente. A partir disso, nota-se que para concentrações mais baixas ainda é

possível determinar Cr(VI) pelo método da DFC, comprovando assim a veracidade do método de detecção.

2. MERCÚRIO

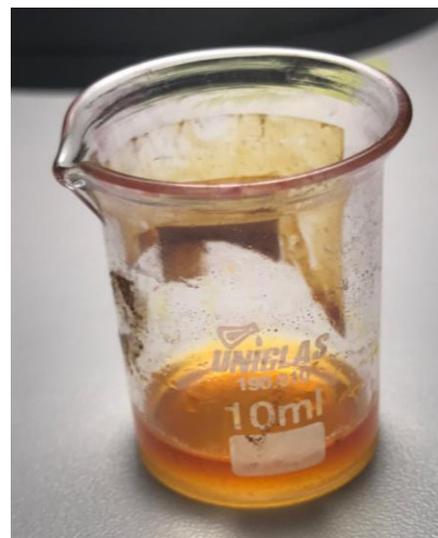
Já para o mercúrio, a DFC apresenta uma coloração vermelha (Figura14 - a) devido ao hidróxido de potássio que age como catalisador, a reação do mercúrio com a DFC produz um composto de cor magenta/violeta. Esta reação é reconhecida como um método muito sensível e pode ser influenciada por muitos fatores, tais como o pH da solução, a exposição com o ar e à proporção do reagente do metal (Figura 14 – b)

Figura 15 - Soluções de 1,5-Difenilcarbazida: (a) pronta para uso imediato; (b) depois de 30 minutos exposta ao ar.

(a)



(b)



Fonte: Autor, 2019.

A reação química que rege esse processo químico da DFC com o Mercúrio é

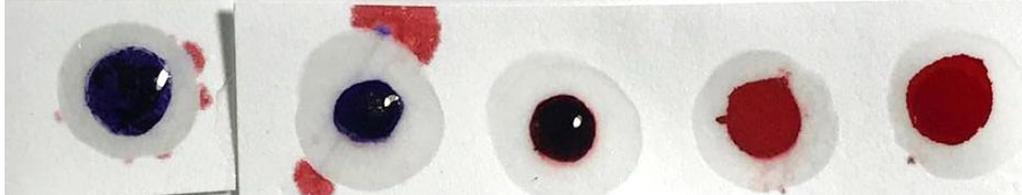


Assim como foi para o cromo, os testes para mercúrio se deram na mesma ordem de concentração e procedimento.

4.2.1 μ PADs de parafina para testes iniciais.

Os testes iniciais de reação foram realizados com concentrações de mercúrio a mol/L para analisar o poder revelador da DFC, e o resultado se mostrou satisfatório como pode ser observado na Figura 16.

Figura 16 - μ PADs de parafina para testes com mercúrio.



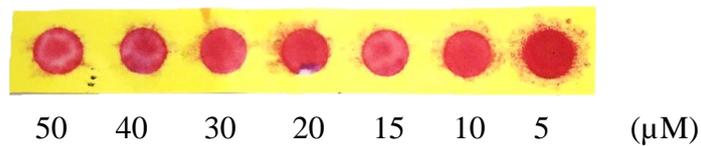
Fonte: Autor, 2019.

4.2.2 μ PADs de cera para a determinação de Hg(II)

