

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**METODOLOGIA ANALÍTICA BASEADA EM μ PAD PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DO Hg(II) e Pb(II) EM ÁGUAS NATURAIS DO RIO SÃO FRANCISCO DA
CIDADE RIBEIRINHA DE PENEDO**

Jéssica da Conceição da Silva

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió - AL

JÉSSICA DA CONCEIÇÃO DA SILVA

**METODOLOGIA ANALÍTICA BASEADA EM μ PAD PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DO Hg(II) e Pb(II) EM ÁGUAS NATURAIS DO RIO SÃO
FRANCISCO DA CIDADE RIBEIRINHA DE PENEDO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador(a): Dr. Diógenes Meneses dos Santos

Coorientador(a): Dr. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Maceió-AL
2022

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

S586m Silva, Jéssica da Conceição da.

Metodologia analítica baseada em μ PAD para determinação simultânea do Hg(II) e Pb(II) em águas naturais do Rio São Francisco da cidade ribeirinha de Penedo / Jéssica da Conceição da Silva. – 2022.

92 f. : il. color.

Orientador: Diógenes Meneses dos Santos.

Coorientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 80-92.

1. Mercúrio. 2. Chumbo. 2. Dispositivos em papel. 4. Detecção colorimétrica. I. Título.

CDU: 543



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação da mestranda **JÉSSICA DA CONCEIÇÃO DA SILVA** intitulada: “**Metodologia analítica baseada em μ PAD para determinação simultânea do Hg(II) e Pb(II) em águas naturais do rio São Francisco da cidade de Penedo**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 31 de outubro de 2022, às 8h, por meio de videoconferência pelo *Google Meet*.

Maceió, 31 de outubro de 2022.

Comissão Examinadora:

Dr. PHABYANNO RODRIGUES LIMA, IFAL
Examinador Externo

Documento assinado digitalmente
gov.br PHABYANNO RODRIGUES LIMA
Data: 31/10/2022 11:49:31-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. VINICIUS DEL COLLE
Examinador Interno, UFAL

Documento assinado digitalmente
gov.br VINICIUS DEL COLLE
Data: 31/10/2022 12:15:26-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dra. JANAÍNA HEBERLE BORTOLUZZI, UFAL
Examinadora Interna

Documento assinado digitalmente
gov.br JANAÍNA HEBERLE BORTOLUZZI
Data: 01/11/2022 08:47:40-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dra. FABIANE CAXICO DE ABREU AGLDINO, UFAL
Orientadora

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO
Data: 02/11/2022 11:53:25-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. DIÓGENES MENESES DOS SANTOS, UFAL
Presidente

Documento assinado digitalmente
gov.br DIÓGENES MENESES DOS SANTOS
Data: 03/11/2022 11:29:56-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Confie no Senhor de todo o
coração e não se apoie na
sua própria inteligência.
Lembre de Deus em tudo o
que fizer, e ele lhe mostrará
o caminho certo.
(Provérbios 3:5,6)

AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata a Deus, meu amigo, conselheiro, meu pai que sempre esteve e está comigo, me ajudando a compreender os mínimos detalhes da química, além disso sou eternamente grata por direcionar e iluminar o meu caminho.

Agradecimento especial a minha amada mãe, Lucidalva da Conceição e ao meu pai, Luiz Alves da Silva, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo oferecidos durante toda a minha vida, especialmente na acadêmica. Sou grata a toda a minha família que de alguma forma me ensinavam algo.

A minha sogra Dona Edneusa, por muitas vezes cuidar do meu filho, por ser um apoio tão grande e fundamental para que eu conseguisse estudar e desenvolver a pesquisa.

Não poderia deixar de agradecer ao meu esposo, meu companheiro, meu amigo, meu confidente, meu eterno amor, muito obrigada por todo carinho, amor, paciência. Obrigada por me ouvir quando estava bem sobrecarregada, obrigada por sua dedicação em todas as horas, principalmente nos momentos mais difíceis. Te amo!

Sou grata ao meu filho por existir, por me fazer sorrir sempre, por ser minha força e motivação para continuar lutando pelos nossos sonhos, para continuar crescendo profissionalmente, te amo muito meu filho, essa conquista é por você, é por nós.

Ao professor Diógenes Meneses e a professora Fabiane Caxico, por assumirem esse trabalho com dedicação, por me instruírem, por compartilharem seus conhecimentos e experiências com paciência e compreensão. Muito Obrigado.

Aos meus amigos do laboratório(Leman) que de alguma forma me ajudaram em todo processo de pesquisa do mestrado. Especialmente Helena, Edla, Guimarães e Elvis. A minha parceira Dani, que esteve comigo cursando várias disciplinas, e que me agraciou com seus conhecimentos e suas experiências.

Muito obrigada a todos que me ajudaram em cada etapa do meu mestrado, obrigada por toda sua paciência, amor e atenção, obrigada a todos que sempre me incentivaram e torceram por mim.

RESUMO

Nos últimos anos, tem havido uma crescente preocupação ecológica e de saúde pública global associada à contaminação ambiental por metais potencialmente tóxicos, pois os íons metálicos, como Hg^{2+} e Pb^{2+} , entram nos ecossistemas como espécies químicas dissolvidas nos sistemas hídricos e se enquadram na categoria de carcinogênicos humanos, e poluentes não biodegradáveis, acarretando efeitos nocivos sobre a saúde, genética, nutrição e ecossistemas. Portanto, o desenvolvimento de dispositivo capaz de identificar e quantificar a concentração desses analitos é de suma importância. Dessa forma, neste trabalho, um dispositivo analítico baseado em papel de teste *in loco* para a determinação simultânea do Hg^{2+} e do Pb^{2+} , em amostras de águas naturais do Rio São Francisco da cidade ribeirinha de Penedo é apresentada. Os Microdispositivos analíticos baseados em papel (μPADs) foram associados a detecção colorimétrica, baseada na reação entre os analitos em questão e a sonda colorimétrica ditizona, gerando uma cor proporcional à concentração destes metais. Foi observado que o sistema se comporta melhor em $\text{pH} = 9,0$, com uma solução tampão de ácido bórico. Foi estudado nesse trabalho a influência dos canais de cor da escala RGB (Red (vermelho), Green (verde) e Blue (azul)), observou-se que para o método proposto neste trabalho o canal vermelho apresentou o melhor resultado para ambos os metais. Verificou-se a estabilidade da cor apresentada nos dispositivos, com uma variação de apenas 5% e 10% em um intervalo de tempo de 4h na presença do Hg^{2+} e do Pb^{2+} , respectivamente. Além disso, obteve-se baixa interferência dos metais potencialmente tóxicos (Na^+ , K^+ , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+}) que podem ser encontrados em amostras de água, o que indica boa seletividade, para ambos analitos. Dos quatro tipos de *layouts* abordados nesse trabalho o que se sobressaiu foi o dispositivo 04, pois, apresentou melhor resultado devido a sua largura, o tempo de secagem e volume dos reagentes. Na avaliação da linearidade, os valores do canal vermelho tiveram correlação superior a 0,989 para o mercúrio e 0,991 para o chumbo. O limite de detecção determinado foi de $\text{LOD} = 0,82 \mu\text{g/mL}$ e quantificação foi de $\text{LOQ} = 1,12 \mu\text{g/mL}$, com faixa linear de 1 – 20 $\mu\text{g/mL}$ para o mercúrio, e para o chumbo os valores encontrados foram de $\text{LOD} = 0,89 \mu\text{g/mL}$; $\text{LOQ} = 5,35 \mu\text{g/mL}$ e faixa linear de 5- 30 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, essa metodologia mostrou-se adequada para aplicação em amostras de águas naturais e é uma alternativa simples, barata e rápida para a determinação do Hg^{2+} e do Pb^{2+} .

Palavras-Chave: Dispositivos baseado em papel; Detecção colorimétrica; Chumbo; Mercúrio

ABSTRACT

In recent years, there has been a growing ecological and global public health concern associated with environmental contamination by potentially toxic metals, as metal ions such as Hg^{2+} and Pb^{2+} enter ecosystems as chemical species dissolved in water systems and fall into the category of human carcinogens, and non-biodegradable pollutants, resulting in harmful effects on health, genetics, nutrition and ecosystems. Therefore, the development of a device capable of identifying and quantifying the concentration of these analytes is of paramount importance. Thus, in this work, an analytical device based on in loco test paper for the simultaneous determination of Hg^{2+} and Pb^{2+} in samples of natural waters from the São Francisco River in the riverside town of Penedo is presented. Paper-based analytical microdevices (μPADs) were associated with colorimetric detection, based on the reaction between the analytes in question and the dithizone colorimetric probe, generating a color proportional to the concentration of these metals. It was observed that the system behaves better at $\text{pH}=9.0$, with a boric acid buffer solution. In this work, the influence of the color channels of the RGB scale (Red, Green and Blue) was studied, it was observed that for the method proposed in this work the red channel presented the best result for both metals. The stability of the color presented in the devices was verified, with a variation of only 5% and 10% in a time interval of 4h in the presence of Hg^{2+} and Pb^{2+} , respectively. In addition, low interference was obtained from potentially toxic metals (Na^+ , K^+ , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+}) that can be found in water samples, which indicates good selectivity for both analytes. Of the four types of layouts discussed in this work, the device 04 stood out, as it presented the best result due to its width, drying time and volume of reagents. In the evaluation of linearity, the values of the red channel had a correlation greater than 0.989 for mercury and 0.991 for lead. The detection limit determined was $\text{LOD}=0.82 \mu\text{g/mL}$ and quantification was $\text{LOQ}= 1.12 \mu\text{g/mL}$, with a linear range of 1 – 20 $\mu\text{g/mL}$ for mercury, and for lead the values found were of $\text{LOD}= 0.89 \mu\text{g/mL}$; $\text{LOQ}= 5.35 \mu\text{g/mL}$ and linear range of 5 - 30 $\mu\text{g/mL}$. Therefore, this methodology proved to be suitable for application in natural water samples. It is a simple, cheap and fast alternative for the determination of Hg^{2+} and Pb^{2+} .

Keywords: Paper-based devices; Colorimetric detection; Lead; Mercury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração do primeiro microsistema para cromatografia em fase gasosa fabricado em substrato de silício, com diâmetro de 5 cm, na Universidade de Stanford, no fim da década de 70.	26
Figura 2: Ilustração esquemática do dispositivo com amplificação isotérmica mediada por loop de acionamento passivo.	27
Figura 3: Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico.	29
Figura 4: Microdispositivos analíticos a base de papel (μ PADs) para determinação de proteínas (BSA-albumina do soro bovino) e glucose.	31
Figura 5: Estrutura linear da celulose.	33
Figura 6: A estrutura dos complexos de ditizona com Hg^{2+} e Pb^{2+} , onde M representa os metais.	38
Figura 7: Esquema do processo de fabricação dos dispositivos de papel.	43
Figura 8: <i>Layouts</i> dos dispositivos 01,02,03 e 04 com o volume da ditizona na área principal de 20,0; 40,0; 40,0 e 20,0 μ L, respetivamente. (A1 e A2 = Áreas de deteção; B= Área principal; D= Controle).....	44
Figura 9: Esquema das etapas de tratamtno de dados e interface do software corel photo-paint (2020) com sua ferramenta de histograma.	45
Figura 10: Reação de formação de complexo de ditizona com Hg^{2+}	47
Figura 11: Reação de formação de complexo de ditizona com Pb^{2+}	47
Figura 12: μ PAD na presença de Ditizona dissolvida em CCl_4 (A) e μ PAD na presença de ditizona dissolvida em CCl_4 e extraída com a solução de NaOH (B).	52
Figura 13: Estudo da variação de concentração do Hg^{2+} em solução tampão de ácido bórico (0,12 mol/L), pH = 9, na presença da solução de ditizona- CCl_4 (10 g/L), por meio das cores R, G, B e RGB.	54
Figura 14: Representação do espaço de cores do Modelo RGB e para efeito de ilustração, a apresentação das faces contendo as possíveis cores existentes. As cores primárias vermelho, verde e azul, formam o sistema de coordenadas. O vermelho "puro" Cor, verde, azul, ciano, magenta e amarelo estão nos vértices do cubo de cores. Todos os tons de cinza, dos quais C é um exemplo, situam-se na diagonal entre Preto e branco.	55
Figura 15: Gráfico com os resultados obtidos para o teste de variação da cor ao longo do tempo na presença do Hg^{2+} com concentração de 100 μ g/mL em solução tampão de ácido bórico, pH = 9,0. Analisado no canal vermelho (R).	57
Figura 16: Gráfico com os resultados referentes à avaliação da influência de CTAB na determinação de íons de Hg^{2+} , utilizando ditizona como sonda colorimétrica. Analisada no	

canal vermelho (R). (A) Mercúrio e ditizona ;(B) Mercúrio +ditizona+CTAB (12mM); (C) Mercúrio +ditizona+CTAB (6 mM). 58

Figura 17: Resultados obtidos para a avaliação de possíveis interferentes ao método proposto na ausência e na presença do mercúrio. 60

Figura 18: Curva analítica otimizada para a determinação do Hg^{2+} de acordo com o método proposto. Inset: Foto do dispositivo utilizado para a construção da curva analítica. 61

Figura 19: Estudo da variação de concentração do Pb^{2+} em solução tampão de ácido bórico (0,12 mol/L), pH=9,0, na presença da solução de ditizona- CCl_4 (10 g/L), por meio das cores R,G,B e RGB. 63

Figura 20: Gráfico com os resultados obtidos para o teste de variação da cor ao longo do tempo na presença do Pb^{2+} com concentração de 100 $\mu g/mL$ em solução tampão de ácido bórico, pH = 9,0. Analisado no canal vermelho (R). 65

Figura 21: Gráfico com os resultados referentes à avaliação da influência de CTAB na determinação de íons de Pb^{2+} , utilizando ditizona como sonda colorimétrica. Analisada no canal vermelho (R). (A) Chumbo e ditizona ;(B) Chumbo+ditizona+CTAB (12mM); (C) Chumbo+ditizona+CTAB (6 mM). 66

Figura 22: Resultados obtidos para a avaliação de possíveis interferentes ao método proposto na ausência e na presença do Chumbo. 68

Figura 23: Curva analítica otimizada para a determinação do Pb^{2+} de acordo com o método proposto. Inset: Foto do dispositivo utilizado para a construção da curva analítica. 69

Figura 24: *Layouts* dos dispositivos 01,02,03 e 04 com o volume da ditizona na área principal de 20,0; 40,0; 40,0 e 20,0 μL , respectivamente. (A1 e A2 = Áreas de detecção; B= Área do agente colorimétrico). 71

Figura 25: Gráfico da média de pixels por concentração de Hg^{2+} para os dispositivos (DP) 01, 02, 03 e 04. (pH= 9,0; Tampão ácido bórico (120 mM); CTAB (12 mM); Canal vermelho). Inset: Foto dos dispositivos utilizados para a construção da curva analítica. 72

Figura 26: Gráfico da média de pixels por concentração de Pb^{2+} para os dispositivos 01, 02, 03 e 04. (pH= 9,0; Tampão ácido bórico (0,12 mol/L); CTAB ($6,0 \times 10^{-3}$ mol/L); Canal vermelho). Inset: Foto dos dispositivos utilizados para a construção da curva analítica. 73

Figura 27: Análise termogravimétrica do Hg^{2+} , da DT(ditizona) e do complexo formado entre Hg^{2+} + DT. 75

Figura 28: Análise termogravimétrica do Pb^{2+} , da DT(ditizona) e do complexo formado entre Pb^{2+} + DT. 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos tóxicos de alguns metais pesados na saúde humana.	18
Tabela 2: Relação de trabalhos presentes na literatura que propõem a determinação de metais pesados em diferentes matrizes.	23
Tabela 3: Reagentes utilizados durante o processo de construção dos dispositivos a base de papel.	41
Tabela 4: Dimensões dos dispositivos 01;02;03 e 04.....	44
Tabela 5: Concentração das soluções de Hg^{2+} e Pb^{2+}	46
Tabela 6: Comparação entre os coeficientes de determinação(R^2), coeficientes de correlação de Pearson (R) e inclinação da reta (α) para os canais de cor RGB, R, G e B na presença do Hg^{2+}	54
Tabela 7: Comparação entre os coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de correlação de Pearson (R) e inclinação da reta (α), para avaliação da influência do CTAB na determinação de íons de Hg^{2+}	58
Tabela 8: Espécies avaliadas como possíveis interferentes ao método proposto na ausência e na presença do Hg^{2+}	60
Tabela 9: Resultados obtidos no teste de recuperação utilizando a metodologia proposta para a determinação do mercúrio em amostra de águas naturais do Rio São Francisco da cidade ribeirinha de Penedo.	62
Tabela 10: Comparação entre os coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de correlação de Pearson(R) e inclinação da reta (α) para os canais de cor RGB, R, G e B na presença do Pb^{2+}	63
Tabela 11: Comparação entre os coeficientes de determinação(R^2), coeficientes de correlação de Pearson(R) e inclinação da reta (α), para avaliação da influência do CTAB na determinação de íons de Pb^{2+}	66
Tabela 12: Espécies avaliadas como possíveis interferentes ao método proposto na ausência e na presença do Pb^{2+}	68
Tabela 13: Resultados obtidos no teste de recuperação utilizando a metodologia proposta para a determinação do Chumbo em amostra de águas naturais do Rio São Francisco da cidade ribeirinha de Penedo.	70
Tabela 14: Comparação entre os coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de correlação de Pearson (R) e inclinação da reta (α) para os dispositivos com o Hg^{2+}	72
Tabela 15: Comparação entre os coeficientes de determinação(R^2), coeficientes de correlação de Pearson (R) e inclinação da reta (α) para os dispositivos com o Pb^{2+}	73

Tabela 16: Estágios de perda de massa do Hg^{2+} , da DT(ditizona) e do complexo formado entre $\text{Hg}^{2+} + \text{DT}$ 75

Tabela 17: Estágios de perda de massa do Pb^{2+} , da DT(ditizona) e do complexo formado entre $\text{Pb}^{2+} + \text{DT}$ 77

LISTA DE ABREVIATURAS

μ PADs	Microdispositivos analíticos baseados em papel (<i>micro paper-based analytical device</i>)
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DT	Ditizona
CCL ₄	Tetracloroeto de carbono
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio(do inglês - <i>Hexadecyltrimethylammonium bromide</i>)
RGB	Red, Green, Blue (vermelho, verde, azul)
CMYK	Cyan, Magenta, Yellow, Black (ciano, magenta, amarelo e preto)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de quantificação
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês- <i>Thermogravimetric analysis</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	15
2.1	Rio São Francisco da Cidade Ribeirinha de Penedo	15
2.2	Metais pesados	17
2.2.1	Impacto e toxicidade do Mercúrio	19
2.2.2	Impacto e toxicidade do chumbo	20
2.2.3	Metodologias de detecção de metais pesados	21
2.3	Miniaturização em química analítica	24
2.3.1	Dispositivos microfluídicos	28
2.3.2	Sensores químicos	28
2.3.3	Microdispositivos analíticos baseado em papel: Sensores colorimétricos	30
2.3.4	Características do papel	32
2.3.5	Métodos de Detecção	34
2.3.6	Detecção colorimétrica	35
2.3.7	Agente colorimétrico- Ditizona (DT)	37
2.3.8	Agente tensoativo- brometo de cetiltrimetilamônio (Hexadecyltrimethylammonium bromide – CTAB)	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos	40
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	41
4.1	Materiais e reagentes	41
4.2	Fabricação dos dispositivos baseados em papel	42
4.3	Tratamento de dados	45
4.4	Procedimento para determinação do Hg²⁺ e do Pb²⁺	46
4.4.1	Teste de estabilidade da cor	48
4.4.2	Avaliação da influência do CTAB	48
4.4.3	Ensaio de interferentes	48
4.4.4	Figuras de mérito	49
4.4.5	Ensaio de recuperação com amostra de água	50
4.4.6	Análise termogravimétrica	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
5.1	Extração e aplicação da Ditizona	52
5.2	Avaliação da Concentração do Hg²⁺	53
5.3	Teste de estabilidade de cor para o Hg²⁺	56
5.4	Avaliação da influência do CTAB com o Hg²⁺	57
5.5	Ensaio de interferentes	59
5.6	Figuras de mérito e curva analítica para o Hg²⁺	60
5.7	Ensaio de recuperação com o Hg²⁺	61
5.8	Avaliação da Concentração do Pb²⁺	62
5.9	Teste de estabilidade de cor para Pb²⁺	64
5.10	Avaliação da influência do CTAB com o Pb²⁺	65
5.11	Ensaio de Interferentes	67

5.12	Figuras de mérito e curva analítica para o Pb^{2+}	68
5.13	Ensaio de recuperação com o Pb^{2+}	69
5.14	Avaliação do <i>layout</i> dos dispositivos	70
5.15	Análise Termogravimétrica	74
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
7	PERSPECTIVAS.....	79
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1 INTRODUÇÃO

A água é essencial na evolução e na preservação de todas as formas de vida na biosfera terrestre. A utilização irracional dos recursos naturais passou a ser uma preocupação de ordem mundial. A água é uma fonte de vida única, escassa e sustenta o equilíbrio dos ecossistemas. Sendo assim, o estudo da qualidade da água é de suma importância, tanto para apresentar as consequências de uma determinada atividade poluidora, quanto para se estabelecer os meios para que se satisfaça determinado uso da água.

Neste contexto, o uso da água deve ser realizado com consciência e discernimento, de forma a garantir a sua utilização pelas atuais e futuras gerações, pois os rios são fortemente poluídos por resíduos industriais, resíduos de lixo, por agrotóxicos e lançamento de esgoto doméstico sem tratamento, interferindo na qualidade e quantidade de suas águas. Dessa forma, a poluição ambiental é um dos principais problemas que contribui para que se chegue a uma situação de esgotamento ou de deterioração de rios, lagos e mares.

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

Dentre todas as contaminações da água, os íons de metais pesados, como Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Hg^{2+} têm alta toxicidade e não são biodegradáveis, podendo causar graves problemas de saúde em animais e seres humanos, como câncer, disfunção hepática, distúrbios nos sistemas endócrino e nervoso, dentre outros problemas (RUCHI D. S. *et al.*, 2021; LARBI O. *et al.*, 2019). Tais metais apresentam várias características físicas e químicas, o que lhes proporcionou um largo emprego na indústria moderna, como matéria-prima de vários produtos. São geralmente usados para confeccionar ligas metálicas e outros materiais. Nestes compostos os metais geralmente possuem configuração eletrônica reduzida

(número de oxidação baixo), situação em que são facilmente corrosíveis, gerando cátions que formam compostos de coordenação altamente solúveis em água e facilmente absorvidos por organismos vivos (MUSE, J. O. *et al.*, 2006).

Nesse contexto, muitas cidades ribeirinhas fazem o uso da água do rio para consumo doméstico, lazer e pesca de subsistência, sendo assim, ver-se a importância de um monitoramento periódica da concentração de espécies químicas, segundo a Resolução n.º 357 de 17 de março de 2005 do CONAMA, as quais podem estar presentes nas águas do referido rio em níveis de concentração superior ao permitido pela legislação brasileira vigente. Dessa forma, esse trabalho tem como foco contribuir para o desenvolvimento de metodologia analítica para determinação simultânea do Mercúrio (Hg^{2+}) e do Chumbo (Pb^{2+}), em águas naturais do Rio São Francisco na cidade ribeirinha de Penedo, com a utilização de um microdispositivo analítico baseado em papel (μ PAD, do inglês *micro paper-based analytical device*) com detecção colorimétrica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Rio São Francisco da Cidade Ribeirinha de Penedo

Considerado um dos mais importantes cursos d'água do Brasil e da América Latina, o rio São Francisco foi descoberto em 04 de outubro de 1501, por Américo Vespúcio, era chamado Opará – rio Mar – pelos índios que habitavam suas margens, e recebera este nome em homenagem ao dia de São Francisco de Assis. É também conhecido por “Velho Chico” e “rio da integração nacional” por ter sua bacia ocupando unicamente o território nacional brasileiro conforme afirmam a Companhia de Saneamento de Sergipe (DESO) e o Comitê da Bacia Hidrográfica do São Francisco (CBHSF, 2016).

A bacia hidrográfica do rio São Francisco tem grande importância para o país não apenas pelo volume de água transportado em uma região semiárida, mas, também, pelo potencial hídrico passível de aproveitamento e por sua contribuição histórica e econômica para a região (CASTRO e PEREIRA, 2017). A Bacia Hidrográfica do rio São Francisco abrange 639.219 km² de área de drenagem (7,5% do país) e vazão média de 2.850 m³ /s (2% do total do país). O rio São Francisco tem 2.700 km de extensão e nasce na Serra da Canastra

em Minas Gerais, escoando no sentido sul-norte pela Bahia e Pernambuco, quando altera seu curso para este, chegando ao Oceano Atlântico através da divisa entre Alagoas e Sergipe. A Bacia está presente em sete unidades da federação, sendo, 48,2% na Bahia, 36,8% em Minas Gerais, 10,9% em Pernambuco, 2,2 % Alagoas, 1,2 % em Sergipe, 0,5% Goiás e 0,2 % no Distrito Federal (RIBEIRO A.; ALMEIDA R.N., 2019; CBHSF,2020).

Devido à sua extensão e aos diferentes ambientes, divide-se em quatro regiões fisiográficas: Alto, Médio, Submédio e Baixo São Francisco. O Baixo São Francisco (BSF) que se inicia na cidade de Paulo Afonso (BA) e termina na foz no Oceano Atlântico, perpassa por diferentes lugares, como, Feliz Deserto, Pacatuba, Penedo, Piaçabuçu, Santana do Ipanema e Major Isidoro. Penedo é um município brasileiro do estado de Alagoas localizado ao sul do estado, é uma cidade ribeirinha às margens do rio São Francisco. Reproduz a mesma realidade das demais regiões do rio, no que diz respeito à dependência das comunidades, e assim como em toda a sua extensão, o velho Chico mantém-se como importante recurso provedor do desenvolvimento e subsistência, pois possui valor econômica, cultural e social, especialmente para as regiões Nordeste e Sudeste.

