

THIAGO LUÍS CANOZZA ROCHA

Desenvolvimento de métodos analíticos ambientalmente amigáveis utilizando plataforma de papel com detecção por imagens digitais.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Helena Redigolo Pezza

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

R672d Rocha, Thiago Luís Canozza
Desenvolvimento de métodos analíticos ambientalmente
amigáveis utilizando plataforma de papel com detecção por
imagens digitais / Thiago Luís Canozza Rocha. –
Araraquara : [s.n.], 2019
64 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Helena Redigolo Pezza

1. Ensaio de toque (Química). 2. Química verde.
3. Imagens digitais. 4. Microfluídica. 5. Química analítica.
I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento de métodos analíticos ambientalmente amigáveis utilizando plataforma de papel com detecção por imagens digitais"

AUTOR: THIAGO LUIS CANOZZA ROCHA

ORIENTADORA: HELENA REDIGOLO PEZZA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a HELENA REDIGOLO PEZZA
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.^a Dr.^a MARISA SPIRANDELI CRESPI
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.^a Dr.^a ADRIANA VITORINO ROSSI
Departamento de Química Analítica. / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 16 de maio de 2019

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Itamar e Katia, por nunca terem medido esforços no investimento em educação dos filhos, e sempre terem me incentivado em tudo.

Ao meu irmão Raphael Rocha, também por todo incentivo e torcida positiva.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Helena Redigolo Pezza, pela dedicação na orientação, por todo o ensinamento, pela compreensão das dificuldades e auxílio em todos os momentos.

Ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Unesp Araraquara pelo apoio, compreensão e incentivo.

Ao Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto, por ter cedido gentilmente o padrão de aço inoxidável para ser utilizado como amostra neste trabalho.

Ao amigo Ricardo Moutinho da Silva por toda valiosa ajuda durante todo o processo, por todas as dicas transmitidas e por toda ajuda profissional.

À Maria Isabel Uthman Sitta, pela valiosa contribuição na finalização deste trabalho.

À minha namorada, Lívia Emília Mazer, por todo apoio, incentivo e carinho transmitidos, que foram fundamentais para minha perseverança na conclusão do trabalho.

Aos amigos: Gabriel Fontes Pereira, Rafael Nativio, João Pedro Silva e Robson Mascarelli pelos momentos de descontração, pela torcida para que tudo desse certo e pelo incentivo.

RESUMO

Este trabalho aborda o desenvolvimento de *spot tests* em plataforma de papel, utilizando barreiras hidrofóbicas feitas com impressora de cera para o confinamento de soluções para fins de análise quantitativa de ferro, níquel e cromo. Foram construídas também barreiras hidrofóbicas utilizando lápis de cor, que contém cera em sua composição. Como método de detecção da coloração dos *spots*, utilizou-se um scanner para digitalizar as áreas dos *spots* e, a partir da imagem digitalizada, foi possível determinar as intensidades de coloração dos *spots* contendo soluções padrão e compará-las com a coloração das amostras, sendo possível, dessa maneira, a quantificação dos elementos químicos estudados. As amostras foram escolhidas de acordo com a facilidade de obtenção e utilização no dia a dia, além da necessidade de desenvolvimento de novos métodos que reduzem tempo de análise e custo. Para o ferro foi escolhido um medicamento contendo sulfato ferroso em sua composição. A equação da curva de calibração obtida é $I_r = 284,8xC + 0,003$; $R^2 = 0,992$, onde I_r é a Intensidade relativa, e o resultado obtido foi $42,2 \pm 0,4$ mg de ferro por comprimido. Os limites de detecção e quantificação foram determinados experimentalmente e os resultados são, respectivamente, em mol L⁻¹: $1,17 \times 10^{-4}$ e $3,52 \times 10^{-4}$. Um método espectrofotométrico foi utilizado como comparativo e apresentou curva de calibração cuja equação é $A = 11,158xC$ e $R^2 = 0,999$. O resultado apresentado por esse método é $40,0 \pm 0,1$ mg de Fe por comprimido. Já os outros metais, cromo e níquel, foram analisados em uma amostra padrão certificada de aço inoxidável AISI 316. Para o cromo e o níquel, não foram necessárias análises comparativas, uma vez que o material era certificado por órgão competente. O *spot test* para determinação de cromo apresentou curva analítica de equação $I_r = 46,83xC + 0,004$, limites de detecção e quantificação de $1,91 \times 10^{-6}$ e $6,38 \times 10^{-6}$, respectivamente, em mol L⁻¹ e resultado de $16,6 \pm 1,2\%$. O resultado que consta no certificado de análise do padrão é 17,37%. Já no caso do níquel, o *spot test* para determinação desse metal apresentou curva analítica de equação $I_r = 23,51xC - 0,011$, limites de detecção e quantificação de $1,00 \times 10^{-5}$ e $3,34 \times 10^{-5}$, respectivamente, em mol L⁻¹ e resultado de $10,7 \pm 0,4\%$. O resultado que consta no certificado de análise do padrão é 11,12%. Em todos os casos, foram feitos testes de comparação entre médias utilizando o teste t de Student, concluindo que todos os *spot tests* se mostraram tão confiáveis quanto métodos referenciados.

Palavras chave: *Spot test*. Escanometria. Química verde.

ABSTRACT

This work tells about the development of paper based spot tests, using hydrophobic barriers built with waxjet printer for the confinement of solutions for purposes of quantitative analysis of Iron, nickel and chrome. Hydrophobic barriers were also built using color pencil, which contains wax in its composition. As a color detection method, a scanner was used to scan the spot areas and, using the digital images, it was possible to determine the color intensities of the spots containing pattern solutions and compare them with those ones containing the sample solutions, so that it was possible to quantify the target elements. The samples were chosen according to the facility to obtain and their day by day use, besides the necessity of developing new methods that reduce time and costs. For the iron it was chosen a medicine containing ferrous sulfate in its composition. The equation of the calibration curve was $I_r = 284,8x C + 0,003$, $R^2 = 0,992$ and the result obtained was $42,2 \pm 0,4$ mg of iron in each tablet. The detection and quantification limits were determined and the results are, respectively, $1,17 \times 10^{-4}$ e $3,52 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A spectrophotometric method was used as comparative method and provided calibration curve with equation $A = 11,158x C$ e $R^2 = 0,999$. The result provided by this method was $40,0 \pm 0,1$ mg of Fe in each tablet. The other metals, chrome and nickel, were analysed in a pattern sample of stainless steel AISI 316. For these analites, there were no need of comparative methods, once the sample had already been certified. The spot test for chrome provided analytical curve which equation was $I_r = 46,83x C + 0,004$, limits of detection and quantification $1,91 \times 10^{-6}$ e $6,38 \times 10^{-6}$, respectively, in mol L⁻¹ and result $16,6 \pm 1,2\%$. The value in the certificate of analysis of the pattern is 17,37%. For the nickel, the spot test provided analytical curve with equation $I_r = 23,51x C - 0,011$, limits of detection and quantification $1,00 \times 10^{-5}$ e $3,34 \times 10^{-5}$, respectively, in mol L⁻¹ and result $10,7 \pm 0,4\%$. The value in the certificate of analysis of the pattern is 11,12%. In all these cases, were made comparative tests using Student t test, concluding that all the spot tests are as trustable as the reference methods.

Keywords: Spot test. Scanometry. Green chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número de publicações com o termo “lab-on-a-chip” por ano. Levantamento feito pelo próprio autor na plataforma digital SciFinder.	12
Figura 2	Número de publicações sobre dispositivos microfluídicos em papel, de janeiro de 2009 até dezembro de 2018. Levantamento feito pelo próprio autor na base de dados SciFinder.	15
Figura 3	Número de publicações sobre microfluídica por ano. Levantamento feito pelo próprio autor baseado em informações da plataforma digital SciFinder.	18
Figura 4	Número de publicações sobre análises por imagem digital por ano. Levantamento feito pelo próprio autor baseado em informações da plataforma digital SciFinder.	21
Figura 5	Impressão dos μ PADs em papel de filtro qualitativo.	27
Figura 6	Fluxograma do procedimento do tratamento da amostra de aço inox para a extração e separação do níquel e do cromo da liga.	32
Figura 7	Estrutura da orto fenantrolina.	34
Figura 8	<i>Spot test</i> de ferro em medicamento após reação química. As linhas contém padrões, todos os valores em mol L ⁻¹ . A linha nomeada “B” contém o branco, a linha 1 contém o padrão $3,58 \times 10^{-5}$; a linha 2 contém o padrão $7,16 \times 10^{-5}$; a linha 3 contém o padrão $1,07 \times 10^{-4}$; a linha 4 contém o padrão $1,43 \times 10^{-4}$; a linha 5 contém o padrão $1,79 \times 10^{-4}$; a linha 6 contém o padrão $2,15 \times 10^{-4}$; a linha 7 contém o padrão $2,15 \times 10^{-4}$ e a linha 8 contém o padrão $2,86 \times 10^{-4}$. As linhas A1, A2 e A3 contém as amostras.	35
Figura 9	Comparação entre os três canais de cor: R, G e B para a mesma curva analítica.	36

Figura 10	Curva analítica de Fe obtida pelo Teste 1.	37
Figura 11	Curva analítica de Fe obtida pelo Teste 2.	38
Figura 12	Curva analítica de Fe obtida pelo Teste 3.	39
Figura 13	Curva analítica de Fe obtida pelo Teste 4.	40
Figura 14	Curva analítica de Fe obtida pelo método espectrofotométrico. Leitura realizada a 510nm em cubeta de vidro de caminho optico 10mm.	41
Figura 15	<i>Spot test</i> de ferro construído com lápis de cor, após reação química. A linha nomeada “B” contém o branco, a linha 1 contém o padrão $3,58 \times 10^{-5}$; a linha 2 contém o padrão $7,16 \times 10^{-5}$; a linha 3 contém o padrão $1,07 \times 10^{-4}$; a linha 4 contém o padrão $1,43 \times 10^{-4}$; a linha 5 contém o padrão $1,79 \times 10^{-4}$; a linha 6 contém o padrão $2,15 \times 10^{-4}$; a linha 7 contém o padrão $2,50 \times 10^{-4}$ e a linha 8 contém o padrão $2,86 \times 10^{-4}$, todos os valores em mol L ⁻¹ . As linhas A1, A2 e A3 contêm as amostras.	43
Figura 16	Curva analítica de Fe com barreira hidrofóbica construída com lápis de cor.	43
Figura 17	Reação entre níquel e dimetilglioxima (VOGEL, 1981).	46
Figura 18	<i>Spot test</i> de níquel após reação química. A linha nomeada “B” contém o branco, a linha 1 contém o padrão $1,00 \times 10^{-3}$; a linha 2 contém o padrão $2,00 \times 10^{-3}$; a linha 3 contém o padrão $3,00 \times 10^{-3}$; a linha 4 contém o padrão $4,00 \times 10^{-3}$; a linha 5 contém o padrão $5,00 \times 10^{-3}$; a linha P1 contém o padrão $2,00 \times 10^{-3}$; a linha P2 contém o padrão $3,00 \times 10^{-3}$ e a linha P3 contém o padrão $4,00 \times 10^{-3}$, todos os valores em mol L ⁻¹ .	47

Figura 19	Comparação entre os três canais de cor: R, G e B para a mesma curva analítica de níquel.	47
Figura 20	Curva analítica de níquel com dimetilglioxima.	48
Figura 21	Processo de digestão e preparo da amostra de aço inox para análise de níquel.	50
Figura 22	Reação entre o cromo, na forma de cromato, e a difenilcarbazida.	54
Figura 23	<i>Spots</i> em papel de filtro após adição de cromo e o complexante, resultando em um produto colorido. A linha nomeada “B” contém o branco, a linha 1 contém o padrão $1,0 \times 10^{-4}$; a linha 2 contém o padrão $2,5 \times 10^{-4}$; a linha 3 contém o padrão $3,75 \times 10^{-4}$; a linha 4 contém o padrão $5,0 \times 10^{-4}$; a linha 5 contém o padrão $7,5 \times 10^{-4}$; a linha P1 contém o padrão $2,5 \times 10^{-4}$; a linha P2 contém o padrão $5,0 \times 10^{-4}$ e a linha P3 contém o padrão $7,5 \times 10^{-4}$, todos os valores em mol L ⁻¹ .	54
Figura 24	Sobreposição de curvas analíticas de cromo obtidas pelos três canais de cores.	55
Figura 25	Estudo da influência do tempo de imersão em banho ultrassônico na intensidade relativa e coloração da amostra de cromo.	56
Figura 26	Fluxograma descritivo sobre tratamento da amostra para análise de cromo.	57
Figura 27	Curva analítica de cromo.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação entre os resultados dos testes 1, 2, 3 e 4 e o método espectrofotométrico.	42
Tabela 2	Comparação entre os resultados dos <i>spot tests</i> construídos com barreira de cera e de lápis de cor e o método espectrofotométrico.	45
Tabela 3	Concentrações, em mol L ⁻¹ , calculadas a partir da equação da reta de regressão para o <i>spot test</i> acima descrito.	49
Tabela 4	Resultados das análises de níquel.	51
Tabela 5	Resultados de recuperações de padrão para o <i>spot test</i> de cromo.	56
Tabela 6	Resultados das análises de cromo.	58

SUMÁRIO

1	Introdução.....	11
1.1	Análise por imagens digitais.....	19
1.2	Amostras.....	20
2	Objetivos.....	23
3	Parte experimental.....	24
3.1	Materiais e equipamentos.....	24
3.2	Reagentes e soluções.....	25
3.3	Metodologia.....	27
3.3.1	Confecção dos μ PADs.....	27
3.3.2	Tratamento dos dados.....	28
3.3.3	Tratamento das amostras.....	29
3.3.3.1	Ferro em medicamento.....	29
3.3.3.2	Cromo e níquel em aço inoxidável.....	30
3.3.3.3	Tratamento dos dados digitais.....	33
4	Resultados e discussão.....	34
4.1	Ferro.....	34
4.1.1	Resultados – Teste 1.....	37
4.1.2	Resultados – Teste 2.....	38
4.1.3	Resultados – Teste 3.....	39
4.1.4	Resultados – Teste 4.....	40
4.1.5	Resultados método espectrofotométrico.....	41
4.1.6	Resultados gerais – Ferro.....	42
4.1.7	Comparação dos resultados.....	44
4.2	Níquel.....	45
4.2.1	Comparação de resultados.....	51
4.3	Cromo.....	52
4.3.1	Comparação de resultados.....	59
5	Conclusão.....	60
	Referências.....	62

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a comunidade científica tem se dedicado muito ao desenvolvimento de novos métodos de análises, principalmente nos campos da medicina e ambiental, pois têm maior impacto em nossa qualidade de vida. Apesar de todo progresso, é sempre emergente a necessidade de se desenvolver métodos que forneçam resultados cada vez mais rápidos, uma vez que, em muitas ocasiões, a rapidez com que o resultado é gerado pode ser fundamental para que uma equipe médica tome decisões corretas em tempo hábil para salvar uma vida durante um procedimento de emergência, por exemplo.

Além da rapidez das análises, também se busca baixo custo e portabilidade. Muitas vezes, durante um acidente ambiental, por exemplo, onde são derramados metais pesados em rios, lagos ou mares, não há por perto um laboratório equipado onde seria possível realizar uma análise de água de um rio ou uma amostra de solo para que se possa mapear os danos. Assim, torna-se interessante um método de análise que proporcione confiança no resultado e portabilidade, para que a análise possa ser feita praticamente em qualquer lugar. Outro campo de desenvolvimento de análises rápidas é o farmacêutico: conhecer a composição de um medicamento, bem como as quantidades de princípios ativos e contaminantes é fundamental, não somente para o controle de qualidade, como também para a detecção de fraudes. Há alguns anos no Brasil um grande número de medicamentos foi falsificado, incluindo antitêrmicos, medicamentos utilizados no tratamento do câncer, antibióticos e até mesmo contraceptivos, trazendo sérias consequências. Por essa razão, torna-se cada vez mais necessária a criação de testes rápidos, confiáveis e portáteis (MATIAS, 2004).