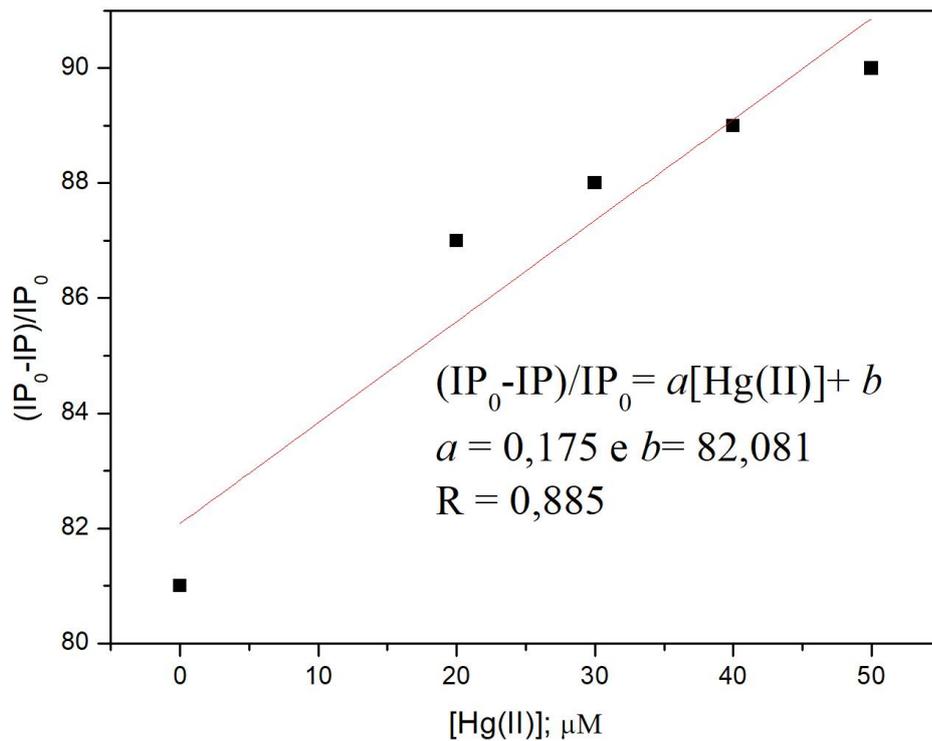
Para testes com cera, as concentrações variaram de 5 a 50 μ M. A variação na intensidade da coloração produzida pela reação permite fazer uma análise quantitativa de Hg(II), como pode ser visto na Figura 17 - a, porém percebe-se um vazamento da solução dissolvendo as barreiras hidrofóbicas, assim como foi para os teste com Cr(VI), devido a utilização da DFC solubilizada em álcool etílico.

Figura 17 - Ensaio colorimétrico para Hg(II) nas concentrações de 5 a 50 μ M. (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μ PAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = 82,08 + 0,175x$; $R = 0,885$.

(a)



(b)



Fonte: Autor, 2019.

O valor de LD obtido para a faixa de concentração 5 a 50 μM foi de 275,40 μM e para LQ foi de 918,01 μM.