O surgimento e desenvolvimento socioeconômico de grande parte das cidades que margeiam o rio São Francisco deram-se pela existência deste recurso hídrico. O progresso oriundo da exploração do rio possibilitou o crescimento das cidades ribeirinhas em todos os aspectos, por consequência, quando explorado de forma descontrolada e pouco sustentável pode acarretar em graves problemas ambientais, como degradação do solo, assoreamento dos leitos dos rios, poluição e escassez hídrica (AGUIAR NETTO *et al.*, 2011; TALLMAN E BENECTIDO, 2018), além de conviver com os impactos causados por fatores naturais e pela ação antrópica, como, desmatamento da vegetação ciliar; barramento do curso natural do rio para exploração energética; transposição de suas águas; desaparecimento de afluentes importantes descarte de resíduos sólidos e despejo de esgotos domiciliares e industriais sem tratamento, dentre outros.

Devido a estes fatores é crescente a preocupação com a disponibilidade dos recursos hídricos em quantidade e qualidade compatíveis com seus usos, principalmente com o abastecimento público. A contaminação hídrica do Rio São Francisco da cidade ribeirinha de Penedo é um desafio que envolve relações complexas devido às múltiplas fontes de poluição (RODRIGUES *et al.*, 2004; LIMA *et al.*,2018). No entanto, este rio, assim como muitos

outros são suscetíveis a contaminações de espécies químicas nocivas a saúde humana. Nesse sentido, a região exige um monitoramento contínuo da qualidade da água e do manuseio do ecossistema fluvial, sendo de fundamental importância a apresentação de metodologias para determinação e quantificação de possíveis espécies contaminantes, como metais potencialmente tóxicos.

2.2 Metais pesados

Os metais pesados são definidos como elementos metálicos que possuem uma densidade relativamente alta em comparação com a água. Em geral, todos os metais, com densidade igual ou superior a 5 e número atômico superior a 11 e que constituam risco para o meio ambiente e/ou para o homem, são considerados metais pesados (TCHOUNWOU *et al.*, 2012). Os limites de concentração tolerados, de acordo com a resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005 o valor máximo dos padrões de qualidade de água para os metais potencialmente pesados varia de $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-1}$ mg/L. Sendo $1,0 \times 10^{-2}$ mg/L e $2,0 \times 10^{-4}$ mg/L os valores máximos para o chumbo total e mercúrio total, respectivamente.

Determinados elementos metálicos podem apresentar toxicidade elevada para muitas formas de vida, enquanto outros são considerados essenciais, como por exemplo, cádmio, cromo, cobre, chumbo, mercúrio, níquel e zinco (inferiores a cerca de 0,01 mg/L). No entanto, a partir de determinadas concentrações, pois em concentrações elevadas e dependendo do tipo do metal, podem trazer graves prejuízos à comunidade aquática, às pessoas e animais que se utilizam de águas contaminadas (ZHANG, W. *et al.*, 2016; LUO, X. *et al.*, 2016; RASEL D. C. D. V. *et al.*, 2017; SALL, M. L. *et al.*, 2020). As fontes desses íons metálicos tóxicos são principalmente de mineração, efluentes de resíduos industriais, estações de tratamento de águas residuais municipais, refinarias de petróleo e dentre outros (M. THIRUMALAI *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, tem havido uma crescente preocupação ecológica e de saúde pública global associada à contaminação ambiental por esses metais, pois os íons metálicos, entram nos ecossistemas como entidades dissolvidas nos sistemas hídricos e se enquadram na categoria de carcinogênicos humanos, e poluentes não biodegradáveis, além disso, entram

no sistema biológico principalmente através da cadeia alimentar (IMRAN A., ZEID A. AL-O., ABDULRAHMAN AL-W , 2016; KUMAR M *et al.* , 2017; IMRAN A., *et al.*, 2017).

A exposição a metais potencialmente tóxicos pode causar várias doenças humanas graves, como problemas respiratórios, patologia renal, distúrbios neurológicos e câncer. Relacionado à toxicologia, os metais pesados podem provocar doenças respiratórias, em contato direto com a pele podem causar ulcerações e perfuração do septo nasal, pode também afetar o sistema imunológico nos humanos, além disso, a maioria dos metais pesados irritam os olhos, a pele e as mucosas. (ARSHAD, M. N. *et al.*, 2017; EL-SHISHTAWY, R. *et al.*, 2018; KHAN, A. *et al.*, 2018; AWUAL, M. R. *et al.*, 2018).

Tabela 1: Efeitos tóxicos de alguns metais pesados na saúde humana.

Metal pesado	Toxicidade	Referências
Mercúrio (II)	Distúrbios do sistema nervoso (memória, funções sensoriais, coordenação).	COUNTER, S. A.; BUCHANAN, L. H, 2004; RALSTON, N. V.C.; RAYMOND, L. J, 2018.
Cromo (VI)	Doenças de pele, anemia, câncer.	CHIU <i>et al.</i> ,2010; AHMAD <i>et al.</i> , 2012.
Chumbo (II)	Distúrbios do sistema nervoso, distúrbios hepáticos e renais, diminuição da fertilidade.	APOSTOLI <i>et al.</i> , 2000; AHAMED <i>et al.</i> ,2008.
Cádmio (II)	Distúrbios respiratórios, doenças renais.	WAISBERG <i>et al.</i> , 2003; OTHUMPAMGAT <i>et al.</i> , 2005.
Níquel (II)	Doenças respiratórias, asma, mal formações congênitas, câncer.	COOGAN <i>et al.</i> ,2008; DAS <i>et al.</i> , 2018.

Fonte: Autora, 2022.

Na Tabela 1 é possível identificar vários problemas de saúde humana que podem ser causados por metais pesados potencialmente tóxicos. Nas seções a seguir, será apresentado um estudo específico sobre o impacto e a toxicidade no meio ambiente e na saúde humana do mercúrio e do chumbo.

2.2.1 Impacto e toxidade do Mercúrio

O mercúrio é um metal pesado pertencente à série de elementos de transição da Tabela periódica. É o único que existe ou é encontrado na natureza em três formas (elementar, inorgânica e orgânica), cada uma com seu próprio perfil de toxicidade (CLARKSON T.W., MAGOS L., MYERS G.J, 2003). À temperatura ambiente, o mercúrio elementar existe como um líquido que tem alta pressão de vapor e é liberado no meio ambiente como vapor de mercúrio. O mercúrio também existe como um cátion com estados de oxidação de +1 (mercuroso) ou +2 (mercúrico) (GUZZI G, LA PORTA C.A.M, 2008 TCHOUNWOU, P. B. *et al.*, 2012).

Tanto os seres humanos quanto os animais estão expostos a várias formas químicas de mercúrio no meio ambiente. Na forma inorgânica pode ser encontrado sob três diferentes estados de oxidação: o Hg elementar (Hg^0), o qual se encontra principalmente na forma de gás, o íon mercuroso (Hg_2^{2+}), forma pouco estável em sistemas naturais, e o íon mercúrico (Hg^{2+}) e na forma orgânica, o íon mercúrico apresenta-se ligado covalentemente a um radical orgânico, sendo o metilmercúrio (CH_3Hg^+) e o dimetilmercúrio ($(CH_3)_2Hg$) os mais comuns, ou ainda com ligantes orgânicos naturais. Como o mercúrio é pode ser encontrado no meio ambiente, humanos, plantas e animais são incapazes de evitar a exposição a alguma forma de mercúrio (TCHOUNWOU P.B. *et al.*, 2003; DOPP E. *et al.*, 2004).

O mercúrio é um metal extremamente tóxico, cuja exposição direta, mesmo em doses pequenas e por um longo período de tempo, pode causar uma ampla gama de efeitos adversos à saúde. Quando na forma de vapor, ele é facilmente absorvido pelo sistema respiratório e solubilizado no sangue, sendo transportado até aos rins e cérebro. Apresenta efeito citotóxico no sistema nervosa central e nas células tronco, resultando em danos aos pulmões, náuseas, vômitos, diarreia, alterações na frequência cardíaca, erupções cutâneas, além de irritação nos olhos. Pode acarretar também em transtornos psicológicos, como

irritabilidade, perda de memória, além de outros problemas físicos, como alterações na visão ou na audição e espasmos (MARTIN; GRISWOLD, 2009; SALL, M. L. *et al.*, 2020;).

O mercúrio pode inibir o crescimento de organismos unicelulares (algas, bactérias e fungos) e de peixes, como a truta arco-íris, produzindo um excesso de mortalidade embrionária e larval. Em mulheres grávidas, pode facilmente atravessar a placenta e atingir o feto. Após o nascimento, o risco persiste, pois o leite materno humano também está contaminado. Sob esta forma, o mercúrio é muito neurotóxico e pode se bioacumular, especialmente em crianças. Mesmo em baixas concentrações, tem efeito citotóxico nas células-tronco do sistema nervoso central (TAN *et al.*, 2009; XUN *et al.*, 2017).

2.2.2 Impacto e toxicidade do chumbo

O chumbo é um metal cinza-azulado de ocorrência natural presente em pequenas quantidades na crosta terrestre. Embora o chumbo ocorra naturalmente no meio ambiente, atividades antrópicas como queima de combustíveis fósseis, mineração e manufatura contribuem para a liberação de altas concentrações. O chumbo tem muitas aplicações industriais, agrícolas e domésticas, por exemplo, atualmente é utilizado na produção de baterias de chumbo-ácido, munições, produtos metálicos (soldas e tubos) e dispositivos para blindagem de raios X, além disso, nos últimos anos, o uso industrial de chumbo foi reduzido significativamente a partir de tintas e produtos cerâmicos, calafetagem e solda de tubos (TCHOUNWOU, P. B. *et al.*, 2012).

O chumbo é um dos metais pesados potencialmente tóxicos, que trás uma série de problemas para a sociedade, pois, sua toxicidade a longo prazo é comumente conhecida como envenenamento por chumbo. Pode ter sérios efeitos nos sistemas nervoso, hematopoiético e cardiovascular humano. Em altas doses, o chumbo pode causar distúrbios neurológicos, hematológicos e renais. Em crianças, também pode produzir distúrbios do desenvolvimento cerebral, com distúrbios psicológicos e dificuldades de aprendizagem. A intoxicação por chumbo resulta em diminuição da fertilidade, morte de fetos e aborto espontâneo, e distúrbios neurológicos, cardiovasculares e gastrointestinais e também pode ter efeitos mutagênicos e carcinogênicos (AHAMED *et al.*, 2008; MARTIN, GRISWOLD, 2009; WANI *et al.*, 2015).

2.2.3 Metodologias de detecção de metais pesados

Sabe-se que é extremamente importante enquadrar especificações regulatórias rigorosas na prevenção da exposição humana aos metais pesados supracitados. Devido aos efeitos adversos desses compostos na saúde humana e no meio ambiente, a determinação de metais pesados tem atraído considerável atenção nos últimos anos (ARSHAD, M. N. *et al.*, 2017; EL-SHISHTAWY, R. *et al.*, 2018; KHAN, A. *et al.*, 2018; AWUAL, M. R. *et al.*, 2018).

Metodologias baseadas em técnicas cromatográficas são reportados na literatura para determinação de metais pesados, como por exemplo, Thirumalai e colaboradores (2018) desenvolveram uma metodologia de análise para metais pesados tóxicos, Pb^{2+} , Hg^{2+} e Cd^{2+} , utilizando um novo método de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) para a separação rápida, seletiva e sequencial destes íons. Para melhorar a sensibilidade deste método de RP-HPLC, os autores modificaram a superfície de uma coluna monolítica, utilizando C18 (Chromolith RP-18e, $100 \times 4,6$ mm) um ligante orgânico anfifílico (sintetizado em laboratório), 1,5-dioctanoil-1,5-difenilcarbazida (DODPC), o qual, atuava como receptor íon-seletivo, para a separação dos analitos alvo. Os parâmetros cromatográficos como linearidade, precisão, recuperação, limites de detecção e quantificação foram validados para alcançar resultados analíticos superiores. A influência de vários parâmetros analíticos como natureza da fase móvel e sua concentração, pH da solução, vazão, reagente pós-coluna e sua concentração foram estudados e otimizados.

Espectrofotometria UV/Vis também pode ser utilizada na determinação de metais pesados. Isquibola e Rodrigues (2021) desenvolveram uma metodologia baseada na determinação e a quantificação desses metais em pilhas do tipo comum que já foram utilizadas e estavam próprias para o descarte, utilizando a técnica de espectrofotometria UV/Vis, onde os analitos foram associados a reagentes cromóforos, como por exemplo a difenilcarbazona, que produz complexos [M-Ligante] que absorvem comprimentos de onda específicos de fácil detecção. A metodologia proposta apresentou eficácia na determinação, e as concentrações encontradas se apresentaram inferiores às permitidas, demonstrando uma adequação por parte dos fabricantes.

Fernandes e colaboradores (2007) desenvolveram uma metodologia para avaliar a presença dos metais pesados Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn por espectrofotometria de emissão de plasma, em solos agrícolas, água de irrigação e alguns vegetais, provenientes de áreas olerícolas do estado de Minas Gerais. As amostras foram submetidas a digestão ácida e os teores de metais pesados determinados em um espectrofotômetro de emissão de plasma. A maior parte das amostras de solo apresentaram baixos teores totais de metais pesados não indicando acumulação desses elementos. De maneira geral, os pesquisadores observaram que os dados indicaram que as amostras de solo, água e vegetais analisadas não estão contaminadas por metais pesados.

Abordagens com a utilização de detecção fluorométrica também são relatadas na literatura. Yahyazadeh e Shemirani (2019) desenvolveram uma metodologia utilizando pontos de carbono facilmente sintetizados para determinação de mercúrio (II) em amostras de água, com um método térmico simples para sintetizar os pontos de carbono a partir de precursores de ácido cítrico e glicina. Os pesquisadores verificaram que os íons Hg^{2+} podem extinguir seletivamente a emissão de fluorescência desses pontos de carbono. Posteriormente, projetaram e otimizaram um sensor para a determinação de íons Hg^{2+} . O limite de detecção e quantificação do sensor encontrado foi de 38 e 112 ppb, respectivamente. O sensor mostrou boa seletividade para íons Hg^{2+} e foi utilizado com sucesso para a determinação de íons Hg^{2+} em amostras de água mineral.

A Tabela 2 abaixo elenca algumas abordagens presentes na literatura para detecção de metais pesados. Em geral, as técnicas supracitadas apresentam vantagens na detecção e determinação destas substâncias, pois são adequadamente sensíveis, específicas e precisas. No entanto, todos eles exigem equipamentos caros e volumosos, pessoal treinado e operação trabalhosa. Portanto, os pesquisadores têm se esforçado para desenvolver dispositivos de detecção baratos, simples, sensíveis, específicos, precisos, fáceis de usar e ecológicos, e o μ PAD é uma das soluções mais promissoras.

Tabela 2: Relação de trabalhos presentes na literatura que propõem a determinação de metais pesados em diferentes matrizes.

<i>Detecção</i>	<i>Amostra</i>	<i>Analito</i>	<i>Faixa linear</i>	<i>LOD</i>	<i>Referências</i>
<i>Espectrometria de absorção atômica com chama e forno de grafite</i>	Peixes búlgaros	Cd, As, Hg, Pb, Zn e Cu	Cu, Zn, Pb, Hg e As (1,40 ; 11; 0,08 ; 0,12; 1,10 mg/ kg w.w, respectivamente.)	Não informado	MAKEDONSK I, L. <i>et al.</i> , 2017.
<i>Espectroscopia de plasma</i>	Solo	Cr, Pb e Hg	Não informado	Cr, Pb e Hg (0,8, 15 e 0,7 mg/kg, respectivamente)	KHUMAENI, A. <i>et al.</i> , 2017.
<i>Eletroquimioluminescência</i>	Fitas de DNA	Pb ²⁺ e Hg ²⁺	Não informado	10 pM and 0.2 nM	ZHANG, M. <i>et al.</i> , 2013.
<i>Cromatografia</i>	Água potável	Cr(III) e Cr(VI)	0,125 e 4 µg/mL (r ² = 0,9926) e 0,1 e 3,0 µg/mL (r ² = 0,9983), respectivamente	0,15 µg/mL e 0,07 µg/mL, respectivamente	UMESH <i>et al.</i> , 2015.
<i>Eletroquímica</i>	Água de torneira	Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , Cu ²⁺ e Hg ²⁺	0,1 a 4,5 µmol /L	7,7 (Cd ²⁺), 3,0 (Pb ²⁺), 4,7 (Cu ²⁺) e 9,6 (Hg ²⁺) nmol/L	SILVA, 2019.
<i>Cromatografia</i>	Água	Pb ²⁺ , Hg ²⁺ e Cd ²⁺	0,05-50,0 g/mL	0,075 g/L - Pb ²⁺ , 0,090 g/L - Cd ²⁺ 0,120 g/L - Hg ²⁺	Thirumalai <i>et al.</i> , 2018.
<i>Espectrofotometria UV/Vis</i>	Pilhas	Pb ²⁺ e Hg ²⁺	Não informado	Hg ²⁺ - 0,5941 mg/L Pb ²⁺ - 153,1 mg/L	Isquibola e Rodrigues, 2021.
<i>Espectros de fluorescência</i>	Água mineral	Hg ²⁺	0,12–2,0 ppm	38 ppb	Yahyazadeh e Shemirani, 2019.

Fonte: Autora, 2022.

Adicionalmente, a averiguação dessas espécies em diferentes matrizes apresenta elevada relevância, sendo essencial o desenvolvimento de metodologias analíticas eficazes, sensíveis, reproduzíveis, robustas, repetitivas e confiáveis. Neste sentido, a utilização de metodologias com μ PAD configura uma alternativa viável e de baixo custo, quando comparadas a outras técnicas, que apresenta vantagens como a diminuição do consumo de reagentes, tempos de análises mais curtos, portabilidade, automação, possibilidade de integração de várias etapas de um procedimento analítico e utilização de diferentes sistemas de detecção. (HENRY, 2006; POL *et al.*, 2017; FIRDAUS *et al.*, 2019; ZHANG H.; YANG F-Q, 2021).

2.3 Miniaturização em química analítica

A comunidade científica tem observado, nas últimas décadas, o surgimento, o crescimento e a consolidação de uma nova tendência mundial: a miniaturização. Em diferentes ramificações da ciência é comum, e cada vez mais necessário, o uso de dispositivos miniaturizados. Na Química Analítica não é diferente, e o uso de sistemas miniaturizados é uma realidade em âmbito mundial, devido ao desenvolvimento destes sistemas analíticos (VAN DEN BRINK *et al.*, 2015; AHRBERG *et al.*, 2016; LIN P. H.; LI B.R., 2021).

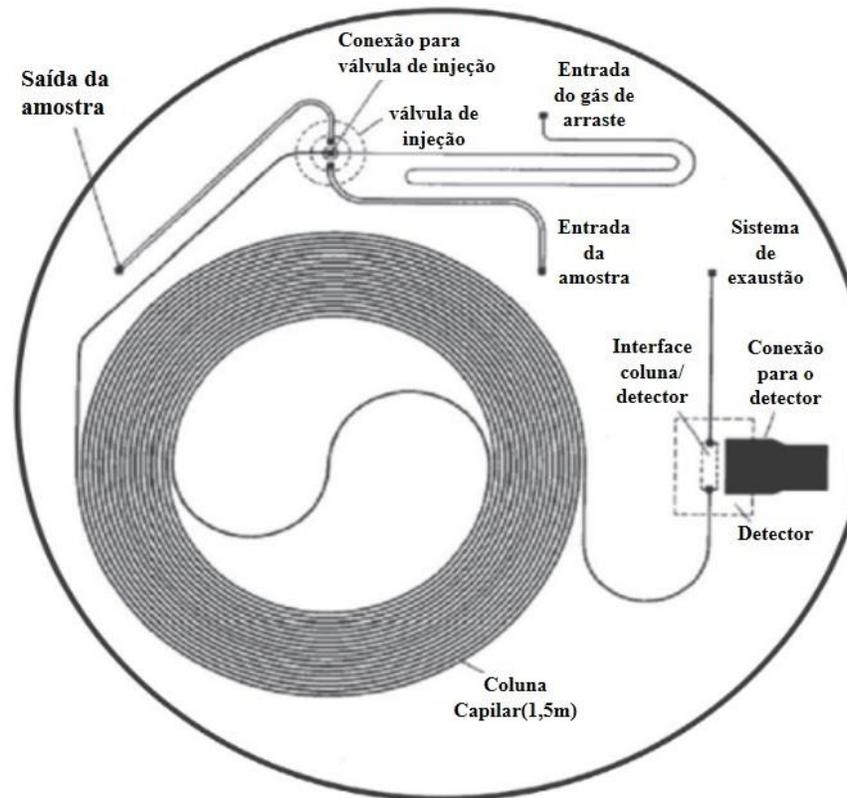
A miniaturização de dispositivos eletrônicos, a partir da década de 60, provocou uma verdadeira revolução na eletrônica e na informática. O rápido desenvolvimento de sistemas miniaturizados, nos mais diferentes campos de pesquisas, tem dominado o progresso da tecnologia moderna. Atualmente, a miniaturização de rádio, televisão, gravador, telefone, discos rígidos e microcomputadores é algo comum e presente no cotidiano do ser humano. Da mesma forma que os microchips eletrônicos revolucionaram o universo dos computadores e da eletrônica, os microchips analíticos têm revolucionado a química analítica nos últimos anos. (DITTRICH; TACHIKAWA ; MANZ, 2006 ; COLTRO *et al.*, 2007; HUSSAIN, 2019 ; SILVA, 2022)

O primeiro dispositivo analítico miniaturizado foi um sistema de cromatografia em fase gasosa, apresentado na década de 70. O micro-cromatógrafo foi construído em lâmina circular de silício com diâmetro de 5 cm. Neste substrato, foi construída uma válvula de injeção e uma coluna de separação de 1,5 m de comprimento. Um detector de condutividade

térmica foi fabricado em um outro substrato, sendo posteriormente prensado mecanicamente para integrá-lo ao substrato contendo a coluna de separação (TERRY; HERMAN; ANGELL, 1979; COLTRO *et al.*, 2007). A Figura 1 apresenta uma imagem desse primeiro microdispositivo analítico.

O conceito de miniaturização dos sistemas de análise foi proposto por Manz e colaboradores, os quais, nomearam esses dispositivos de microssistemas de análises totais (μ TAS, do inglês micro-total analysis systems), os mesmos, que na década de 90 também passaram a ser conhecidos como Lab-on-Chip (LOC), onde eles lançam a proposta de construir dispositivos, de tamanho reduzido, que pudessem realizar várias etapas analíticas (MANZ, GRABER e WIDMER, 1990). Esses sistemas oferecem inúmeras vantagens, tais como a redução do consumo de reagentes/amostras, do tempo de análise e do custo do dispositivo, bem como a menor geração de resíduos. Além disso, é importante ressaltar que esses dispositivos são portáteis, corroborando assim para sua utilização para análises em campo e possibilitam a integração de diversas etapas analíticas (pré-tratamento, injeção, separação e detecção) no mesmo dispositivo (COLTRO *et al.*, 2007; NEUŽIL *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2019).

Figura 1: Ilustração do primeiro microsistema para cromatografia em fase gasosa fabricado em substrato de silício, com diâmetro de 5 cm, na Universidade de Stanford, no fim da década de 70.

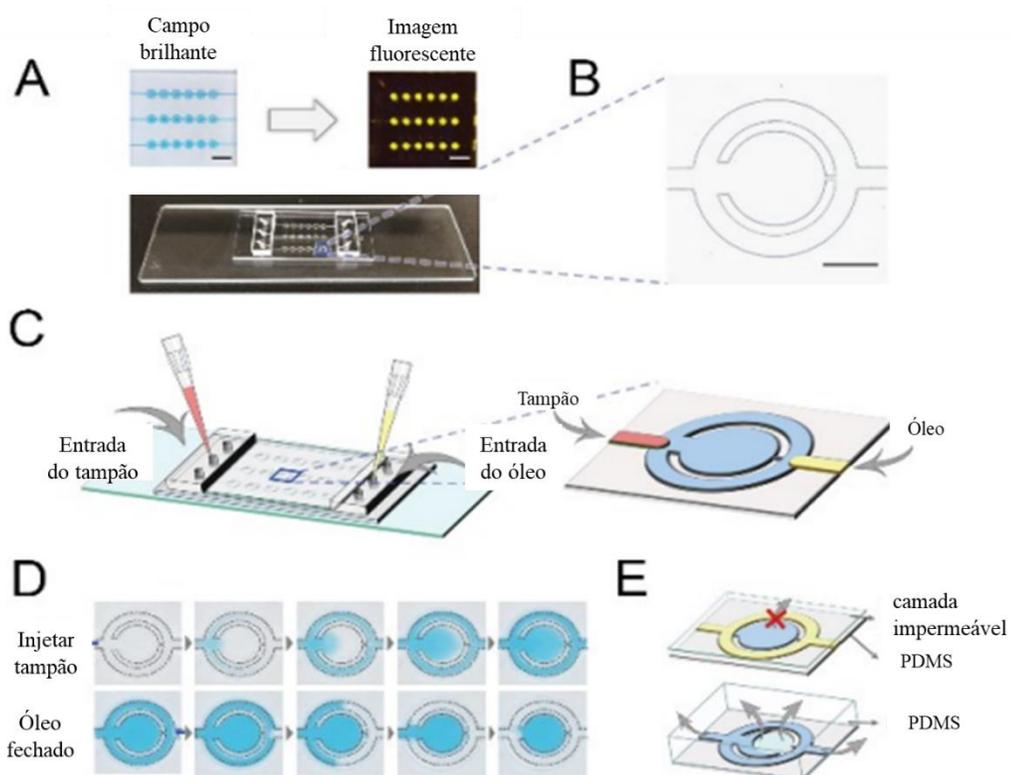


Fonte: Adaptado de COLTRO *et al.*, 2007

Diante das vantagens apresentadas pelos sistemas miniaturizados, diversos trabalhos vem sendo reportados na literatura visando inúmeras aplicações, tais como: dispositivos para análises clínicas (SRINIVASAN, PAMULA e FAIR, 2004; ZHANG *et al.*, 2014; CHO *et al.*, 2015; LIN, Y. *et al.*, 2016; PÉREZ-RODRÍGUEZ; CAÑIZARES-MACÍAS, 2022), microsensores eletroquímicos (MAJZLÍKOVÁ *et al.*, 2017), genéticas (DÍAZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2015; RADOVANOVIĆ, M. *et al.*, 2021) e microreatores (FERREIRA *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2015). A Figura 2 mostra um exemplo de sistema miniaturizado já reportado na literatura, onde Lin e colaboradores (2021) desenvolveram uma nova tecnologia de detecção rápida e confiável utilizando um dispositivo microfluídico (MF) para a técnica de amplificação de ácidos nucleicos com base no diagnóstico do *Point-of-care testing* (teste de ponto de atendimento- POCT). Neste estudo, demonstraram um ensaio LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop) operacional simples que contém

gotículas uniformes, cada uma das quais controlada por um canal capilar para a troca de fluido e óleo fechado. (LIN P. H.; LI B.R., 2021)

Figura 2: Ilustração esquemática do dispositivo com amplificação isotérmica mediada por loop de acionamento passivo.



