

Universidade de São Paulo

Cleyton Nascimento Makara

Desenvolvimento de uma plataforma de baixo custo com aplicação na agricultura
para determinação semi-quantitativa de micro- e macronutrientes no solo

São Carlos

2018

Cleyton Nascimento Makara

Desenvolvimento de uma plataforma de baixo custo com aplicação na agricultura
para determinação semi-quantitativa de micro- e macronutrientes no solo

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências.
Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. À minha amiga e companheira Karine Minari que se fez presente em todos os momentos de conquista e fraqueza. Sou imensamente grato por tê-la em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado forças e saúde para chegar onde estou.

À sociedade brasileira por ter financiado a minha vida acadêmica, assim como ao CNPq.

A esta Universidade, seu corpo docente, direção e administração.

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho por ter me recebido e confiado na minha capacidade em desenvolver este trabalho. Os meus agradecimentos sinceros são eternos.

Às pessoas que Deus colocou em minha vida nesse trajeto e que tive a oportunidade de conhecer.

Aos amigos formados na pós-graduação e fora dela. Tive oportunidade de conhecer pessoas brilhantes.

Aos alunos integrantes do grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações – BioMicS da USP pela colaboração e ajuda. Em especial à Juliane Borba, Juliana Alberice e Jonatan Catai pelas sugestões e ajuda no desenvolvimento do projeto.

Sou imensamente grato aos integrantes do grupo pelos valores morais e éticos aqui demonstrados. Levarei comigo tudo que aprendi com este grupo unido.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha vida acadêmica, o meu muito obrigado.

RESUMO

Com o crescimento populacional crescente, a demanda por alimentos torna-se vital e o monitoramento de nutrientes no solo para sua produção é indispensável. A importância do agronegócio na sociedade, aliado com o desenvolvimento de plataforma microfluídica na atualidade, nos impulsionou o seu desenvolvimento para a determinação simultânea de nutrientes como fosfato, nitrato, nitrito, zinco, boro, ferro, cobalto e cobre. Com aplicação de um pequeno volume de amostra no centro da plataforma dispositivo microfluídica, o líquido percola o interior da plataforma por capilaridade até os *spots*, onde estão depositados os reagentes. Após a amostra atingir o *spot*, uma alteração visual da cor é observada, podendo ser quantificada por análise de imagem. As curvas analíticas foram construídas em três soluções diferentes: água, ácido cítrico 2% (m/v) e citrato neutro de amônio. O boro apresentou R^2 0,96 e faixa linear de trabalho entre 10 e 250 mg/L quando as imagens foram adquiridas com *smartphone* e dispositivo seco. Já o cobalto apresentou R^2 0,99 e maior sensibilidade, de 0,07 e 0,04 pixel/mg/L quando molhado e seco em água respectivamente, com as imagens capturadas com *scanner* e aumento da faixa linear de trabalho quando secos. Cobre apresentou R^2 0,99, faixa linear de trabalho de 0 a 550 mg/L e sensibilidade de 0,09 e 0,08 pixel/mg/L quando molhado e seco respectivamente com imagens capturadas com *smartphone* em solução de citrato neutro de amônio. Para Fe^{2+} as imagens capturadas por *smartphone* teve aumento da sensibilidade de 0,05 para 0,17 pixel/mg/L e R^2 0,99 em ácido cítrico 2% (m/v) respectivamente quando molhado e seco. A curva analítica para Fe^{3+} apresentou R^2 0,96 e sensibilidade 0,46 pixel/mg/L em ácido cítrico 2% (m/v) quando capturada a imagem molhada com *scanner*. Resultado superior ao capturado com *smartphone*. Para o fosfato, as imagens adquiridas com *smartphone* apresentaram R^2 0,99 e diminuição de sua sensibilidade de molhado para seco em solução de água ou citrato neutro de amônio. A curva analítica de nitrito, nitrato e zinco apresentaram baixa reprodutibilidade. A aquisição de imagens pode ser realizada através do uso de *smartphone* ou *scanner*, mas o tempo para realizar a aquisição de imagem é um fator importante. Os dados gerados podem ser utilizados na modelagem da distribuição de nutrientes no terreno em estudo e posterior correção visando benefícios à agricultura.