Simplificação, automação e miniaturização são tendências em processos laboratoriais, e são possíveis na atualidade por conta de um grande desenvolvimento tecnológico nos últimos anos, incluindo a miniaturização e simplificação também de computadores, sensores ou até mesmo *smartphones* (RÍOS, 2015), sendo excelentes aliados na criação de novos testes químicos, contribuindo principalmente para a portabilidade dos mesmos. Assim como em outras áreas da ciência, a miniaturização de processos também tem ajudado muito a química analítica, sendo possível, muitas vezes, automatizar todos os processos de uma análise e embuti-los em um sistema miniaturizado.

Esse conceito é conhecido como “lab-on-a-chip” ou μ TAS (micro-total analysis system) e tem sido tendência na comunidade científica, como podemos ver na figura 1, que mostra um levantamento feito na plataforma digital SciFinder sobre o número de publicações contendo esse termo, de janeiro de 1996 até dezembro de 2018. É possível notar que o número de publicações sobre o assunto teve um grande crescimento no início dos anos 2000, que coincide com o surgimento de computadores mais baratos e mais portáteis.

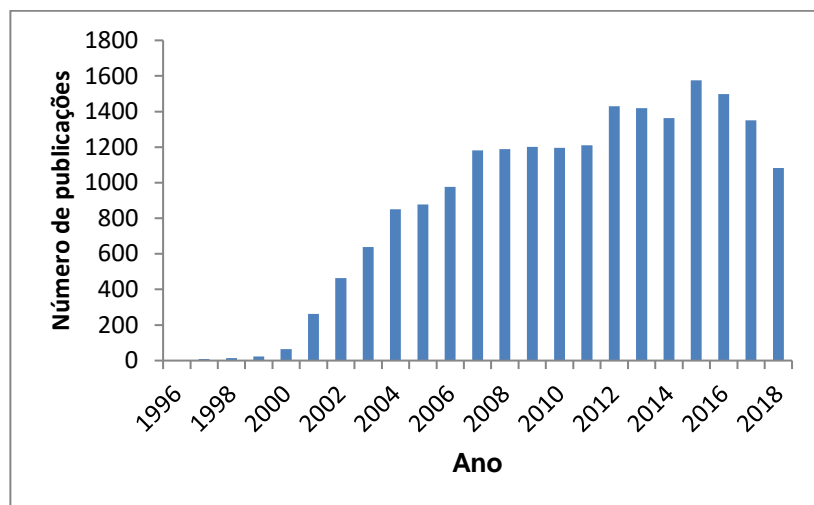


Figura 1: Número de publicações com o termo “lab-on-a-chip” por ano. Levantamento feito pelo próprio autor na plataforma digital SciFinder.

Um procedimento bastante explorado para o desenvolvimento de testes miniaturizados são os *spot tests*. Esse tipo de análise proporciona resultados rápidos, portáteis e dispensam muitas vezes o uso de equipamentos mais sofisticados, reduzindo assim o custo de análise. Também chamados de testes de toque, caracterizam-se por serem análises simples, sensíveis, seletivas e na maioria das vezes, portáteis (ZERAİK *et al.*, 2008) que utilizam mínima quantidade de reagentes e amostra, sendo essa quantidade frequentemente uma gota ou até menos, reduzindo custos e minimizando impactos ambientais, uma vez que a geração de resíduos é a mínima possível (BENEDETTI, 2013; ZERAİK *et al.*, 2008). Nesse tipo de análise uma pequena quantidade de amostra na qual deseja-se verificar a presença e/ou a quantidade de determinado composto ou grupo de compostos, sejam eles inorgânicos ou orgânicos, são misturadas com gotas de reagentes específicos para tais analitos, a fim de verificar a ocorrência de uma reação química, que

pode ser percebida pela formação de um precipitado ou pela alteração da cor (BENEDETTI, 2013; MATIAS *et al.*, 2004). A partir da intensidade da coloração, que é proporcional à concentração do analito, é possível realizar testes semi quantitativos ou até mesmo quantitativos (MATIAS *et al.*, 2004).

Os *spot tests* tiveram seu desenvolvimento por volta da década de 60, porém inicialmente para fins qualitativos. Por algum tempo, a utilização de *spot tests* para análises quantitativas não foi largamente utilizada devido à dificuldade de manuseio de pequenos volumes de solução, afetando diretamente a precisão da análise (SALMAN, M. *et al.*, 2011). No entanto, o uso dos *spot tests* combinados com outras técnicas de detecção e análise, como por exemplo a espectrofotometria ou a reflectância difusa, permitiu que esses dispositivos miniaturizados pudessem ser utilizados para fins quantitativos, agregando precisão e confiabilidade à análise.

A origem dos *spot tests* é desconhecida, mas há registros que, em 1834, Friedlieb Ferdinand Runge utilizou papel de filtro impregnado com amido e iodeto para a detecção qualitativa de cloreto livre, sendo esse teste comercializado desde então. Por ser um estudioso sobre cromatografia, Runge foi o pioneiro na utilização de reações químicas em papel, levando, por isso, o mérito de criador das análises por *spot test* (BENEDETTI, 2009). Um grande estudioso no assunto, Fritz Feigl, aplicou essa técnica em diversas reações orgânicas e inorgânicas, contribuindo muito para o desenvolvimento de diversas técnicas de *spot tests*.

Ao mesmo tempo que novos métodos analíticos sofisticados foram sendo aperfeiçoados (métodos cromatográficos, espectrais, eletroanalíticos, entre outros), o desenvolvimento dos *spot tests* também foi ganhando destaque pois havia a necessidade de redução de custos, simplificação e portabilidade. Em muitos *spot tests*, o olho humano é usado como detector, substituindo um equipamento mais caro. Os maiores fabricantes de *spot tests* passaram a concentrar esforços no desenvolvimento desses dispositivos em três áreas principais: controle de qualidade de águas, análises clínicas e análises de qualidade do ar, devido à grande necessidade de testes de controle nessas áreas (JUNGREIS, 1997).

Há vários tipos de *spot tests* comerciais que visam reduzir custos e tempo de análise, como o teste de gravidez em urina, testes forenses para resíduos de armas de fogo (BENEDETTI, 2013; ELKINS *et al.*, 2017) ou o teste de glicemia, entre outros. Nesse

aspecto, os *spot tests* contribuem inclusive para a melhoria da qualidade de vida de pessoas que têm alguma doença e que necessitam de monitoramento constante de algum parâmetro do organismo, como por exemplo os diabéticos (CHEN, C., *et al.*, 2018).

Nos *spot tests*, as soluções e amostras podem ser depositadas em pequenos recipientes, onde permanecem em solução, ou em uma plataforma física, onde ficarão confinadas para a ocorrência da reação e posterior detecção. Dentre as plataformas existentes, encontram-se placas de toque, placas de vidro, plásticos, papel, entre outros. Em 2007 o professor da Universidade de Harvard, George W. Whitesides, propôs o uso de papel como base para a fabricação de dispositivos microfluídicos para análise (em inglês, paper-based Analytical Device, ou μ PAD), uma vez que esse material é barato e de fácil obtenção (CARDOSO, 2014; WHITESIDES, 2007). Além disso, esse material possui uma grande força capilar, facilitando a difusão das soluções de interesse pela matriz (MORBIOLI, 2015), dispensando o uso de bombas e tubulações, uma vez que o papel possui alta capilaridade, facilitando o transporte da solução até o sítio da reação e detecção (CHOI, G.; Choi, S., 2015). Ainda há outras vantagens que tornam o papel uma ótima opção para ser utilizado como plataforma de análises, como por exemplo (MARTINEZ, PHILLIPS e WHITESIDES, 2010):

- **Portabilidade:** por ser um material leve, é facilmente transportado;
- **Disponibilidade:** é um material disponível em praticamente qualquer lugar do mundo;
- **Versatilidade:** pode ser facilmente alterado quimicamente para atender diversas necessidades;
- **Coloração:** por ser uma matriz geralmente branca, tem maior contraste com áreas coloridas, favorecendo a utilização de métodos de detecção baseados na coloração dos *spots*;
- **Flexibilidade:** compatibilidade com impressoras diversas;
- **Características físicas:** é encontrado sob diversas formas, espessuras e tipos;

Por essas razões, dispositivos em plataformas de papel têm sido amplamente desenvolvidos devido às suas características de baixo custo de produção, possibilidade de ser descartável e ambientalmente amigável (CHEN, C., *et al.*, 2018).

Os μ PADs foram inicialmente desenvolvidos para análises clínicas visando aplicação em países de terceiro mundo e outros lugares onde os recursos são escassos. Desde então, vêm sendo utilizados para uma gama de análises (MUSILE, 2013). Desde o final dos anos 2000, quando foram desenvolvidos, o número de publicações sobre o assunto aumentou muito, como podemos ver na Figura 2. O ano de 2018 foi o que mais teve publicações sobre esse tema, sendo mais do que o dobro de publicações do que o recorde anterior, em 2016. Isso mostra que tais dispositivos microfluídicos estão sendo muito explorados na atualidade, em diversas aplicações.

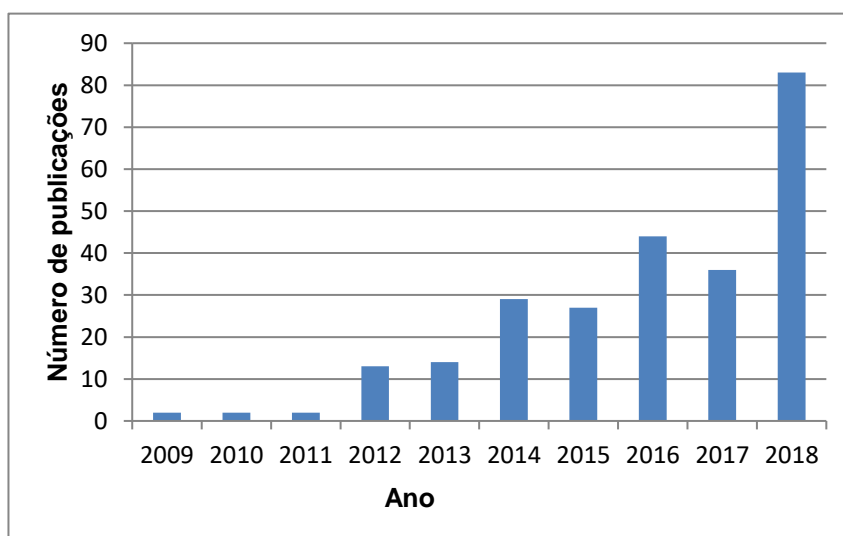


Figura 2: Número de publicações sobre dispositivos microfluídicos em papel, de janeiro de 2009 até dezembro de 2018. Levantamento feito pelo próprio autor na base de dados SciFinder.

Conforme as plataformas em papel foram sendo desenvolvidas e novos métodos de análise foram surgindo, tornou-se necessário o confinamento de soluções em áreas definidas da plataforma. Foram introduzidas então barreiras hidrofóbicas a fim de delimitar a área por onde a solução de interesse seria transportada (CARRILHO, 2009). Desse modo, é possível fazer com que todos os pontos de uma curva analítica se espalhem pela mesma

área, contribuindo para a melhoria da repetibilidade do teste. Em plataformas de papel, por exemplo, devido à porosidade desse material, a solução de interesse é absorvida por entre suas fibras e por capilaridade se espalha pelo substrato, daí a necessidade de se criarem barreiras que impeçam que a solução se espalhe muito. Entre os vários tipos de barreiras existentes, encontram-se a fotolitografia, serigrafia, flexografia, impressão de cera, entre outros (CARRILHO, 2009). O processo constitui basicamente em desenhar a barreira hidrofóbica em *software* gráfico e imprimir na plataforma de papel, podendo ser necessário algum tratamento posterior para que a barreira tenha o efeito desejado, como é o caso da impressão de cera. A impressora derrete a cera por aquecimento e a deposita na superfície do papel, não formando uma barreira hidrofóbica adequada, uma vez que a solução flui por capilaridade no interior do papel e a cera está depositada na sua superfície. Um tratamento térmico é necessário para que a cera derreta e penetre no papel, para que a barreira seja formada eficientemente.

Algumas técnicas de construção de barreiras hidrofóbicas podem não ser tão acessíveis do ponto de vista financeiro e prático, além de, muitas vezes, não serem relativamente portáteis. Isso porque normalmente necessitam de equipamentos caros e de manutenção difícil. Pensando nisso, vários grupos de pesquisa vêm desenvolvendo materiais alternativos e mais baratos para a produção das barreiras hidrofóbicas. Entre os estudos pioneiros, destacam-se o de Bruzewicz e colaboradores (2008), que desenvolveram uma caneta que dispensava, por meio de uma impressora X,Y, polímeros em papel de filtro, formando uma barreira hidrofóbica que confine a solução em um espaço definido (BRUZEWICZ *et al.*, 2008). Outro trabalho que se destaca é o do Abe e colaboradores (2008), onde impregnou-se uma folha de papel de filtro com poliestireno dissolvido em hexano. Após a secagem do hexano, uma impressora jato de tinta equipada com cartucho de tolueno imprimia canais que dissolviam o poliestireno impregnado no papel e formava canais hidrofílicos, por onde a solução fluía (ABE *et al.*, 2008). No presente trabalho, utilizou-se lápis de cor como material de construção de barreiras hidrofóbicas, pois o mesmo contém cera na composição do material colorido, substituindo uma impressora ou método mais sofisticado.

Independente da plataforma, os *spot tests* utilizam baixos volumes de soluções que fluem por microcanais, sejam eles naturais (por entre as fibras do papel, por exemplo) ou

artificiais (microcanais impressos em determinada matriz). A ciência que estuda o comportamento de fluídos em microcanais chama-se microfluídica (CARDOSO, 2014). Técnicas analíticas que utilizam esse princípio visam a utilização e manipulação de baixas quantidades de fluídos (10^{-9} a 10^{-18} litros), lançando mão de microcanais, da ordem de dezenas a milhares de micrômetros, por onde as soluções fluem. Manz e colaboradores foram os pioneiros na utilização de técnicas microfluídicas, na década de 90. Os autores desse trabalho propuseram a junção de todas as etapas das reações em um único *chip*, possibilitando, além da diminuição do volume de soluções, o acoplamento de sistemas automatizados (CARDOSO, 2014). Como vantagens, a microfluídica proporciona maior rapidez na análise, utilização de pequenas quantidades de amostras e reagentes (por consequência, geração de pequenas quantidades de resíduos) e baixo custo (WHITESIDES, G., 2006). Além disso, a microfluídica facilita análises em campo e a construção de equipamentos portáteis, o que muitas vezes dispensa o transporte até um laboratório. Whitesides (2006) classifica a microfluídica como “boa demais para ser verdade”, devido às suas inúmeras vantagens e poucas desvantagens.

Desde o seu surgimento, a microfluídica tem sido muito desenvolvida e aplicada. A Figura 3 mostra o número de publicações anuais sobre microfluídica desde o final da década de 90, quando apareceu o primeiro registro na literatura sobre o assunto. Nota-se um crescimento muito rápido de publicações tratando desse assunto.