Fonte: Adaptado de LIN P. H. ; LI B.R., 2021

A miniaturização é mais do que simplesmente a redução de sistemas bem conhecidos, uma vez que a importância relativa das forças e processos muda com a escala. Uma das características mais relevantes dos microsistemas analíticos é a presença do fluxo laminar, no qual as forças viscosas dominam a inércia. Isso significa que a turbulência é muitas vezes inatingível e que o transporte de moléculas ocorre apenas por difusão, o que tem consequências diretas nos projetos desse tipo de microsistema. A outra característica relevante é a possibilidade de lidar com a fluídica na escala de nanolitros e até picolitros, o que ampliou o escopo do μ TAS para agora ser chamado de microfluídica (MANZ, A. *et al.*, 1990; WHITESIDES, 2006; PÉREZ-RODRÍGUEZ; CAÑIZARES-MACÍAS, 2021).

2.3.1 Dispositivos microfluídicos

Microfluídica é a ciência e tecnologia de sistemas que processam ou manipulam pequenas quantidades de fluidos (10^{-9} a 10^{-18} L), usando canais medindo de dezenas a centenas de micrômetros. Por esta razão, o termo microfluídica abrange melhor a pesquisa e enfatiza o forte impacto que a miniaturização tem na fluídica e nos microssistemas analíticos, além disso, é uma tecnologia que vem contribuindo para o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos, que são sistemas miniaturizados capazes de realizar a manipulação e o transporte de fluidos em escala reduzida (WHITESIDES, 2006; CREVILLÉN *et al.*, 2007).

Esses dispositivos têm sido utilizados em inúmeras áreas, tais como biologia, medicina, química e engenharias, além disso, são instrumentos de pesquisa que podem ser fabricados em diversos substratos. Atualmente, os substratos de baixo custo vem ganhando espaço no que diz respeito a fabricação desses microssistemas. (YAGER *et al.*, 2006; FOUDEH *et al.*, 2012; COLTRO *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2019; RADOVANOVIC M. *et al.*, 2021). Dentre os substratos alternativos que vem recebendo grande atenção, podem ser citados o tecido (algodão), os polímeros e o papel (COLTRO *et al.*, 2014; KOMATSU, T. *et al.*, 2020; CARVALHO, 2021). Neste sentido, diversos pesquisadores têm desenvolvido metodologias alternativas para a fabricação desses dispositivos, visando sua utilização como sensores analíticos.

2.3.2 Sensores químicos

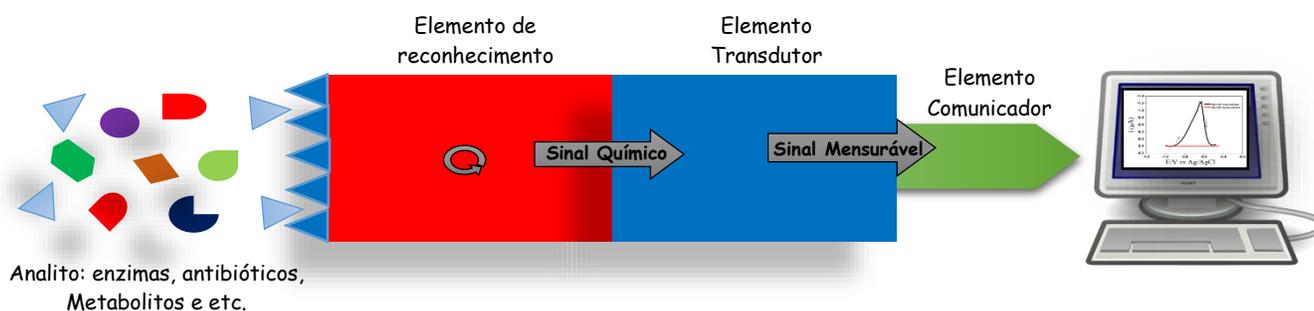
Os sensores químicos são dispositivos que tem por objetivo detectar a presença e/ou concentração de uma ou várias espécies químicas, em uma determinada amostra de interesse, capazes de transformar informações químicas em um sinal analiticamente útil. O sensor deve funcionar de maneira reversível e contínua, bem como realizar a medida diretamente na matriz. De forma geral, os sensores são ordenados com base no tipo de resposta que é medida, como por exemplo:

- 1- Sensores físicos: Dispositivos que medem propriedades de natureza estritamente físicas, como a massa, a viscosidade, o índice de refração, entre outras grandezas. Parâmetros como temperatura, fluxo, pressão, velocidade de agitação e densidade são largamente empregados nos mais diversos processos (MATTIONI, A. C. *et al.*, 2020).

2- Sensores químicos: Dispositivos usados para detectar substâncias empregando um elemento receptor químico, que engloba biossensores, os quais utilizam um receptor biológico como forma de identificação de substâncias (CAPELETTI, 2010; (MATTIONI, A. C. *et al.*, 2020).

Os sensores químicos podem reconhecer um ou mais analitos por meio de uma reação química na interface sensor-amostra, podendo ser aplicado para amostras de origem biológica ou não (CAPELETTI, 2010). Na Figura 3 é possível observar um modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico, mostrando o caminho desde a interação do analito com a fase sensora até a obtenção da resposta tanto qualitativa quanto quantitativa.

Figura 3: Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico.



Fonte: Autora, 2022.

Neste modelo esquemático é apresentado o elemento de reconhecimento, o transdutor e o comunicador. Na parte de reconhecimento de um sensor, é onde ocorre a interação de forma específica com o analito, gerando uma alteração em um ou mais parâmetros físico-químicos e assim é possível obter uma informação química, a qual, é transformada numa forma de energia gerando uma variação de sinal, que pode ser medido pelo transdutor. O transdutor é responsável por converter o sinal gerado que transporta a informação química sobre a amostra, num sinal analiticamente mensurável e a parte do comunicador é responsável por transportar o sinal analítico ao equipamento.

Os sensores químicos possuem alguns aspectos que os fazem ser bastante requerido em análises químicas, como: baseiam-se em técnicas de micro ou nano escala que melhoram os seus métodos de detecção, caracteristicamente, podem torná-los mais rápidos para

obtenção de respostas, baratos, sensíveis, reprodutíveis, fáceis de usar bem como aumentar a sua portabilidade – vantagens para o diagnóstico Point Of Care (POC) (LIU, 1995; ZHANG H.; YANG F-Q, 2021 e CHOCALHEIRO, 2010). O desenvolvimento de sensores analíticos de baixo custo vem recebendo grande atenção nos últimos anos, visando aplicações em diversas áreas. Dentre eles, se destacam os sensores colorimétricos, também conhecidos como microdispositivos analíticos a base de papel, os quais, são discutidos de maneira mais abrangente nas próximas seções.

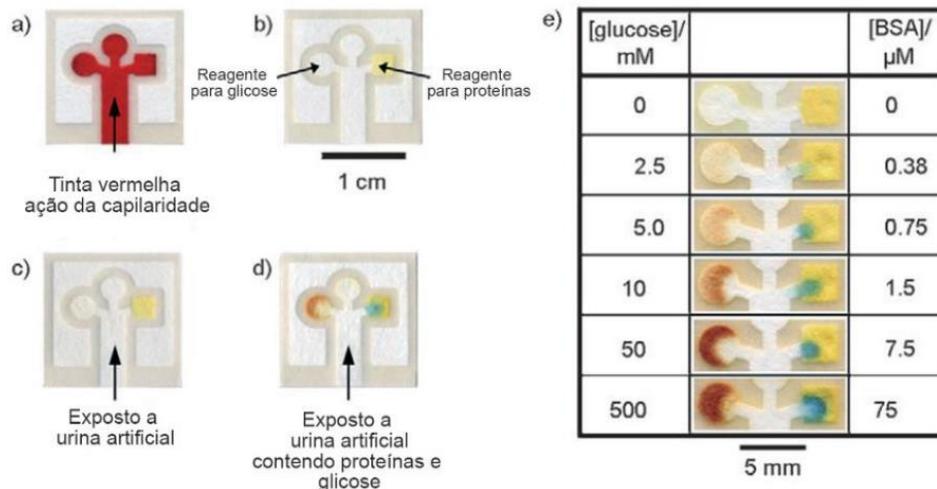
2.3.3 Microdispositivos analíticos baseado em papel: Sensores colorimétricos

Um sensor colorimétrico é um dispositivo que fornece uma resposta visual, ou seja, uma mudança de cor que pode ser determinada visualmente com relação a presença de um analito em uma determinada amostra. Este tipo de sensor pode ser fabricado em diversos substratos, porém, o papel é um substrato de baixo custo que vêm recebendo grande atenção nos últimos anos, uma vez que apresenta inúmeras vantagens, como: baixo custo, alta abundância, excelente compatibilidade química, está disponível em diferentes formas e formatos, possui acessibilidade global e apresenta facilidade de estocagem e transporte (COLTRO *et al.*, 2014; CATE *et al.*, 2015; ZHANG H.; YANG F-Q, 2021). Além disso, apresenta facilidade de padronização e a confecção destes dispositivos a base de papel podem ser feitas as zonas hidrofóbicas e hidrofílicas (sejam elas por tecnologias de impressão ou corte) de maneira simples e eficiente, o papel também apresenta uma boa capilaridade, seu potencial de descarte é convidativo por ser biodegradável.

Os μ PADs são reconhecidos como uma plataforma analítica potencialmente poderosa, pois apresentam muitas das características apresentados para sensores químicos relatadas anteriormente. Os antecedentes dos dispositivos analíticos baseados em papel datam de meados do século XVII, quando Boyle introduziu o papel tornassol como indicador ácido-base. No entanto, desde 2007 esta metodologia tem crescido exponencialmente, pois, Whitesides e colaboradores descreveram um método simples para padronizar papel com barreiras hidrofóbicas, criando canais hidrofílicos bem definidos, para serem utilizados como sensores colorimétricos (MARTINEZ *et al.*, 2007). Neste trabalho, os autores apresentaram o desenvolvimento e a utilização do μ PAD em análises clínicas, uma vez que foram

realizadas determinações quantitativas de glicose e da proteína albumina em amostras de urina artificial (Figura 4).

Figura 4: Microdispositivos analíticos a base de papel (μ PADs) para determinação de proteínas (BSA- albumina do soro bovino) e glicose.



Fonte: Adaptado de MARTINEZ *et al.*, 2007.

A grande vantagem em utilizar os μ PADs como sensores colorimétricos está relacionada com a possibilidade de realizar as análises *in loco* (*point-of-care*) (MARTINEZ *et al.*, 2010), apesar de a maior parte da investigação sobre μ PADs tenha sido focada em dispositivos de diagnóstico *point-of-care*, surgiram outras aplicações nomeadamente, na análise ambiental bem como na análise de alimentos e água. Uma infinidade de técnicas de fabricação e métodos de detecção foram propostas e descritas em revisões recentes, explorando os μ PADs como sensores colorimétricos para determinação de analitos importantes como a glicose (NILGHAZ e SHEN, 2015; FIGUEREDO *et al.*, 2016) a albumina (GARCIA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015), o ácido úrico (KUMAR *et al.*, 2015; GABRIEL *et al.*, 2016), o mercúrio (MEELAPSOM *et al.*, 2016), o cobre (RATNARATHORN *et al.*, 2012), o ferro (ASANO; SHIRAIISHI, 2015) e entre outros. Além disso, também existem outras aplicações, como análises genéticas, testes imunológicos, monitoramento de titulações ácido-base, análises de alimentos e dentre outras áreas (NOGUEIRA *et al.*, 2017; BOEHLE *et al.*, 2017). Como pode ser observado, a

utilização de μ PADs como sensores colorimétricos é bastante ampla, uma vez que esses dispositivos corroboram para análises rápidas diretamente no point-of-care.

Os μ PADs utilizam vários materiais baseados em papel como: filtro de papel, papel cromatográfico e entre outros. Geralmente, esses materiais são compostos de celulose pura e por não possuírem aditivos tornam mais fáceis o controle nos ensaios analíticos. Além disso os papéis cromatográficos e filtro de papel possuem uma etapa de branqueamento na sua fabricação que acaba removendo impurezas do próprio papel (FU; WANG, 2018). A estrutura de celulose do substrato do μ PAD pode ser funcionalizada servindo como um canal e suporte ideal para o transporte e imobilização de várias substâncias (sejam elas, amostras ou reagentes) usadas em ensaios analíticos.

2.3.4 Características do papel

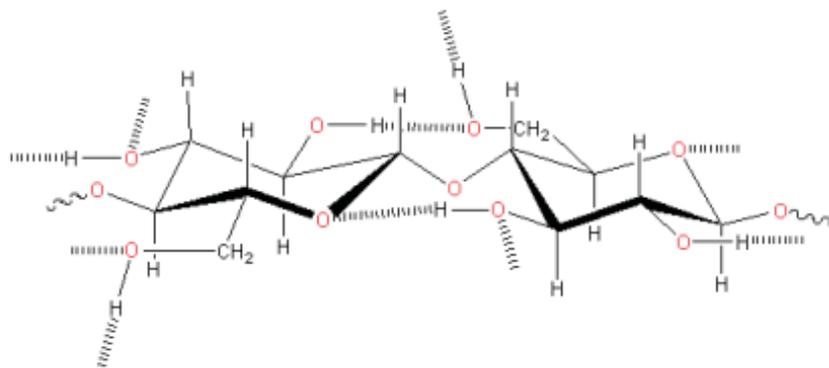
Papéis de filtro possuem uma longa história de aplicações laboratoriais para filtração e também como suporte para separação cromatográfica. Além disso, o papel oferece vantagens únicas em relação aos materiais poliméricos na busca por novas plataformas para a construção de dispositivos. O papel é produzido praticamente em todas as partes do mundo a partir de recursos renováveis e recicláveis é facilmente impresso, revestido e impregnado; a celulose é um polissacarídeo de ocorrência natural e sua estrutura porosa facilita separações cromatográficas e a utilização como dispositivos microfluídicos (COSTA O. E.,2012).

A celulose é o principal constituinte do papel. Suas fibras são tubos ocos de aproximadamente 1,5 mm de comprimento, 20 μ m de largura e sua parede possui uma espessura de 2 μ m. As dimensões desses canais dependem do tipo de material utilizado para a preparação do papel, como madeira fresca, papéis reciclados, filtros Whatman e vários outros (DAS S. *et al.*,2022). A celulose é um biopolímero de carboidrato, oferece tanto um amplo espaço em seus microporos para armazenamento de reagentes analíticos quanto uma força capilar para conduzir amostras líquidas a uma zona de reação dedicada para detecção dos analitos desejados. Devido ao baixo custo e sensibilidade ultra-alta, esses novos dispositivos tornaram-se uma alternativa promissora aos tradicionais instrumentos analíticos avançados e oferecem grande potencial para aplicações em emergências médicas,

diagnósticos de saúde em pontos de atendimento sem a necessidade de equipamentos adicionais. (RATAJCZAK, K.; STOBIECKA, M.,2020)

Quimicamente, a celulose é um polímero linear de unidades de D-glicose que estão conectadas entre si por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 5). A estrutura supramolecular da celulose é representada por áreas de estruturas de alta ordem (cristalina) e de baixa ordem (amorfa) (KHALIL, BHAT, & YUSRA, 2012; KLEMM *et al.*, 2005). As moléculas de celulose são organizadas em fibrilas que se agregam para formar microfibrilas (5-50 nm de diâmetro e vários micrômetros de comprimento) e depois fibras de celulose entrelaçadas (LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. 1993). Pela sua estrutura celulósica é possível também realizar modificações químicas, principalmente por apresentar grupos hidroxílicos de fácil acesso.

Figura 5: Estrutura linear da celulose.



Fonte: DONINI *et al.*, 2010.

O papel é produzido pressionando as fibras úmidas; estes são tipicamente fibras de celulose, as quais, são extraídas principalmente da polpa de madeira, encontradas em plantas como microfibrilas e são separadas da fonte (lasca de madeira, caule ou outras partes da planta) por processos químicos ou mecânicos de polpação. Enquanto nos processos de polpação química, as fibras de celulose são extraídas pela degradação da lignina e da hemicelulose em pequenas partículas que ficam suspensas em água sem despolimerização, os processos de polpação mecânica separam fisicamente as fibras de celulose umas das outras. Anselme Payen foi o primeiro a descobrir a celulose em 1838; isolou-o da matéria vegetal e também determinou sua fórmula química, no entanto, a estrutura polimérica da

celulose na forma de uma macromolécula linear de monômeros de anidroglicose não era conhecida até 1920. (MAHADEVA, S. K. *et al.*, 2015; RATAJCZAK, K.; STOBIECKA, M., 2020).

O papel ou a celulose em geral, é atraente para aplicações de sensoriamento por apresentar as fibras de celulose de madeira funcionalizadas, ou seja, as propriedades das fibras de celulose de madeira como hidrofiliabilidade, permeabilidade, reatividade e entre outras, podendo ser ajustadas de acordo com requisitos específicos, o papel tem a capacidade de deixar substâncias líquidas passar por sua matriz hidrofílica sem auxílio de forças externas e ainda a celulose de madeira também é conhecida por ter propriedades piezoelétricas.

2.3.5 Métodos de Detecção

Para análise dos $\mu PADS$ pode ser utilizado vários tipos de detecção, entre os quais óptica simples, através de leitores de microplacas, quimioluminescente, eletroquímica e piezoresistiva. Alguns destes métodos requerem o uso de equipamentos externos complexos para leitura de resultados, o que impossibilita os objetivos pretendidos. Contudo, para detecção óptica, foi sugerida a utilização de uma câmera digital, ou mesmo uma câmera integrada num *smartphone*, de maneira a obter os resultados das análises dos biossensores (MARTINEZ *et al.*, 2008; DUNGCHAI *et al.*, 2011).

De acordo com a literatura, para os diferentes tipos de sensores químicos colorimétricos ou para os $\mu PADS$, diversos métodos de detecção podem ser acoplados, como por exemplo, detecção colorimétrica, detecção fluorescente, detecção eletroquímica e detecção fotoeletroquímica, detecção quimioluminescente, detecção eletroquimioluminescente e detecção de espectroscopia de massa / Raman (FU; WANG, 2018). Dentre esses mecanismos de detecção, este trabalho terá como foco a detecção colorimétrica, pois é um método que se destaca, quando se fala de $\mu PADS$, devido a seus custos e benefícios e vem sendo cada vez mais explorado na área de sensores químicos de baixo custo.

2.3.6 Detecção colorimétrica

O mecanismo de detecção colorimétrica é baseada na mudança de coloração apresentada por uma reação entre a substância de interesse (analito) e um reagente colorimétrico, conhecido como cromógeno (MARTINEZ *et al.*, 2008; ZHANG e LIU, 2016; LIU *et al.*, 2019; MARTINEZ *et al.*, 2007; XIE *et al.*, 2019). Este método vem sendo bastante utilizado, em virtude de algumas vantagens instrumentais, tais como o baixo custo, a fácil acessibilidade aos detectores colorimétricos, a portabilidade e por fim, a capacidade de realizar as análises através da telemedicina utilizando câmeras de celular (MARTINEZ *et al.*, 2008).

Por meio da reação química seletiva entre o analito e o agente cromógeno, pode ser obtidas determinações qualitativas, como respostas sim ou não/ verdadeiro ou falso, por meio do olho humano sendo utilizado como detector colorimétrico e determinações semi-quantitativas ou quantitativas, pois a mudança de cor pode ser correlacionada com concentração de um analito de interesse, isto por meio da mudança de coloração dentro das zonas de detecção (regiões onde acontecem as reações) dos dispositivos (DE TARSO GARCIA *et al.*, 2014; POLLOCK *et al.*, 2012). Para uma análise semi-quantitativa, a cor desenvolvida no sensor pode ser comparada com um gradiente de cores previamente estabelecido, e assim o analista pode através da comparação visual, estimar a concentração do analito na amostra (FIGUEREDO *et al.*, 2016; GARCIA *et al.*, 2017).

Para determinações quantitativas, geralmente a região colorida do sensor deve ser capturada por um dispositivo de captura (scanners, câmeras fotográficas, smartphones e etc.) de imagens e a intensidade de cor é então analisada. Após a captura da imagem do ensaio colorimétrico, pode-se utilizar um software gráfico capaz de fornecer uma resposta da intensidade de cor (em termos de pixels) e esta é correlacionada com a concentração do analito, através de curvas analíticas previamente construídas (MARTINEZ *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2014; ZHANG e LIU, 2016). Além disso, existem alguns sistemas de cores: RGB (*Red, Green e Blue*) ou CYMK (*Cyan, Magenta, Yellow e Black*) porém o mais utilizado para avaliação nos μ PADs é o RGB.

O sistema RGB as cores possuem uma representação numérica. Onde esse sistema usa uma arquitetura 8 bits (1 byte) para cada 28 componente (R, G e B), podendo assumir

256 níveis de intensidades de cor. Logo, cada componente pode assumir valores de 0 a 255, gerando cerca de 16 milhões de combinações de cores. A cor de um pixel é a combinação das três componentes (SANTOS; 2013).

O sistema RGB divide a luz em três canais de cores primárias (vermelho, verde e azul). Cada cor é representada digitalmente por um canal de 8 bits (1 byte) para cada 28 componente (R, G e B), podendo assumir 256 níveis de intensidades de cor ($2^8 = 256 = 0 - 255$) de informação, sendo que o canal 0 significa a ausência da cor e o 255 a intensidade máxima da mesma. Com isso 16 milhões de cores podem ser geradas através da combinação de coordenadas dos três canais, por exemplo, a branca é representada por (255, 255, 255) e a preta por (0, 0, 0). (LEAL, 2020; MORBIOLI et al., 2017).

A escolha do método de aquisição de dados de intensidade de cor e sua utilização como sinal analítico depende do método a ser aplicado, pois cada sistema é único, tanto no tratamento do papel, o cromóforo usado, a cor formada, o método de digitalização da imagem e outras condições. (MORBIOLI *et al.*, 2017)

Alguns autores preferem utilizar apenas um canal da escala RGB para obter a relação linear entre concentração e sinal analítico, como Ferreira; Mesquita; Rangel (2021) que usa apenas o canal verde para determinação de nitrato em urina, já que sua cor resultante é rosa, a cor complementar de verde. O mesmo princípio é usado por Ferreira *et al.*, (2021) no método para determinação de ferro. O canal azul foi escolhido para a melhor correlação do sinal analítico e concentração do analito para determinação de cobre em cachaça adotado por Fernandes *et al.*, (2020).

Dessa forma, visando a praticidade e principalmente a portabilidade, muitos trabalhos utilizam a câmera de smartphones como método de captura de imagens (DA SILVA *et al.*, 2020; HUY; NGHIA; LEE, 2020; KIM *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2019). Partindo da possibilidade da correlação entre a média da intensidade de pixels, no sistema de cor RGB, e a concentração de uma molécula de interesse. Neste trabalho foi aplicado esse método para a determinação do mercúrio e do chumbo complexado com o agente colorimétrico, ditizona.

2.3.7 Agente colorimétrico- Ditizona (DT)

A difeniltiocarbazona, mais conhecida como ditizona, foi primeiramente introduzida por Emil Fischer, o qual notificou sua reação com metais pesados gerando produtos coloridos brilhantes (SANDELL, 1906). Em 1925, Hellmut Fischer (STARY, J., 1963) mostrou que a ditizona apresentava um grande valor importante para determinação de trações metálicas. Desde então, a ditizona tem sido extensivamente estudada como reagente para determinação de íons metálicos.