ABSTRACT

With increasing population growth, the demand for food becomes vital and the monitoring of nutrients in the soil for its production is indispensable. The importance of agribusiness in society, together with the development of a microfluidic platform, has led us to develop simultaneously the nutrients such as phosphate, nitrate, nitrite, zinc, boron, iron, cobalt and copper. With application of a small volume of sample in the center of the platform microfluidic device, the liquid percolates the interior of the platform by capillarity until the spots, where the reagents are deposited. After the sample reaches the spot, a visual alteration of the color is observed, and can be quantified by image analysis. The analytical curves were constructed in three different solutions: water, 2% citric acid (m / v) and neutral ammonium citrate. The boron presented R^2 0.96 and linear working range between 10 and 250 mg / L when the images were acquired with smartphone and dry device. On the other hand, cobalt presented R^2 0.99 and higher sensitivity of 0.07 and 0.04 pixel / mg / L when wet and dry in water respectively, with the images captured with scanner and increase of the linear range when dry. Copper presented R^2 0.99, linear working range from 0 to 550 mg / L and sensitivity of 0.09 and 0.08 pixel / mg / L when wet and dry respectively with images captured with smartphone in neutral ammonium citrate solution . For Fe²⁺, the images captured by smartphone increased sensitivity from 0.05 to 0.17 pixel / mg / L and R^2 0.99 in citric acid 2% (m / v) respectively when wet and dry. The analytical curve for Fe³⁺ presented R^2 0.96 and sensitivity 0.46 pixel / mg / L in citric acid 2% (m / v) when the wetted image was captured with a scanner. Result higher than that captured with smartphone. For phosphate, the images acquired with a smartphone showed R^2 0.99 and decreased its sensitivity from wet to dry in water solution or neutral ammonium citrate. The analytical curve of nitrite, nitrate and zinc presented low reproducibility. Image acquisition can be accomplished through the use of smartphone or scanner, but the time to perform image acquisition is an important factor. The data generated can be used in the modeling of nutrient distribution in the field under study and later correction aiming at benefits to agriculture.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Levantamento bibliográfico realizado na plataforma *Web of Science* relacionado com microfluídica. A) Levantamento bibliográfico relacionado com microfluídica; B) Microfluídica baseado em papel. pg. 2
- Figura 2 Solo dividido em horizontes A, B e C. pg. 5
- Figura 3 Influência do pH do solo na disponibilidade de nutrientes. A espessura das barras horizontais indica o grau de disponibilidade do nutriente para as raízes das plantas. Todos esses nutrientes estão disponíveis na faixa de pH de 5,5 a 6,5. pg. 8
- Figura 4 Reação de Griess. pg. 10
- Figura 5 Mecanismo de reação do zinco com ditizona. pg. 14
- Figura 6 Mecanismo de reação boro com curcumina. pg. 14
- Figura 7 Complexo entre cobre monovalente e ácido bicinconínico. pg. 15
- Figura 8 Complexo entre ferro bivalente e 1,10-fenantrolina. pg. 16
- Figura 9 Métodos de fabricação de μ PADs. pg. 19
- Figura 10 Impressão de dispositivos PT com estruturas STL e DTL. pg. 21
- Figura 11 Processo de fabricação dos dispositivos de papel. (a) desenho do microdispositivo; (b) impressão de cera na superfície do papel; (c) fusão e permeação da cera no papel por aquecimento na estufa; (d) dispositivo finalizado. pg. 29
- Figura 12 Layout dos dispositivos. (A) em papel cromatográfico Whatman; (B) em poliéster - toner; (C) híbrido em poliéster – toner e papel cromatográfico Whatman. pg. 30
- Figura 13 Captura de imagem. (A) Scanner; (B) Smartphone. pg. 31
- Figura 14 Sistema para aquisição de imagem com smartphone LG-D805. pg. 32
- Figura 15 Espectrômetro de absorção atômica. pg. 32

- Figura 16 Ensaios colorimétricos para determinação de micro- e macronutrientes. Os eppendorfs à esquerda contêm somente os reagentes (branco), e os da direita evidenciam a coloração do produto da reação após a adição do analito, referente as determinações: (A) fosfato com ácido molibdovanadofosfórico. (B) fosfato com reagente vanadomolíbdico e posterior redução com ácido ascórbico. (C) nitrito com reagente de Griess. (D) nitrato através da redução com zinco e posterior reação com reagente de Griess. (E) zinco com ditizona. (F) boro com solução etanólica de curcumina. (G) potássio com tetrafenilborato de sódio. (H) cobalto com nitrito de sódio. (I) Fe^{2+} com 1,10-fenantrolina. (J) Fe^{3+} com 1,10-fenantrolina após redução com cloridrato de hidroxilamina. (K) cobre com ácido bicinconínico após redução com cloridrato de hidroxilamina.
- Figura 17 Impressão da cera e sua percolação através do papel. pg. 35
- Figura 18 Influência da largura do canal na velocidade de percolação do fluido. Ensaio realizado com solução de corante à base de água no papel cromatográfico Whatman Nº 1 com cera. pg. 36
- Figura 19 Influência da largura do canal na velocidade de percolação do fluido. Ensaio realizado com solução de corante à base de água no papel cromatográfico Whatman Nº 1 com cera. pg. 37
- Figura 20 Curva analítica de zinco com ditizona. pg. 38
- Figura 21 Determinação colorimétrica de fosfato. (A) Cor azul proveniente da reação do íon fosfato com reagente vanadomolíbdico e posterior redução com ácido ascórbico. Cor azul oriunda da redução de Mo(VI) a Mo(V). (B) Imagem superior: ácido molibdovanadofosfórico no papel. Imagem inferior: cor amarela proveniente da reação do íon fosfato com ácido molibdovanadofosfórico. pg. 39