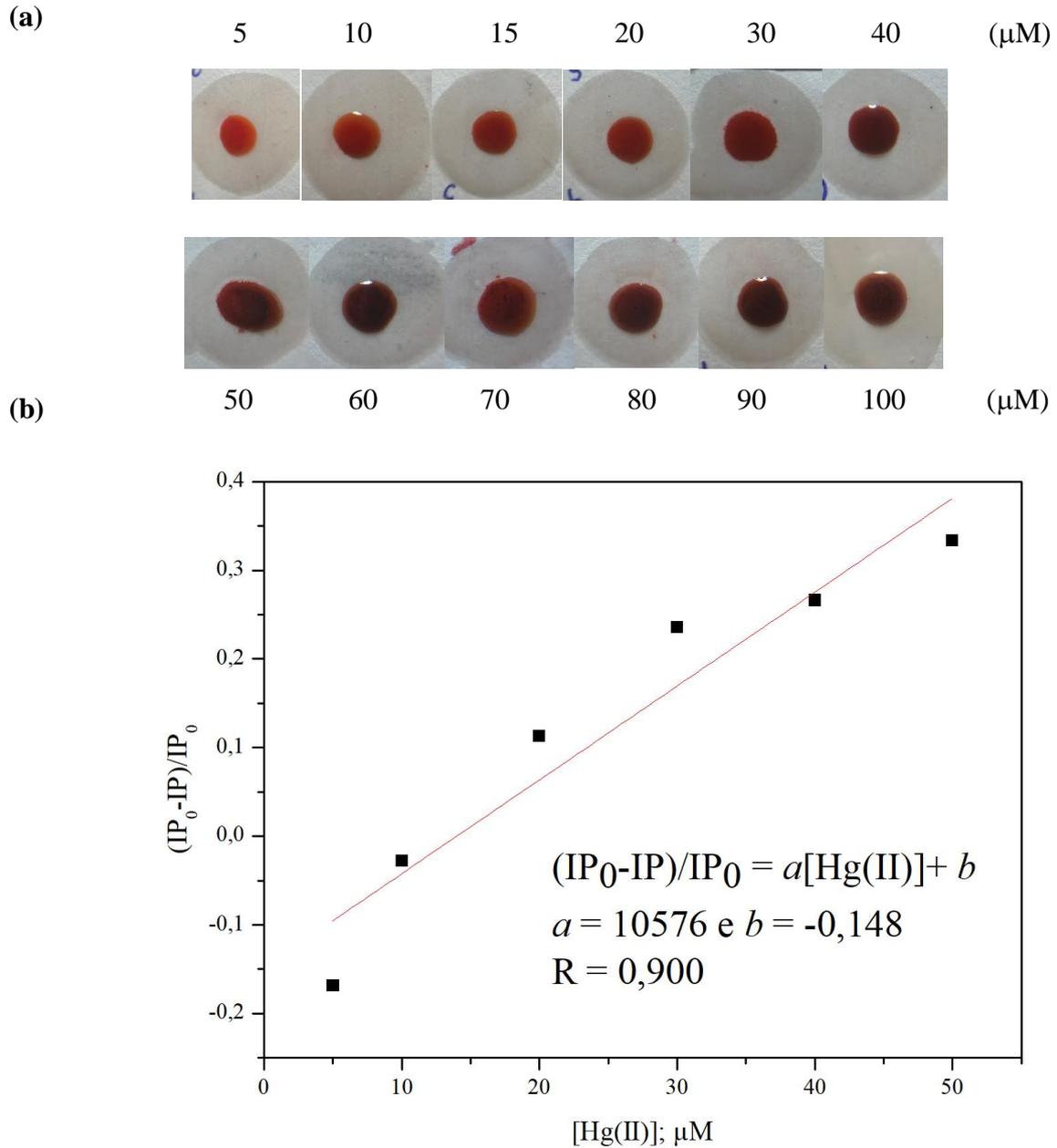
Da mesma forma que foi para Cr(VI), calculou-se a Variância e o Desvio Padrão e obtiveram os seguintes valores:

$$V = 258,1 \text{ e o DP} = 16,06$$

4.2.3 μPADs de PDMS para a determinação de Hg(II)

Já para a realização dos ensaios com μPADs feitos com barreiras hidrofóbicas de PDMS, as concentrações variaram de 5 a 100 μM, porém não ocorreu vazamento. A variação na intensidade da cor também pode ser notada, com a mesma característica de cor magenta indicando a presença de Hg(II) como pode ser visto na Figura 18.

Figura 18 - Ensaio colorimétrico para Hg(II) nas concentrações de 5 a 100 μM. (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μPAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = -0,148 + 10576X$; $R = 0,900$.



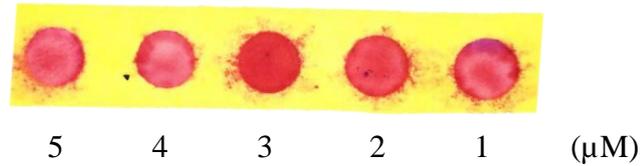
Fonte: Autor, 2019

O valor de LD obtido para a faixa de concentração 5 a 100 μM foi de 0,004 μM e para LQ foi de 0,01 μM .