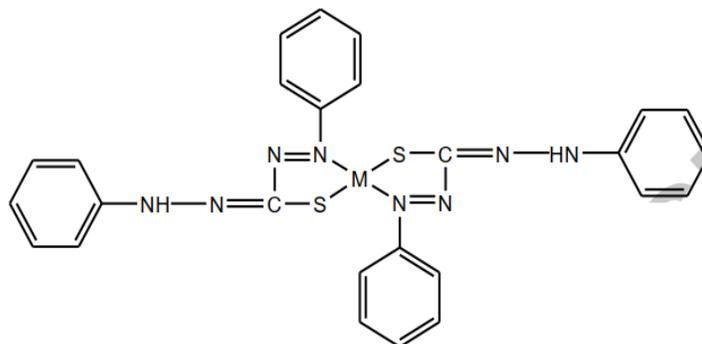
DT é um composto cristalino violeta-preto, de massa molecular 256,33 g/mol praticamente insolúvel em água e em ácido. É solúvel em clorofórmio e tetracloreto de carbono. Estes dois solventes são quase que exclusivamente usados para preparar soluções de ditizona com fins analíticos. Soluções de ditizona diluídas com clorofórmio ou o tetracloreto de carbono, possuem coloração verde, em ambos os solventes. E, se diluídas com solventes fortemente polares como nitrobenzeno, possui uma coloração amarela. (STARY, J., 1963; DE, A. K. *et al.*, 1970; ISQUIBOLA, G.; RODRIGUES E. C., 2021). A grande sensibilidade das reações da ditizona com íons metálicos deve-se à alta absorvidade das soluções em solventes orgânicos. (SANDELL, 1906)

Soluções de ditizona decompõem-se rapidamente se exposta à luz intensa e à temperaturas relativamente altas. Também está sujeita à oxidação pelo ar, pelos produtos da fotodecomposição de solventes orgânicos e por compostos oxidantes, como por exemplo, o Fe (III). Ditizona em solução aquosa comporta-se como ácido monobásico com constante de dissociação K_a de $2,8 \times 10^{-5}$. Os dois átomos de hidrogênio da estrutura da ditizona podem ser substituídos por um metal equivalente. Quando um hidrogênio da molécula da ditizona é substituído, o ditizonato primário é formado, quando ambos são substituídos o ditizonato secundário é formado (ZARGOOSH K., BABADI F.F., 2015).

Dessa forma a ditizona é um agente de ligação bem conhecido, a qual, tem sido amplamente utilizado para determinação espectrofotométrica de Hg^{2+} e Pb^{2+} em amostras biológicas e industriais. A ditizona forma complexos metálicos na proporção 1:2 com íons Pb^{2+} e Hg^{2+} (Figura 6). Por outro lado, a ditizona e seus complexos metálicos são imiscíveis em água, portanto, a determinação seletiva de Hg^{2+} e Pb^{2+} requer etapas de extração demoradas e caras por solventes orgânicos perigosos, como clorofórmio e tetracloreto de

carbono. Sendo assim, é de suma importância explorar e desenvolver um método simples e sensível para determinação de Hg^{2+} e Pb^{2+} especialmente em análises ambientais na presença de outros íons de metais pesados. (ZARGOOSH K., BABADI F.F., 2015)

Figura 6: A estrutura dos complexos de ditizona com Hg^{2+} e Pb^{2+} , onde M representa os metais.



Fonte: ZARGOOSH K., BABADI F.F., 2015

2.3.8 Agente tensoativo-brometo de cetiltrimetilamônio (Hexadecyltrimethylammonium bromide – CTAB)

Os agentes tensoativos (detergentes ou surfactantes) são usados em diferentes áreas da Biotecnologia. São moléculas anfipáticas com um núcleo polar (parte hidrofílica e uma cauda apolar (parte hidrofóbica). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não iônica ou anfotérica, para os tensoativos catiônicos, a estrutura geral obedece a fórmula $\text{R}_n\text{X}^+\text{Y}^-$, onde R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X representa um elemento que pode formar uma estrutura catiônica e Y é o seu contra íon (MANIASSO, 2001; NTISCHIKI; PASTORE, 2002). Além disso, os Tensoativos são bastante utilizados em química analítica devido à possibilidade de modificar o meio reacional e melhorar tanto a sensibilidade quanto a seletividade analítica (JÚNIOR, 2019).

Entre esses tensoativos, destaca-se o CTAB, um tensoativo catiônico que é constantemente utilizado em aplicações em eletroforese capilar e sistemas microfluídicos, por facilitar a separação de analitos (MANIASSO, 2001; TAVARES, 1996). A utilização de surfactantes (tensoativos catiônicos) em eletroforese capilar para a otimização do fluxo

eletroosmótico e também do processo de separação tem sido utilizado devido aos efeitos decorrentes da adição destes ao sistema. Surfactantes podem interagir com a parede do capilar (ou canal) e modificar a magnitude e polaridade do fluxo eletroosmótico assim como interagir com os analitos e assim facilitar a separação dos mesmos (GUO; FUNG, 2011; JÚNIOR, 2019)

No desenvolvimento de metodologias colorimétricas baseadas em dispositivos de papel o CTAB também apresenta papel importante na estabilidade e homogeneidade da cor. Silva e colaboradores (2018) utilizaram CTAB para aprimorar a resposta analítica do sistema desenvolvido para a determinação de fenacetina. Os autores reportaram que a formação de micelas no meio reacional proporcionou uma melhor intensidade na cor e estabilidade do produto colorimétrico. A precisão do método proposto foi avaliada usando amostras reais de cocaína apreendidas. Dessa forma, baseado nessa estratégia, neste trabalho foi aplicado o CTAB para analisar e observar a influência deste tensoativo no produto colorimétrico formado, bem como a sua influência na sensibilidade do dispositivo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente projeto tem por objetivo geral o desenvolvimento de uma metodologia analítica alternativa e de baixo custo para a determinação simultânea dos íons Hg^{2+} e Pb^{2+} usando μPAD com detecção colorimétrica, em amostras de águas naturais do Rio São Francisco na cidade ribeirinha de Penedo.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver, avaliar e aplicar diferentes tipos de *layouts* usados na confecção dos μPADS para detecção colorimétrica rápida *in situ* das espécies em estudo;
- Avaliar a adequação dos μPADs em proposta qualitativa para as espécies em estudo;
- Empregar a ditizona, como reagente colorimétrico para determinação e quantificação de Hg^{2+} e Pb^{2+} , respectivamente;
- Estudar as condições de aplicação da amostra nos μPADs . Envolvendo parâmetros como: volume dos reagentes, pH; sistema de cor, estabilidade da coloração apresentada, concentração dos analitos e do reagente colorimétrico;
- Avaliar a influência do CTAB na formação do produto colorimétrico e consequentemente na sensibilidade do dispositivo para a metodologia;
- Avaliar possíveis interferentes ao método proposto com base nas amostras utilizadas;
- Avaliar algumas Figuras de mérito do método de quantificação dos metais em μPAD a partir dos parâmetros: linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.
- Aplicar a metodologia proposta na determinação dos íons Hg^{2+} e Pb^{2+} e efetuar o ensaio de recuperação com as amostras reais;
- Avaliação da aplicação da análise termogravimétrica (TGA), para verificar a estabilidade dos complexos formados.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e reagentes

Todas as substâncias utilizadas durante os procedimentos experimentais foram de pureza de grau analítico, não sendo necessária qualquer purificação adicional (Tabela 3).

Tabela 3: Reagentes utilizados durante o processo de construção dos dispositivos a base de papel.

Reagentes	Fórmula molecular	Fornecedor	Pureza
Sulfato de mercúrio II	HgSO ₄	Dinâmica	98,0 %
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Êxodo científica	98,0 %
Tetracloreto de carbono	CCl ₄	Êxodo científica	99,8%
Acetona	CH ₃ COCH ₃	Dinâmica	90,0%
Hidróxido de Sódio	NaOH	Vetec	97,0%
Ácido bórico	H ₂ BO ₃	Vetec	99,5%
Nitrato de chumbo II	Pb(NO ₃) ₂	Dinâmica	99,0%
Solução estoque de HCl de 0,1M	HCl	-	-
Solução de NaOH de 1 M	NaOH	-	-
Solução de NaOH de 0,02M	NaOH	-	-
CTAB	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(Br)(CH ₃) ₃	Sigma	99,0%
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	Vetec	99,0%
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	Synth	98,0%
Cloreto de potássio	KCl	Qhemis	99,0%
Sulfato de cobre II	CuSO ₄	Dinâmica	98,0%
Cloreto de sódio	NaCl	Dinâmcia	99,0%
Cloreto de Zinco	ZnCl ₂	Dinâmcia	97,0%

Fonte: Autora, 2022.

Para as medições das massas dos reagentes utilizou-se balança analítica eletrônica Shimadzu (modelo ATY224, Brasil) com precisão de 0,1 mg. Eventualmente, a solubilização completa de alguns reagentes foi efetuada utilizando banho de ultrassom da Cristófoli Equipamentos de Biossegurança LTDA (modelo USC070236, Brasil) ou um agitador do tipo Vortex com velocidade fixa Biomixer (modelo VTX-F-110, Brasil). A análise dos dados foi realizada a partir dos gráficos obtidos utilizando o programa Excel 2013[®].

As soluções foram preparadas com água ultrapura (condutividade elétrica $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) e resistividade específica de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ obtida a partir do deionizador Milli-Q[®] Millipore (modelo F9PN54566, USA). Diluições subsequentes das soluções foram efetuadas quando necessárias. Os valores de pH das soluções tampão foram ajustados com soluções de NaOH e HCl e utilizando um eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro QUIMIS (modelo Q400mt, Brasil).

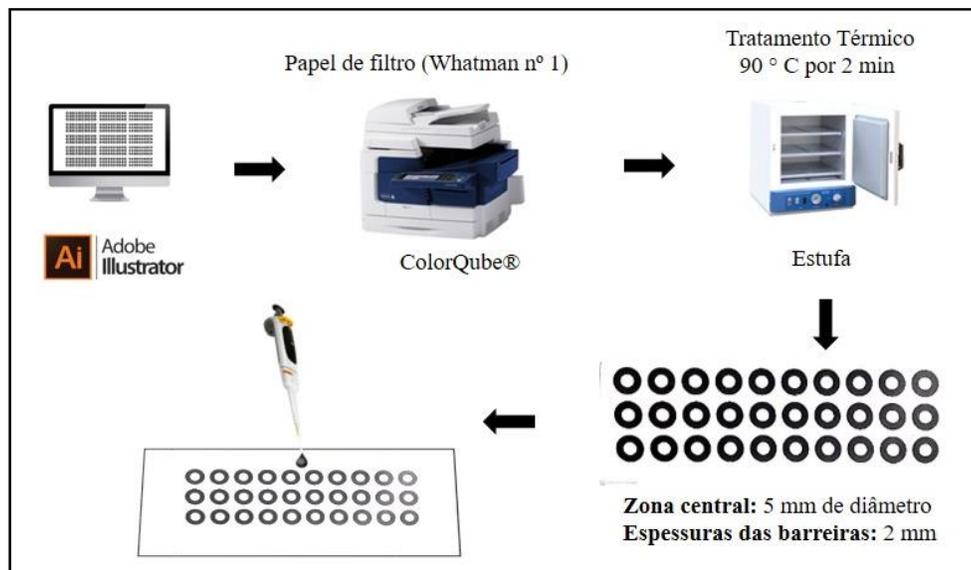
Soluções tampão de ácido bórico foram preparadas ($0,12 \text{ mol/L}$) e o pH foi ajustado conforme o desejável com $0,2 \text{ mol/L NaOH}$. Uma solução padrão estoque de Hg^{2+} ($1,0 \text{ g/L}$) foi preparada dissolvendo $0,1480 \text{ g HgSO}_4$ ($K_{ps} = 2,0 \times 10^{-24}$) em 10 mL de água, seguido pela adição de $0,83 \text{ mL}$ de H_2SO_4 concentrado e depois diluído para 100 mL . As soluções padrão de trabalho de Hg^{2+} foram preparadas por diluição apropriada da solução padrão estoque de Hg^{2+} com tampão. Uma solução padrão estoque de Pb^{2+} ($1,0 \text{ g/L}$) foi preparada dissolvendo $0,04968 \text{ g Pb(NO}_3)_2$ ($K_{ps} = 1,2 \times 10^{-15}$) em 50 mL de água ultrapura.

4.2 Fabricação dos dispositivos baseados em papel

Os dispositivos analíticos baseados em papel foram desenhados segundo a metodologia de Carrilho e colaboradores (2009), por impressão a cera (CARRILHO *et. al.*, 2009). Utilizando o *software* Adobe Illustrator[®], os *layouts* de *spot test* de 5 mm de diâmetro foram escolhidos para os experimentos iniciais e assim foram gerados e impressos em uma impressora de cera Xerox ColorQube[®] (Xerox, Norwalk, CT, USA) usando papel de filtro como substrato, como pode ser observado na Figura 7. Logo, em seguida, um procedimento de aquecimento foi utilizado nos dispositivos em uma chapa térmica a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos (JÚNIOR, 2022), para permitir que a cera fundisse no papel com o intuito de formar as barreiras hidrofóbicas de maneira eficiente. Por fim, para evitar vazamento e contaminação

da solução, uma fita adesiva foi colocada na parte inferior dos *spots test*, logo em seguida foi utilizada uma placa de vidro (previamente limpa) para facilitar o manuseio (Figura 7).

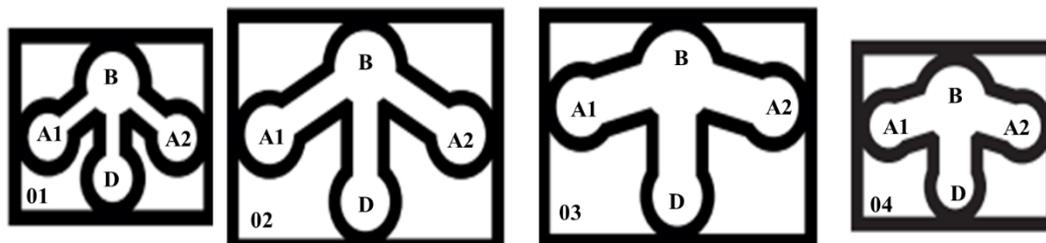
Figura 7: Esquema do processo de fabricação dos dispositivos de papel.



Fonte: Autora,2022.

Neste trabalho, além do dispositivo utilizado para os testes iniciais e as otimizações, também foram utilizados quatro *layouts* de μ PADs diferentes como pode ser observado na Figura 8, elaborado por meio do programa *Adobe Illustrator*. O projeto da estrutura do dispositivo 01 consistiu na área principal (12 mm de diâmetro), três zonas de detecção (6 mm de diâmetro) e canais (2×12 mm) para conectar as zonas. No dispositivo 02 apresentava a área principal (10 mm de diâmetro), três zonas de detecção (8 mm de diâmetro) com canais (4×9 mm) para conectar as zonas. Já no dispositivo 03 continha a área principal (12 mm de diâmetro), três zonas de detecção (8 mm de diâmetro) com canais (6×6 mm). Por fim no dispositivo 04 foi feita a área principal (10 mm de diâmetro), três zonas de detecção (6 mm de diâmetro) com canais (3×5 mm) com barreira hidrofóbica de 2mm para todos os dispositivos. É importante ressaltar que após o aquecimento da cera no sensor, os valores dos diâmetros apresentavam uma redução de 1mm.

Figura 8: *Layouts* dos dispositivos 01,02,03 e 04 com o volume da ditizona na área principal de 20,0; 40,0; 40,0 e 20,0 μL , respetivamente. (A1 e A2 = Áreas de detecção; B= Área principal; D= Controle)



Fonte: Autora,2022.

Tabela 4: Dimensões dos dispositivos 01;02;03 e 04.

Dispositivos	01	02	03	04
Canais:	2 × 12 mm	4 × 9 mm	6 × 6 mm	3 × 5 mm
Zona central	12 mm	10 mm	12 mm	10 mm
Zonas de detecção	6 mm	8 mm	8 mm	6 mm
Espessuras das barreiras:	2 mm	2 mm	2 mm	2 mm

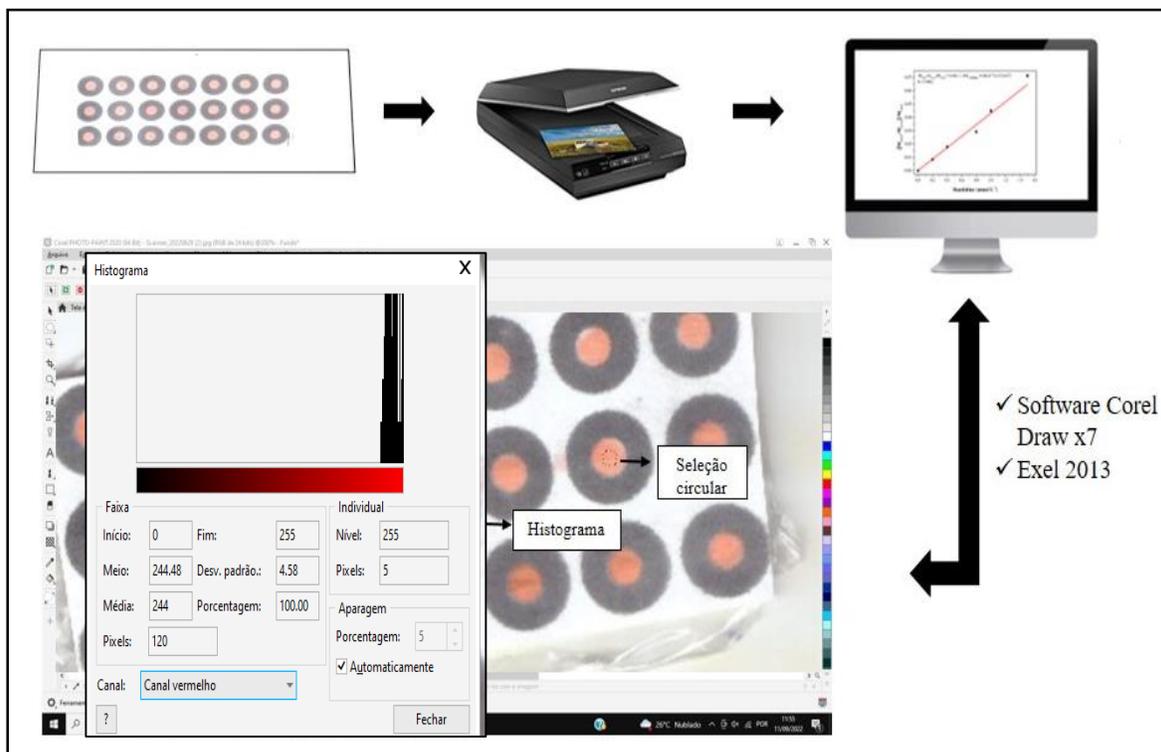
Fonte: Autora,2022.

Conforme apresentado na Figura 8, os diferentes dispositivos são constituídos das áreas de detecção, onde A1 é o reservatório utilizado como referência para analisar e quantificar o mercúrio por meio da solução padrão e/ou amostra real, já A2 é a área para quantificar e determinar o chumbo. É possível observar também que os dispositivos, possuem área principal (B), onde foi adicionado o agente colorimétrico, o qual, percorreu os canais e consequentemente uma reação química seletiva foi obtida, fornecendo uma resposta visual, por meio do complexo formado entre os íons metálicos e a ditizona. Por fim, os *Layouts* apresentam a área D, onde é possível verificar a diferença de cor entre cada reservatório, pois nesta área continha apenas a ditizona.

4.3 Tratamento de dados

As imagens são então tratadas no software corel photo-paint (2020). Um padrão de régua foi determinado para que houvesse uma padronização das imagens dentro do software, evitando a diferença de tamanho da avaliação de um dispositivo para o outro. Também foi padronizada uma área de seleção circular de 120 pixels (px) de diâmetro para capturar as informações das zonas de detecção através da ferramenta de histograma. Foram coletadas, através dessa ferramenta, a média de intensidade de cor (em pixels) e esse valor foi correlacionado com a concentração, como pode ser visto na Figura 9. Foram coletados os dados de intensidade de cor para o canal RGB e para cada outro canal individual R (Red), G (Green) e B (Blue).

Figura 9: Esquema das etapas de tratamtno de dados e interface do software corel photo-paint (2020) com sua ferramenta de histograma.



Fonte: Autora,2022.

4.4 Procedimento para determinação do Hg^{2+} e do Pb^{2+}

Com os μPADs prontos, sob condições otimizadas, o procedimento de determinação do Hg^{2+} e do Pb^{2+} , separadamente, foi realizado da seguinte forma: 1,0 μL da solução de DT (10 g/L), em solução de tetracloreto de carbono, foi aplicada no *spot test* e deixado secar ao ar por 15 min, isso no dispositivo apresentado na Figura 7 utilizado para os testes iniciais. Em seguida, 1,0 μL do analito (solução de amostra ou solução padrão de íons de mercúrio ou íons de chumbo) foi pipetada no reservatório do dispositivo e deixado secar ao ar, novamente, por 15 min, na sequência as imagens foram capturadas para a análise, isto aplicado no dispositivo utilizado para realizar as otimizações conforme apresentado na Figura 7.

Quando foi realizado os testes com diferentes *layouts*, foi necessário reajustar os volumes, sendo assim, para os dispositivos 02 e 03, o volume de ditizona utilizado foi de 40,0 μL e 1,5 μL da solução contendo íons de mercúrio, respectivamente. Já nos dispositivos 01 e 04 foram utilizados 20,0 μL de ditizona e 1,0 μL do analito (íons de mercúrio ou íons de chumbo) respectivamente. Além disso, foi preparado várias diluições da solução estoque, como pode ser visto na Tabela 5, utilizando a solução tampão de ácido bórico (0,12 mol/L), com $\text{pH} = 9,0$.

A detecção colorimétrica foi realizada utilizando um scanner Samsung Xpress M2070W para a aquisição de imagens e resolução de 600 dpi. A intensidade RGB (Red, Green, Blue) foi analisada com o software Corel Draw X7 e aplicada para quantificar os parâmetros analíticos de intensidade de cor. Os íons de mercúrio ou de chumbo reagem com a ditizona depositada no canal anteriormente para formar um complexo colorido (Figura 10 e 11), o produto precipita no canal devido à insolubilidade em líquido aquoso (adaptação de CAI *et. al.*,2017).

Tabela 5: Concentração das soluções de Hg^{2+} e Pb^{2+} .

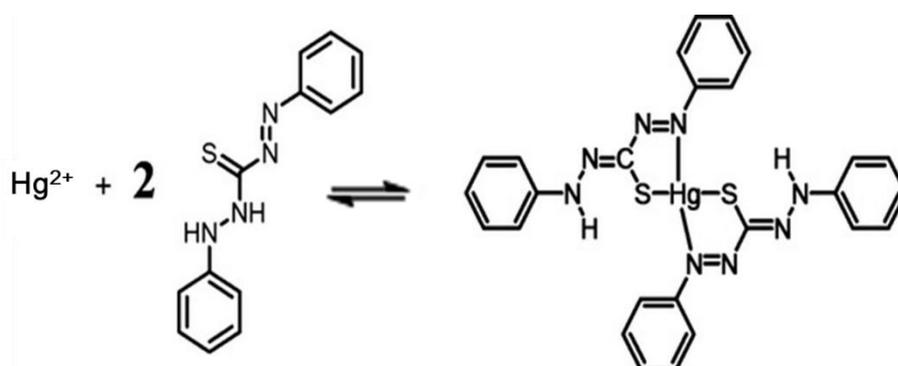
Soluções e Concentração ($\mu\text{g/mL}$)

I	1	IX	50
II	5	X	60

III	10	XI	70
IV	15	XII	80
V	20	XIII	90
VI	25	XIV	100
VII	30	XV	150
VIII	40		

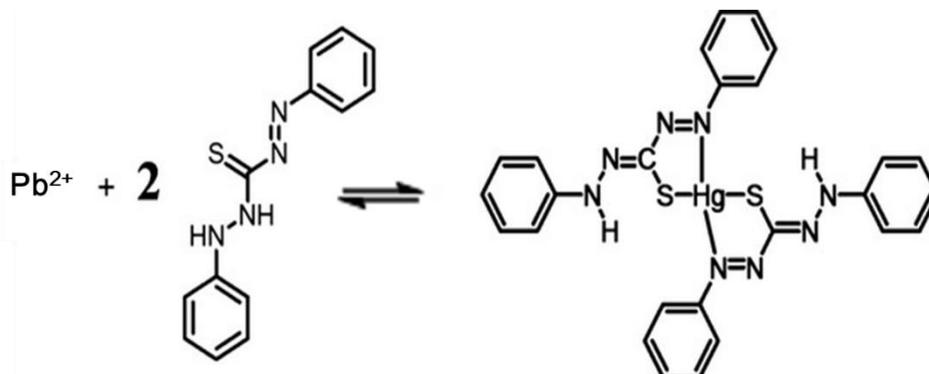
Fonte: Autora,2022.

Figura 10: Reação de formação de complexo de ditizona com Hg^{2+} .



Fonte: Adaptado de PRASERTBOONYAI K. *et al.*, 2015.

Figura 11: Reação de formação de complexo de ditizona com Pb^{2+} .



Fonte: Adaptado de PRASERTBOONYAI K. *et al.*, 2015

4.4.1 Teste de estabilidade da cor

A estabilidade da cor gerada nos dispositivos foi avaliada, mantendo fixa uma concentração do metal (100 $\mu\text{g/mL}$). Sendo assim, foi adicionado no reservatório do dispositivo 1 μL da solução de DT- CCl_4 , aguardando o tempo de secagem como já foi supracitado e em seguida adicionou-se 1 μL da solução de mercúrio/chumbo. Inicialmente foram obtidas as imagens dos dispositivos nos tempos de 15 em 15 minutos até completar uma hora do experimento, em seguida as medições foram efetuadas em intervalos de 30min, até completar as duas horas de análise, e após esse tempo, as medições foram realizadas em intervalos de 60 min, com uma duração total do experimento de 4 horas. A intensidade de pixels foi utilizada como parâmetro analítico para comparar os dados obtidos.