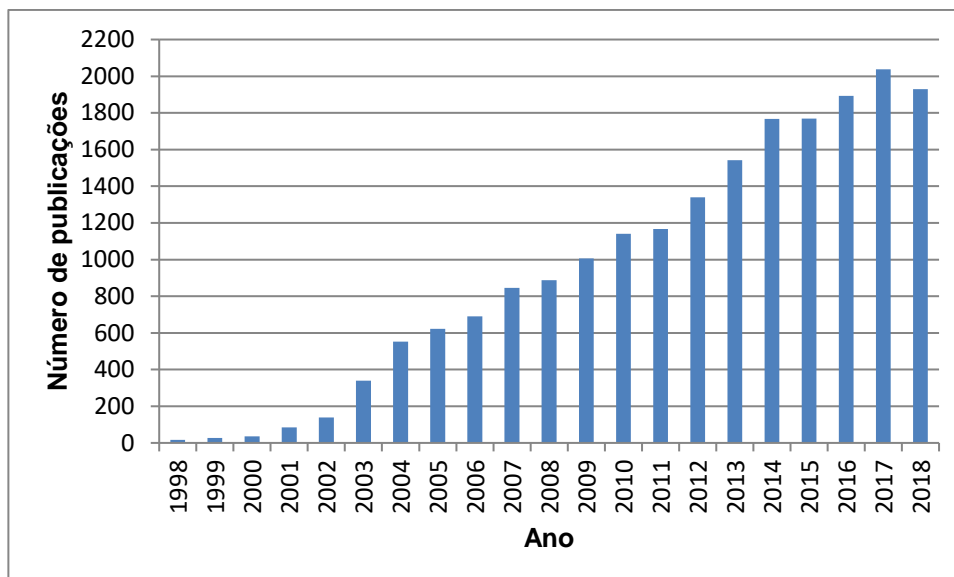


Figura 3: Número de publicações sobre microfluídica por ano. Levantamento feito pelo próprio autor baseado em informações da plataforma digital SciFinder.

Os primeiros *spot tests* utilizavam o olho humano como detector. O teste de cloreto de F. Runge, por exemplo, acusava a presença desse íon pela alteração de cor no papel, facilmente detectada pelo olho humano. Com o avanço de técnicas computacionais em todas as áreas de conhecimento, não demorou muito para que fossem desenvolvidos métodos analíticos utilizando a tecnologia de informação como aliada, nesse caso, utilizando métodos de captura e processamento de imagens digitais auxiliando na possibilidade de medir a intensidade de cor, favorecendo a sensibilidade e precisão da análise. É o caso da escanometria (SHOKROLLAHI *et al.*, 2015), técnica que consiste no escaneamento ou na fotografia (por meio de câmeras fotográficas ou *web cams*) de soluções ou sítios de reações as quais originam produtos coloridos impregnados em uma matriz, coletando a imagem através de um sensor eletrônico (CCD) e armazenando-a na memória de um computador (PESSOA *et al.*, 2017). *Softwares* comerciais amplamente disponíveis são capazes de coletar as informações de cor da imagem e transformá-las em números de acordo com a intensidade e cor.

A utilização de um *scanner* em análises químicas deu início na década de 1980 em duas situações iniciais: 1) na obtenção de informações de processos de separação

bidimensionais, como é o caso da cromatografia em camada delgada ou eletroforese em gel de poliacrilamida e 2) para análises quantitativas e/ou qualitativas em fase sólida ou mesmo uma solução. Análises químicas utilizando métodos colorimétricos com detecção digital têm aumentado nas últimas décadas. Nos dias atuais, desde a última década, imagens digitais (sejam elas adquiridas por um *scanner*, câmera digital ou *smartphone*) têm sido muito utilizadas para fins de quantificação de substâncias (LAPRESTA-FERNÁNDEZ, A., 2011).

1.1 Análise por imagens digitais:

Uma imagem digital é formada por milhares de *pixels* que assumem uma única cor. Há vários sistemas de cores, como por exemplo o CYM: Cyan (azul), Yellow (amarelo) e M (magenta) e o RGB: Red (vermelho), Green (verde) e Blue (azul), sendo este último o sistema utilizado para análise neste trabalho. No sistema RGB, cada pixel cada pixel assume apenas uma de três cores: vermelho, verde ou azul em diferentes intensidades que, aos nossos olhos, se misturam e se mostram homogêneas. A ideia de um sistema de três cores que dão origem a milhares de outras foi publicada pela primeira vez por Jakob Christoffel Le Blon, em 1722 (CHEN, C., *et al.*, 2018). A combinação e o ajuste do brilho de três cores básicas origina milhões de outras. Esse sistema utiliza como base as cores vermelho (R), de comprimento de onda 700nm, verde (G), de comprimento de onda 550nm e azul (B), de comprimento de onda 440nm, e suas intensidades variam de 0 (preto) até 255 em uma escala de brilho. Assim, um *pixel* digital de cor vermelha intensa possui os seguintes valores de brilho dos componentes (R, G, B): (255, 0, 0). Analogamente, um *pixel* azul possui valores de brilho (0, 0, 255). O mesmo acontece com um *pixel* verde, que tem valores (0, 255, 0) em *pixel* de cor preta tem valores (0, 0, 0). Ao todo, nesse sistema, um total de 16.777.216 cores podem ser formadas (SHOKROLLAHI, MOHAMMADPOUR, ABBASPOUR, 2017).

Softwares são capazes de segregar a intensidade de cada um dos três componentes (R, G ou B) e informar a intensidade de brilho média dos *pixels* da área selecionada. (PACIORNIK *et al.*, 2006). Como a intensidade de cor do *spot* aumenta com o aumento da

concentração do analito, é possível associar as intensidades de brilho dos *pixels* com a concentração.

No presente trabalho foram desenvolvidos *spot tests* miniaturizados com base em papel de filtro qualitativo, mais conhecidos como *Paper-based Analytical Devices* (μ PAD), como matriz para a ocorrência das reações e uma impressora de cera para a produção da barreira hidrofóbica. Visando diminuir ainda mais os custos e simplificando o processo, foi testada a construção de barreiras hidrofóbicas utilizando lápis de cor, pois os mesmos contêm cera em sua composição. Desta maneira, é possível eliminar qualquer equipamento sofisticado de impressão e também o uso de qualquer *software* para a confecção das barreiras hidrofóbicas em computador.

1.2 Amostras

As amostras estudadas neste trabalho foram escolhidas de modo a atender necessidades industriais, de áreas como farmacêutica e de materiais, bem como facilidade de obtenção e também visando aplicação para fins didáticos.

No campo da ciência dos materiais, encontram-se em franco desenvolvimento ligas metálicas, fabricadas com inúmeros metais. Dentre essas ligas, destaca-se o aço inoxidável, que pode ser formado por várias combinações de diferentes metais. Esse material leva em sua composição alguns metais que formam óxidos em sua superfície em uma camada passiva, protegendo-o de corrosão, daí o nome “aço inoxidável”. São utilizados industrialmente para a construção de tubulações para transporte e processamento de alimentos ou químicos altamente corrosivos (NEVES, 2016).

Há vários tipos de aço inoxidável, classificados de acordo com sua composição química e resistência à corrosão. O Aço Inox AISI 304, por exemplo, possui em sua composição ferro, cromo e níquel em determinada composição, o que lhe confere certa resistência à corrosão. Já o AISI 316, por exemplo, possui a mesma composição do 304, mas com adição de molibdênio, o que faz com que sua resistência à corrosão seja alterada (SILVA, 2017). A determinação do teor de cromo ou níquel é interessante para confirmar se esses metais estão em proporção correta para que o aço seja classificado como inoxidável.

Outras ligas metálicas, como o bronze, também levam níquel em sua composição. Assim como o aço inox e outras amostras, a determinação de tais elementos em ligas metálicas necessitam de equipamentos caros e sofisticados como fluorescência de raios X, por exemplo (BATISTA, 2012; MOUTINHO, 2012). O desenvolvimento de técnicas simples, sustentáveis e de baixo custo facilita o processo de análise e pode ser utilizado para despertar em alunos de graduação ou pós graduação o senso de economia e adaptação para técnicas mais baratas.

Escolheu-se um medicamento com sulfato ferroso como amostra farmacêutica, para determinação de ferro, devido à necessidade de desenvolver métodos novos de análise de fármacos. Métodos considerados de referência por farmacopeias exigem equipamentos caros, como absorção atômica, encarecendo a análise. Além disso, tal medicamento é uma amostra barata e de fácil obtenção e aplicação, inclusive para fins didáticos.

Nos últimos anos, muitas técnicas de análise por imagem digital foram desenvolvidas, como podemos ver na Figura 4, que mostra o número de publicações científicas sobre o assunto por ano. O ano de 2018 foi o que mais teve publicações sobre o tema, que vem demonstrando uma tendência crescente ano a ano. Esse fato sugere que cada vez mais a sociedade está utilizando a tecnologia digital, largamente difundida na atualidade, como ferramenta para produzir ciência e como alternativa para métodos mais sofisticados.

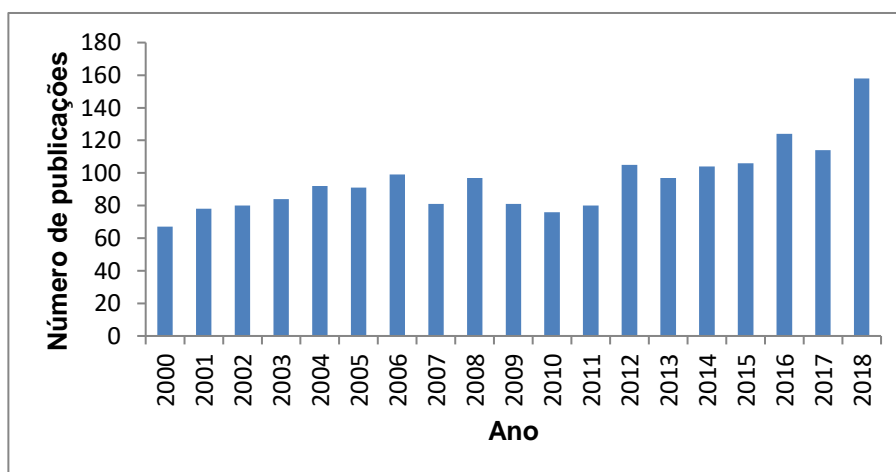


Figura 4: Número de publicações sobre análises por imagem digital por ano. Levantamento feito pelo próprio autor baseado em informações da plataforma digital SciFinder.

Ao combinarmos as vantagens dos *spot tests* utilizando os princípios da microfluídica e utilizando para isso plataformas baratas como o papel, além de um método de detecção e análise por imagem digital, como um *scanner* ou um *smartphone*, o custo das análises será muito reduzido e os métodos ficam cada vez mais acessíveis, simples e baratos.

Se considerarmos que o acesso à tecnologia vem crescendo, principalmente entre o público jovem, torna-se interessante a criação de métodos de análise utilizando a tecnologia de informação para fins didáticos. Segundo Liu e Yu (2016), 1.4 bilhões de pessoas compraram um *smartphone* em 2016, ou seja, aproximadamente 20% da população mundial. Segundo os autores, o grande volume de vendas desse aparelho se dá pela possibilidade de instalação de aplicativos diversos, incluindo redes sociais e edição de fotos.

Juntando todas as vantagens já discutidas dos *spot tests* em plataforma de papel utilizando-se detecção por imagens digitais com o crescente acesso à tecnologia, temos uma excelente ferramenta de análise barata, portátil e de fácil construção.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de *spot tests* com detecção por imagens digitais para determinação quantitativa de ferro, níquel e cromo, em amostras de interesse industrial, ambiental ou em medicamentos, aplicando a filosofia da Química Verde.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Equipamentos:

- Utilizaram-se vidrarias de uso comum “classe A”;
- Balança analítica marca Shimadzu, modelo AY220;
- Impressora de cera marca Xerox, modelo ColorQube 8580;
- Micropipeta 20-200 μ L marca Boeco;
- Banho ultrassom marca Thornton, modelo T14;
- Espectrofotômetro marca Femto, modelo 600 Plus;
- Impressora multifuncional marca HP, modelo PSC 1315 all-in-one;
- *Software* ImageJ, versão 1.44o;
- *Software* CorelDraw, versão X5;
- Papel de filtro qualitativo para utilização em plataformas de construção dos *spot tests*;
- Papel de filtro quantitativo marca Unifil C41 faixa preta;
- Lápis de cor marrom da marca Faber-Castell;
- Amostra de medicamento comercial contendo 40mg de ferro por comprimido;
- Amostra de aço inoxidável: material de referência de aço inoxidável AISI316, certificado pelo IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas), nº 1925-103 IPT24A.

3.2 Reagentes e soluções:

- Solução de cloridrato de hidroxilamina 10% (m/V), preparada pesando-se 10 g do sal, marca Anidrol, e avolumando-se em balão volumétrico para 100 mL;
- Solução acetato de sódio 10% (m/V), preparada pesando-se 100 g do sal, marca Nuclear, e avolumando-se em balão volumétrico de 1000 mL;
- Solução de fenantrolina 0,1% (m/V), preparada pesando-se 1g de 1,10-ortrofenantrolina, marca Vetec, e avolumando-se em balão volumétrico de 1000 mL;
- Solução estoque de ferro (II) 10 mg L^{-1} ($1,79 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$): preparada pesando-se 0,1413 g de sulfato ferroso amoniacal, marca Panreac, e avolumando-se em balão volumétrico de 2000 mL, com adição prévia de cerca de 300 mL de água deionizada e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, marca Synth. A partir dessa solução, foram preparados todos os pontos das curvas analíticas de ferro para todos os experimentos descritos neste trabalho;
- Solução padrão de Cr (VI) $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$: preparada dissolvendo-se 0,1471 g de dicromato de potássio, marca Panreac (padrão primário, pureza 99 – 101%) previamente seco em estufa, em balão volumétrico de 100 mL. A partir dessa solução, foram preparadas todas as soluções diluídas que compuseram as curvas analíticas de cromo descritas neste trabalho;
- Solução de 1,5-difenilcarbazida 0,2%: preparada pesando-se 0,1 g do sal, marca Sigma Aldrich, em béquer de 25 mL, com posterior dissolução e avolumando-se em balão volumétrico de 50 mL utilizando-se mistura de água e Acetona (marca JTBaker) na proporção 1:1;
- Solução tampão pH 4,0: preparada dissolvendo-se 8,203 g de acetato de sódio anidro (marca Nuclear) em cerca de 200 mL de água deionizada no interior de um balão volumétrico de 100 mL. Após esse processo, adicionaram-se 68 mL de ácido acético glacial (marca Synth) e avolumou-se com água deionizada;

- Solução padrão de níquel $0,0498 \text{ mol L}^{-1}$: preparada pesando-se $1,3144 \text{ g}$ de sulfato de níquel hexahidratado (marca Synth) e avolumando-se com água deionizada para balão de 100 mL , posteriormente padronizada segundo método descrito em Flaschka, H.A., 1964;
- Solução de dimetilglioxima $0,2\%$: preparada pesando-se $0,1 \text{ g}$ do sal, marca Sigma Aldrich, em béquer de 25 mL , com posterior dissolução e avolumando-se em balão volumétrico de 50 mL utilizando-se mistura de água e Acetona (marca JTBaker) na proporção 1:1.

3.3 Metodologia:

3.3.1 Confeção dos μ PADs

Para a preparação dos μ PADs, imprimiram-se círculos de cera de 15mm de diâmetro com impressora apropriada no papel de filtro qualitativo. Foram impressos, por folha de papel, 7 colunas contendo 12 círculos cada uma conforme visto na figura 5:

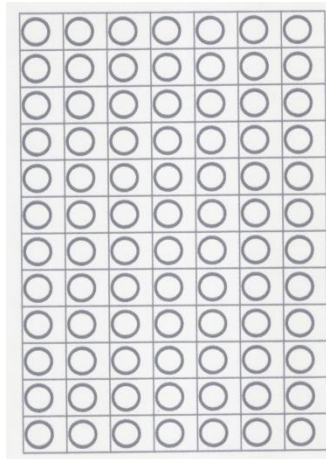


Figura 5: Impressão dos μ PADs em papel de filtro qualitativo.

Após a impressão, as folhas do papel de filtro foram levadas à estufa a 120°C por 5 minutos, para que a cera derretesse e penetrasse no papel, formando a barreira hidrofóbica efetiva, pois, dessa maneira, a solução fica impossibilitada de penetrar pelo interior da folha de papel. Assim que retiradas da estufa, os *spots* estavam prontos para receber as soluções.

Os testes se desenvolveram da seguinte maneira:

Fixaram-se com fita adesiva as folhas de papel de filtro com os μ PADs impressos em bancada de laboratório limpa, previamente forrada com filme plástico de PVC para que estas não se movessem durante as análises. Cada linha de 7 círculos receberia as soluções correspondentes a um ponto da curva analítica (a primeira linha recebeu, em todos os *spots*, o primeiro ponto da curva analítica (branco). A segunda linha, o segundo ponto e assim por

diante). As linhas eram, então, nomeadas segundo as concentrações dos padrões que ali seriam adicionados.