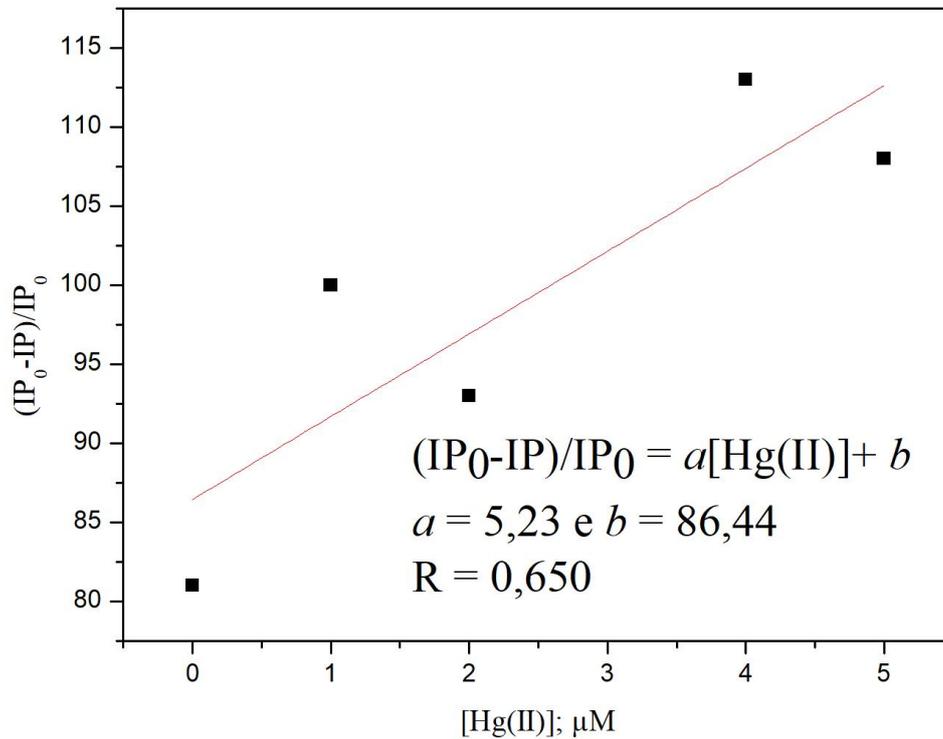
Para finalizar fez-se um ensaio para concentrações muito menores, de 1 a 5 μM , utilizando μPAD de cera.

Figura 19 - Ensaio colorimétrico para Hg(II) nas concentrações de 1 a 5 μM . (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o μPAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $Y = 86,44 + 5,23x$; $R = 0,650$.

(a)



(b)



Fonte: Autor, 2019

Para esse último teste não apresentou linearidade e não foi conforme esperado.

Assim, comparando os LD, LQ, e o R para os dois metais, percebe-se que para dispositivos feitos com a impressão à cera, as soluções vazaram, aumentando o raio do reservatório e espalhando a solução com o analito, devido a solução de DFC, que no seu preparo foi utilizado álcool etílico para solubilizá-la. Pela literatura, sabemos que a cera é altamente solúvel na presença de álcool. Afim de corrigir esse espalhamento da amostra no reservatório, que influi diretamente na determinação do analito e na captura das imagens, utilizou-se como alternativa o PDMS, pois sua estrutura química não solubiliza a DFC e mantém a uniformidade da cor em cada reservatório. (DORNELAS, K. L; DOSSI, N.; PICCIN, E., 2015) Observa-se que os valores para LD e LQ não foram valores adequados, pode-se atribuir esse ao à captura das imagens e as soluções utilizadas. Os melhores valores para esses parâmetros foram para barreiras de PDMS. Tabela 3 pode-se observar esses resultados.

Tabela 2- Comparativos entre as metodologias utilizadas e os resultados obtidos.

Parâmetros	Cromo			Mercúrio		
	CERA		PDMS	CERA		PDMS
Concentração	1 a 5 µM	5 a 50 µM	5 a 100 µM	1 a 5 µM	5 a 50 µM	5 a 100 µM
R	0,969	0,9111	0,967	0,650	0,885	0,900
LD	11,95 µM	3614 µM	0,01 µM	9,21 µM	275,50 µM	0,004 µM
LQ	39,85 µM	12047 µM	0,03 µM	30,71 µM	918,01 µM	0,01 µM

Fonte: Autor, 2019.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou o desenvolvimento de μ PADs visando aplicações em análises de soluções preparadas de Cr(VI) e Hg(II). Com isso, foi possível mostrar a aplicação destes dispositivos em amostras previamente preparadas para a determinação de dois metais muito tóxicos, através da detecção colorimétrica.