4.4.2 Avaliação da influência do CTAB

CTAB foi avaliado neste trabalho para verificar se uma melhoria significativa na intensidade de cor pudesse ser observada na presença desse tensoativo catiônico. Sendo assim, foram preparadas duas soluções com diferentes concentrações de CTAB (6 mM e 12 mM), utilizando o tampão de ácido bórico (0,12 mol/L) para solubilizar este composto. Logo em seguida, com a solução de CTAB pronta, foi realizado várias diluições, com a mesma, na presença de íons mercúrio e chumbo separadamente.

4.4.3 Ensaio de interferentes

A avaliação dos possíveis interferentes ao método proposto foi realizada na determinação de 10 $\mu\text{g/mL}$ do Hg^{2+} e 50 $\mu\text{g/mL}$ do Pb^{2+} . Um total de 6 possíveis interferentes foram estudados, baseados na presença e ausência dos analitos ($\text{Hg}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$), seguindo uma adaptação de CAI e colaboradores (2017). As concentrações toleráveis destes possíveis interferentes são 800 $\mu\text{g/mL}$ para Na^+ e K^+ , 190 $\mu\text{g/mL}$ para Fe^{3+} e Mn^{2+} , por fim, 5 $\mu\text{g/mL}$ Zn^{2+} e Cu^{2+} . Os possíveis interferentes ao método foram selecionados com base no trabalhos

recente na literatura e no tipo de matriz para a qual o método proposto foi aplicado (adaptação de CAI *et. al.*,2017).

4.4.4 Figuras de mérito

Inicialmente foi realizado a otimização da metodologia proposta, utilizando a inclinação da curva de calibração (sensibilidade analítica) como principal parâmetro de comparação das condições avaliadas. Eventualmente, outros parâmetros analíticos foram utilizados como ferramentas de avaliação das condições experimentais, como, o sinal do branco, faixa linear e limites de detecção e quantificação. Assim, a Equação 1 foi utilizada para a avaliação dos parâmetros analíticos:

$$\left[\frac{M_b - M_r}{M_b} \right] = aC_{\text{metal}} + b \quad \text{Equação 1}$$

Onde M_b e M_r são, respectivamente, o valor de RGB (média de pixels) na ausência e presença de dos metais em estudo, C_{metal} é a concentração referente ao chumbo e ao mercúrio, por fim , a e b são a sensibilidade analítica e o coeficiente linear, respectivamente.

A curva analítica foi obtida utilizando o metodo proposto, com a solução de DT-CCl₄ na concentração de 10 g/L e as soluções contendo o chumbo ou mercúrio foram diluídas com tampão de ácido bórico 0,12 mol/L, nas concentrações apresentadas na Tabela 5. Nesta etapa, os parâmetros avaliados foram LOD (limite de detecção), LOQ (limite de quantificação) e RSD (desvio padrão relativo). Os cálculos relativos aos limites de detecção (3σ) e de quantificação (10σ) foram realizados de acordo com as Equações 2 e 3:

$$LOD = C_{\text{branco}} - 3 Sb / ac \quad \text{Equação 2}$$

$$LOQ = C_{\text{branco}} - 10 Sb / ac \quad \text{Equação 3}$$

Onde C_{branco} = concentração relativa ao sinal do branco, sb corresponde ao desvio padrão do branco analítico ($n=10$)., enquanto a_c equivale ao coeficiente angular da curva

analítica obtido por meio da metodologia proposta. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com a Equação 4:

$$RSD = (sp/xp) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde sp equivale ao desvio padrão referente a um determinado padrão analítico de para o Pb^{2+} e Hg^{2+} dentro da faixa linear e xp corresponde ao valor médio encontrado para este padrão ($n = 10$).

4.4.5 Ensaio de recuperação com amostra de água

O método proposto foi utilizado para a determinação do analitos (Pb^{2+} e Hg^{2+}) em amostras de águas naturais do Rio São Francisco na cidade ribeirinha de Penedo. Foram coletadas três amostras de água no mesmo local (Santo antônio, Penedo-AL; $10^{\circ}17'05.3''S$ $36^{\circ}35'06.4''W$). Todas as coletas foram feitas numa profundidade média de 15 a 30 cm. As amostras foram armazenadas em frascos de 500 mL de polietileno, esterelizados utilizando uma solução de 10% de HNO_3 (Adaptação de JUNIOR,2017).

As amostras foram submetidas a filtração com membrana de $0,45 \mu m$ e posteriormente foi realizada a diluição das amostras em tampão, sem a necessidade de procedimentos adicionais para o preparo de amostra. Seguidamente, padrões do chumbo e do mercúrio foram adicionados às amostras e medições colorimétricas foram realizadas de acordo com o método proposto.

4.4.6 Análise termogravimétrica

O comportamento térmico dos materiais (Ditizona; $HgSO_4$; $Pb(NO_3)_2$; Ditizona + Hg^{2+} ; Ditizona + Pb^{2+}) foi avaliado por análise termogravimétrica (TGA), uma técnica, na qual, a massa de uma substância é medida em função da temperatura com uma atmosfera controlada. A amostra pode ser aquecida com uma velocidade selecionada ou pode ser mantida a uma temperatura constante (modo isotérmico), visando a sua decomposição térmica. Dessa forma, por meio da análise TGA é possível identificar mudanças de peso relacionado com volatilização de compostos de amostra, decomposição, reações redox ou outras mudanças.

Ao sofrer degradação, o material perde massa sob a forma de produtos voláteis e o sensor registra essa perda de massa. O resultado de análise, em geral, é expresso sob a forma de um gráfico cuja abscissa apresenta os registros de temperatura e a ordenada, o percentual de massa perdida ou ganho. Logo, pode-se avaliar a eficiência da metodologia empregada nesta etapa.

Para essas análises foi utilizada um equipamento de análise térmica da shimadzu (TGA 60H, modelo 062021, Brasil) , o qual, encontra-se no laboratório de síntese de catalisadores, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Utilizou-se aproximadamente 10,0 mg do chumbo e do mercúrio e 5,0 mg da ditizona, nessa primeira etapa foi analisada a parte solida de cada um dos reagentes. Para a análise do complexo, as amostras foram preparadas e adicionadas nos dispositivos de papel e assim levadas ao TGA. A taxa de aquecimento utilizada foi de 10°C/min, até uma temperatura de 1000°C. A análise foi realizada em atmosfera de nitrogênio, inerte, (vazão de gás 1000 mL/min). Na sequências os resultados foram tratados no origin8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Extração e aplicação da Ditizona

O método espectrofotométrico baseado em ditizona é um método analítico padrão que tem sido amplamente utilizado para detecção de íons de mercúrio/íons de chumbo com alta precisão. A ditizona reage com íons de mercúrio para formar um complexo e então é extraída para a fase orgânica. A absorbância da fase orgânica foi então medida para detectar os teores de Hg^{2+} . No entanto, este método é limitado pela operação trabalhosa e demorada. Além disso, são necessários instrumentos caros e grandes quantidades de solvente orgânico. A técnica de detecção colorimétrica, baseada na análise dos sinais da cor apresentada no dispositivo analítico de papel vem recebendo considerável atenção para detecção dos metais pesados.

Dessa forma, nos experimentos iniciais foi utilizada a ditizona- CCl_4 como reagente colorimétrico e depositada no canal do dispositivo utilizado para realizar as otimizações, no entanto, a barreira hidrofóbica de cera foi rompido pelo reagente devido ao uso de solvente orgânico (Figura 12A), além disso, se fosse diminuída a quantidade do volume de $1\ \mu\text{L}$ para $0,5\ \mu\text{L}$ não preenchia a totalidade do espaço no reservatório. Para resolver este problema, a ditizona foi preparada em líquido aquoso, onde uma solução de NaOH $1,0\ \text{mol/L}$ e uma ditizona- CCl_4 $10,0\ \text{g/L}$ foram misturadas de modo que a ditizona foi extraída para solução aquosa.

Figura 12: μPAD na presença de Ditizona dissolvida em CCl_4 (A) e μPAD na presença de ditizona dissolvida em CCl_4 e extraída com a solução de NaOH (B).



Fonte: Autora, 2022.

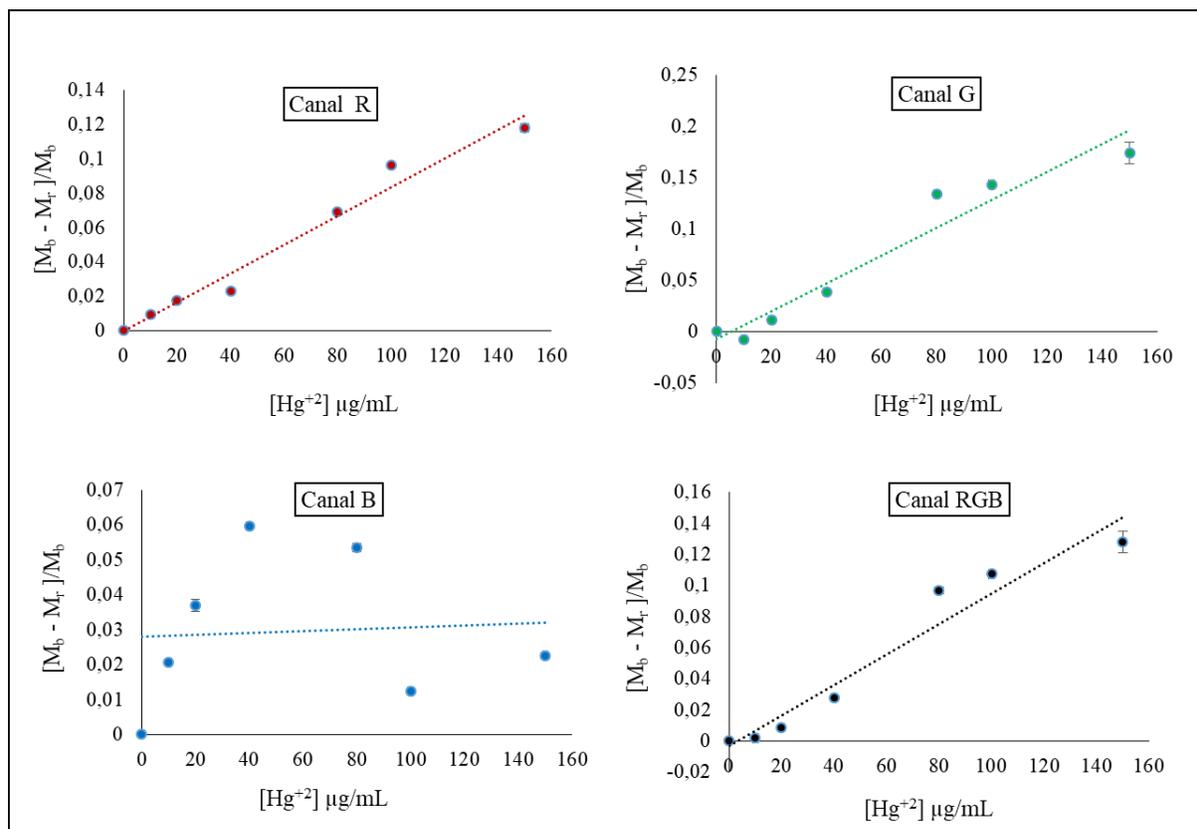
Após a extração da ditizona para solução aquosa, o agente colorimétrico foi aplicado no reservatório do dispositivo, evitando assim a quebra da barreira de cera pelo reagente (Figura 12B) e logo foi colocado para secar ao ar à temperatura ambiente. Uma solução contendo íons de mercúrio/íons de chumbo foi então colocada no reservatório circular por pipetagem, e assim foi deixada novamente em temperatura ambiente para total secagem do dispositivo e posteriormente análise das cores apresentadas.

5.2 Avaliação da Concentração do Hg^{2+}

Quando foi pipetado a solução contendo íons de mercúrio á medida que a solução se espalhava no canal devido à ação capilar, ocorreu a reação do analito com a ditizona formando assim um complexo colorido insolúvel, que precipitou no dispositivo formando uma faixa colorida. Quanto mais analito era adicionado, ou seja, quanto maior a concentração do metal, mais reagente colorimétrico (ditizona) no canal seria consumido, logo maior a intensidade da cor apresentada no reservatório. Os complexos de mercúrio formado com a ditizona apresentaram coloração magenta.

Inicialmente foi avaliada a concentração do mercúrio na presença da ditizona extraída presente no reservatório do dispositivo. A correlação avaliada foi o valor de média de intensidade de pixel corrigido (IPC), obtida através de um tratamento matemático a fim de convertê-los a um comportamento ascendente (equação 1). Sendo assim, visando um sistema de cor que pudesse descrever melhor a variação de IPC, foi avaliado os resultados para a escala RGB. Os Canais RGB, vermelho(R), verde(G) e azul (B) foram estudados separadamente pelo método colorimétrico. Como pode ser visto na Figura 13.

Figura 13: Estudo da variação de concentração do Hg^{2+} em solução tampão de ácido bórico (0,12 mol/L), pH = 9, na presença da solução de ditizona- CCl_4 (10 g/L), por meio das cores R, G, B e RGB.



Fonte: Autora, 2022.

Tabela 6: Comparação entre os coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de correlação de Pearson (R) e inclinação da reta (α) para os canais de cor RGB, R, G e B na presença do Hg^{2+} .

CANAIS	RGB	VERMELHO	VERDE	AZUL
R^2	0,944	0,974	0,939	0,004
R	0,971	0,987	0,969	0,006
α	$6,0 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-3}$	$9,0 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-5}$

Fonte: Autora, 2022.

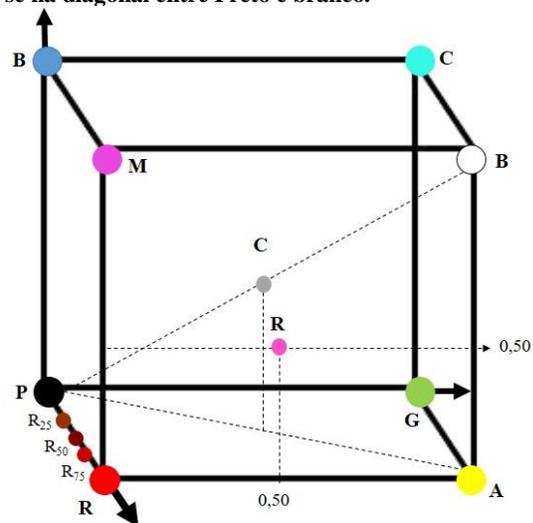
O comportamento na escala de cor R, G, B e RGB pode ser melhor avaliado pelos valores da Tabela 6, pois encontra-se os dados de inclinação da reta, coeficiente de determinação e coeficiente de correlação de Pearson para os canais supracitados. Com um

valor de $R = 0,987$ e $\alpha = 8,0 \times 10^{-3}$ o canal vermelho foi escolhido como o mais satisfatório, além disso, analisando graficamente, observa-se na Figura 13 os dados provenientes dos canais RGB e verde, apresentam coeficientes superiores a 0,9, já no canal azul os dados são insatisfatórios quando comparados com os canais R, G, e RGB, logo, a maior correlação da intensidade da cor com a concentração do analito em questão foi apresentada no canal vermelho, proporcionando uma boa sensibilidade para o dispositivo em questão.

Segundo Burger e Burge (2009), o espaço de cores RGB pode ser representado por um cubo unitário tridimensional em que as três cores primárias formam o eixo das coordenadas. Os valores RGB são positivos e está na faixa $[0, C_{\max}]$; para a maioria das imagens digitais, $C_{\max} = 255$. Toda cor possível C_i corresponde a um ponto dentro do cubo de cores RGB na forma: $C_i = (R_i, G_i, B_i)$, onde $0 \leq R_i, G_i, B_i \leq C_{\max}$. Os valores RGB são geralmente normalizados para o intervalo $[0, 1]$ de modo que o espaço de cor resultante forma um cubo unitário (Figura 14). O ponto $S = (0, 0, 0)$ corresponde à cor preta, $W = (1, 1, 1)$ corresponde à cor branca e todos os pontos que se encontram na diagonal entre S e W são tons de cinza criados a partir de componentes de cores iguais $R = G = B$ (BURGER e BURGE 2009).

Figura 14: Representação do espaço de cores do Modelo RGB e para efeito de ilustração, a apresentação das faces contendo as possíveis cores existentes. As cores primárias vermelho, verde e azul, formam o sistema de coordenadas. O vermelho "puro" Cor, verde, azul, ciano, magenta e amarelo estão nos vértices do cubo de cores. Todos os tons de cinza, dos quais C é um exemplo, situam-se na diagonal entre Preto e branco.

Ponto	Cor	R	G	B
P	Preto	0,00	0,00	0,00
R	Vermelho	1,00	0,00	0,00
A	Amarelo	1,00	1,00	0,00
G	Verde	0,00	1,00	0,00
C	Ciano	0,00	1,00	1,00
B	Azul	0,00	0,00	1,00
M	Magenta	1,00	0,00	1,00
B	Branco	1,00	1,00	1,00
C	50% cinzento	0,50	0,50	0,50
R ₇₅	75% Vermelho	0,75	0,00	0,00
R ₅₀	50% Vermelho	0,50	0,00	0,00
R ₂₅	25% Vermelho	0,25	0,00	0,00
R	Rosa	1,00	0,50	0,50



Fonte: Adaptação de OLIVEIRA *et al.*, 2020

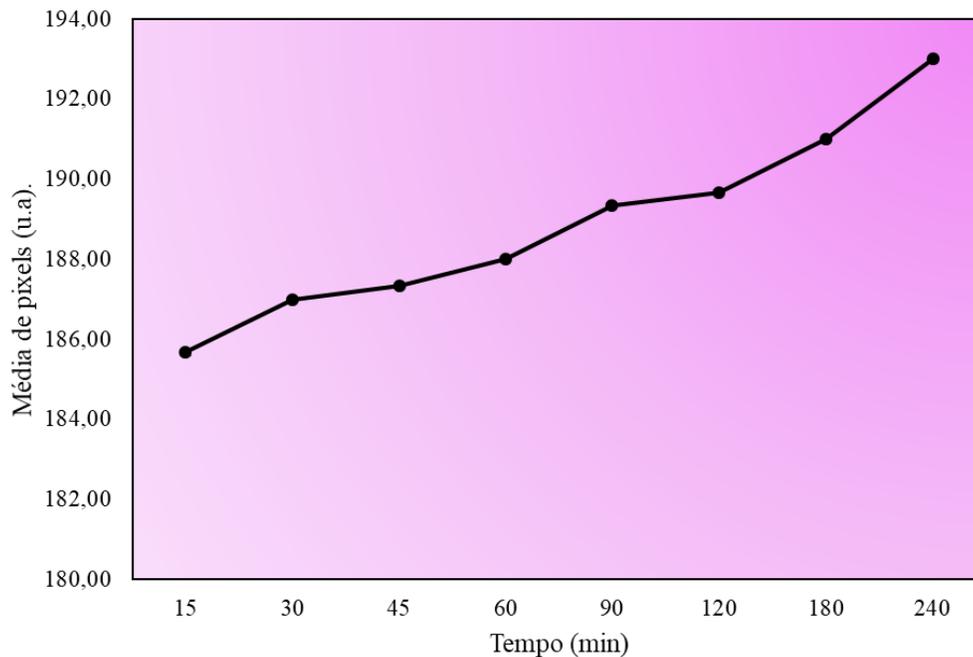
Neste contexto, quando foi obtido a média da intensidade de cores apresentada nos dispositivos, foi possível verificar que os valores RGB é diretamente proporcional à concentração do íon mercúrio e pôde ser usado para quantificação em amostras. Como pode ser observado na Figura 13 e Tabela 6, a curva de calibração obtida com o uso da intensidade de cor, o canal vermelho obteve boa linearidade e inclinação, uma vez que a cor magenta derivada do complexo formado entre Hg^{2+} e DT- CCl_4 é a cor complementar do canal vermelho, como pode ser observado na Figura 12. Portanto estes valores foram utilizados para a pesquisa.

5.3 Teste de estabilidade de cor para o Hg^{2+}

A estabilidade da cor gerada nos dispositivos foi avaliada. Assim, mantendo fixa uma concentração de íons de mercúrio ($100 \mu\text{g/mL}$) e utilizando os parâmetros otimizados nas etapas anteriores, a intensidade de pixels foi utilizada como parâmetro analítico para comparar os dados obtidos (Figura 15). Evidencia-se pelo gráfico que nas 4 horas de experimento e observação, a cor obtida nos dispositivos não apresenta alteração expressiva, com variação de apenas 5% nesse intervalo de tempo, no entanto foi necessário limitar um tempo para realizar as medições e obter um padrão de cor. Além disso, percebe-se que, a cor apresentada no dispositivo parte de uma menor intensidade de pixels para um valor maior (partindo da mais escura para a mais clara), mesmo com pouca variação, o complexo formado apresenta uma constante de estabilidade de $2,0 \times 10^{40}$, sendo assim, um valor considerado alto, logo é formado um complexo muito estável.

Sendo assim, para padronizar a medição de cor e evitar possíveis erros definiu-se o tempo para medição da cor dos dispositivos em 20 min. Este tempo possibilita a análise e avaliação dos dispositivos sem comprometer a frequência analítica, o que é um parâmetro importante para dispositivos baseados em papel. Não obstante, a utilização de estratégias para melhorar a estabilidade e homogeneidade da cor dos μPADs foram realizadas na etapa subsequente da otimização do método proposto.

Figura 15: Gráfico com os resultados obtidos para o teste de variação da cor ao longo do tempo na presença do Hg^{2+} com concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ em solução tampão de ácido bórico, $\text{pH} = 9,0$. Analisado no canal vermelho (R).

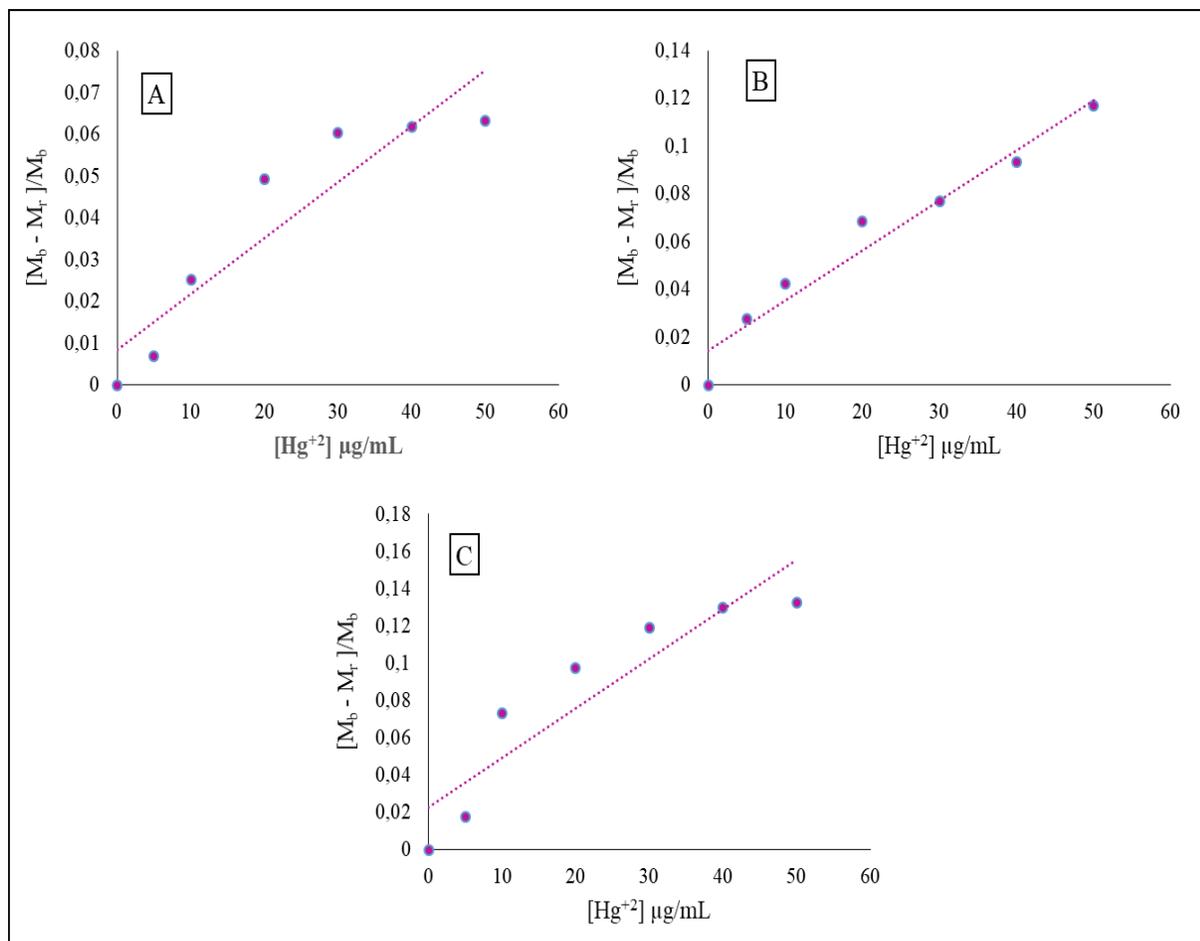


Fonte: Autora, 2022.

5.4 Avaliação da influência do CTAB com o Hg^{2+}

Baseado na estratégia de Silva e colaboradores (2018), CTAB foi avaliado neste trabalho para verificar se uma melhoria significativa na intensidade de cor pudesse ser observada na presença desse tensoativo catiônico. Para tanto, duas soluções com diferentes concentrações de CTAB (6 mM e 12 mM) foram adicionadas ao meio reacional e curvas analíticas foram construídas para avaliar a influência desse composto, analisando apenas no canal R(vermelho) (Figura 16).