Com micropipeta, adicionaram-se 20 μ L das soluções da curva analítica e da amostra na parte interna dos círculos impressos, de tal sorte que a solução se espalhou por toda a área do círculo e ficou confinada em seu interior devido à ação da barreira hidrofóbica de cera, seja ela feita por lápis de cor ou impressora de cera.

Após secagem completa, escanearam-se as folhas e as imagens foram tratadas no ImageJ, *software* específico que é capaz de analisar o histograma de cor que forma a imagem e, dessa forma, fornecer os valores dos componentes R, G ou B que formam a imagem.

3.3.2 Tratamento dos dados

No *software* ImageJ, abriram-se as imagens dos *spot tests*. Utilizando a ferramenta “color histogram”, foi possível delimitar a área colorida dos *spot tests* e quantificar a intensidade dos três componentes que formam a imagem: Verde, Vermelho e Azul (Red, Green ou Blue, ou R, G ou B). Foram feitas as curvas analíticas, para todos os analitos, primeiramente para os três componentes, para que fosse possível determinar qual seria o componente mais sensível. Após determinar o componente a ser monitorado, a curva analítica foi feita, sendo cada ponto a média das intensidades relativas dos 7 *spots* de uma mesma linha horizontal da folha contendo os *spots*. Interpolou-se então a amostra de medicamento para verificar sua concentração e aplicou-se um método espectrofotométrico como referência (SAWYER, 1984). Posteriormente, compararam-se estatisticamente os resultados dos *spot tests* com os resultados do método espectrofotométrico utilizando o teste t de Student.

3.3.3 Tratamento das amostras

3.3.3.1 Ferro em medicamento

Pesaram-se em balança analítica 10 comprimidos de sulfato ferroso contendo 40 mg de ferro cada um, utilizados no tratamento de anemia. A massa média foi calculada, chegando no valor de 0,2398 g por comprimido. Essa massa então foi tomada a partir dos comprimidos macerados, transferida para balão volumétrico de 1000 mL e este foi avolumado com água deionizada, de modo que a solução da amostra contenha aproximadamente 40 mg L⁻¹. Para o preparo da amostra, 10,00 mL dessa solução foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL.

Preparou-se uma solução 50 mg L⁻¹ de ferro pesando-se 0,3512 g de sulfato ferroso amoniacal (Merck, pureza 99-101%), solubilizou-se em 500 mL de água deionizada contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, para que não ocorra a hidrólise do ferro (II), e avolumando-se para 1000 mL. A partir dela, foram preparadas, todas em balão volumétrico de 50 mL, as soluções que formam a curva analítica com as seguintes concentrações: 0,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00; 12,00; 14,00 e 16,00 mg L⁻¹. Também foram utilizadas as seguintes soluções: 1,10-fenantrolina (Synth, pureza 100%), como agente complexante para o ferro; acetato de sódio 10% m/v (LS Chemicals, pureza 99%), cuja função é manter o pH em uma faixa intermediária para que a 1,10-fenantrolina pudesse atuar mais eficientemente; cloridrato de hidroxilamina (Anidrol, pureza 96%), atuando como agente redutor, para evitar que o Fe²⁺ fosse oxidado a Fe³⁺. A ordem de adição desses reagentes foi estudada segundo os testes descritos a seguir:

Foram realizados quatro testes para determinar a melhor condição de análise. Foram denominados como Teste1, Teste 2, Teste 3 e Teste 4, a saber:

- Teste 1: A reação ocorreu totalmente dentro dos balões volumétricos. Posteriormente, 20µL de cada solução foram transferidos para os *spots*. Em cada balão, além do padrão de ferro, foram adicionados 1,00 mL de cloridrato de hidroxilamina a 10%; 8,00 mL de Acetato de Sódio 10% e 10,00 mL de 1,10 fenantrolina 0,1%.

- Teste 2: Impregnou-se o papel com 20 µL de uma mistura de soluções de acetato de sódio e 1,10-fenantrolina, ambos a 10%. Nos balões volumétricos da curva analítica,

adicionaram-se apenas 20 μL de cada solução padrão de ferro e 1,00 mL de cloridrato de hidroxilamina. A intenção desse teste é, além de eliminar o espectrofotômetro, proporcionar uma economia de reagentes, pois parte deles estará impregnada no papel.

- Teste 3: Idêntico ao Teste 1, porém as soluções são adicionadas aos *spots* utilizando conta gotas ao invés de micropipeta, eliminando assim este instrumento volumétrico.

- Teste 4: Impregnaram-se os *spots* tal como no Teste 2, mas a solução padrão de ferro foi adicionada aos *spots* com auxílio de micropipeta em diferentes volumes: 0,00 μL na primeira linha de *spots*; 10,0 μL na segunda, 20,0 μL na terceira e assim por diante, até 60,0 μL .

As soluções foram adicionadas às áreas delimitadas na curva, conforme descrito nos testes: a primeira linha de *spots* recebeu a solução contendo 0,00 mg L^{-1} de ferro (branco da curva analítica), 20 μL cada *spot*. A segunda linha recebeu a solução contendo 2,00 mg L^{-1} de ferro, 20 μL cada *spot* e assim por diante. Após secagem, escanearam-se os *spots* e os dados foram tratados.

Para o método espectrofotométrico, utilizado neste trabalho como método de referência (SAWYER, 1984), preparou-se solução padrão tomando-se 0,1424 g de sulfato ferroso amoniacal e avolumou-se para 2000 mL, resultando em uma solução padrão de 10,14 mg L^{-1} de ferro. Utilizando-se uma bureta, a partir dessa solução foram feitas outras soluções de diferentes concentrações, que formaram a curva analítica. 2,00 mL da amostra de medicamento já preparada foram tomados e avolumados a 50 mL. A leitura da absorbância foi feita a 510 nm, máximo de absorção do complexo ferro - 1,10 fenantrolina.

3.3.3.2 Cromo e níquel em aço inoxidável

Uma curva analítica de níquel de $1,00 \times 10^{-3}$ a $5,00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} foi feita a partir de sulfato de níquel (Synth, pureza 98 – 102%) e tomaram-se 20,0 μL de cada ponto da curva e adicionaram-se aos *spots*. Uma solução 0,2% (m/V) de dimetilglioxima (Sigma Aldrich, pureza 100%) em meio 50% de acetona foi preparada e 20,0 μL dessa solução foram adicionados nos *spots* contendo as soluções padrão de níquel. Uma coloração

avermelhada se desenvolveu. Em todos os testes, um ponto da curva foi feito em duplicata e utilizado para verificar a recuperação.

Paralelamente, uma cuva analítica de Cr (VI) foi preparada, a partir de $K_2Cr_2O_7$ (Synth, pureza 99 – 101%) na faixa de $1,00 \times 10^{-4}$ até $6,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e conduziram-se os testes da mesma forma com a qual os testes de níquel foram desenvolvidos. Uma solução de 1,5-difenilcarbazida (Sigma Aldrich, pureza 100%) também a 0,2% (m/V) em meio 50% acetona foi utilizada como complexante, sendo também adicionada aos *spots* após a adição dos padrões. Após a secagem, os μ PADs contendo os *spot tests* foram escaneadas. O tratamento do aço inox para a separação do níquel e do cromo foi feito de acordo com o fluxograma a seguir:

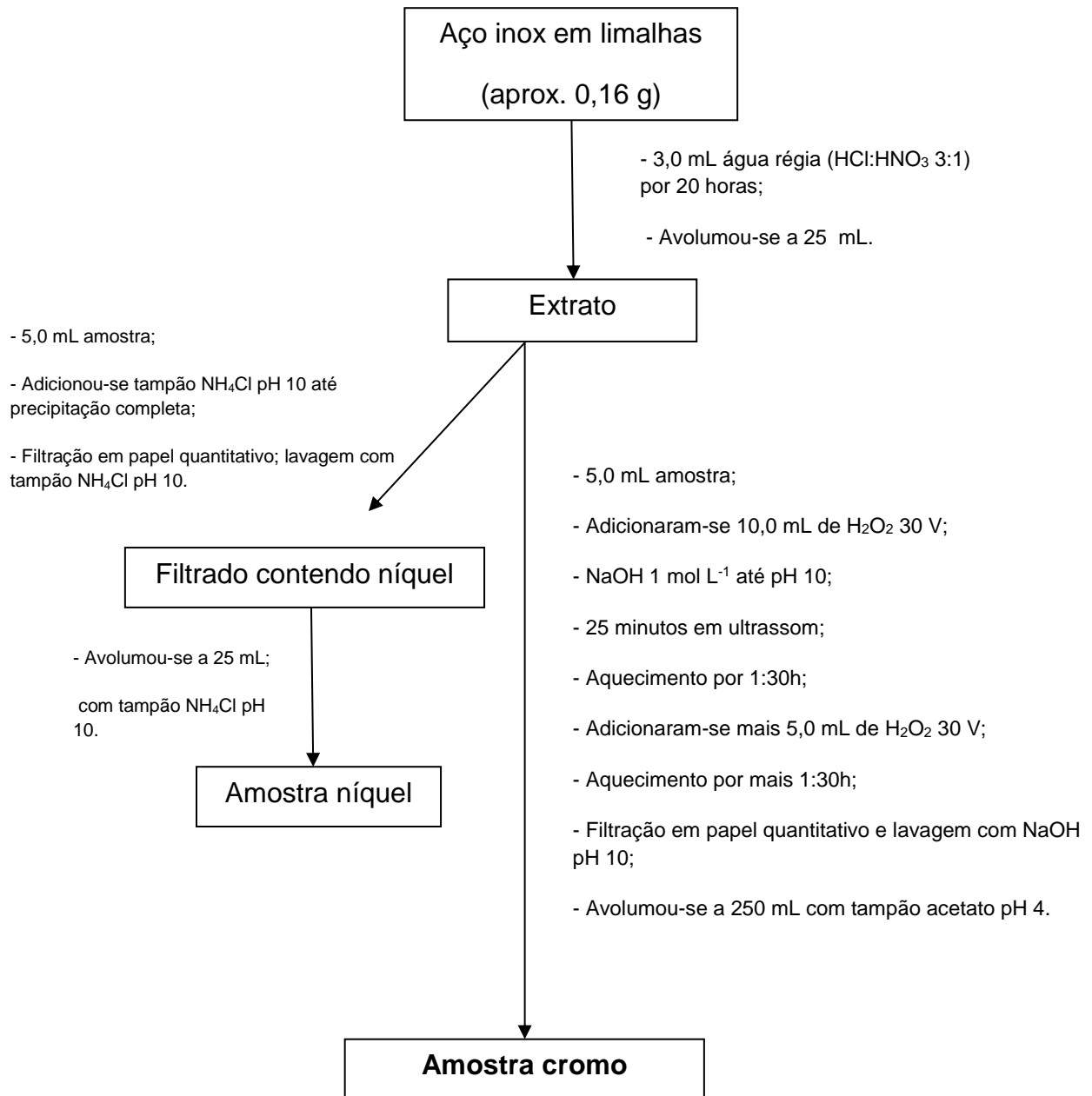


Figura 6: Fluxograma do procedimento do tratamento da amostra de aço inox para a extração e separação do níquel e do cromo da liga.

3.3.3.3 Tratamento dos dados digitais:

A intensidade relativa foi calculada da seguinte maneira: para cada linha de 7 *spots* (Figura 1), calculou-se a média dos valores de R, G ou B fornecidos pelo *software* ImageJ. A intensidade relativa foi obtida pela equação 1:

$$I_r = -\log (V_m/V_{mb}) \quad \text{equação (1)}$$

Onde o termo I_r é a intensidade relativa, V_m é o valor médio de R, G ou B de cada linha de *spots* e V_{mb} é o equivalente a V_m da linha referente ao branco (SHOKROLLAHI, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Ferro

A Figura 7 ilustra a estrutura da ortofenantrolina utilizada como complexante para o ferro (II) neste caso. A Reação (1) é a equação química que representa a reação de complexação entre o ferro II e a ortofenantrolina.

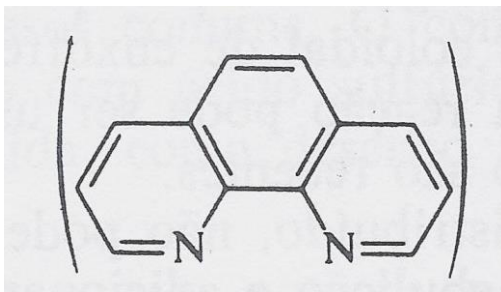


Figura 7: Estrutura da ortofenantrolina. (Vogel, 1981)



Primeiramente, a curva analítica do Teste 1 foi aplicada nos *spot tests*, para que fosse determinado qual o melhor componente para monitorar a intensidade relativa. Após secagem dos *spots*, coleta de imagem em *scanner* e tratamento dos dados, um gráfico de intensidade relativa vs. Concentração de ferro foi gerado para as três cores: vermelho (R), verde (G) e azul (B), mostrado na Figura 9. As equações das retas de regressão foram:

$$\text{R: } I_r = 10,28x_C; R^2 = 0,375 \quad \text{equação (2)}$$

$$\text{G: } I_r = 265,6x_C + 0,003; R^2 = 0,990 \quad \text{equação (3)}$$

$$\text{B: } I_r = 244,5x_C + 0,004; R^2 = 0,987 \quad \text{equação (4)}$$

A Figura 8 mostra o papel de filtro com os *spots* após receberem os reagentes e após a ocorrência da reação química. É possível verificar visualmente o aumento da

intensidade de cor nas colunas de *spots* onde está indicada a curva analítica na Figura 8, indicando visualmente a linearidade da curva.

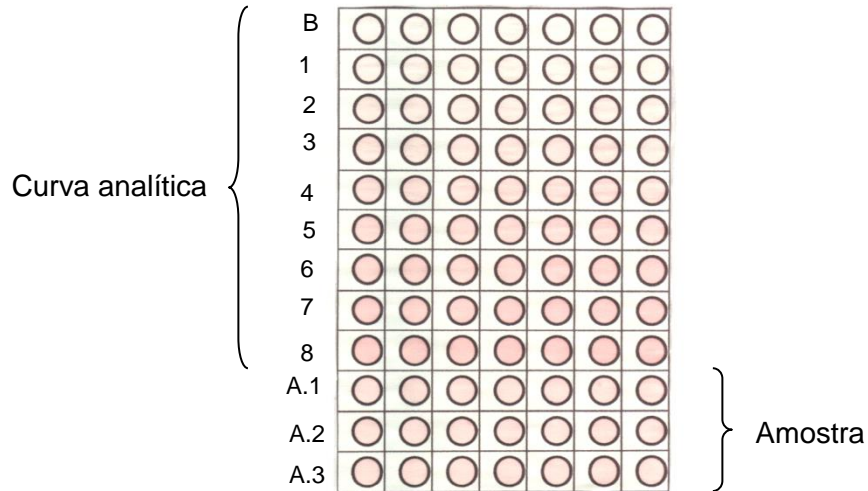


Figura 8: *Spot test* de ferro em medicamento após reação química. As linhas contêm padrões, todos os valores em mol L⁻¹. A linha nomeada “B” contém o branco, a linha 1 contém o padrão $3,58 \times 10^{-5}$; a linha 2 contém o padrão $7,16 \times 10^{-5}$; a linha 3 contém o padrão $1,07 \times 10^{-4}$; a linha 4 contém o padrão $1,43 \times 10^{-4}$; a linha 5 contém o padrão $1,79 \times 10^{-4}$; a linha 6 contém o padrão $2,15 \times 10^{-4}$; a linha 7 contém o padrão $2,15 \times 10^{-4}$ e a linha 8 contém o padrão $2,86 \times 10^{-4}$. As linhas A1, A2 e A3 contêm as amostras.