- Figura 22 Determinação de nitrato através da sua redução para nitrito com zinco metálico em pó e posterior reação de Griess. (A) Detalhe da separação do pó de zinco metálico e reagente de Griess no dispositivo. (B) Resultado da reação de Griess através da aplicação de amostra contendo nitrato. A reação ocorreu após a redução do nitrato em nitrito. pg. 40
- Figura 23 Imagens de MEV da superfície do papel cromatográfico Whatman Nº 1 sem cera em duas regiões distintas. pg. 42
- Figura 24 Imagens de MEV de partículas de pó de zinco. pg. 42
- Figura 25 Imagens de MEV da superfície μ PADs com partículas de zinco depositadas. As imagens A e B apresentam escala de 10 μ m e as imagens C e D apresentam escala de 20 μ m. pg. 43
- Figura 26 Influência da posição do respiro da zona reacional em dispositivo microfluídico de poliéster-toner na formação de bolhas no interior da zona reacional. (A) 45°; (B) 90°; (C) 145° e (D) 180°. pg. 44
- Figura 27 Imagem de scanner de dispositivo microfluídico para determinação simultânea de nitrito, fosfato, potássio e boro. (A) Reagentes aplicados nos dispositivos, secos em estufa e laminados posteriormente a quente. (B) Desenvolvimento de cor do produto da reação com aplicação de uma solução mix contendo nitrito, fosfato, potássio e boro. Círculos I – IV destacados para melhor discussão, em detalhes, no texto. pg. 45
- Figura 28 Dispositivo microfluídico híbrido de poliéster-toner na determinação de zinco com ditizona. pg. 47

- Figura 29 Curva analítica referente a boro em água ($n = 3$). A) Curva pg. 48 analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal verde; B) Ídem com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal vermelho; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal verde; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 40 a 400 mg/L no canal azul.
- Figura 30 Curva analítica referente a boro em ácido cítrico 2% (m/v) ($n = 3$). pg. 50
A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 400 mg/L no canal verde; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 550 mg/L no canal verde; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal verde; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal verde.
- Figura 31 Curva analítica referente ao cobalto em água ($n = 3$). A) Curva pg. 52 analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 550 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 40 a 850 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 1000 mg/L no canal azul.

Figura 32 Curva analítica referente ao cobalto em ácido cítrico 2% (m/v) ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal verde; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 40 a 550 mg/L no canal verde; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal verde; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 550 mg/L no canal vermelho.

Figura 33 Curva analítica referente ao cobre em água ($n = 3$). A) Curva pg. 56 analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal vermelho; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 250 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal verde; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal verde.

Figura 34 Curva analítica referente ao cobre em água ($n = 3$). A) Curva pg. 58 analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal vermelho; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 250 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal verde; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal verde.

Figura 35 Curva analítica referente ao cobre em citrato neutro de amônio ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal verde; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 550 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 80 a 400 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 550 mg/L no canal azul.

Figura 36 Curva analítica referente ao Fe^{2+} em água ($n = 3$). A) Curva pg. 62 analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 150 a 425 mg/L no canal verde; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 150 a 425 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal azul.

Figura 37 Curva analítica referente ao Fe^{2+} em ácido cítrico 2% (m/v) ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal vermelho; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal vermelho; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 80 a 400 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 400 mg/L no canal verde.

- Figura 38 Curva analítica referente ao Fe^{2+} em ácido cítrico 2% (m/v) (n = pg. 66 3). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal vermelho; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal vermelho; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 80 a 400 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 400 mg/L no canal verde.
- Figura 39 Curva analítica referente ao Fe^{2+} em ácido cítrico 2% (m/v) (n = pg. 68 3). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal vermelho; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal vermelho; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 80 a 400 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 400 mg/L no canal verde.
- Figura 40 Curva analítica referente ao Fe^{3+} em ácido cítrico 2% (m/v) (n = pg. 70 3). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 250 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 250 mg/L no canal azul.

- Figura 41 Curva analítica referente ao fosfato em água ($n = 3$). A) Curva pg. 72 analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 300 mg/L no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 1100 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 500 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 800 mg/L no canal azul.
- Figura 42 Curva analítica referente ao fosfato em água ($n = 3$). A) Curva pg. 74 analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 300 mg/L no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 1100 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 500 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 800 mg/L no canal azul.
- Figura 43 Local de coleta de solo. Localização 22°00'22.5"S 47°53'42.0"W. pg. 76
- Figura 44 Solo coletado. (A) Solo bruto; (B) Solo peneirado. pg. 76
- Figura 45 Soluções extratoras aplicadas em μ PADs. (A) Solução extratora em água; (B) Solução extratora em ácido cítrico 2% (m/v); (C) Solução extratora em citrato neutro de amônio. pg. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação de partículas em função do seu tamanho.	pg. 4
Tabela 2	Concentração de elementos encontrado em plantas.	pg. 7
Tabela 3	Concentração de elementos encontrado em três culturas de plantas.	pg. 9
Tabela 4	Custo de equipamentos para aquisição de imagem.	pg. 23
Tabela 5	Influência da largura do canal nominal (<i>software</i>), impresso e após aquecimento em estufa no papel cromatográfico Whatman Nº.1.	pg. 34
Tabela 6	Massa de solo pesado para extração com respectivo volume de solução extratora e tempo de agitação.	pg. 77
Tabela 7	Curvas analíticas referentes a ferro, cobre e cobalto por absorção atômica. n = 3.	pg. 78
Tabela 8	Concentração de ferro, cobre e cobalto na amostra com diferentes soluções extratoras. Os resultados estão expressos em µg / g de solo.	pg. 79