O processo de revelação dos analitos se deu a partir da utilização do cromógeno 1,5-Difenilcarbazida e mostrou-se ser uma boa alternativa por ser um método rápido e fácil, e também por apresentar um bom desempenho analítico, uma vez que as curvas analíticas apresentaram boas linearidades, porém para otimizar e verificar possíveis interferentes, e a repetibilidade do sistema são necessários mais estudos. Os melhores resultados se deram com ensaios feitos com barreiras hidrofóbicas de PDMS nos μ PADs, permitindo para Cr(VI) LD igual a 0,01 μ M e LQ igual a 0,03 μ M e para Hg(II) LD de 0,004 μ M e LD de 0,015 μ M.

Muitos problemas foram detectados ao longo da metodologia e dos resultados, como por exemplo a utilização de barreiras hidrofóbicas diferentes, a forma de capturar as imagens, os valores de LD e LQ que não foram os esperados, a falta de uniformidade da cor e a solubilidade do reagente cromóforo. Esses parâmetros precisam ser analisados novamente para adequar a metodologia.

Dentre as vantagens que os μ PADs apresentaram, são elas as mais relevantes: baixo custo, portabilidade, facilidade de transporte, facilidade no manuseio e análises rápidas. Os materiais utilizados são de fácil aquisição e baixo custo e permitem a implementação da metodologia em laboratórios de pesquisa, sem o emprego de equipamentos sofisticados.

Portanto, os μ PADs desenvolvidos e testados nesse trabalho, possuem elevado potencial para serem inseridos comercialmente e acredita-se que diante de todas essas vantagens, irá facilitar as análises clínicas e o monitoramento ambiental.

6 PERSPECTIVAS

Como visto anteriormente, inúmeras aplicações existem para os μ PADs, então ficam como perspectivas para complementação do trabalho as seguintes atividades:

- ✓ Determinação de metais em amostras forenses de cigarros contrabandeados do Paraguai.
- ✓ Aplicar metodologias analíticas alternativas para a bioadsorção e pré-concentração de traços de metais pesados, tais como Pb(II), Cd(II), Cr(VI) e Hg(II), e dos agrotóxicos glifosato, ametrina, clomazona e carbamatos presentes em águas naturais, empregando um sistema em batelada com detecção espectrofotométrica e um microfluídico dispositivo analítico baseado em papel (μ PAD) para detecção colorimétrica rápida *in situ* e usando os endocarpos do *cocos nucifera*, do *attalea speciosa*, do mesocarpo do *theobroma grandiflorum* e carcaças de crustáceos como bioadsorvente de baixo custo para a adsorção e pré-concentração dessas espécies.
- ✓ Realizar teste de prováveis interferentes presentes em amostras reais utilizando o sistema de melhor resultado deste trabalho.

7 REFERÊNCIAS

AKYAZI, T. et al. Fluidic flow delay by ionogel passive pumps in microfluidic paper-based analytical devices. **Sensors and Actuators B: Chemical**. Volume 233, Pages 402-408, 2016.

ANDREIS, F. Redução dos Níveis de Cromo em Águas Residuais Utilizando *Saccharomyces Cerevisiae* como Bioadsorvente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

ARNOLD, J.; RUPERT, D. Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater. **American public health association**. 15 ed. p. 1134. 2008.

CANO, S. E. Toxicología del mercurio. Actualidades preventivas en sanidad laboral y ambiental. Jornada Internacinal sobre el impacto ambiental del mercurio utilizado por la minería aurífera artesanal en Iberoamérica. **Lima**, [s.n.]. p. 1-66. 2001.

CARDOSO, T. M. G. et al. Método de fabricação de dispositivos analíticos em substratos de papel: deposição de barreiras hidrofóbicas de parafina a partir do processo de estampagem a quente e uso dos referidos dispositivos. BR1020130175307. 2013.

CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 7091–7095, 2009.

CAVICCHIOLI, A.; GUTZ, I. G.R. O uso de radiação ultraviolet para o prétratamento de amostras em análise inorgânica. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 913-921, 2003.

COLTRO, W. K. T. et al. Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications. **Electrophoresis**, DOI: 10.1002/elps.201400006, 2014.

CONAMA. **Resolução n° 357 de 17 de março de 2005**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em: 04/03/2019.

CREVILLEN, A. G. et al. Real sample analysis on microfluidic devices. **Talanta**, v. 74, p. 342–357, 2007.