Figura 16:Gráfico com os resultados referentes à avaliação da influência de CTAB na determinação de íons de Hg^{2+} , utilizando ditizona como sonda colorimétrica. Analisada no canal vermelho (R). (A) Mercúrio e ditizona ;(B) Mercúrio +ditizona+CTAB (12mM); (C) Mercúrio +ditizona+CTAB (6 mM).



Fonte: Autora, 2022.

Tabela 7: Comparação entre os coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de correlação de Pearson (R) e inclinação da reta (α), para avaliação da influência do CTAB na determinação de íons de Hg^{2+} .

	A	B	C
R^2	0,856	0,954	0,845
R	0,925	0,976	0,919
α	$1,3 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$

Fonte: Autora, 2022.

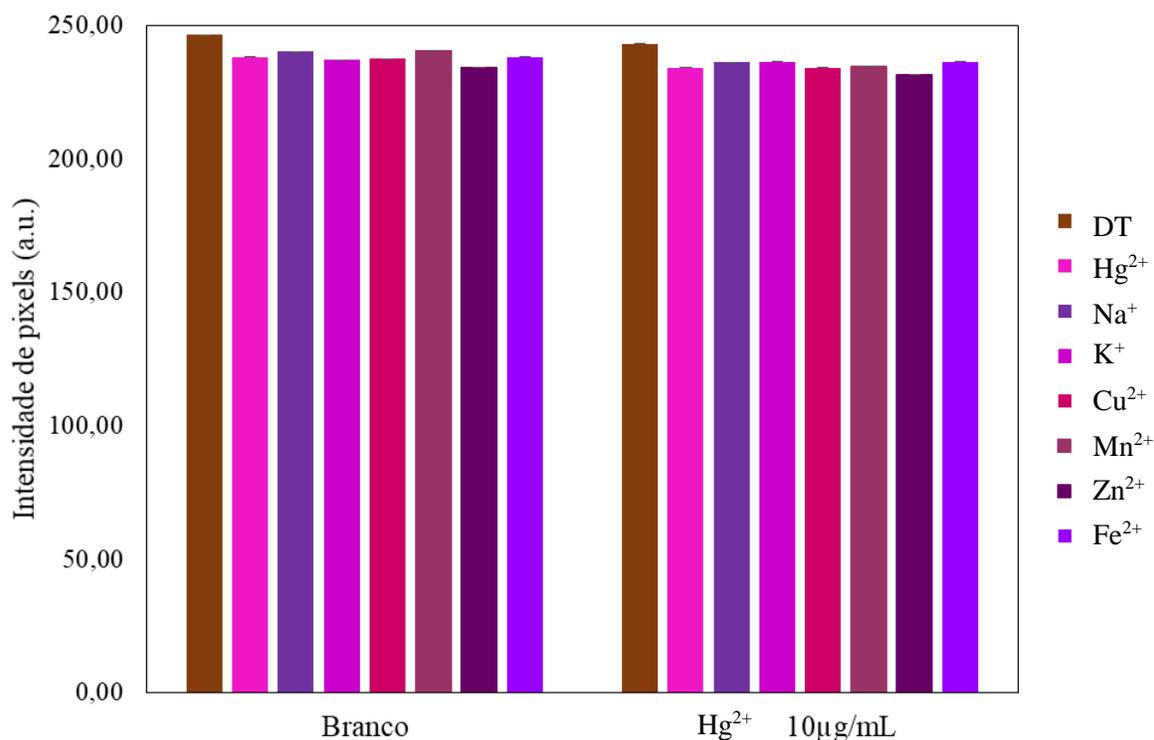
Como pode ser observado na Figura 16 e na Tabela 7, a presença de CTAB no meio reacional proporcionou um ganho significativo na inclinação das curvas analíticas quando comparado com a curva de referência e, por conseguinte, na sensibilidade analítica. Desta forma, optou-se por utilizar CTAB na concentração de 12 mM no meio reacional já que foi obtido um ganho significativo na sensibilidade alcançado com a inclusão do tensoativo catiônico no sistema

5.5 Ensaio de interferentes

Inicialmente, para a avaliação dos interferentes, um total de 6 espécies foram avaliadas para verificação da seletividade do método proposto frente aos analitos em estudo (Hg^{2+} / Pb^{2+}). Para este estudo, uma interferência de $\pm 5\%$ no sinal do branco analítico e/ou sistema na presença do Hg^{2+} , foi considerado como parâmetro de avaliação. Dessa forma, foi utilizada uma solução contendo íons de mercúrio numa concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, a qual, está dentro da faixa linear da metodologia proposta. As concentrações toleráveis destes possíveis interferentes são 800 $\mu\text{g/mL}$ para Na^+ e K^+ , 190 $\mu\text{g/mL}$ para Fe^{3+} e Mn^{2+} , por fim, 5 $\mu\text{g/mL}$ para Zn^{2+} e Cu^{2+} .

Com base nos resultados apresentados na Figura 17 e Tabela 8, evidencia-se que a interferência das espécies para o método proposto foi relativamente baixa, com valores de intensidade de pixels na faixa de 97,53 – 99,71 % com relação aos valores obtidos como referência na ausência e presença do mercúrio. Desta forma, tem-se que a metodologia proposta apresenta baixa interferência com relação as espécies comumente encontradas em águas naturais.

Figura 17: Resultados obtidos para a avaliação de possíveis interferentes ao método proposto na ausência e na presença do mercúrio.



Fonte: Autora, 2022.

Tabela 8: Espécies avaliadas como possíveis interferentes ao método proposto na ausência e na presença do Hg²⁺.

Interferente	Concentração avaliada (µg/mL)	Interferências das espécies
Na ⁺	800	98,33 %
K ⁺	800	99,71 %
Cu ²⁺	5	98,59 %
Mn ²⁺	190	97,53 %
Zn ²⁺	5	98,72 %
Fe ³⁺	190	99,29 %

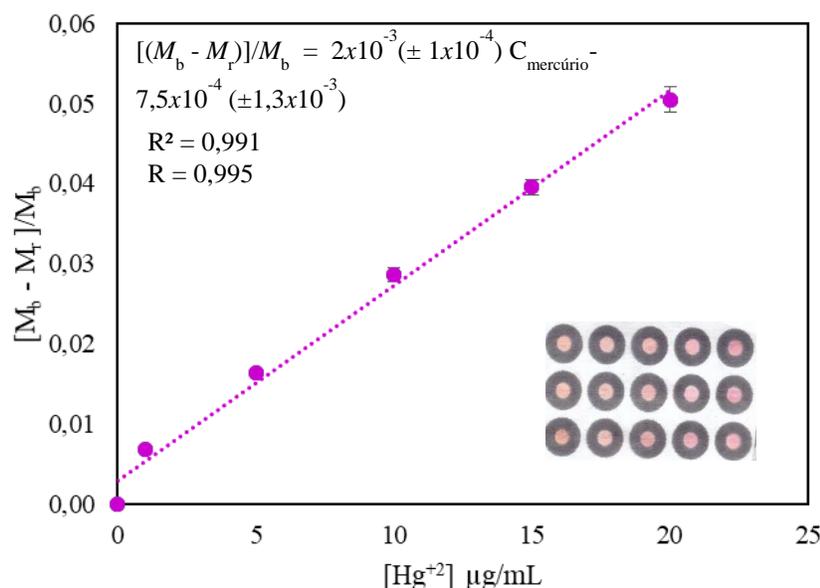
Fonte: Autora, 2022.

5.6 Figuras de mérito e curva analítica para o Hg²⁺

Como a concentração do mercúrio está diretamente relacionada à cor gerada pelo método proposto, foram estabelecidas as Figuras de mérito (Figura 18). Em condições ótimas, o método proposto apresenta uma faixa linear de 1 - 20 µg/mL, com coeficiente de

determinação de $R^2 = 0,991$ e com um coeficiente de correlação linear de $R = 0,989$, correspondendo a equação $[(M_b - M_r)]/M_b = 2 \times 10^{-3} (\pm 1 \times 10^{-4}) C_{\text{mercúrio}} - 7,5 \times 10^{-4} (\pm 1,3 \times 10^{-3})$. Limite de detecção encontrado foi de $0,82 \mu\text{g/mL}$ com limite de quantificação foi de $1,12 \mu\text{g/mL}$ e o método proposto é preciso visto que o desvio padrão relativo (RSD) foi calculado como $1,73\%$ e $2,42\%$ para concentrações do mercúrio de 5 e $15 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A curva analítica construída para a metodologia proposta está presente na Figura 18 abaixo:

Figura 18: Curva analítica otimizada para a determinação do Hg^{2+} de acordo com o método proposto. Inset: Foto do dispositivo utilizado para a construção da curva analítica.



Fonte: Autora, 2022.

5.7 Ensaio de recuperação com o Hg^{2+}

O ensaio de recuperação é uma ferramenta utilizada para a validação de metodologias analíticas e possibilita o entendimento sobre o efeito da matriz nas amostras. Diante dos resultados apresentados no ensaio de interferentes obtidos na etapa anterior, evidenciam que as espécies avaliadas têm pouca ou nenhuma interferência no sinal analítico mensurado. Este comportamento, de fato, foi observado para o sistema proposto. De acordo com os dados presentes na Tabela 9, têm-se que as recuperações medidas foram satisfatórias.

Tabela 9: Resultados obtidos no teste de recuperação utilizando a metodologia proposta para a determinação do mercúrio em amostra de águas naturais do Rio São Francisco da cidade ribeirinha de Penedo.

Amostra	Mercúrio ($\mu\text{g/mL}$)		recuperação (%)
	Adicionado	Recuperado	
	0	0,38	-
Água do Rio São Francisco de Penedo	5	5,25	105,00
	10	10,23	102,30
	15	15,10	100,67
	20	20,09	100,45
	25	25,83	103,32

Fonte: Autora, 2022.

A amostra de água apresentou concentração de Hg^{2+} abaixo do limite de detecção. As porcentagens de recuperação variaram entre 100,45 e 105%. Considerando que uma variação de $\pm 10\%$ é tida como razoável (VAZ *et al.*, 2017).

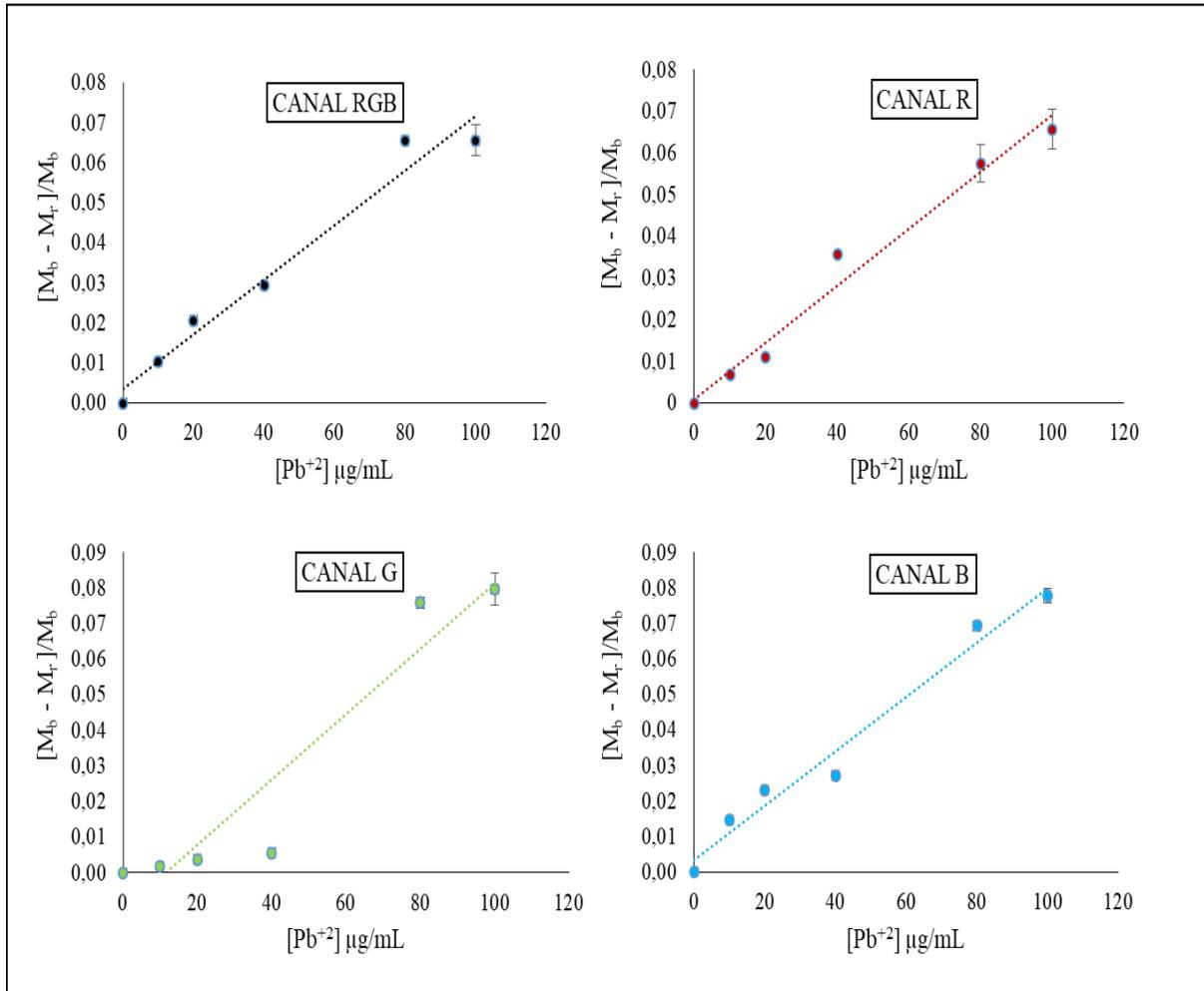
5.8 Avaliação da Concentração do Pb^{2+}

Quando a solução contendo íons de chumbo foi pipetada no dispositivo á medida que a solução se espalhava no canal devido à ação capilar, ocorreu a reação do analito com a ditizona formando assim um complexo colorido insolúvel, apresentando uma faixa colorida. Assim como foi observado na reação entre a ditizona e os íons de mercúrio, semelhantemente ocorreu na reação entre a ditizona e os íons de chumbo, pois quanto maior a concentração do metal, mais reagente colorimétrico (ditizona) no canal seria consumido, logo maior a intensidade da cor apresentada no reservatório. Os complexos de chumbo formado com a ditizona apresentaram coloração vermelho claro.

Inicialmente foi avaliada a concentração do chumbo na presença da ditizona extraída. A correlação avaliada foi o valor de média de intensidade de pixel corrigido (IPC), obtida através de um tratamento matemático a fim de convertê-los a um comportamento ascendente (equação 1). Senso assim, visando um sistema de cor que pudesse descrever melhor a variação de IPC, foi avaliado os resultados para a escala RGB. Os Canais RGB,

vermelho, verde e azul foram estudados separadamente pelo método colorimétrico. Como pode ser visto na Figura 19.

Figura 19: Estudo da variação de concentração do Pb^{2+} em solução tampão de ácido bórico (0,12 mol/L), pH=9,0, na presença da solução de ditizona- CCl_4 (10 g/L), por meio das cores R,G,B e RGB.



Fonte: Autora, 2022.

Tabela 10: Comparação entre os coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de correlação de Pearson (R) e inclinação da reta (α) para os canais de cor RGB, R, G e B na presença do Pb^{2+} .

CANAIS	RGB	VERMELHO	VERDE	AZUL
R^2	0,9688	0,987	0,903	0,976
R	0,984	0,988	0,950	0,987

α	$7,0 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-4}$
----------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

Fonte: Autora, 2022.

O comportamento na escala de cor RGB pode ser melhor avaliado pelos valores da Tabela 10, pois encontra-se os valores de inclinação da reta e coeficiente de correlação de Pearson para os canais supracitados. Com um valor de $R = 0,987$ e inclinação da reta de $7,0 \times 10^{-4}$ o canal vermelho foi escolhido como o mais satisfatório.

Na determinação do chumbo também foi obtido a média da intensidade de cores apresentada nos dispositivos, sendo possível verificar que dos valores RGB é diretamente proporcional à concentração deste metal e pode ser usado para quantificação em amostras. Como pode ser observado na Figura 19 e Tabela 10, a curva de calibração obtida com o uso da intensidade do canal de cor vermelho obteve a maior linearidade e inclinação, uma vez que a cor vermelho claro derivada do complexo formado entre Pb^{2+} e DT- CCl_4 é a cor primária do canal RGB, como pode ser observado na Figura 14, portanto estes valores foram utilizados para a pesquisa.

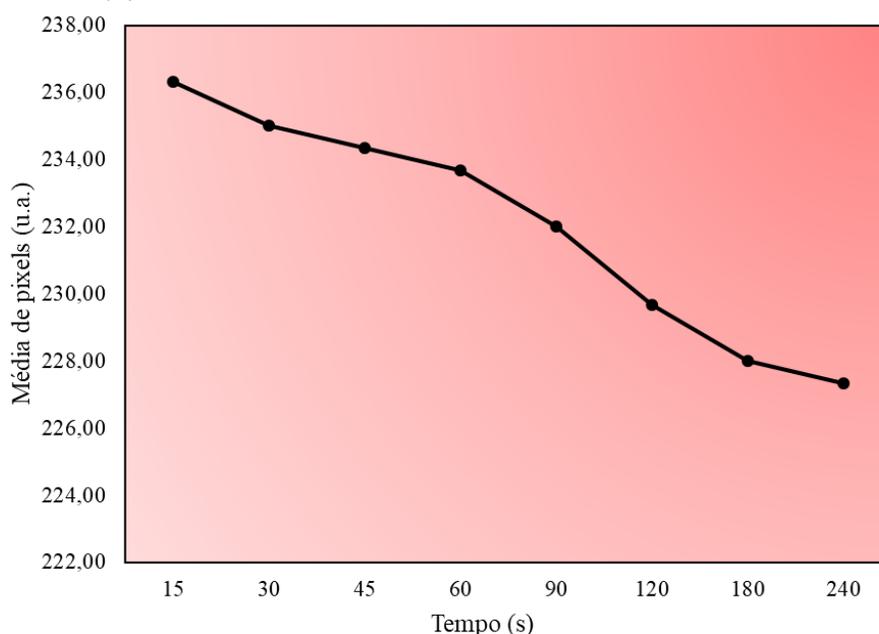
5.9 Teste de estabilidade de cor para Pb^{2+}

A estabilidade da cor gerada nos dispositivos foi avaliada. Assim, mantendo fixa uma concentração de íons de chumbo ($100 \mu\text{g/mL}$) e utilizando os parâmetros otimizados nas etapas anteriores, a intensidade de pixels foi utilizada como parâmetro analítico para comparar os dados obtidos (Figura 20). Evidencia-se pelo gráfico que nas primeiras 4 horas de experimento e observação a cor obtida nos dispositivos não apresenta alteração expressiva, com variação de apenas 10% a 15% nesse intervalo de tempo, no entanto foi necessário limitar um tempo para realizar as medições e obter um padrão de cor. Sendo assim, para padronizar a medição de cor e evitar possíveis erros definiu-se o tempo para medição da cor dos dispositivos em 20 min. Este tempo possibilita a análise e avaliação dos dispositivos sem comprometer a frequência analítica, o que é um parâmetro importante para dispositivos baseados em papel.

Além disso, foi observado que a cor apresentada no dispositivo parte de uma maior intensidade de pixels para um menor valor (partindo do mais claro para o mais escuro).

Quando comparado com o gráfico de estabilidade do complexo entre a ditizona e o mercúrio, a variação de cor para o produto colorimétrico entre a ditizona e o chumbo é um pouco maior, isto pode ser justificado pela constante de estabilidade do complexo formado sendo de $1,4 \times 10^{14}$, a qual, é menor que a constante de estabilidade entre a ditizona e o mercúrio. Não obstante, a utilização de estratégias para melhorar a estabilidade e homogeneidade da cor dos μ PADs foram realizadas na etapa subsequente da otimização do método proposto.

Figura 20: Gráfico com os resultados obtidos para o teste de variação da cor ao longo do tempo na presença do Pb^{2+} com concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ em solução tampão de ácido bórico, $\text{pH} = 9,0$. Analisado no canal vermelho (R).

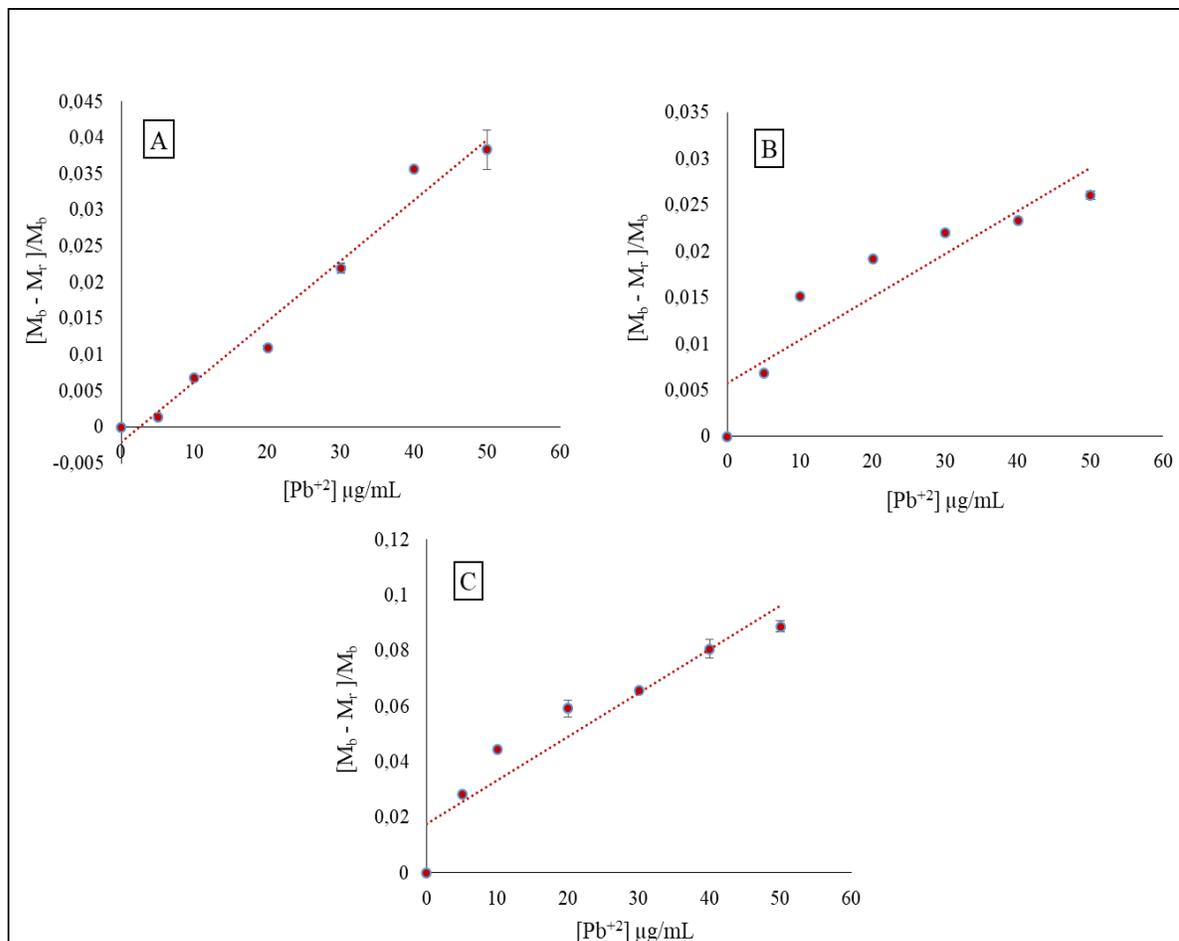


Fonte: Autora 2022.

5.10 Avaliação da influência do CTAB com o Pb^{2+}

Visto que o resultado para o complexo formado entre o mercúrio e ditizona na presença do CTAB, apresentou uma resposta significativa, proporcionando uma melhor intensidade na cor, o CTAB foi avaliado na presença de íons de Pb^{2+} para verificar se uma melhoria na intensidade de cor pudesse ser observada na presença desse tensoativo catiônico. Para tanto, as mesmas concentrações de CTAB (6 mM e 12 mM) foram avaliadas ao meio reacional e assim as curvas analíticas foram construídas para avaliar a influência desse composto (Figura 21).

Figura 21:Gráfico com os resultados referentes à avaliação da influência de CTAB na determinação de íons de Pb^{2+} , utilizando ditizona como sonda colorimétrica. Analisada no canal vermelho (R). (A) Chumbo e ditizona ;(B) Chumbo+ditizona+CTAB (12mM); (C) Chumbo+ditizona+CTAB (6 mM).



Fonte: Autora, 2022.

Tabela 11: Comparação entre os coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de correlação de Pearson (R) e inclinação da reta (α), para avaliação da influência do CTAB na determinação de íons de Pb^{2+} .

	A	B	C
R^2	0,973	0,836	0,895
R	0,986	0,914	0,946
α	$1,4 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-4}$	$7,1 \times 10^{-4}$

Fonte: Autora, 2022.