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Solo.....	4
2.2 Nutrientes.....	6
2.2.1 Nitrogênio.....	9
2.2.2 Fósforo	11
2.2.3 Potássio	12
2.2.4 Zinco.....	13
2.2.5 Boro	14
2.2.6 Cobre	15
2.2.7 Ferro	15
2.2.8 Cobalto	16
2.3 Métodos de extração.....	17
2.4 Dispositivos microfluídicos	17
2.3.1 Papel (μ PADs)	18
2.3.2 Poliéster-Toner (PT).....	20
2.5 Método de detecção.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Solução extratora de ácido cítrico 2%.....	25
4.2 Solução extratora de citrato neutro de amônio.....	25
4.3 Determinação de nitrito (NO_2^-).....	25
4.4 Determinação de nitrato (NO_3^-).....	26
4.5 Determinação de boro	26
4.6 Determinação de cobalto	27
4.7 Determinação de ferro	27
4.8 Determinação de fosfato	28
4.9 Determinação de cobre	28
4.10 Determinação de zinco	29
4.11 Construção dos microchips em papel	29
4.12 Construção dos microchips em poliéster-toner	30
4.13 Layout dos dispositivos microfluídicos	30

4.14	Detecção.....	31
4.15	Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Ensaios colorimétricos.....	33
5.2	Impressão de cera.....	34
5.3	Construção de microdispositivos de poliéster-toner	36
5.4	Ensaios colorimétricos em dispositivos de papel	38
5.4.1	Detecção de zinco	38
5.4.2	Fosfato	39
5.4.3	Detecção de nitrato	40
5.5	Ensaios colorimétricos em poliéster-toner.....	43
5.6	Curvas analíticas e análises quantitativas.....	47
5.6.1	Boro	48
5.6.2	Cobalto	52
5.6.3	Cobre	56
5.6.4	Ferro (Fe^{2+}).....	62
5.6.5	Ferro (Fe^{3+}).....	68
5.6.6	Fosfato	72
5.7	Extração	76
5.8	Quantificação dos analitos em diferentes extractores com μ PADs e FAAS	77
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	80
7.	SUGESTÃO DE PRÓXIMAS ETAPAS	82
8.	REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

A população mundial cresce rapidamente devido a melhorias na saúde pública, campanhas de vacinação e consequente redução da mortalidade infantil. Segundo relatório publicado em 2015 pelo Centro Regional de Informação das Nações Unidas (UNRIC), a população mundial crescerá 16% em 2030, chegando a 8,5 bilhões de pessoas, ante 7,3 bilhões atuais.

Com um crescimento tão expressivo da população mundial, um fornecimento de alimentos torna-se vital. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a produção de grãos no Brasil deve superar 215 mil toneladas em 2017. Esta produção representa um aumento de 294% em relação à produção de 1996. Os ganhos de produção refletem a eficácia do setor produtivo, investimento em pesquisas e o desenvolvimento de tecnologias.¹

A agricultura desempenha um papel relevante na evolução da economia brasileira. Toda produção vinda do campo, além de garantir o abastecimento dos centros urbanos, provê um excedente que é exportado, gerando divisas e estabilidade econômica.¹ Assim, para um bom controle da produção agrícola, o monitoramento de nutrientes no solo é fundamental, e adubação e calagem são recomendadas quando necessárias.² Além disso, o controle de nutrientes no solo é essencial porque o excesso não assimilado pela cultura pode se manifestar como poluição difusa no ambiente, trazendo custos sociais, econômicos e ambientais significativos, como eutrofização das águas superficiais e subterrâneas.^{3,4}

Porém, o custo das análises de solo para controle de nutrientes reflete o deslocamento das amostras, infraestrutura específica e pessoal altamente qualificado, além do tempo dispendioso de se obter os resultados. Uma solução analítica seria o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para medições químicas que forneçam respostas rápidas, precisas e sensíveis com o mínimo de preparação laboratorial, permitindo ao operador manuseá-los com o mínimo de treinamento.