A Figura 9 ilustra a mesma curva analítica de ferro monitorando-se os três componentes separadamente: verde (G), azul (B) e vermelho (R). Como a sensibilidade de cada componente para esse sistema é diferente, notam-se inclinações diferentes para cada reta de regressão obtidas na análise das cores do sistema RGB.

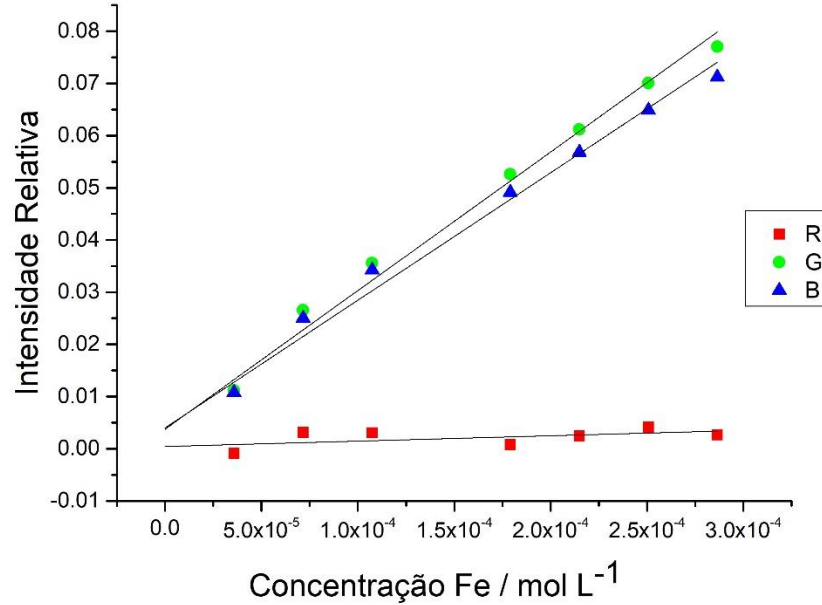


Figura 9: Comparação entre os três componentes de cor: R, G e B para a mesma curva analítica.

Pode-se concluir então, pela análise das retas de regressão, que o melhor componente para monitorar o ferro neste teste é o verde (G), pois este componente apresentou a maior inclinação frente às outras cores, ou seja, em uma mesma variação de concentração de analito, o componente verde apresenta maior variação de valor de intensidade relativa, o que é favorável devido à alta sensibilidade.

4.1.1 Resultados – Teste 1

A Figura 10 mostra a curva analítica de ferro complexado com 1,10-fenantrolina feita pelo Teste 1. A equação da reta de regressão é: $I_r = 284,8x C + 0,003$; $R^2 = 0,992$. A interpolação das amostras nessa curva forneceu as seguintes concentrações, em mg L^{-1} : 42,71; 42,09 e 41,92 resultando na concentração média de $42,24 \pm 0,41$ mg por comprimido.

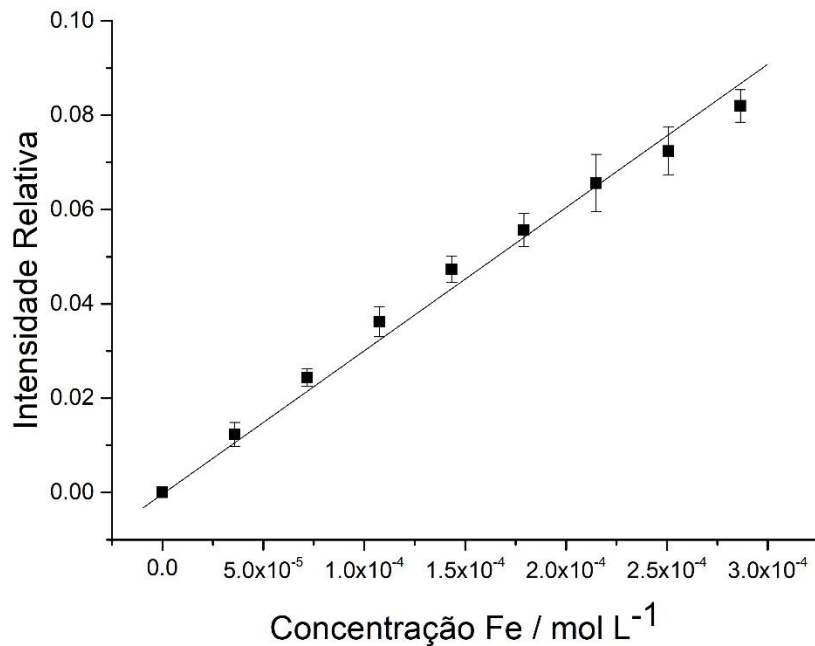


Figura 10: Curva analítica de Fe^{2+} obtida pelo Teste 1.

4.1.2 Resultados – Teste 2

A Figura 11 mostra a curva analítica de ferro complexado com 1,10-fenantrolina feita pelo Teste 2. A equação da reta de regressão da curva analítica obtida pelo Teste 2 é: $I_r = 319,2x C + 0,004$; $R^2 = 0,989$. A interpolação das amostras nessa curva forneceu as seguintes concentrações, em mg L^{-1} : 48,8; 45,8 e 48,9 resultando na concentração média de $47,9 \pm 1,7$ mg por comprimido.

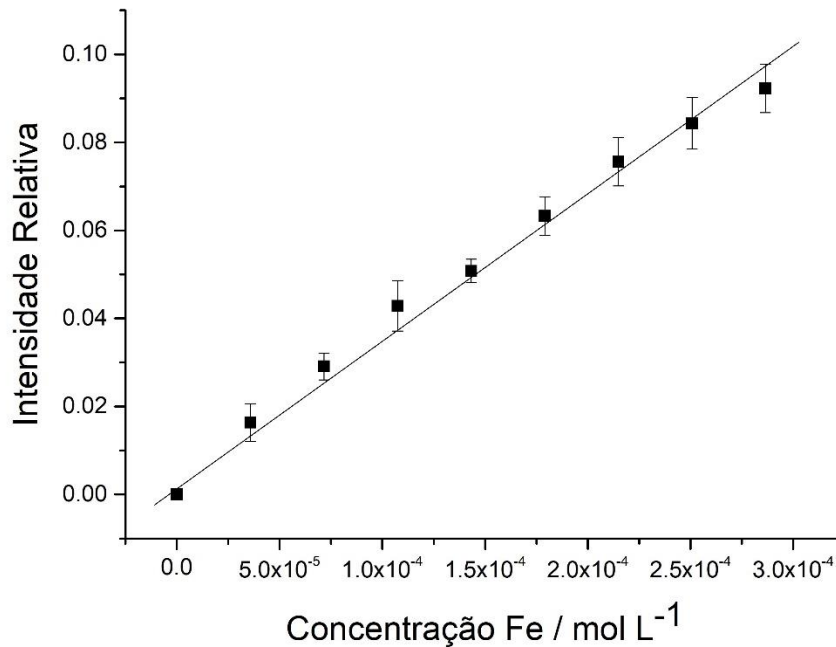


Figura 11: Curva analítica de Fe^{2+} obtida pelo Teste 2.

4.1.3 Resultados – Teste 3

A Figura 12 mostra a curva analítica de ferro complexado com 1,10-fenantrolina feita pelo Teste 2. A equação da reta de regressão da curva analítica obtida por esse teste é: $I_r = 165,5x C - 0,004$; $R^2 = 0,975$. A interpolação das amostras nessa curva forneceu as seguintes concentrações, em mg L^{-1} : 38,3; 46,3 e 40,5 resultando na concentração média de $41,7 \pm 4,2$ mg por comprimido. É possível notar que os desvios das medidas dos pontos da curva são grandes. Isso se deve ao fato de o conta gotas não ser um instrumento volumétrico de precisão, além de ter baixa reprodutibilidade no volume das gotas.

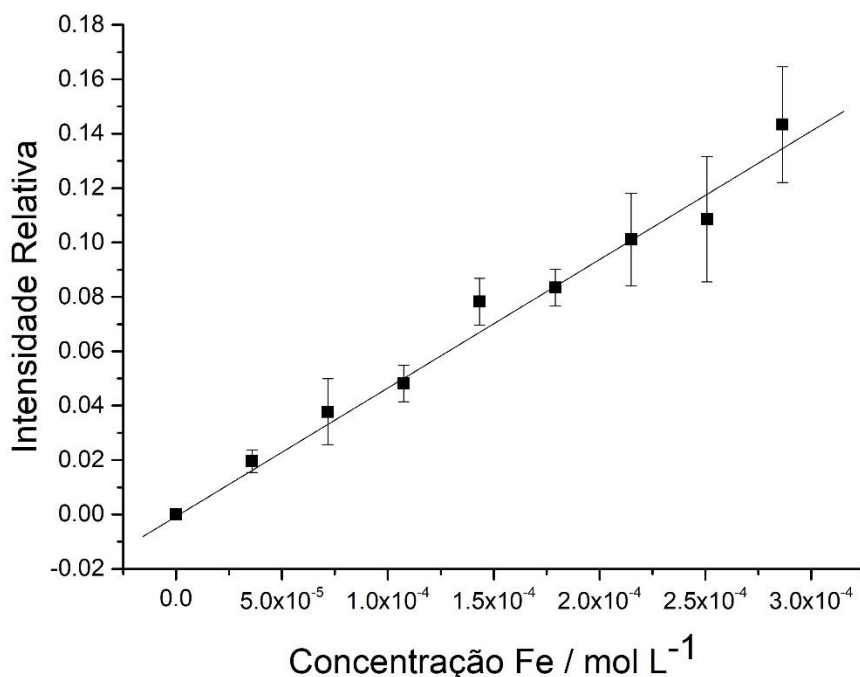


Figura 12: Curva analítica de Fe^{2+} obtida pelo Teste 3.

4.1.4 Resultados – Teste 4

A Figura 13 mostra a curva analítica de ferro complexado com 1,10-fenantrolina feita pelo Teste 2. A equação da reta de regressão da curva analítica obtida por esse teste é: $I_r = 451,9xC + 0,020$; $R^2 = 0,939$. A interpolação das amostras nessa curva forneceu as seguintes concentrações, em mg L^{-1} : 28,5; 29,9 e 30,2 resultando na concentração média de $29,5 \pm 0,9$ mg por comprimido.

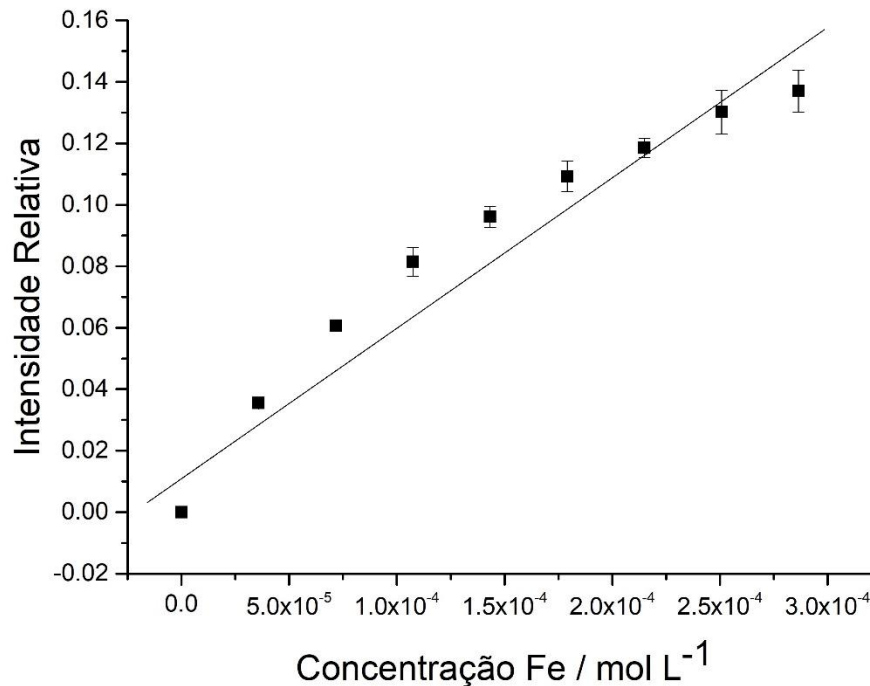


Figura 13: Curva analítica de Fe obtida pelo Teste 4.

Utilizou-se, como método referência e para fins de comparação, um método espectrofotométrico utilizando-se o mesmo método que foi aplicado nos testes anteriores, ou seja, utilizando-se a 1,10-fenantrolina como complexante. Os resultados desse teste são expressos a seguir:

4.1.5 Resultados – Método espectrofotométrico

A curva analítica do método espectrofotométrico é apresentada na Figura 14. Equação da reta de regressão da curva analítica é: $I_r = 11.158xC$; $R^2 = 0,999$. A interpolação das amostras nessa curva forneceu as seguintes concentrações, em mg L^{-1} : 40,1; 40,0 e 40,1, fornecendo a concentração média de $40,0 \pm 0,1$ mg por comprimido.

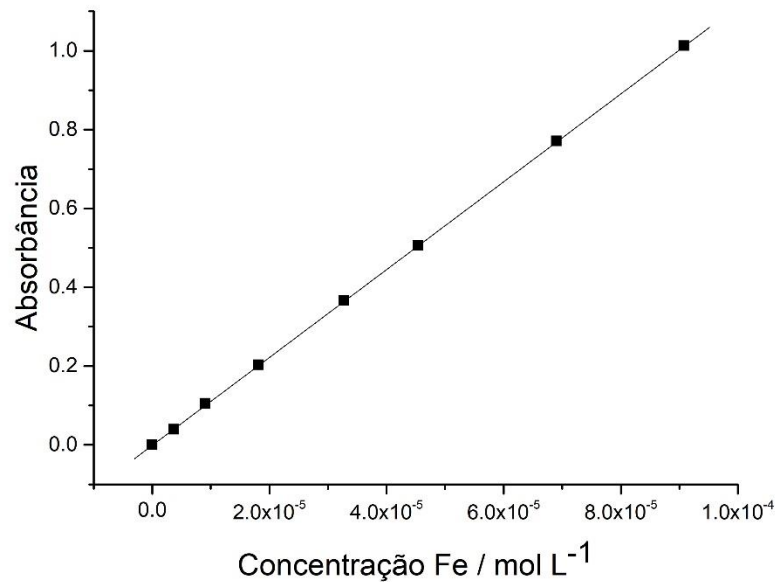


Figura 14: Curva analítica de Fe obtida pelo método espectrofotométrico. Leitura realizada a 510nm em cubeta de vidro de caminho optico 10mm.

Considerando o valor obtido pelo método espectrofotométrico como verdadeiro, o resultado do Teste 1 foi o que apresentou melhor exatidão (a média mais se aproximou do valor considerado verdadeiro) e também maior precisão, ou seja, menor desvio padrão entre as replicatas.

4.1.6 Resultados Gerais – Ferro

Na Tabela 1 são apresentados os resultados das análises da mesma amostra de comprimido de sulfato ferroso discutidos acima. Observou-se que os testes que apresentaram melhor exatidão (considerando como valor verdadeiro o resultado obtido pelo método espectrofotométrico) foram os Testes 1 e 3. Porém, comparando esses 2 testes, aquele que apresentou maior precisão e melhor exatidão foi o Teste 1, sendo considerado então o mais apropriado para essa determinação.

Tabela 1: Comparação entre os resultados dos testes 1, 2, 3 e 4 e o método espectrofotométrico.

	Equação de reta	R ²	[Fe] / comprimido
Teste 1	$I_r = 284,8 \times C + 0,003$	0.992	$42,2 \pm 0,4$
Teste 2	$I_r = 319,2 \times C + 0,004$	0.992	$47,9 \pm 1,7$
Teste 3	$I_r = 165,5 \times C - 0,004$	0.970	$41,7 \pm 4,2$
Teste 4	$I_r = 451,9 \times C + 0,020$	0.939	$29,5 \pm 0,9$
Espectrofotômetro	$I_r = 11.158 \times C$	0.999	$40,0 \pm 0,1$

Cabe lembrar que também é possível fazer o Teste 1 utilizando micro reações em placas de toque ou pequenos recipientes, contribuindo para a redução de custos e geração de resíduos, indo de encontro aos princípios da Química Verde. Pensando nisso, utilizou-se lápis de cor na construção das barreiras hidrofóbicas, pois contém cera em sua composição e são consideravelmente mais baratos do que uma impressora de cera comercial. Utilizou-se, para desenhar as barreiras hidrofóbicas circulares, uma régua geométrica escolar que contém elementos vazados de diversas formas, incluindo um círculo.