Baseado nos resultados apresentados na Figura 21 e Tabela 11, a presença de CTAB no meio reacional não proporcionou um ganho significativo na inclinação das curvas

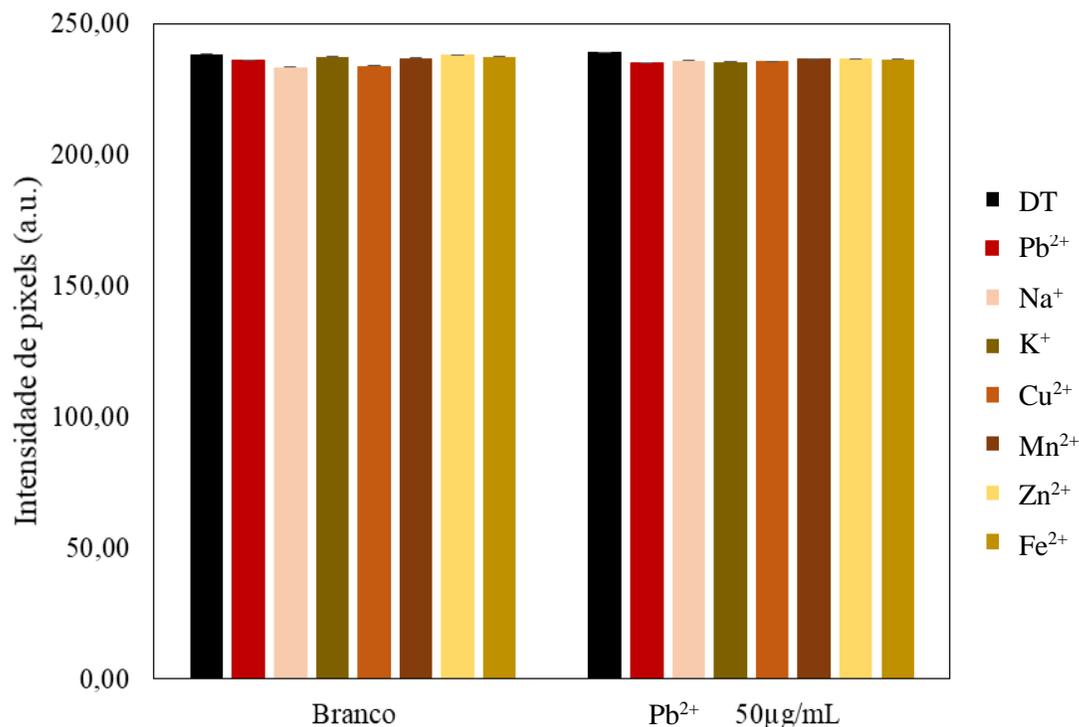
analíticas quando comparado com a curva de referência e, por conseguinte, na sensibilidade analítica. Desta forma, optou-se por não utilizar CTAB no meio reacional, visto que não foi obtido um ganho na sensibilidade com a inclusão do tensoativo catiônico no sistema.

5.11 Ensaio de Interferentes

Como já foi supracitado, para a avaliação dos interferentes, um total de 6 espécies foram avaliadas, para tanto, uma interferência de $\pm 5\%$ no sinal do branco analítico e/ou sistema na presença do Pb^{2+} , foi considerado como parâmetro de avaliação. Dessa forma, foi utilizada uma solução contendo íons de chumbo numa concentração de $50 \mu\text{g/mL}$. As concentrações toleráveis dos possíveis interferentes são apresentadas na Tabela 12.

Com base nos resultados observados na Figura 22 e Tabela 12, evidencia-se que a interferência das espécies para o método proposto foi relativamente baixa, com valores de intensidade de pixels na faixa de 99,23 – 101,14 % com relação aos valores obtidos como referência na ausência e presença do chumbo. Desta forma, tem-se que a metodologia proposta apresenta baixa interferência com relação as espécies comumente encontradas em águas naturais.

Figura 22: Resultados obtidos para a avaliação de possíveis interferentes ao método proposto na ausência e na presença do Chumbo.



Fonte: Autora, 2022.

Tabela 12: Espécies avaliadas como possíveis interferentes ao método proposto na ausência e na presença do Pb²⁺.

Interferente	Concentração avaliada (µg/mL)	Interferências das espécies
Na ⁺	800	101,14 %
K ⁺	800	99,23 %
Cu ²⁺	5	100,71 %
Mn ²⁺	190	99,86 %
Zn ²⁺	5	99,44 %
Fe ³⁺	190	99,58 %

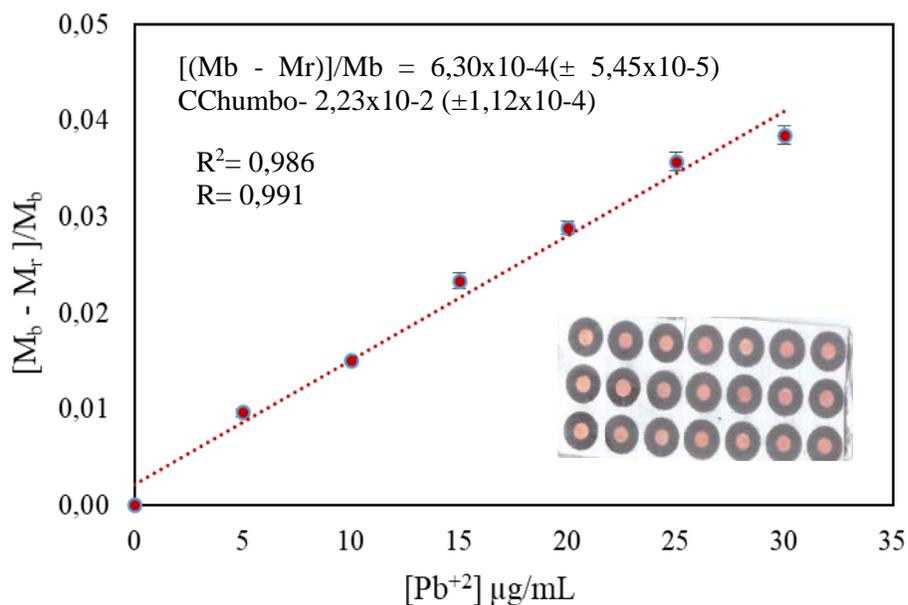
Fonte: Autora, 2022.

5.12 Figuras de mérito e curva analítica para o Pb²⁺

Como a concentração do chumbo está diretamente relacionada à cor gerada pelo método proposto, foram estabelecidas as Figuras de mérito (Figura 23). Em condições

ótimas, o método proposto apresenta uma faixa linear de 5 - 30 $\mu\text{g/mL}$, com coeficiente de determinação de $R^2 = 0,986$ e um coeficiente de correlação linear de $R = 0,991$, correspondendo a equação $[(M_b - M_r)]/M_b = 6,30 \times 10^{-4} (\pm 5,45 \times 10^{-5}) C_{\text{Chumbo}} - 2,23 \times 10^{-2} (\pm 1,12 \times 10^{-4})$. O limite de detecção encontrado foi de 0,89 $\mu\text{g/mL}$ com limite de quantificação foi de 5,35 $\mu\text{g/mL}$. O método proposto é preciso, visto que o desvio padrão relativo (RSD) foi calculado como 2,20% e 3,83% para concentrações do chumbo de 5 e 20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A curva analítica construída para a metodologia proposta está representada na Figura 23 abaixo:

Figura 23: Curva analítica otimizada para a determinação do Pb^{2+} de acordo com o método proposto. Inset: Foto do dispositivo utilizado para a construção da curva analítica.



Fonte: Autora, 2022.

5.13 Ensaio de recuperação com o Pb^{2+}

O ensaio de recuperação é uma ferramenta utilizada para a validação de metodologias analíticas e possibilita o entendimento sobre o efeito da matriz nas amostras. Diante dos resultados apresentados no ensaio de interferentes obtidos na etapa anterior, evidenciam que as espécies avaliadas têm pouca ou nenhuma interferência no sinal analítico

mensurado. Este comportamento, de fato, foi observado para o sistema proposto. De acordo com os dados presentes na Tabela 13, têm-se que as recuperações medidas foram satisfatórias.

Tabela 13: Resultados obtidos no teste de recuperação utilizando a metodologia proposta para a determinação do Chumbo em amostra de águas naturais do Rio São Francisco da cidade ribeirinha de Penedo.

Amostra	Chumbo ($\mu\text{g/mL}$)		recuperação (%)
	Adicionado	Recuperado	
	0	0,44	-
Água do Rio São Francisco de Penedo	20	20,16	100,80
	30	30,27	100,90
	40	40,52	101,30
	50	52,06	104,12
	60	60,35	100,58

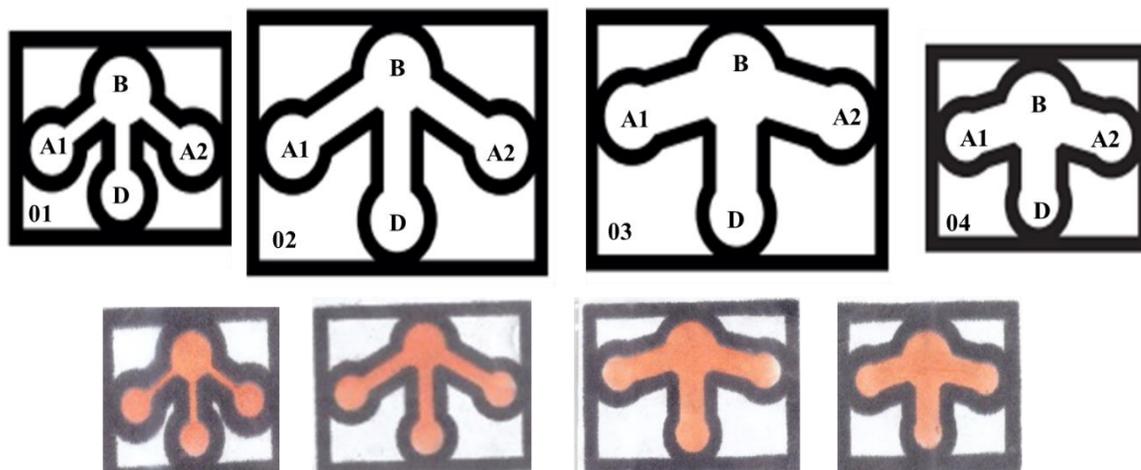
Fonte: Autora, 2022.

De acordo com os resultados pôde-se quantificar o chumbo na amostra de água. A amostra de água apresentou concentração de Pb^{2+} abaixo do limite de detecção. As porcentagens de recuperação variaram entre 100,58 e 104,12%. Considerando que uma variação de $\pm 10\%$ é tida como razoável (VAZ et al., 2017).

5.14 Avaliação do *layout* dos dispositivos

Em condições otimizadas os dispositivos 01, 02, 03 e 04 foram avaliados e esperava-se que o menor dispositivo tanto em tamanho quanto em largura (Dispositivo 01) seria o escolhido como dispositivo ideal para reduzir os volumes dos reagentes, quanto a isso foi obtido um ótimo parâmetro, entretanto o tempo de secagem era maior se comparado com o tempo de secagem do dispositivo 03 e 04, isso pode ser explicado pela maior largura do canal, pois agente colorimétrico percorreu os canais com mais facilidade. Dessa forma, para cada dispositivo foi definido um volume ideal do agente colorimétrico após as otimizações, como é possível observar na Figura 24.

Figura 24: *Layouts* dos dispositivos 01,02,03 e 04 com o volume da ditizona na área principal de 20,0; 40,0; 40,0 e 20,0 μL , respectivamente. (A1 e A2 = Áreas de detecção; B= Área do agente colorimétrico).

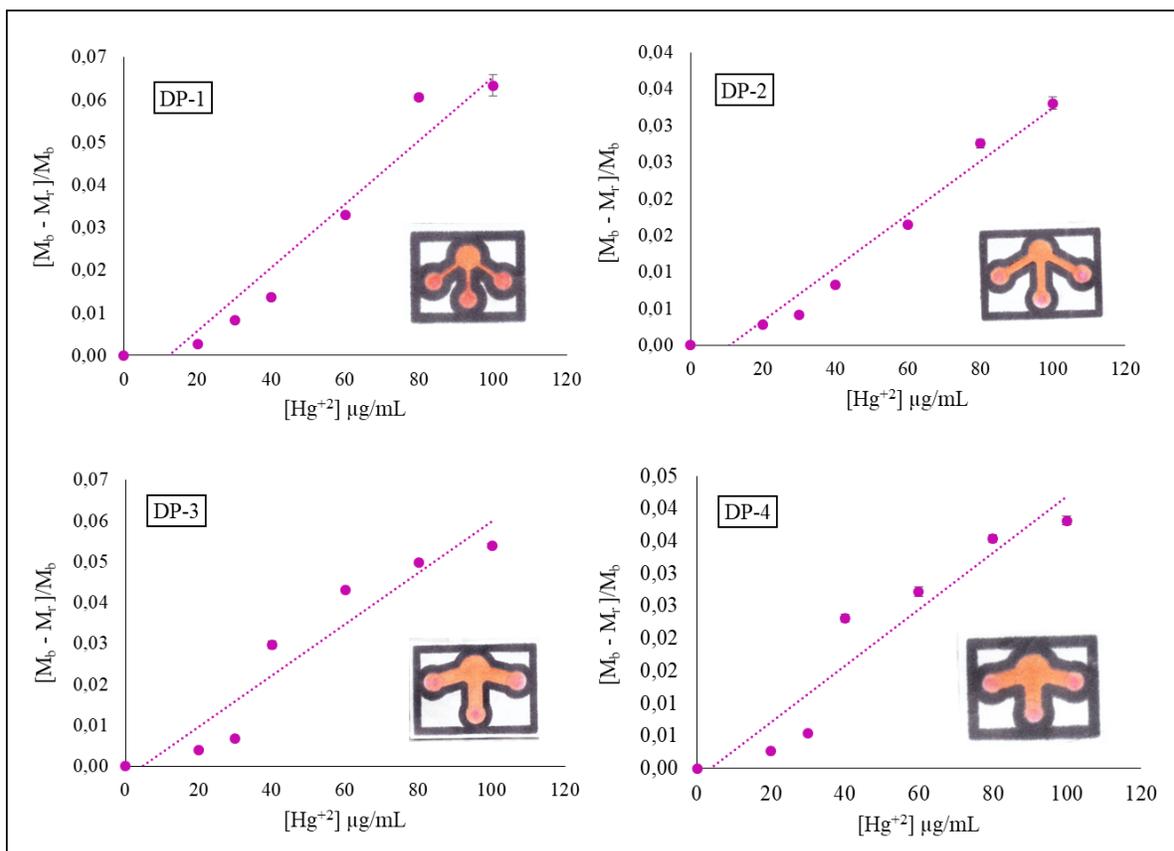


Fonte: Autora, 2022.

Estes volumes foram definidos baseado nas observações feitas durante a otimização com a ditizona, pois quando era adicionado mais de 40,0 μL nos dispositivos 02 e 03 ocorria vazamento no reservatório do dispositivo, sendo assim, iria impossibilitar realizar uma análise de forma efetiva da intensidade da cor apresentada no dispositivo. Para esses dispositivos também foi escolhido os parâmetros avaliados e otimizados anteriormente para os analitos em questão. Dessa forma, foi observado uma correlação boa tanto na presença do Hg^{2+} quanto na presença do Pb^{2+} , porém a sensibilidade do dispositivo 02 na presença do mercúrio se saiu melhor que os outros três dispositivos como pode ser visto na Figura 25 e Tabela 14.

É possível perceber na Tabela 14, de fato, as diferenças de correlação entre cada dispositivo. Tendo em vista que o dispositivo 02 obteve melhor comportamento dentre os parâmetros avaliados, no entanto, neste sensor foi usado apenas 40 μL de ditizona e o tempo de secagem foi de 40 min.

Figura 25: Gráfico da média de pixels por concentração de Hg^{2+} para os dispositivos (DP) 01, 02, 03 e 04. (pH= 9,0; Tampão ácido bórico (120 mM); CTAB (12 mM); Canal vermelho). Inset: Foto dos dispositivos utilizados para a construção da curva analítica.



Fonte: Autora, 2022.

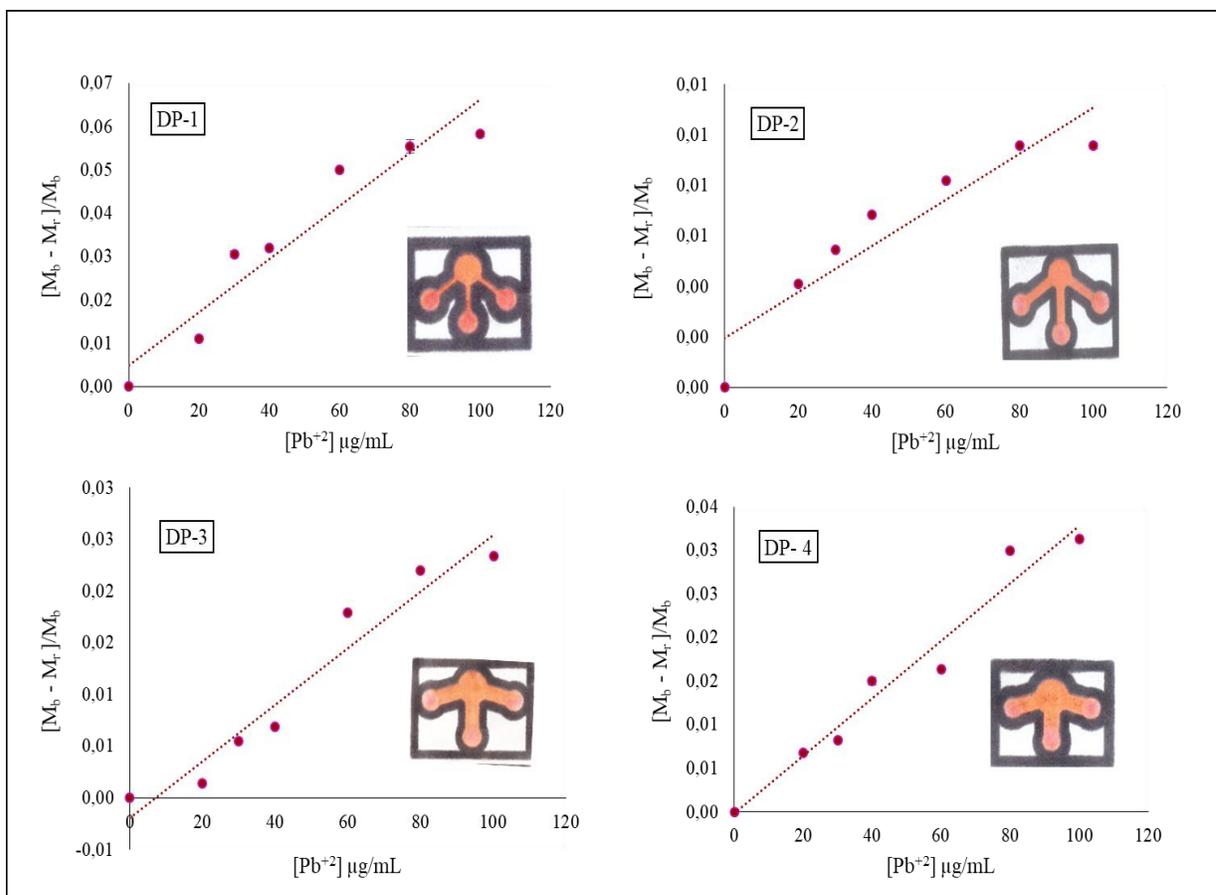
Tabela 14: Comparação entre os coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de correlação de Pearson (R) e inclinação da reta (α) para os dispositivos com o Hg^{2+} .

DISPOSITIVOS	1	2	3	4
R^2	0,935	0,962	0,908	0,909
R	0,967	0,981	0,953	0,953
α	$6,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-4}$

Fonte: Autora, 2022.

Na Figura 26, percebe-se que o dispositivo 04, na determinação do Pb^{2+} apresentou uma melhor curva analítica, podendo ser confirmado pelo seu coeficiente e inclinação da curva visto na Tabela 15.

Figura 26: Gráfico da média de pixels por concentração de Pb^{2+} para os dispositivos 01, 02, 03 e 04. (pH=9,0; Tampão ácido bórico (0,12 mol/L); CTAB ($6,0 \times 10^{-3}$ mol/L); Canal vermelho). Inset: Foto dos dispositivos utilizados para a construção da curva analítica.



Fonte: Autora, 2022.

Tabela 15: Comparação entre os coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de correlação de Pearson (R) e inclinação da reta (α) para os dispositivos com o Pb^{2+} .

DISPOSITIVOS	1	2	3	4
R^2	0,915	0,902	0,942	0,959
R	0,937	0,9182	0,969	0,980
α	$6,0 \times 10^{-4}$	$9,0 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-4}$

Fonte: Autora, 2022.

Nos dispositivos 01 e 02, é observado um menor valor para os coeficientes, porém não é uma diferença tão grande quando é comparado com os demais dispositivos, pois os

coeficientes de correlação de Pearson, tanto para o chumbo quanto para o mercúrio, foram acima de 0,9. Essa menor correlação apresentada pelos dispositivos 01 e 02 (com o Pb^{2+}) e para os dispositivos 03 e 04 (com o Hg^{2+}), pode estar relacionada com a maneira ou jeito que é realizada a pipetagem da amostra na zona de detecção, pois estes resultados apresentados foram melhores do que outros ensaios realizados. Percebeu-se que era necessário ter esse cuidado no momento da pipetagem da amostra na zona de reação, pois, tem-se uma área específica e limitada para análise da intensidade colorimétrica, sendo assim, se não for pipetada corretamente será obtido uma menor intensidade de cor nessa área de inspeção, como é visto na metodologia abordada neste trabalho.

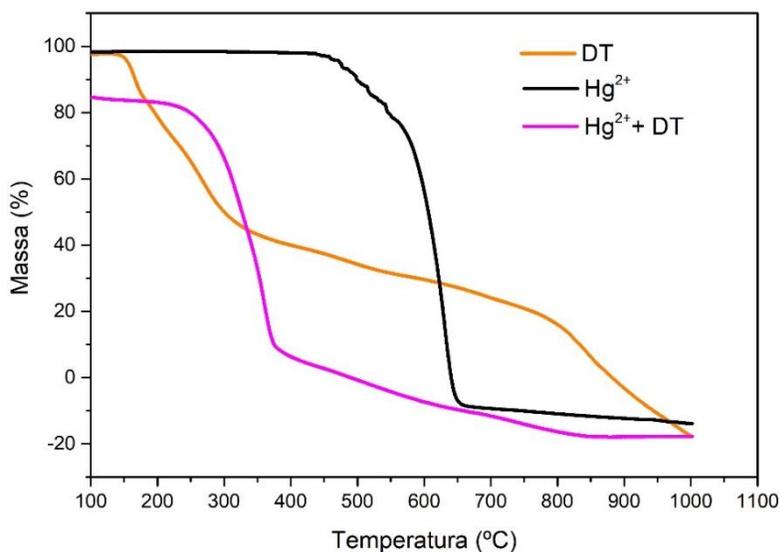
Neste contexto a escolha do dispositivo se deu por outros parâmetros, como por exemplo, o volume de ditizona, nos dispositivos 02 e 03 eram de 40 μL e 2 μL para os metais em ambos os sensores, e o tempo de secagem era de aproximadamente 40 a 50 minutos para o dispositivo 02 e 30 minutos para o dispositivo 03. Já no dispositivo 01 era utilizado 20 μL do agente colorimétrico e 1 μL para os analitos, no entanto os canais tinham uma largura de 2 mm, e após o aquecimento houve uma diminuição de 1mm, logo houve uma maior dificuldade para a ditizona percorrer os canais em direção às zonas de reação, aumentando assim o tempo de secagem e de reação do dispositivo para aproximadamente 40 minutos. Aumentar a largura do canal do mesmo, poderia melhorar a qualidade de análise desse dispositivo, no entanto, no dispositivo 04, a largura dos canais foi satisfatória, o tempo de secagem foi de 20 minutos, o volume utilizado foi de 20 μL para a ditizona e 1 μL para os metais. Portanto foi escolhido o dispositivo 04 como melhor situação para realizar a determinação simultânea do Pb^{2+} e do Hg^{2+} neste trabalho.

5.15 Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas realizadas no presente trabalho serviram para avaliar a estabilidade e o comportamento térmico dos complexos gerados e dos metais quando submetidos a uma rampa de aquecimento. Na Figura 27, pode-se observar que o complexo formado $\text{Hg}^{2+} + \text{DT}$ (4,0 mg) possui uma estabilidade menor que o Hg^{2+} , e isto pôde ser confirmado comparando os estágios de perda de massa. Para o complexo de mercúrio, a curva TGA mostra as perdas de massa em duas etapas consecutivas entre 250 °C

e 790 °C. Na primeira etapa, até 390 °C, a decomposição térmica ocorre através de um rápido processo por combustão, com perda de 77,95%. Na segunda etapa, entre 390 °C e 790 °C, a perda de massa ocorre lentamente e corresponde a 19,99% com perda total do complexo.

Figura 27: Análise termogravimétrica do Hg^{2+} , da DT(ditizona) e do complexo formado entre Hg^{2+} + DT.



Fonte: Autora, 2022.

Tabela 16: Estágios de perda de massa do Hg^{2+} , da DT(ditizona) e do complexo formado entre Hg^{2+} + DT.

Amostra	Estágios	Início (°C)	Fim (°C)	Perda de massa (mg)	Perda de massa (%)
Hg^{2+}	I	500	650	12,57	90,17
	II	-	-	-	-
DT	I	150	300	2,83	49,96
	II	300	800	4,75	34,01
Hg^{2+} +DT	I	250	390	3,12	77,95
	II	390	790	3,92	19,99

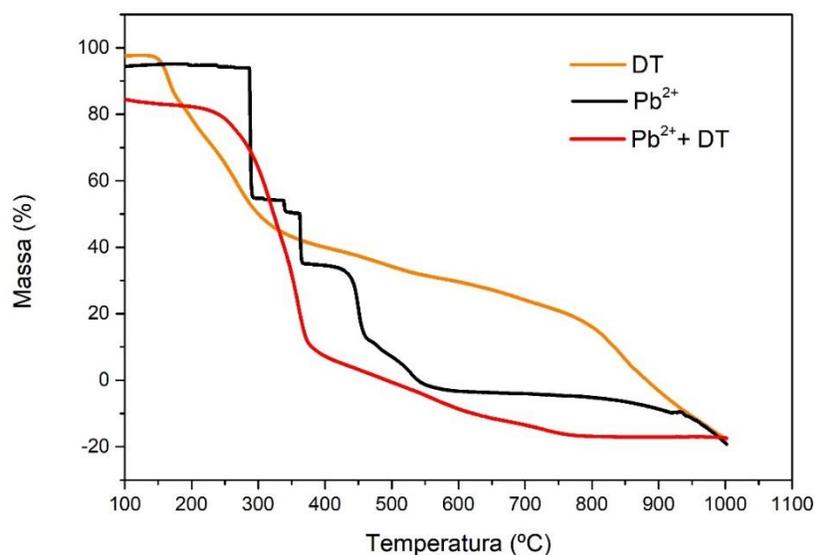
Fonte: Autora, 2022.