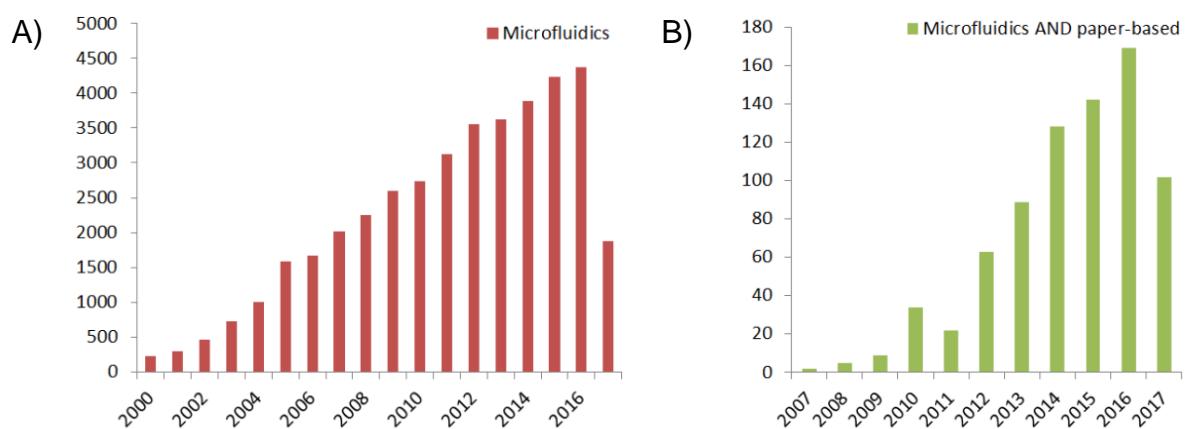
O interesse em plataformas analíticas combinado com avanços da microfluídica tem motivado a proposta de vários métodos baseados em dispositivos microfluídicos.⁵ Devido à sua capacidade de realizar operações de laboratório em pequena escala, o uso de tais dispositivos é muito atraente. Estes são pequenos, leves, portáteis e apresentam baixo consumo de reagentes e analitos.⁶⁻⁹

Segundo Whitesides (2006), a microfluídica como tecnologia oferece muitas vantagens e poucas desvantagens.¹⁰ As vantagens são convincentes, mas projetar e fabricar dispositivos microfluídicos que funcionam efetivamente é um desafio.⁶ Existe uma grande variedade de materiais que podem ser utilizados para construir dispositivos microfluídicos dependendo das suas aplicações, desde vidro, polímero, tecido ou papel. Dentre as vantagens, a capacidade de realizar análises em tempo real e monitoramento contínuo de analitos são pontos em destaque.

Há uma década, o papel surgiu como uma plataforma para o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos.¹¹ Sua disponibilidade, baixo custo, produção em massa, área superficial elevada e fácil descarte tornam o papel uma plataforma atraente para análises químicas.⁹⁻¹¹

A Figura 1 mostra o crescimento bibliográfico relacionado à área de microfluídica realizado no *Web of Science* no período de 2000 a 2017. Fica evidente o interesse e tendência crescente neste tema.

Figura 1 – Levantamento bibliográfico realizado na plataforma *Web of Science* relacionado com microfluídica. A) Levantamento bibliográfico relacionado com microfluídica; B) Microfluídica baseado em papel.



Fonte: Autoria própria.

Ao longo dos últimos anos, houve um crescente interesse e rápido desenvolvimento de dispositivos microfluídicos. Estes dispositivos são encontrados na literatura como *micro total analysis systems (μTAS)*^{7,8}, *lab-on-a-chip (LOC)*⁸, *point-of-care test (POC)*⁸ ou *microfluidic paper-based analytical devices (μPADs)*.⁸

A aplicação de plataformas microfluídicas abrange principalmente a área industrial, agrícola, monitoramento ambiental e saúde pública.^{6,9,12,13} Martinez *et al.* (2008) e Sechi *et al.* (2013) desenvolveram dispositivos para determinação de glicose e proteína em urina.^{14,15} Outros dispositivos foram desenvolvidos para determinação de glicose, lactato e ácido úrico¹⁶, alanina aminotransferase em doentes com lesões hepáticas¹⁷, hemoglobina¹⁸, HIV¹⁹, tuberculose²⁰, resíduos de explosivos²¹, metais pesados²², nutrientes²³, dentre muitos outros. O uso de ensaios colorimétricos para análise é atraente porque esses ensaios produzem resultados visuais e são geralmente simples de realizar.²⁴

A combinação de dispositivos microfluídicos e detectores portáteis capazes de transmitir informações digitais através dos meios de comunicação existentes fornece uma abordagem integrada para detecção.¹⁴ O uso de *smartphones*, *scanners* ou câmeras digitais para digitalizar a intensidade de cor associada a cada ensaio colorimétrico para quantificação já é uma realidade.^{11,12,14,20} Porém, um dispositivo microfluídico deve permanecer estável por um longo tempo.¹⁴ A vedação dos dispositivos é uma alternativa para evitar sua contaminação e oxidação¹², assim como armazenar o dispositivo em embalagem à vácuo e que impeça a entrada de luz.

Assim, dada à relevância da agricultura na economia brasileira e do desenvolvimento de dispositivos microfluídicos na atualidade, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma de baixo custo focada na determinação simultânea de nutrientes. Serão abordadas técnicas clássicas de fabricação de dispositivos microfluídicos, assim como técnicas colorimétricas para determinação de fosfato, nitrato, nitrito, zinco, boro, ferro, cobalto e cobre. Os dados gerados poderão ser utilizados na modelagem da distribuição geoespacial de nutrientes no território em estudo e posterior correção do solo através de adubação, favorecendo seu uso sustentável e conservação dos solos brasileiros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Solo