Dentre as diversas cores de lápis de cor testadas, todos da marca Faber-Castell®, o que formou uma barreira hidrofóbica mais efetiva foi o de cor marrom. Outras cores apresentaram vazamentos nas barreiras hidrofóbicas após a adição das soluções. Foram feitos então, círculos de lápis de cor marrom em papel de filtro qualitativo. Após tratamento térmico, repetiu-se o Teste 1 nas mesmas condições. Na figura 15, pode-se ver a folha com os *spots* de lápis de cor desenhados e já com os reagentes adicionados, notando-se a formação do complexo colorido. A curva analítica deste teste está representada na Figura 16:

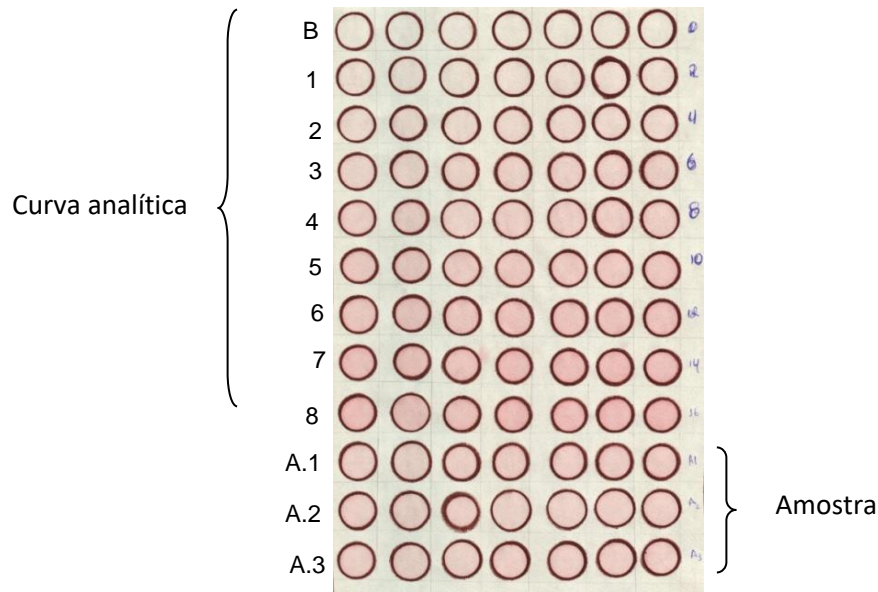


Figura 15: Spot test de ferro construído com lápis de cor, após reação química. A linha nomeada “B” contém o branco, a linha 1 contém o padrão $3,58 \times 10^{-5}$; a linha 2 contém o padrão $7,16 \times 10^{-5}$; a linha 3 contém o padrão $1,07 \times 10^{-4}$; a linha 4 contém o padrão $1,43 \times 10^{-4}$; a linha 5 contém o padrão $1,79 \times 10^{-4}$; a linha 6 contém o padrão $2,15 \times 10^{-4}$; a linha 7 contém o padrão $2,50 \times 10^{-4}$ e a linha 8 contém o padrão $2,86 \times 10^{-4}$, todos os valores em mol L^{-1} . As linhas A1, A2 e A3 contêm as amostras.

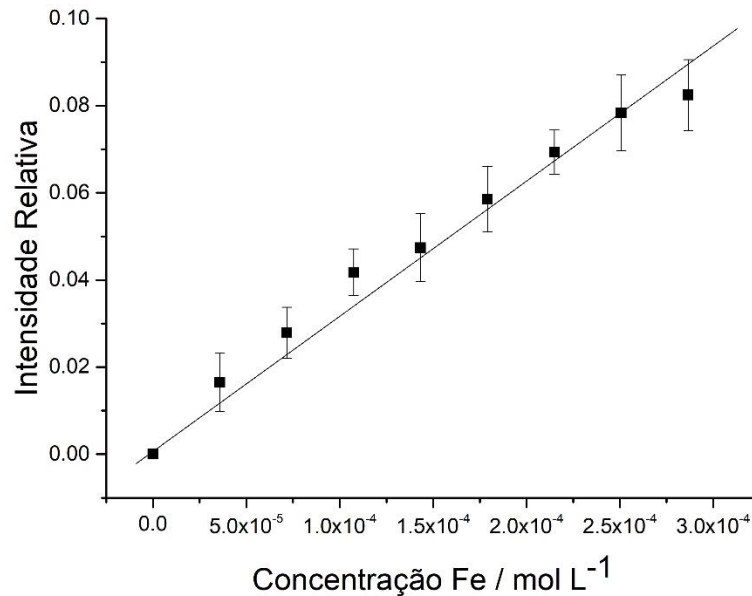


Figura 16: Curva analítica de Fe^{2+} com barreira hidrofóbica construída com lápis de cor.

A Equação da reta de regressão da curva analítica obtida pelo teste com lápis de cor é: $I_r = 286,2x C + 0,006$; $R^2 = 0,985$. A interpolação das amostras nessa curva forneceu as

seguintes concentrações, em mg L⁻¹: 41,0; 37,1 e 39,9, resultando na concentração média de 39,4 ± 2,0 mg Fe / comprimido.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do *spot test* foram determinados (SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V., 2011). Os resultados obtidos foram, respectivamente: 1,17x10⁻⁴ e 3,52x10⁻⁴ mol L⁻¹.

4.1.7 Comparação dos resultados

Na tabela 2 são apresentados os resultados da comparação estatística, utilizando-se teste t de Student, entre os *spot tests* construídos com barreira hidrofóbica feita com impressora de cera e com lápis de cor com os resultados obtidos pelo método de referência.

1) Comparação entre *spot test* com impressora de cera e método referência: 7 medidas de uma mesma amostra foram feitas com o Teste 1, utilizando *spot test* fabricado com impressora de cera. Também foram feitas 3 medidas da mesma amostra em um espectrofotômetro. O teste t de Student foi aplicado para comparar as médias, a fim de verificar se elas são semelhantes.

2) Comparação entre *spot test* com lápis de cor e método referência: 7 medidas de uma mesma amostra foram feitas com o Teste 1, desta vez utilizando *spot test* fabricado com lápis de cor. Os resultados foram também comparados com o valor dos resultados obtidos com o espectrofotômetro.

Tabela 2: Comparação entre os resultados dos *spot tests* construídos com barreira de cera e de lápis de cor e o método espectrofotométrico.

	Equação da reta	mg de Fe / comprimido	t_{tabelado}	t_{calculado}
Cera^a	284,8xC + 0.003	42,2 ± 0,41	2,306	0,59
Lápis de cor^b	286,2xC + 0,006	39,36 ± 2,04	2,306	0,55
Referência^c	11,58xC	40,0 ± 0,1	***	***

^a 7 medidas foram feitas; ^b 7 medidas foram feitas; ^c três medidas foram feitas.

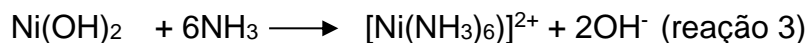
Pela análise da Tabela 2, é possível observar que as equações das retas de regressão dos testes feitos com barreiras hidrofóbicas de cera e lápis de cor são muito semelhantes e que os valores de t calculados para a comparação entre ambos os testes com o método espectrofotométrico (8 Graus de Liberdade e 95% de confiança) são menores que o valor do t tabelado (2,306). Assim sendo, podemos afirmar que tanto o *spot test* com barreira hidrofóbica de cera quanto o de lápis de cor são estatisticamente semelhantes ao método espectrofotométrico. Então, é possível reduzir ainda mais os custos substituindo o espectrofotômetro ou a impressora de cera por lápis de cor, obtendo um resultado tão confiável quanto um método referência.

4.2 Níquel

Para a extração do níquel, é necessário adicionar tampão NH₃/NH₄Cl pH 10 ao extrato. Esse tampão tem duas funções nesse caso: o fornecimento de amônia em excesso para a complexação do níquel, para que esse permaneça em solução, segundo as reações 2 e 3 (VOGEL, 1981, p.292) e a precipitação de todos os metais que compõem o aço inox, pois em pH 10 todos esses metais permanecem na forma de hidróxido, segundo diagrama encontrado em Vogel (1981, p.95). Uma vez que todos os outros metais encontram-se precipitados e somente o níquel está em solução, este é separado com uma filtração com papel quantitativo.



O precipitado Ni(OH)₂ se dissolve em excesso de amônia:



Além disso, para manter as condições de reação segundo Vogel (1981), avolumou-se o balão contendo o níquel já separado dos demais metais com tampão $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ pH 10.

Da mesma maneira que o ferro, também foram feitos testes para níquel. Adicionou-se curva analítica desse metal nos *spots* e utilizou-se, como complexante, a dimetilglioxima, de acordo com a reação mostrada na figura 17:

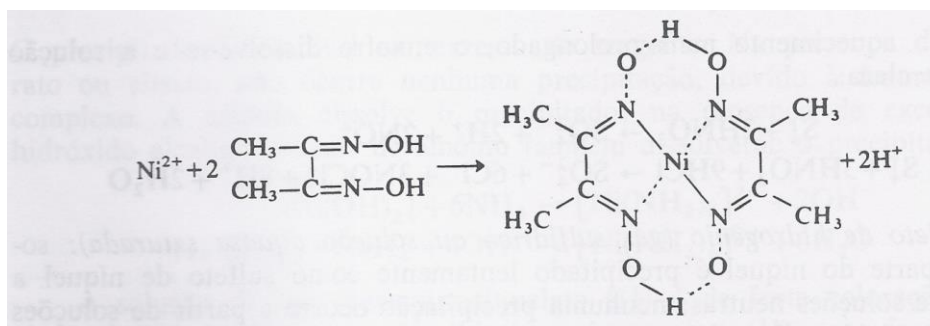


Figura 17: Reação entre níquel e dimetilglioxima (VOGEL, 1981).

Primeiramente, realizou-se um estudo para determinar qual componente é o mais sensível para este teste. Na figura 18, podemos ver os *spot tests* construídos com impressora de cera após receberem os reagentes e a completa reação química. A Figura 19 ilustra a sobreposição das curvas analíticas para os canais G e B.

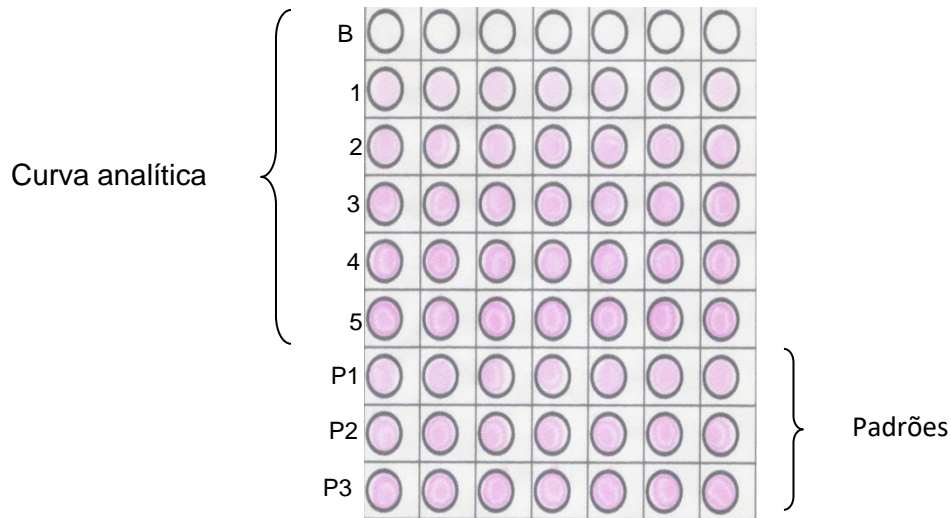


Figura 18: Spot test de níquel após reação química. A linha nomeada “B” contém o branco, a linha 1 contém o padrão 0,001; a linha 2 contém o padrão 0,002; a linha 3 contém o padrão 0,003; a linha 4 contém o padrão 0,004; a linha 5 contém o padrão 0,005; a linha P1 contém o padrão 0,002; a linha P2 contém o padrão 0,003 e a linha P3 contém o padrão 0,004, todos os valores em mol L⁻¹.

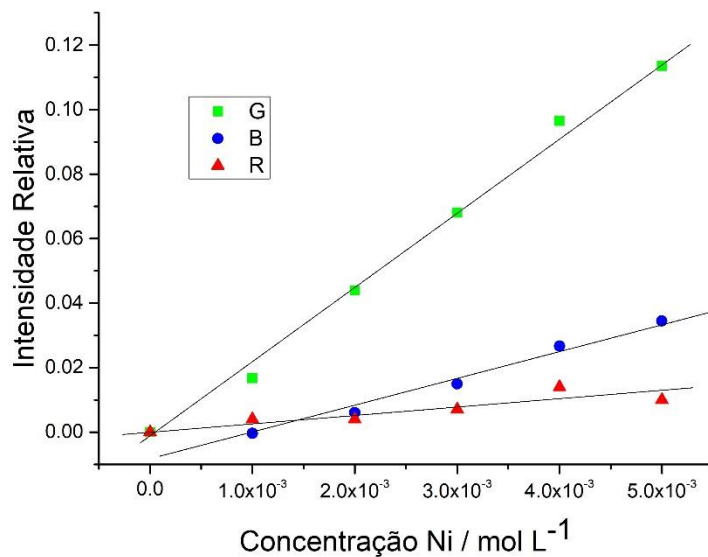


Figura 19: Comparação entre os três canais de cor: R, G e B para a mesma curva analítica de níquel.

As equações das retas de regressão são as seguintes:

$$R: 1,96xC + 0,001; R^2 = 0,579$$

equação (5)

$$G: I_r = 23,74xC - 0,002; R^2 = 0,994$$

equação (6)

$$B: I_r = 9,021xC - 0,010; R^2 = 0,991$$

equação (7)

Conclui-se, pela análise dos dados, que o componente mais sensível e, portanto, mais conveniente para monitorar no caso do níquel é o verde (G), devido ao maior coeficiente angular da curva analítica em comparação aos canais azul (B) e vermelho (R).

Assim, foram feitas curvas analíticas com concentrações de $1,0 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} da mesma maneira como feito no teste para ferro. Os pontos intermediários da curva ($2,0 \times 10^{-3}$, $3,0 \times 10^{-3}$ e $4,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}) foram repetidos e interpolados na reta de regressão, a fim de verificar a recuperação.

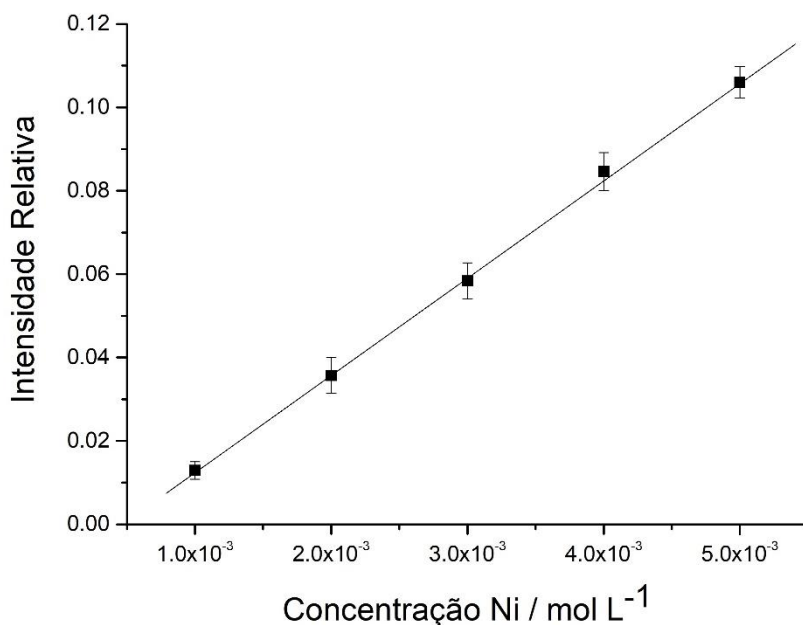


Figura 20: Curva analítica de níquel com dimetilglioxima.