Para a ditizona (5,65 mg), mostra a estabilidade térmica até 150 °C e que a decomposição térmica ocorre em duas etapas consecutivas entre 150 °C e 800 °C. Na primeira etapa é observado uma perda de massa em 150 °C com perda de massa de 49,96%. Na segunda etapa até 800 °C, a perda de massa corresponde a 34,01%. No entanto, o mercúrio (13,94 mg) apresentou apenas um estágio de perda de massa com temperatura entre 500 °C

a 650 °C (90,17%), esse estágio é devido a decomposição de sua molécula. A Tabela 16 mostra os estágios de perda de massa do complexo gerado e para o mercúrio.

Na Figura 28, é possível observar que o complexo formado $Pb^{2+}+DT$ (4,6 mg) possuem uma estabilidade maior que o Pb^{2+} , e isto pôde ser confirmado comparando os estágios de perda de massa. Para o complexo de chumbo, a curva TGA mostra as perdas de massa em duas etapas consecutivas entre 290 °C e 750 °C. Na primeira etapa, até 380 °C, a decomposição térmica ocorre através de um rápido processo por combustão, com perda de 74,14%. Na segunda etapa, entre 380 °C e 750 °C, a perda de massa ocorre lentamente e corresponde a 2,11% com perda total do complexo.

Figura 28: Análise termogravimétrica do Pb^{2+} , da DT(ditizona) e do complexo formado entre $Pb^{2+}+DT$.



Fonte: Autora, 2022.

Para a ditizona (5,65 mg), a análise termogravimétrica é a mesma apresentada anteriormente. No entanto, o chumbo (13,94 mg) apresentou quatro estágios de perda de massa com temperatura entre 290 °C á 940 °C, esse estágio é devido a decomposição de sua molécula. Na primeira (290 °C á 350 °C), segunda (350°C á 390 °C), e terceira (350 °C á 450 °C) etapa a decomposição térmica ocorre em um processo rápido com perda de 75,97 %; 66,99 %; e 58,91 % , respectivamente. Na etapa quatro, entre 450 °C e 940, a perda de massa

segue de maneira lenta, correspondendo a 41,03%. A Tabela 17 mostra os estágios de perda de massa do complexo formado e para o chumbo.

Tabela 17: Estágios de perda de massa do Pb^{2+} , da DT(ditizona) e do complexo formado entre Pb^{2+} + DT.

Amostra	Estágios	Início (°C)	Fim (°C)	Perda de massa (mg)	Perda de massa (%)
Pb⁺	I	290	350	3,42	24,03
	II	350	390	3,01	10,98
	III	390	450	2,64	8,08
	IIII	450	940	1,84	47,04
DT	I	166	300	2,83	49,96
	II	300	800	4,75	34,01
Pb²⁺ +DT	I	290	380	3,42	25,86
	II	380	750	4,51	72,03

Fonte: Autora, 2022.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste presente estudo foi abordado o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação simultânea dos íons Hg^{2+} e Pb^{2+} acoplados a detecção colorimétrica, apresentando resultados satisfatórios. Foi observado que o sistema se comporta melhor em $\text{pH} = 9,0$ (120 mM), com uma solução tampão de ácido bórico, com a ditizona como agente colorimétrico. Para o método proposto neste trabalho, o canal vermelho (R) apresentou o melhor resultado para ambos os metais. Na análise da estabilidade da cor, foi obtido, uma variação de apenas 5% e 10% em um intervalo de tempo de 4h na presença do mercúrio e do chumbo, respectivamente. A aplicação do CTAB (12mM), apresentou um ganho significativo na sensibilidade do dispositivo, na presença do Hg^{2+} , no entanto, este tensoativo não apresentou influência na curva analítica na presença dos íons de Pb^{2+} .

Obteve-se baixa interferência dos metais potencialmente tóxicos que podem ser encontrados em amostras de água, o que indica boa seletividade, para ambos analitos. Para o ensaio de recuperação, foi considerado uma variação de $\pm 10\%$, e tanto para as soluções de amostras reais na presença do chumbo (100,58 e 104,12 %) quanto na presença do mercúrio (100,45 e 105,00%), apresentaram uma variação razoável. O LOD determinado foi 0,82 $\mu\text{g/mL}$ e o LOQ foi de 1,12 $\mu\text{g/mL}$, com faixa linear de 1 – 20 $\mu\text{g/mL}$ para o mercúrio, e para o chumbo os valores encontrados foram de 0,89 $\mu\text{g/mL}$; 5,35 $\mu\text{g/mL}$ e 5 - 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

O volume otimizado para o dispositivo 04 foi de 1 μL para o analito e 20 μL para o agente colorimétrico, o qual, apresentou o melhor resultado devido a sua largura, tempo de secagem e volume dos reagentes. Por fim, através da análise termogravimétrica, pôde-se observar a formação do complexo. De modo geral, os μPADs com detecção colorimétrica empregados, neste trabalho apresentaram potencialidade elevada para as análises, pois o método proposto supera inconvenientes como alto custo, procedimento laborioso, alto consumo de amostra e reagentes e outros problemas comuns para metodologias já estabelecidas na literatura. Portanto, a metodologia proposta é simples, barata, rápida e eficaz para a determinação destes metais em amostras de águas naturais.

7 PERSPECTIVAS

- Comparar os dados obtidos com a metodologia de referência para determinação dos metais em estudo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR NETTO, *et al.* Água e ambiente no Baixo São Francisco Sergipano. In: LUCAS, A. A. T.; AGUIAR NETTO, A de O. (org.) Águas do São Francisco. **São Cristóvão: Editora UFS**, p. 312, 2011.

AHAMED, M. *et al.* Oxidative stress and neurological disorders in relation to blood lead levels in children. **Redox Report**, v. 13, n. 3, p. 117-122, 2008.

AHMAD, A. *et al.* Effect of Chromium, Cadmium and Arsenic on Growth and Morphology of HeLa Cells. **Journal Of Basic & Applied Sciences**, v. 8, n. 1, p. 53-58, 2012.

AHRBERG, C. D. *et al.* Handheld real-time PCR device. **Lab on a Chip**, v. 16, p. 586-592, 2016.

APOSTOLI, P. *et al.* The effect of lead on male fertility: a time to pregnancy (ttp) study. **American Journal Of Industrial Medicine**, v. 38, n. 3, p. 310-315, 2000.

ASANO, H.; SHIRAISHI, Y. Development of paper-based microfluidic analytical device for iron assay using photomask printed with 3D printer for fabrication of hydrophilic and hydrophobic zones on paper by photolithography. **Analytica Chimica Acta**, v. 883, p. 55-60, 2015.

BOEHLE, K. E. *et al.* Utilizing Paper-Based Devices for Antimicrobial-Resistant Bacteria Detection. **Angewandte Chemie**, v. 129, p. 6990-6994, 2017

BUEGER, W. BURGE, M. Principles of Digital Image Processing. Fundamental Techniques. **London Springer-Verlag London**, 2009.

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

CAPELETTI, L. B. **Efeitos da Rota Sol-Gel no Encapsulamento de Indicadores Colorimétricos e Fluorimétricos e em suas performances com sensores de pH e gás amônia.** Dissertação (Mestrado) – Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CARVALHO, R. M. **Determinação analítica de contaminantes ambientais utilizando dispositivo microfluídico e técnicas de detecção eletroquímicas.** Dissertação (Pós-Graduação em Química) -Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Inqui/Ufms), Campo Grande – Ms, 2021.

CASTRO, C.N.; PEREIRA, C.N. Revitalização do Rio São Francisco. **IPEA- Boletim regional, urbano e ambiental.** p. 69-76, 2017.

CATE, D. M. *et al.* Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 19-41, 2015.

CBSHF. Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco. 2015. **Os impactos no Médio e Sub-Médio São Francisco.** Disponível em:<https://cbhsaofrancisco.org.br/noticias/sustentabilidade_blog/os-impactos-nomedio-e-sub-medio-sao-francisco/>. Acessado em 05 de Setembro de 2022.

CBSHF. Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco. 2015. Bacia Hidrográfica do rio São Francisco. Disponível em: <https://cbhsaofrancisco.org.br/abacia/>. Acessado em 05 de Setembro de 2022.

CHIU, A.*et al.* Review of Chromium (VI) Apoptosis, Cell-Cycle-Arrest, and Carcinogenesis. **Journal Of Environmental Science And Health, Part C**, v. 28, n. 3, p. 188-230, 2010.

CHO, M. *et al.* A fully integrated microdevice for biobarcode assay based biological agent detection. **Lab on a Chip**, v. 15, p. 2744-2748, 2015.

CHOCALHEIRO, A.L.M. **Lab on Paper: biossensores colorimétricos de papel para a detecção de membros do complexo Mycobacterium tuberculosis.** Dissertação (Mestrado) – faculdade de ciências e tecnologia, Universidade nova de Lisboa, Portugal, 2010.

CLARKSON T.W., MAGOS L., MYERS G.J. The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. **The new england journal of medicine**, v. 349, p. 1731–1737, 2003.

COLTRO, W. K. T. *et al.* Microsistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v.30, p. 1986-2000, 2007.

COLTRO, W. K. T. *et al.* Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications. **Electrophoresis**, v. 35, p. 2309-2324, 2014.

COLTRO, W. K. T. *et al.* Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. **Electrophoresis**, v. 31, p. 2487-2498, 2010.

COOGAN, T. *et al.* Toxicity and Carcinogenicity of Nickel Compounds. **Crc Critical Reviews In Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 341-384, 1989.

COUNTER, S. A.; BUCHANAN, L. H. Mercury exposure in children: a review. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 198, n. 2, p. 209-230, 2004.

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

DAS S., GAGANDEEP E BHATIA, ROHIT. Dispositivos microfluídicos baseados em papel: fabricação, detecção e aplicações significativas em vários campos. **Reviews in Analytical Chemistry** , vol. 41, nº. 1 , pp. 112-136,2022.

DAS, K. K. *et al.* Primary concept of nickel toxicity – an overview. **Journal Of Basic And Clinical Physiology And Pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 141-152, 2018.

DE FRANCISCO N, TROYA RJD, AGUERA EI. Lead and lead toxicity in domestic and free living birds. **Avian Pathol**, 32:3–13, 2003.

DE, A. K. *et al.* solvent extration of metals. **Van Nostrand reinhold company**, 1970.

DÍAZ-GONZÁLEZ, M. *et al.* A microfluidic device for the automated electrical readout of low-density glass-slide microarrays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 698-704, 2015.

DITTRICH, P. S. *et al.* Micro Total Analysis Systems. Latest Advancements and Trends. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 3887-3908, 2006.

DONINI I. A. N. *et al.* Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética química**, v. 35, p. 165-178, 2010.

DOPP E. *et al.* Environmental distribution, analysis, and toxicity of organometal (loid) compounds. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 34, p. 301–333, 2004.

DUNGCHAI, W. *et al.* “A low cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing”. **Analyst**, v. 136, p.77 – 82, 2011.

FERNANDES R. B. A. *et al.* Avaliação da concentração de metais pesados em áreas olerícolas no Estado de Minas Gerais R. Bras. **Eng. Agríc. Ambiental**, v.11, n.1, p.81–93, 2007.

FERNANDES, G. M. *et al.* Paper-based analytical device for colorimetric detection of Cu²⁺ in Brazilian sugarcane spirits by digital image treatment. **Microchemical Journal**, v. 159, p 105463, 2020.

FERREIRA, F. T. S. M. *et al.* New microfluidic paper-based analytical device for iron determination in urine samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2021.

FERREIRA, F. T. S. M.; MESQUITA, R. B. R.; RANGEL, A. O. S. S. Design and functionalization of a μ pad for the enzymatic determination of nitrate in urine. **Molecules**, v. 26, n. 21, 2021.

FERREIRA, L. M. C. *et al.* Miniaturized flow system based on enzyme modified PMMA microreactor for amperometric determination of glucose. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 539-544, 2013.

FIGUEREDO, F *et al.* Enhanced Analytical Performance of Paper Microfluidic Devices by Using Fe₃O₄ Nanoparticles, MWCNT, and Graphene Oxide. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 8, p. 11-5, 2016

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

FU, L-M; WANG, Y-N. Detection methods and applications of microfluidic paper based analytical devices. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, v. 107, p. 196-211, 2018.

GABRIEL, E. F. *et al.* Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosan-modified paper microfluidic devices. **Analyst**, v. 141, p. 4749-56, 2016.

GARCIA, P. T.; *et al.* A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays. **RSC Adv.**, v. 4, p. 37637-37644, 2014.

GUZZI G, LA PORTA C.A.M. Molecular mechanisms triggered by mercury. **Toxicology**, v. 244, p. 1–12, 2008.

HOSSAIN, S. M. Z.; BRENNAN, J. D. β -Galactosidase-based colorimetric paper sensor for determination of heavy metals. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 22, p. 8772–8778, 15 nov. 2011.

ILKHANI, H. *et al.* A novel three-dimensional microTAS chip for ultra-selective single base mismatched *Cryptosporidium* DNA biosensor. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 282, p. 675-683, 2019.

IMRAN A. *et al.* Supra molecular mechanism of the removal of 17 β -estradiol endocrine disturbing pollutant from water on functionalized iron nano particles. **Journal of Molecular Liquids**, v. 241, p. 123–129, 2017.

IMRAN A., ZEID A. AL-O., ABDULRAHMAN AL-W.. Molecular uptake of congo red dye from water on iron composite nano particles. **Journal of Molecular Liquids**, v. 224, p. 171–176, 2016.

ISQUIBOLA, G.; RODRIGUES E. C. Quantificação dos metais pesados chumbo e mercúrio em pilhas do tipo comum (Zn/C). **Scientia Vitae**, v.11, n.33, p. 18-29, 2021.

JÚNIOR J. G. F. **Desenvolvimento de metodologia analítica baseada em PADs para a determinação de Ranitidina em amostras farmacêuticas**. Tese (doutorando em Química e Biotecnologia) – Universidade federal de Alagoas, UFAL, Maceió, 2019.

JUNIOR L. C. S. S. **Determinação de metais pesados em amostras de água em área de lixão de francisco veltrão**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Francisco Beltrão, 2017.

JÚNIOR, F.J. G., *et al.* Paper based device (PAD) for colorimetric determination of ranitidine in Pharmaceutical Samples, **Microchemical Journal**, v. 178, p. 107336, 2022.

KHALIL, H. P. S. A., BHAT, A. H., & YUSRA, A. F. I. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 963– 979,2012

KHAN, Y. *et al.*1- Butanol dehydration in microchannel reactor: Kinetics and reactor modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 137, p. 740-751, 2015.

KLEMM, D. *et al.* Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angew. Chem. Int.** v. 44, p. 3358 – 3393, 2005

KOMATSU, T. *et al.* Paper-Based Device for the Facile Colorimetric Determination of Lithium Ions in Human Whole Blood. **ACS Sensors**, v. 5, n. 5, p. 1287–1294, 2020.

KUMAR M. *et al.* Review of perspective, problems, challenges, and future scenario of metal contamination in the urban environment. **J Hazard Toxic Radioact Waste**, v. 21, p. 1–16, 2017.

KUMAR, A. *et al.* A paper based microfluidic device for easy detection of uric acid using positively charged gold nanoparticles. **Analyst**, v. 140, p. 1817-1821, 2015

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

LIMA, B.P; MAMEDE, G. L; LIMA NETO, I.E. Monitoramento e modelagem da qualidade de água em uma bacia hidrográfica semiárida. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 23, n. 1, p. 125-135, 2018.

LIN P. H. ; LI B.R. Passively Driven Microfluidic Device with Simple Operation for Quantitative Droplet LAMP Sssay for Point-of-Care Analysis. **Scientific Reports**, v. 11, p. 21019, 2021.

LIN, Y. *et al.* Detection of heavy metal by paper-based microfluidics. **Biosensors And Bioelectronics**, v. 83, p. 256-266, 2016.

LIU, C. C.; Review: Development of chemical sensors using microfabrication and micromachining techniques. **Materials Chemistry and Physics**, v. 42, p. 87 – 90, 1995.

LUO, X. *et al.* Removal of Heavy Metal Ions from Water by Magnetic Cellulose- Based Beads with Embedded Chemically Modi Fi Ed Magnetite Nanoparticles and Activated Carbon. *ACS Sustain. Chem. Eng.* v. 4, p. 3960–3969, 2019.

M. THIRUMALAI, *et al.* Dynamically modified C18 silica monolithic column for the rapid determinations of lead, cadmium and mercury ions by reversed-phase high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography A** , v.1569, p. 62-69 2018.

MAHADEVA, S. K. *et al.* Paper as a Platform for Sensing Applications and Other Devices: a review. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 16, p. 8345-8362, 2015.

MAKEDONSKI, L. *et al.* Determination of heavy metals in selected black sea fish species. *Food Control*, v.72,p. 313–318, 2017.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. Á. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, p. 244-248, 1990.

MARTIN, S.; GRISWOLD, W. Human health effects of heavy metals. **Environmental Science and Technology briefs for citizens**, v. 15, p. 1-6, 2009.

MARTINEZ, A. *et al.* Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80/10, p. 3699 – 3707, 2008.

MARTINEZ, A. W. *et al.* Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 3-10, 2010.

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

MATTIONI, A. C. *et al.* Sensores químicos e físicos: uma revisão voltada à engenharia biomédica e suas aplicações. **Disciplinarum Scientia - Ciências Naturais e Tecnológicas**, v. 21, n. 2, p. 1-15, 2020.

MEELAPSOM, R. *et al.* Chromatic analysis by monitoring unmodified silver nanoparticles reduction on double layer microfluidic paper-based analytical devices for selective and sensitive determination of mercury(II). **Talanta**, v. 155, p. 193-201, 2016.

MORBIOLI, G. G. *et al.* Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 970, p. 1-22, 2017.

NEUŽIL, P. *et al.* From chip-in-a-lab to lab-on-a-chip: towards a single handheld electronic system for multiple application-specific lab-on-a-chip (ASLOC). **Lab on a Chip**, v. 14, p. 2168-2176, 2014

NILGHAZ, A.; SHEN, W. Low-cost blood plasma separation method using salt functionalized paper. **RSC Advances**, v. 5, p. 53172-53179, 2015.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes:propriedades e aplicações. **Química nova**, v.25, n.5, p.772-776,2002.

NOGUEIRA, S. A. *et al.* Monitoring Acid–Base Titrations on Wax Printed Paper Microzones Using a Smartphone. **Micromachines**, v. 8, p. 139, 2017.

NUR, Y. *et al.*, Optical Sensor for the Determination of Lead(II) Based On Immobilization of Dithizone onto Chitosan-Silica Membrane. **Indonesian Journal Of Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 7, 2017.

OLIVEIRA, A. M. *et al.* Classificação não supervisiona aplicada ao MDE para identificação de Lagoas / Unsupervised classification applied to the MDE for Pond identification. **Brazilian Journal Of Animal And Environmental Research**, v. 3, n. 4, p. 3696-3714, 2020.

OTHUMPANGAT, S. *et al.* Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Is a Cellular Target for Toxicity and Death Due to Exposure to Cadmium Chloride. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 280, n. 26, p. 25162-25169, 2005.

PADARAUSKAS, A. *et al.* On-line preconcentration and determination of chromium(VI) in waters by high-performance liquid chromatography using pre-column complexation with 1,5-diphenylcarbazide. **Journal Of Chromatography A**, v. 808, n. 1-2, p. 193-199, 1998.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, M. *et al.* Metabolic biomarker modeling for predicting clinical diagnoses through microfluidic paper-based analytical devices. **Microchemical Journal**, v. 165, p. 106093, 2021.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, M., CAÑIZARES-MACÍAS, M.D.P. Exploring the potential of paper-based analytical sensors for tea geographical origin authentication. **J Food Sci Technol** , 2022.

PRASERTBOONYAI K. *et al.* Mercury(II) determination in commercial cosmetics and local Thai traditional medicines by flow injection spectrophotometry. **International Journal Of Cosmetic Science**, v. 38, n. 1, p. 68-76, 2015.

RADOVANOVIĆ, M. *et al.* Rapid detection of olive oil blends using a paper-based portable microfluidic platform. **Food Control**, v. 124, p. 107888, 2021.

RALSTON, N. V.C.; RAYMOND, L. J. Mercury's neurotoxicity is characterized by its disruption of selenium biochemistry. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, v. 1862, n. 11, p. 2405-2416, 2018.

RATAJCZAK, K.; STOBIECKA, M. High-performance modified cellulose paper-based biosensors for medical diagnostics and early cancer screening: a concise review. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, p. 115463, 2020.

RATNARATHORN, N. *et al.* Wijitar. Simple silver nanoparticle colorimetric sensing for copper by paper-based devices. **Talanta**, v. 99, p. 552-557, 2012.

RIBEIRO A.A.L.; ALMEIDA R.N. Educação ambiental para a conservação do rio são francisco: da percepção a ação. **Revbea**, V. 14, No 2: 09-29, 2019.

RODRIGUES, G. S *et al.* Diagnóstico ambiental das fontes pontuais de poluição das águas nas bacias hidrográficas do norte de Minas e do Submédio São Francisco. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 42, 2004.

SALL, M. L. *et al.* Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, 2020.

SANDELL, E. B. photometric determination of trace of metals. **john wiley & sons**, v.3 part 1, , 1906.

SHARIFI, H. *et al.* Identification and determination of multiple heavy metal ions using a miniaturized paper-based optical device. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 359, p. 131551, 2022.

SILVA, D. M. D. **Determinação de íons metálicos utilizando métodos colorimétricos e dispositivos microfluídicos em papel: uma revisão da literatura.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

SILVA, M.K. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos para a detecção de metais pesados**. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNES, São Paulo, 2019.

STARY, J. The solvent extration of metals chelates. **Pergamon press ltda.** oxford, 1964.

TALLMAN, H E BENEDICTO, M. São Francisco o rio que resiste. **Retratos a Revista do IBGE.** n.13 ,p. 1-28. 2018.

TAN S.W. et al. The endocrine effects of mercury in humans and wildlife. **Crit Rev Toxicol**, v. 39, p. 228–269, 2009.

TCHOUNWOU P.B. *et al.* Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. **Environ Toxicol**, v. 18, p. 149–175, 2003.

TCHOUNWOU, P. B. *et al.*. Heavy Metal Toxicity and the Environment. **Experientia Supplementum**, p. 133-164, 2012.

TERRY, S.C. *et al.* A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. **Ieee Transactions On Electron Devices**, v. 26, n. 12, p. 1880-1886, 1979.

THIRUMALAI, M. *et al.* Akhila. Dynamically modified C18 silica monolithic column for the rapid determinations of lead, cadmium and mercury ions by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal Of Chromatography A**, v. 1569, p. 62-69, 2018.

UMESH, B. *et al.* Method for the determination of chromium in feed matrix by HPLC. **Poultry Science**, v. 94, n. 11, p. 2805-2815, 2015.

VAN DEN BRINK, F. T. *et al.* Miniaturization of electrochemical cells for mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 70, p. 40-49, 2015.

VAZ, R. et al. High luminescent carbon dots as an eco-friendly fluorescence sensor for Cr(VI) determination in water and soil samples. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 2017. v. 346, p. 502–511.

WAISBERG, M. *et al.* Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology**, v. 192, n. 2-3, p. 95-117, 2003.

WANI, A. L. *et al.* Lead toxicity: a review. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 8, p. 55-64, 2015.

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

XIE, L. *et al.* Low-cost fabrication of a paper-based microfluidic using a folded pattern paper. **Analytica Chimica Acta**, v. 1053, p. 131–138, 2019.

XUN Y. *et al.* Mercury accumulation plant *Cyrtomium macrophyllum* and its potential for phytoremediation of mercury polluted sites. **Chemosphere**, v. 189, p. 161–170, 2017.

YAHYAZADEH E., SHEMIRANI F., Easily synthesized carbon dots for determination of mercury(II) in water samples, **Heliyon**, v.5, p. 1-6, 2019.

ZAHIR A. *et al.* Low dose mercury toxicity and human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, p. 351–360, 2005.

ZARGOOSH K., BABADI F.F. Highly selective and sensitive optical sensor for determination of Pb^{2+} and Hg^{2+} ions based on the covalent immobilization of dithizone on agarose membrane, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** . v. 137, p. 105-110, 2015.

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

ZHANG H.; YANG F-Q. Equipment-free quantitative determination of urea based on paper-based sensor via urease-mediated chitosan viscosity change. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 148, p. 109830, 2021.

ZHANG, L.; LI, L.; MA, C.; GE, S.; YAN, M.; BIAN, C. Detection of α -fetoprotein with an ultrasensitive electrochemiluminescence paper device based on green-luminescent nitrogen-

doped graphene quantum dots. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 221, p. 799-806, 2015.

ZHANG, M. *et al.* 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.

ZHANG, Y. *et al.* One-step glass-like coating of polycarbonate for seamless DNA purification and amplification on na integrated monolithic microdevice. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p. 1281-1289, 2014.