O solo é a fonte primária de nutrientes para as plantas, fornecendo também um suporte físico. Além disso, o solo fornece água e um ambiente gasoso conveniente para o desenvolvimento do sistema radicular, enquanto os nutrientes inorgânicos utilizados pelas plantas derivam da atmosfera e do intemperismo de rochas da crosta terrestre.²⁵

As rochas são constituídas de muitos minerais diferentes, sendo as mesmas divididas em três grupos baseados em sua origem e formação. As rochas ígneas derivadas diretamente do material fundido. As rochas sedimentares do transporte pela água e vento proveniente do intemperismo das rochas ígneas e outros tipos de rochas, que são quebradas em componentes solúveis e insolúveis. E a rocha *metamórfica*, que é o resultado das rochas sedimentares e ígneas sob calor extremo e grandes pressões no interior da Terra.²⁵

A rocha é submetida ao processo de intemperização, que envolve desintegração física e decomposição química de minerais e rochas na superfície terrestre ou próxima dela, produzindo materiais inorgânicos a partir dos quais o solo é formado. Os solos também contêm materiais orgânicos decorrentes da decomposição de vegetação e microrganismos.²⁵

Devido ao processo de intemperização, uma mistura de partículas de diferentes tamanhos compõe o solo. Estes fragmentos de rocha e minerais estão categorizadas de acordo com seus tamanhos na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação de partículas em função do seu tamanho.

Fração	Diâmetro / μm
Areia grossa	200 – 2000
Areia fina	20 – 200
Silte	2 – 20
Argila	< 2

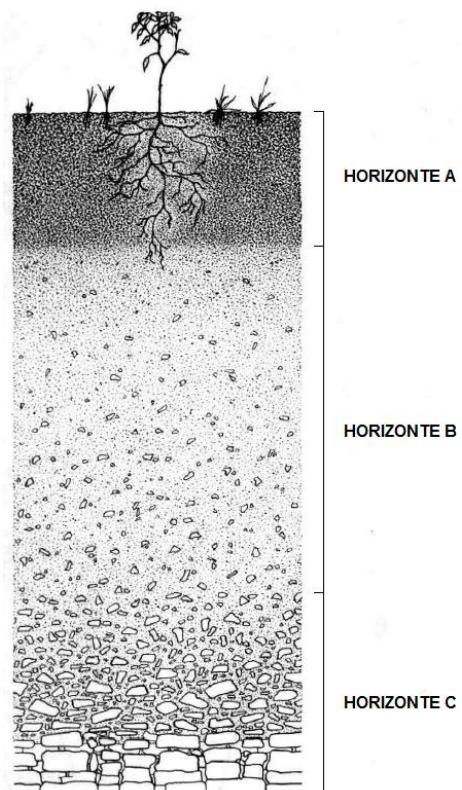
Fonte: Adaptado de RAVEN, P.H., 1996, p. 557.²⁵

O solo apresenta uma mistura de partículas de diferentes tamanhos, e são divididos em classes texturais de acordo com a proporção dessas partículas. Solos

com 35% ou menos de argila e 45% ou mais de areia são arenosos, aqueles contendo 40% ou mais de silte são siltosos. Solos de textura média contêm areia, silte e argila em proporções que resultam em um solo propício para a agricultura. Essa mistura é ideal por duas razões. As partículas de solo grosseiras proporcionam melhor drenagem, enquanto as partículas de solo finas têm alta capacidade de retenção de nutrientes.²⁵

Na Figura 2 está apresentada a seção vertical do solo. Podemos observar variações de sua estrutura vertical representada por horizontes que refletem a porosidade, extensão do intemperismo e quantidade de material vivo e morto.

Figura 2 – Solo dividido em horizontes A, B e C.



Fonte: Adaptado de RAVEN, P.H., 1996, p. 557.²⁵

O horizonte A é a região superior, que apresenta grande atividade física, química e biológica. O horizonte B é a região de deposição onde se encontram óxidos de ferro, partículas de argila e pequena quantidade de material orgânico. Este horizonte contém menos material orgânico e é menos intemperizado do que o horizonte A. O horizonte C é composto de rochas intemperizadas e minerais a partir dos quais o verdadeiro solo dos horizontes superiores é formado.²⁵

2.2 Nutrientes

A produtividade de uma cultura é o resultado da ação de diferentes características ligadas ao clima, solo, planta e manejo, sendo a fertilidade a característica que mais evidencia o valor agronômico do solo. Ela define a capacidade do solo em fornecer nutrientes às plantas em quantidades e proporções adequadas para a obtenção de maior produtividade, e pode ser modificada pelo homem com certa facilidade, para se adequar às exigências da planta cultivada.²⁶

As plantas precisam principalmente de gás carbônico, água, clorofila e energia solar para fazer a fotossíntese, processo fundamental para a produção de glicose. Entretanto, as plantas absorvem minerais em quantidades específicas e necessárias ao seu desenvolvimento, sendo a quantidade o critério que define os nutrientes em macro ou micronutrientes. No entanto, todos são requeridos pelas plantas e a deficiência de apenas um deles pode prejudicar o desenvolvimento da cultura.²⁷

São considerados macronutrientes primários os elementos nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), por serem requeridos em grandes quantidades, assim como os macronutrientes secundários; cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S). Estes elementos fazem parte de moléculas essenciais e possuem função estrutural nas plantas. Já os micronutrientes são elementos requeridos pelas plantas em pequenas quantidades, como boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e zinco (Zn). Estes fazem parte de enzimas e têm função reguladora.²⁷ A Tabela 2 apresenta as principais formas de micro e macronutrientes absorvidos pelas plantas e sua concentração usualmente encontrada na planta.