DE SOUZA, F. R. et al. Avaliação de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. **Química Nova**, v. 37, p. 1171-1176, 2014.

DORNELAS, K. L.; DOSSI, N.; PICCIN, E. A simple method for patterning poly(dimethylsiloxane) barriers in paper using contact-printing with low-cost rubber stamps. **Analytica Chimica Acta**, v. 858, p 82-90, 2015.

DUSSKY, J. V.; TRTILEK, J. A mercurimetria por meio da difenilcarbazida e da difenilcarbazona como indicadoresres. **Seg. Journ de Pharm. et de Chim**, v. 23, n. 2, p. 39-40, Janeiro 1936.

EVANS, E. et al. Rational Selection of Substrates to Improve Color Intensity and Uniformity on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. **Analyst**, v. 139, p. 2127-2132, 2014.

FOUDEH, A. M. et al. Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics. **Lab on a Chip**, v. 12, p. 3249-3266, 2012.

HERBER, R. & STOEPLER, M. Trace Element Analysis in Biological Specimens. **Elsevier**, Amsterdam, p. 570, 1994.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**, 2nd ed, New York: Worth Publishers, 1993.

LEOPOLD, K.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters – A Review. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, p. 127-138, 2010.

MARCZENKO, Z. Spectrophotometric Determination of Elements. **Chichester**, U.K.: Ellis Horwood. p. 360-365, 1976.

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

MARTINEZ, A. W. et al. Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 3699-3707, 2008.

MARTINEZ, A. W. et al. FLASH: A rapid method for prototyping paperbased microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 8, p. 2146-2150, 2008.

MATOS, W. O. et al. Especificação redox de cromo em solo acidentalmente contaminado com solução sulfocrômica. **Química Nova**, v. 31, p- 1450-1454, 2008.

MULLER, R. H.; CLEGG, D. L.. Automatic Paper Chromatography. **Analytical Chemistry**. v. 21, 9, p. 1123-1125. 1949.

PELTON, R. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 925-942, 2009.

RATNARATHORN, N.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S.; DUNGCHAI, W. Simple silver nanoparticle colorimetric sensing for copper by paper-based devices. **Talanta**, v. 99, p. 552–557, 2012.

SMITH, F. W. L. A. S. A. Determination of Mercury with s-Diphenylcarbazide. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 10, p. 576-578, October 1938.

SONGJAROEN, T. et al. Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. **Lab on a Chip**, v. 12, p. 3392-3398, 2012.

SHEN, L.; HAGEN, J. A.; PAPAUTSKY, I. Point-of-care colorimetric detection with a smartphone. **Lab on a Chip**, v. 12, p. 4240-4243, 2012.

SHI, J.; TANG, F.; XING, H.; ZHENG, H.; BI, L.; WANG, W. Electrochemical Detection of Pb and Cd in Paper-Based Microfluidic Devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 6, p. 1124-1130, 2012.

TRINDADE, L. **A alquimia dos processos de aprendizagem em Química**. 2010.

PICCIN, E. Novas metodologias de fabricação de microssistemas analíticos e detecção eletroquímica. Orientador: Emanuel Carrilho. 2008, 181 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

WALEED, A. B. et al. A colorimetric paper-based analytical device coupled with hollow fiber membrane liquid phase microextraction (HF-LPME) for highly sensitive detection of hexavalent chromium in water samples. **Talanta**, v. 190, 2018

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, p. 368-373, 2006.

YAGER, P. et al. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. **Nature**, v. 442, p. 412-418, 2006.

YAGODA, H. Applications of Confined Spot Tests in Analytical Chemistry: Preliminary Paper. **Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.**, v. 9, p. 79-82, 1937.

YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. **Lab on a Chip**, v. 13, p. 2210-2251, 2013.

ZHANG, A. L.; ZHA, Y. Fabrication of paper-based microfluidic device using printed circuit technology. **Aip Advances**, v. 2, 022171, p. DOI: 10.1063/1.4733346, 2012.

ZHANG, M.; GE, L.; GE, S.; YAN, M.; HUANG, J.; LIU, S. Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence device for simultaneous detection of Pb^{2+} and Hg^{2+} based on potential-control technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 544–550, 2013.