A Equação da reta de regressão é $I_r = 23,51x C - 0,011$ e o coeficiente de correlação é $R^2 = 0,999$. A Tabela 3 expõe os valores de concentrações encontrados para a recuperação dos padrões:

Tabela 3: Concentrações, em mol L⁻¹, calculadas a partir da equação da reta de regressão para o *spot test* acima descrito:

Concentração esperada	Concentração obtida
2,00x10 ⁻³	2,30x10 ⁻³
3,00x10 ⁻³	3,01x10 ⁻³
4,00x10 ⁻³	4,10x10 ⁻³

Os Limites de detecção (LOD) e o de quantificação (LOQ) desse *spot test* são, respectivamente: 1,00x10⁻⁵ e 3,34x10⁻⁵ mol L⁻¹ (SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V., 2011).

Após testes preliminares, o *spot test* foi aplicado em uma amostra de aço inox 316 com a quantidade de cromo certificada por um órgão competente. A amostra, que se apresenta em limalhas, contém 11,12% (m/m) de níquel, ou seja, 11,12 g de níquel para cada 100 g de amostra. Uma pequena porção da amostra foi digerida com água régia. O processo de preparo e digestão é ilustrado no fluxograma da figura 21. O teste foi feito em triplicata.

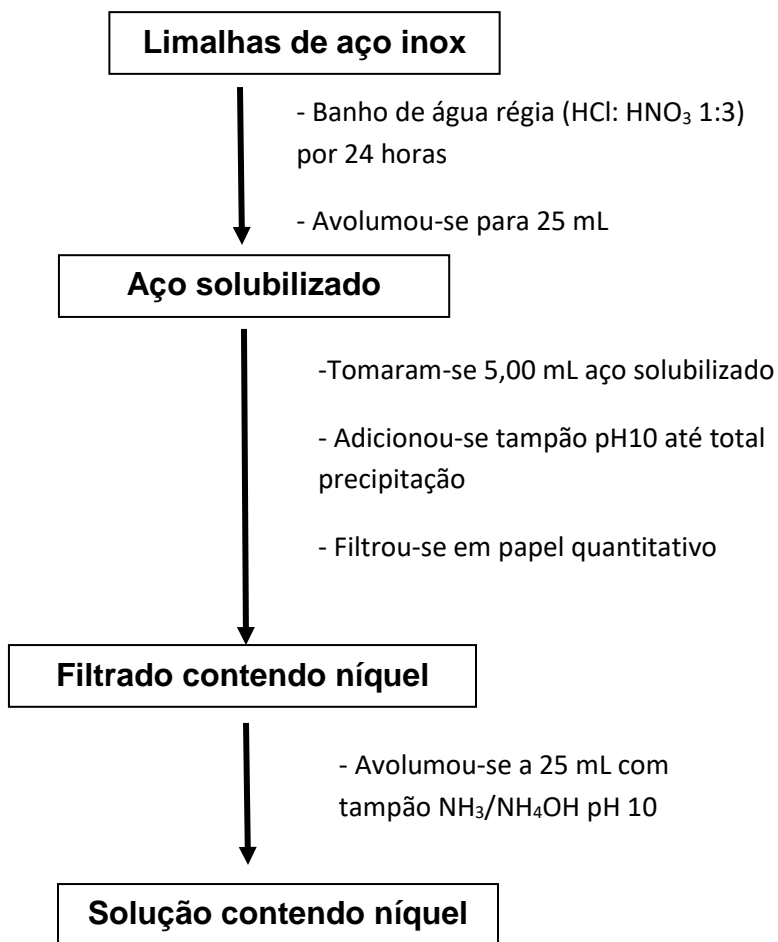


Figura 21: Processo de digestão e preparo da amostra de aço inox para análise de níquel.

Após esse processo, os padrões para a curva analítica e a amostra em triplicata foram adicionados aos *spots* e, após reação química com o complexante, foram escaneados e procedeu-se a análise quantitativa. A tabela 4 mostra o resultado das análises de níquel na amostra de aço inox pelo *spot test*:

Tabela 4: Resultados das análises de níquel.

Amostra	Valor teórico (%)^a	Valor obtido (%)	Desvio (%)
1	11,12	11,1	- 0,01
2	11,12	10,7	- 4,05
3	11,12	10,2	- 8,00
Média	-----	10,7	- 4,05

^a Valor informado no certificado de análise da amostra, em porcentagem (m/m).

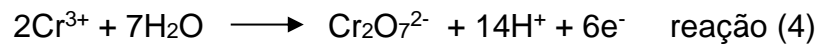
4.2.1 Comparação de resultados

O resultado desse teste foi comparado ao valor do certificado utilizando-se o teste t de Student, considerando este último como o valor verdadeiro, segundo Harris (2005).

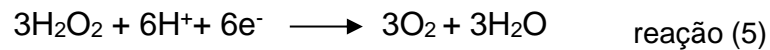
O valor de $t_{\text{calculado}}$ para esse caso é 1,751. O valor de t_{tabelado} com 2 graus de liberdade para 95% de confiança é 4,303. Como o valor de $t_{\text{calculado}}$ é menor do que o valor de t_{tabelado} , é possível afirmar que os resultados obtidos pelo *spot test* não apresentam diferença significativa do valor presente no certificado da amostra.

4.3 CROMO

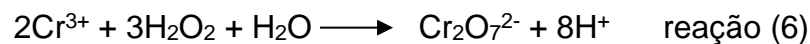
Para a separação do cromo, adiciona-se, em alíquota distinta de 5,0 mL do extrato de aço inox, 10,0 mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes e hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ até atingir pH 10. Dessa forma, todos os metais presentes no aço inox precipitarão na forma de hidróxido exceto o cromo, uma vez que, com excesso de peróxido e pH básico, o Cr(III) se oxida a Cr(VI) na forma de dicromato ficando, portanto, solúvel e separado do restante. Abaixo segue a semi reação de oxidação do Cr(III) a Cr(VI) reação (4), cujo potencial padrão de reação (E₀) é 1,77V.



Paralelamente ocorre a redução do peróxido de hidrogênio, cuja semi reação está representada a seguir reação (5) e cujo potencial padrão para a semi reação (E₀) é -1,36V.



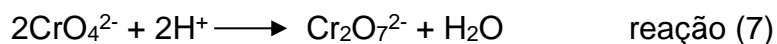
Somando as duas semi reações, obtemos a equação global de oxirredução do Cr(III) e do peróxido de hidrogênio, segundo a reação (6), cujo potencial padrão para a semi reação (E₀) é 0,41V, ou seja, termodinamicamente favorável.



Nessa etapa o meio reacional está ácido, uma vez que o peróxido é adicionado diretamente ao extrato de aço inox, que fora digerido com água régia. Assim, a reação 5 fica impossibilitada de ocorrer, uma vez que a grande concentração de prótons livres desloca o equilíbrio na direção dos reagentes. Por essa razão é necessário adicionar hidróxido de sódio até o meio reacional ficar básico pois, dessa maneira, os íons hidróxido consomem os prótons que são liberados durante o processo, deslocando assim, o equilíbrio para a formação dos produtos.

No entanto, quando o dicromato é formado, em meio básico, este é rapidamente transformado em cromato, como podemos ver na reação (7). Como o meio reacional está básico, os prótons livres são consumidos e o equilíbrio é deslocado no sentido da formação

dos reagentes, ou seja, cromato. A condição para a ocorrência da reação de complexação é justamente o cromo na forma de cromato e meio levemente ácido (VOGEL, 1981).



O tempo em ultrassom na etapa mostrou-se necessário pois, sem essa etapa, as quantidades de cromo encontradas na amostra são muito diferentes do valor real. Uma hipótese para esse fato é que o cromo permanece preso (por nucleação ou atração eletrostática) aos precipitados gelatinosos formados pelos hidróxidos de outros metais que compõem a liga. Realizou-se estudo para a determinação do tempo em que a amostra ficaria imersa no banho ultrassônico.

Após 25 minutos em banho ultrassônico, o extrato é submetido à fervura por 3 horas em banho maria, para que todo o peróxido fosse degradado. À metade desse tempo, adicionaram-se mais 5,0 mL de peróxido para que algum possível resíduo de cromo (III) fosse oxidado. Após esse tempo, filtrou-se o extrato e recolheu-se o filtrado com o cromo em balão de 250 mL, o qual foi avolumado com tampão acetato pH 4. A função desse tampão é manter o pH ácido, condição ideal para a reação do cromo com a difenilcarbazida (VOGEL, 1981).

Analogamente ao ferro e ao níquel, os testes de cromo foram conduzidos adicionando-se pontos da curva analítica e da amostra nos *spots* e, logo em seguida, o agente complexante (no caso, 1,5-difenilcarbazida). A Figura 22 ilustra a reação química entre o cromo e o complexante. Na Figura 23 podemos ver a folha de *spots* após adição de cromo e complexante.

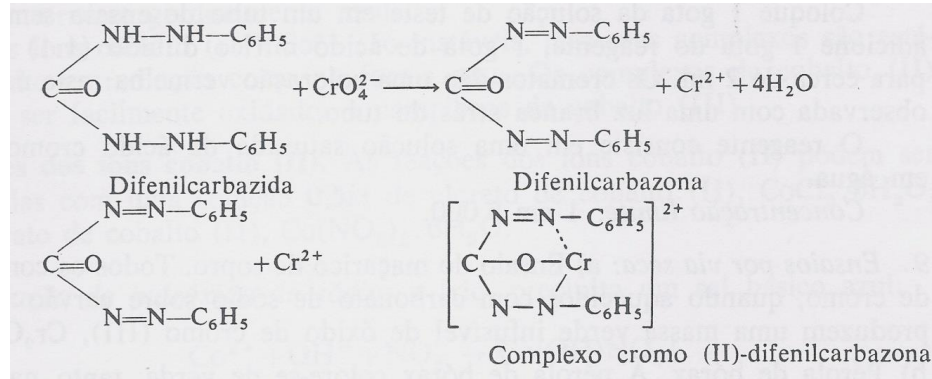


Figura 22: Reação entre o cromo, na forma de cromato, e a difenilcarbazida (VOGEL, 1981).

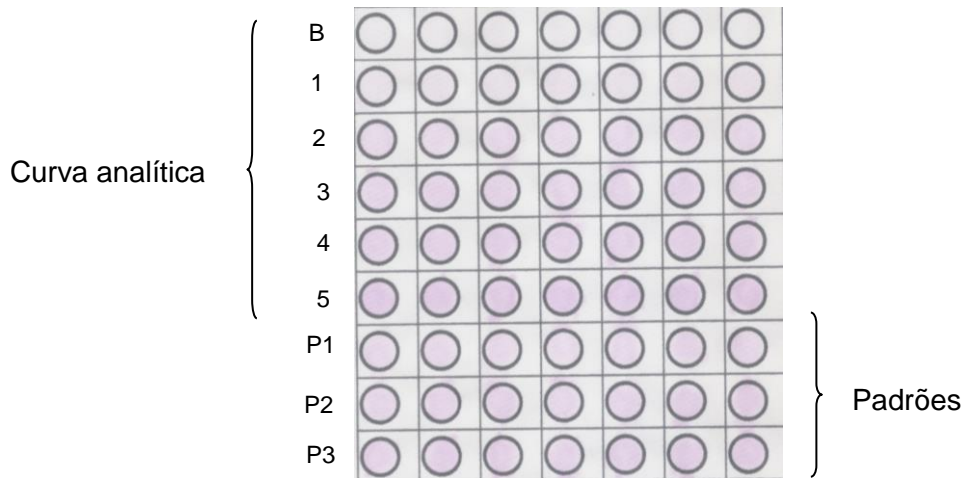


Figura 23: Spots em papel de filtro após adição de cromo e o complexante, resultando em um produto colorido. A linha nomeada “B” contém o branco, a linha 1 contém o padrão $1,0 \times 10^{-4}$; a linha 2 contém o padrão $2,5 \times 10^{-4}$; a linha 3 contém o padrão $3,75 \times 10^{-4}$; a linha 4 contém o padrão $5,0 \times 10^{-4}$; a linha 5 contém o padrão $7,5 \times 10^{-4}$; a linha P1 contém o padrão $2,5 \times 10^{-4}$; a linha P2 contém o padrão $5,0 \times 10^{-4}$ e a linha P3 contém o padrão $7,5 \times 10^{-4}$, todos os valores em mol L^{-1} .

A curva analítica foi feita nos três canais de cor: vermelho, verde e azul, para que fosse determinado o componente mais sensível para a realização dos testes. Na figura 24 podemos ver a sobreposição das curvas analíticas feitas pelos três canais de cores:

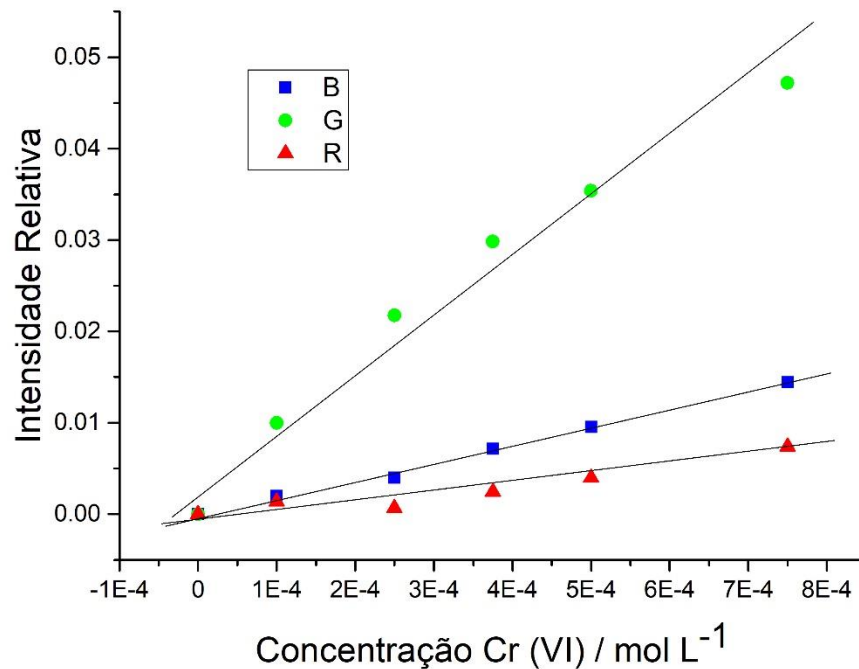


Figura 24: Sobreposição de curvas analíticas de cromo obtidas pelos três componentes de cores.

As equações das retas de regressão para os três canais são:

$$R: I_r = 19,31xC + 0,0001; R^2 = 0,996 \quad (\text{equação 8})$$

$$G: I_r = 61,97xC + 0,003; R^2 = 0,974 \quad (\text{equação 9})$$

$$B: I_r = 9,403xC + 0,0002; R^2 = 0,903 \quad (\text{equação 10})$$

Pela análise das retas de regressão, foi possível concluir que o melhor componente para monitorar o cromo, nessas condições, é o verde (Green), pois a reta de regressão dessa curva apresenta maior coeficiente angular e, portanto, maior sensibilidade na análise.

Após determinar o melhor componente e considerar a curva analítica do verde, testes de recuperação de padrão, limites de detecção e quantificação foram feitos. Os resultados podem ser vistos na tabela 5:

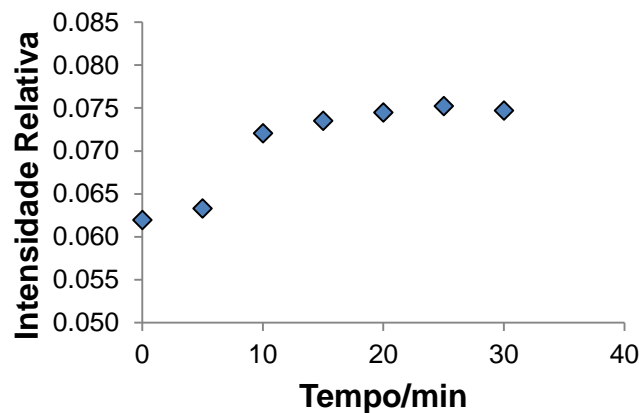
Tabela 5: Resultados de recuperações de padrão para o *spot test* de cromo.