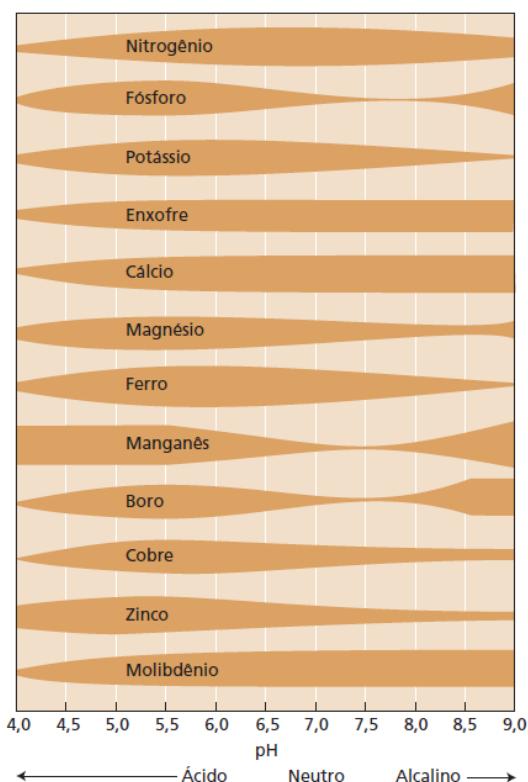
Tabela 2 – Concentração de elementos encontrado em plantas.

Elemento	Principal forma na qual o elemento é absorvido	Concentração usual em plantas sadias (% ou ppm em peso seco)
Macronutriente		
Nitrogênio	NO ₃ ⁻ ou NH ₄ ⁺	1-4%
Potássio	K ⁺	0,5-6%
Cálcio	Ca ²⁺	0,2-3,5%
Fósforo	H ₂ PO ₄ ⁻ ou HPO ₄ ²⁻	0,1-0,8%
Magnésio	Mg ²⁺	0,1-0,8%
Enxofre	SO ₄ ²⁻	0,05-1%
Micronutrientes		
Ferro	Fe ²⁺ ou Fe ³⁺	25-300 ppm
Cloro	Cl ⁻	100-10000 ppm
Cobre	Cu ²⁺	4-30 ppm
Manganês	Mn ²⁺	15-800 ppm
Zinco	Zn ²⁺	15-100 ppm
Boro	B(OH) ₃ ou B(OH) ₄ ⁻	5-75 ppm

Fonte: Adaptado de RAVEN, P.H., 1996, p. 555.²⁵

O suprimento inadequado de um elemento essencial pode provocar um distúrbio nutricional que se manifesta por sintomas de deficiência característicos.²⁸ Quando esta deficiência pode ser detectada visualmente, o desenvolvimento da cultura poderá já estar comprometido. Daí a razão de ser feita uma análise do solo o mais cedo possível, para determinar a habilidade do solo em fornecer nutrientes às plantas. Porém, as plantas apresentam uma capacidade limitada para a absorção seletiva de minerais que não são necessários para o seu crescimento e podem tornar-se tóxicos.²⁷ Na Figura 3 está apresentado um gráfico da disponibilidade nutricional destes nutrientes versus pH do solo.

Figura 3 – Influência do pH do solo na disponibilidade de nutrientes. A espessura das barras horizontais indica o grau de disponibilidade do nutriente para as raízes das plantas. Todos esses nutrientes estão disponíveis na faixa de pH de 5,5 a 6,5.



Fonte: Adaptado de Fisiologia e desenvolvimento vegetal (2017).²⁸

Fica evidente que o pH tem influência direta na disponibilidade de nutrientes e reflete em sua fertilidade. O pH ideal normalmente se encontra entre 6,0 e 7,0, mas essa faixa de pH varia de cultura para cultura. Um conhecimento do solo e da plantação é importante na gestão do pH do solo para o desenvolvimento da cultura.

Não está estabelecido quais são os elementos essenciais para o crescimento de uma cultura, devido às necessidades nutricionais variarem de acordo com a espécie e idade da planta, assim como a concentração mineral de outros elementos no solo e na planta.^{25,27} Na Tabela 3 estão apresentadas as concentrações de alguns micro- e macronutrientes em três culturas diferentes.

Tabela 3 – Concentração de elementos encontrado em três culturas de plantas.