Concentração esperada ^a	Concentração obtida ^a
$2,50 \times 10^{-4}$	$2,41 \times 10^{-4}$
$5,00 \times 10^{-4}$	$5,02 \times 10^{-4}$
$7,50 \times 10^{-4}$	$7,30 \times 10^{-4}$

^avalores expressos em mol.L⁻¹.

Também foram calculados os limites de detecção e quantificação, sendo, respectivamente, em mol L⁻¹: $1,91 \times 10^{-6}$ e $6,38 \times 10^{-6}$ (SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V., 2011).

A digestão da amostra de aço inoxidável para que seja possível extrair o cromo para análise está exemplificada na Figura 26, na forma de fluxograma. Antes de prosseguir com a digestão, foi feito estudo do tempo ótimo de imersão em banho ultrassônico ao qual a amostra deveria ser submetida. Na Figura 25 é possível visualizar que a intensidade relativa das amostras aumenta conforme aumenta-se o tempo de imersão no banho ultrassônico. A partir de 15 minutos, não há alteração significativa na intensidade de coloração, porém, o ponto de maior sinal é em 25 minutos, levando à conclusão de que esse é o tempo ideal de imersão em banho ultrassônico.

**Figura 25:** Estudo da influência do tempo de imersão em banho ultrassônico na intensidade relativa e coloração da amostra de cromo.

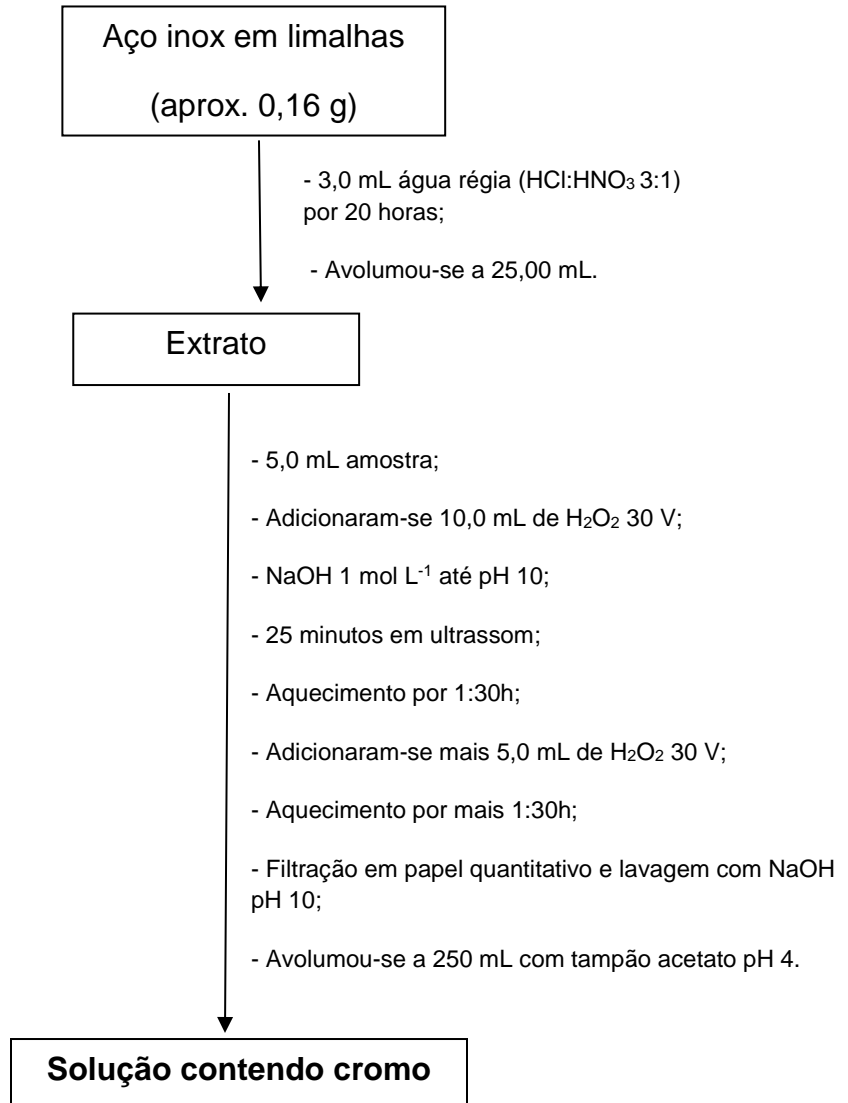


Figura 26: Fluxograma descritivo sobre tratamento da amostra para análise de cromo.

O procedimento acima descrito foi feito em triplicata. A curva analítica está representada na Figura 27 e os resultados das análises feitas com o *spot test* estão expostos na Tabela 6:

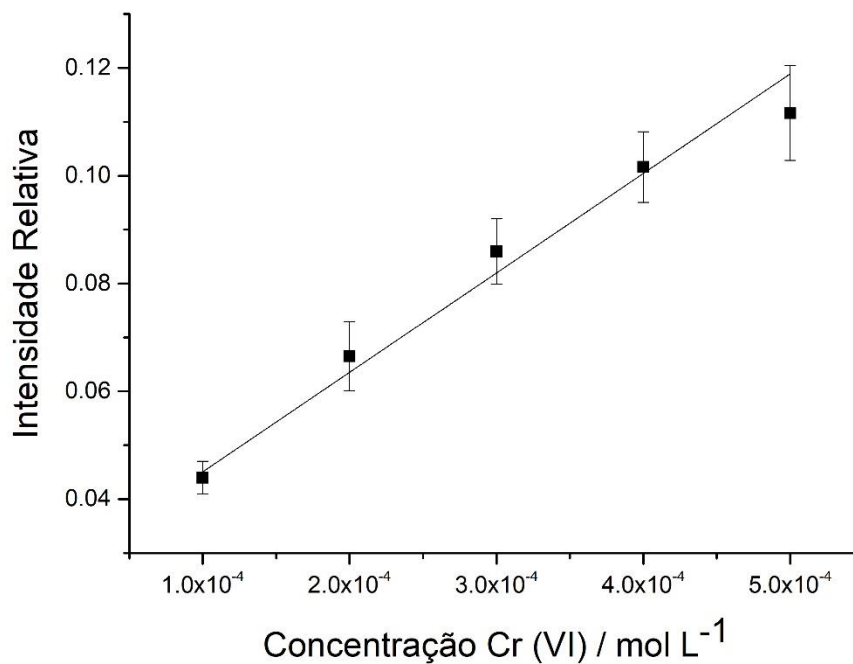


Figura 27: Curva analítica de cromo.

Tabela 6: Resultados das análises de cromo.

Amostra	Valor teórico^a	Valor obtido	Desvio
1	17,37%	16,4 %	- 5,53%
2	17,37%	15,4 %	- 11,1 %
3	17,37%	17,8%	+ 2,50 %
Média	-----	16,6 %	- 4,72 %

^a Valor informado no certificado de análise da amostra, em porcentagem (m/m).

4.3.1 Comparação de resultados

O resultado desse teste foi comparado ao valor do certificado utilizando-se o teste t de Student, considerando este último como o valor verdadeiro, segundo método Harris (2005).

O valor de $t_{\text{calculado}}$ para esse caso é 1,193. O valor de t_{tabelado} com 2 graus de liberdade para 95% de confiança é 4,303. Como o valor de $t_{\text{calculado}}$ é menor do que o valor de t_{tabelado} , é possível afirmar que os resultados obtidos pelo *spot test* são estatisticamente equivalentes, a um nível de confiança de 95% ao valor presente no certificado da amostra (17,37% m/m).

4 CONCLUSÃO

Os *spot tests* apresentados acima apresentaram resultados satisfatórios. Todas as retas de regressão das curvas analíticas utilizadas para quantificação dos três analitos apresentaram um coeficiente de correlação acima de 0,980, chegando a 0,999, o que é muito bom para um teste rápido e que apresenta grande portabilidade e facilidade de operação.

Outra vantagem que foi destacada é a redução de custos. Além de utilizar poucos reagentes e produzir pouca quantidade de resíduos em todos os testes, também foi possível a construção de uma plataforma de papel com barreiras hidrofóbicas eliminando a impressora de cera e substituindo-a por lápis de cor, ampliando muito a economia e portabilidade. Em todos os casos, foi possível realizar uma análise quantitativa sem nenhum equipamento, como por exemplo um espectrofotômetro ou um espectrômetro de absorção atômica, reduzindo drasticamente o custo dos experimentos.

Considerando a aplicação prática dos testes, todos os resultados obtidos foram submetidos a uma comparação estatística com outros métodos ou com um certificado de análise emitido por órgão competente utilizando o teste t de Student, fornecendo resultados estatisticamente semelhantes a método espectrofotométrico, no caso do ferro em medicamento e também a certificado de análise, no caso de níquel e cromo no aço inox. Destaque merece ser dado para o *spot test* construído com lápis de cor, que também forneceu resultados estatisticamente semelhantes ao método espectrofotométrico.

Embora os testes 2, 3 e 4, no caso do ferro, não apresentem grande precisão e exatidão, ainda podem ser aplicados obtendo-se resultados satisfatórios, dependendo das condições de infra estrutura disponíveis e finalidades as quais se destinam. O teste 3, por exemplo: apresentou baixa precisão e grande desvio das medidas dos pontos, porém é perfeitamente aplicável em situações onde não há uma micropipeta disponível.

Em suma, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios e mostraram confiabilidade, portabilidade e economia. Uma perspectiva de aplicação desses testes é em disciplinas de química para graduação (ou até mesmo pós graduação), pois desperta nos alunos esse tipo de senso crítico, muito pouco explorado em disciplinas experimentais. Nesse caso, os estudantes podem, eles próprios, construir os *spots* utilizando lápis de

cor, ficando evidenciada a facilidade e portabilidade dos testes. Além disso, utilizaram-se vários conceitos de química analítica qualitativa na separação de cromo e níquel em aço inoxidável, abrindo um vasto campo para discussão de equilíbrios químicos e a influência de parâmetros como o pH na separação de elementos.

REFERÊNCIAS

- ABE, K.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 6928-6934, 2008.
- BATISTA, R. T. **Caracterização de um sistema de fluorescência de raios X por dispersão em energia para análise quantitativa de ligas metálicas**. 2001. 68 f. Dissertação (mestrado em física), Instituto de Física, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- BENEDETTI, L. P. S. **Determinação in situ de analitos de interesse Alimentício empregando tratamento de imagens digitais de spot tests**. 2013. 78 f. Dissertação (mestrado em química), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- BRUZEWICZ, D. A.; RECHES, M.; WHITESIDES, G. M. Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 3387-3392, 2008.
- CARDOSO, T. M. G. **Desenvolvimento de tecnologias alternativas para fabricação de dispositivos microfluídicos em papel**. 2014. 80 f. Dissertação (mestrado em química), Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.
- CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 7091-7095, 2009.
- CHEN, C-Y. et. al. Laminated copper nanocluster incorporated antioxidative paper device with RGB system-assisted signal improvement. **Nanomaterials** v. 8, n. 2, 2018. DOI 10.3390/NANO8020097.
- DIAS, B. D et. al. Ação do enxofre em chuva ácida simulada sobre parâmetros morfofisiológicos de *Phaseolus vulgaris L. (Fabaceae)*. **Acta Scientiarum**. Agronomy v. 32, n. 3, p. 433-439, 2010.
- ELKINS K. M. et.al. Colour quantitation for chemical spot tests for a controlled substances presumptive test database. **Drug Testing and Analysis**, n. 9, p. 306-310, 2017.
- HARRIS, D. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.
- LAPRESTA-FERNÁNDEZ, A.; CAPITÁN-VALLVERY, F. Evaluation of analytical reflection scanometry as an analytical tool. **Analytical Methods**, v. 3, n. 11, p.2644-2650, 2011.
- LIU, N.; YU, R. Identifying design feature factors critical to acceptance and usage behavior of smartphones. **Computers in Human Behavior**, v. 70 p. 131-142, 2017.

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

MARTINEZ, A.; PHILLIPS, S; WHITESIDES, G. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. **Analytical Chemistry**, v. 82. n. 1, p. 3-10, 2010.

MATIAS, A. A. F. VILA M. M. D. C. TUBINO M. Quantitative Reflectance Spot Test for the Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Preparations. **Jornal Sociedade Brasileira de Química**, v.15, n. 2, p. 327-330, 2004.

MORBIOLI, G. G. **Funcionalização de celulose para ensaios bioanalíticos em dispositivos microfluídicos baseados em papel (μ PAD)**. 2015. 178 f. Dissertação (mestrado em Química Analítica e Inorgânica), Instituto de Química de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

MOUTINHO, D. J. C. **Análise da evolução microestrutural e da formação de macrossegregação e microporosidade na solidificação unidirecional transitória de ligas ternárias Al-Cu-Si**. 2012. 172 p. Tese (doutorado em engenharia mecânica), Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

MUSILE, G. et. al. The development of paper microfluidic devices for presumptive drug detection. **Analytical Methods**, v. 7, n. 19, p. 8025-8033, 2015.

NEVES, E. B. BIEHL, L. V.; OSORIO, A. G.; SCHNEIDER, T. H. Estudo da sinterização de uma liga Fe-22,5Cr-5,5Ni obtida pela mistura de pós elementares. **Revista Matéria**, v. 21, n. 1, p.185-195, 2016.

PACIORNIK, S.; YALLOUZ, A. V.; CAMPOS R. C.; GANNERMAND, D. Scanner image analysis in the quantification of mercury using spot-tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 156-161, 2006.

PESSOA, K. D. et al A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 310-316, 2017.

SALMAN, M. et al A rapid method for measurement of nickel and chromium at trace level in aqueous samples. **Journal of the Mexican chemical society**, v. 55, p. 214-217, 2011.

SAWYER, D. T.; HEINEMAN, W. R.; BEEBE, J. N. **Chemistry experiments for instrumental methods**. New York: John Wiley & sons, 1984.

SHOKROLLAHI, A.; SHOKROLLAHI, N. Determination of Mn^{2+} ion by solution scanometry as a new, simple and inexpensive method. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1589-1593, 2014.

SHOKROLLAHI A.; ZARGHAMPOUR F.; AKBARI S.; SALEHI A. Solution scanometry, a new method for determination of acidity constants of indicators. **Royal Society of Chemistry**, v. 7, p. 3551-3558, 2015.

SHOKROLLAHI, A.; MOHAMMADPOUR, Z.; ABBASPOUR, A., colorimetric determination of free salicylic acid in aspirin and urine by scanometry as a new, reliable, inexpensive and simple method, **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 51, n. 4, p. 324-329, 2017.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. Methods for determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n. 1, p.21-25, 2011.

SILVA, C. O. **Caracterização do metal de solda do aço inoxidável austenítico AISI 316L com laser pulsado nd:yag**. 2017. 72 f. Dissertação (mestrado em Engenharia Mecânica), Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2017.

SOUZA, F.R.; JUNIOR, G. F.D; GARCIA, P. T.; COLTRO, W. K. T. Avaliação de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1171-1176, 2014.

STEINMETZ, T.; et. al Antianemic treatment of cancer patients in german routine practice: data from a prospective cohort study—the tumor anemia registry. **Anemia**, v. 2016, p.1-9, 2016.

VOGEL, A. **Química analítica qualitativa**. 5. ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981.

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

WHITESIDES, G. et. al.; Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie International edition** v. 46, p. 1318-1320, 2007.

ZERAIK, A. E.; SOUZA F. S. A.; FATIBELLO FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, n. 31, p. 731, 2008.