Elemento	Cultura		
	Alfafa	Milho	Carvalho Branco
Macronutriente	%	%	%
Nitrogênio	3,12	2,81	2,19
Potássio	2,77	1,86	0,85
Cálcio	1,70	0,40	0,82
Fósforo	0,35	0,28	0,19
Magnésio	0,41	0,27	0,36
Enxofre	0,29	0,18	0,13
Micronutriente	ppm	ppm	ppm
Ferro	190	110	126
Cloro	8800	3100	43
Cobre	9	6	8
Manganês	62	80	572
Zinco	57	27	22
Molibdênio	1,40	1,03	6,21
Boro	35	14	38

Fonte: Adaptado de RAVEN, P.H., 1996, p. 553.²⁵

2.2.1 Nitrogênio

O nitrogênio é um dos nutrientes essenciais mais exigidos pela planta, atuando em todas as fases de crescimento, floração e frutificação. Ele está presente na composição de proteínas, clorofila, enzimas e DNA.²⁸⁻³⁰ No entanto, o nitrogênio da atmosfera não pode ser assimilado diretamente, precisando ser fixado ou convertido em compostos de nitrogênio úteis através de fenômenos atmosférico, biológicos ou industriais. Para ser assimilado pela planta, o nitrogênio precisa estar sob a forma de NO_3^- ou NH_4^+ . O nitrato é absorvido através das raízes e posteriormente reduzido a amônio nas raízes ou folhas.²⁸⁻³¹

A taxa e a quantidade de nitrogênio absorvido e assimilado durante o ciclo da planta depende da presença de carregadores específicos na membrana plasmática, da atividade das enzimas envolvidas no seu ciclo, da disponibilidade de energia

necessária para os processos de absorção e assimilação e do estágio de desenvolvimento da planta.³¹ A quantidade de nitrogênio absorvida aumenta progressivamente durante o período de crescimento vegetativo, atingindo o máximo durante os estágios reprodutivos e decrescendo na fase de enchimento dos grãos.³⁰

O melhoramento da qualidade dos cultivos requer aplicações de nitrogênio para se obter boa produção. No entanto, o excedente é perdido por lixiviação, volatilização da amônia e emissão de N₂, N₂O e outros óxidos de nitrogênio. No caso de perdas por lixiviação, este pode alcançar córregos, podendo causar eutrofização de sistemas aquáticos e estimular o crescimento de fitoplâncton e macrófitas.^{30,32,33} Esta é uma razão de se fazer um controle rigoroso do nitrogênio no solo.

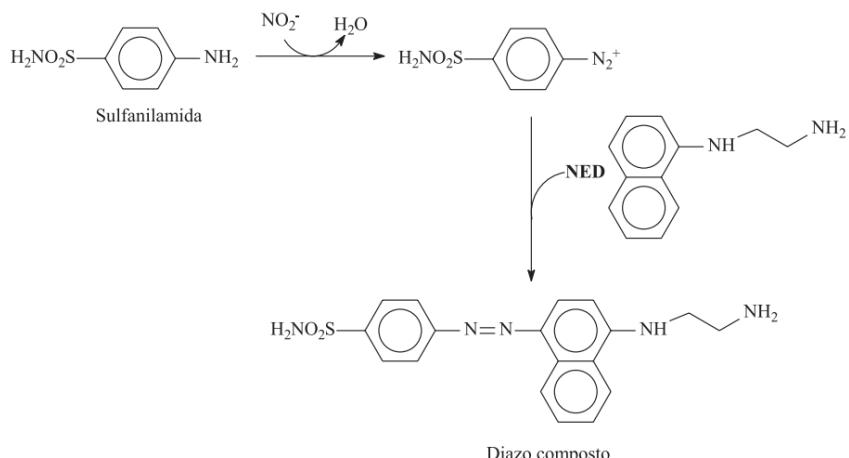
Para o melhor controle do nutriente no solo, vários métodos estão disponíveis para sua quantificação. O método Kjeldahl para determinação de nitrogênio total é o mais estabelecido, porém, trabalhoso.³⁴

Determinação de nitrito

Método direto mais adotado para a determinação de nitrito é a reação de Griess. Nitrito reage com sulfanilamida em meio ácido, formando o diazo composto que reage com cloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NED) de acordo a Figura 4, gerando um composto de coloração vermelho púrpura.^{35,36}

O produto deve ser determinado entre 10 min e 2 h após a mistura dos reagentes.³⁶ Colman (2010) relata que Fe²⁺ acima de 10 mg L⁻¹ é um interferente e inibe a reação de Griess.³⁷

Figura 4 – Reação de Griess.



Fonte: Adaptado de Ramos *et al.* (2006).³⁶

Determinação de nitrato

Nitrato pode ser medido por diversos métodos analíticos que utilizam determinação espectrofotométrica^{38,39}, cromatografia⁴⁰, análise por injeção de fluxo (FIA)³², eletroforese capilar⁴¹⁻⁴³, técnicas eletroquímicas²⁹, dentre outros. A determinação espectrofotométrica de nitrato pode ser feita de forma direta ou indireta. Na determinação direta é utilizado o ácido fenoldissulfônico³⁸ ou ácido cromotrópico.^{38,39}

Dentre os métodos indiretos para quantificação de nitrato, o emprego de um agente redutor para redução a nitrito é uma alternativa⁴⁴. Uma variedade de reagentes como zinco^{23,32,45}, cádmio^{46,47}, vanádio trivalente⁴⁸ ou enzimas⁴⁴ podem ser empregados com posterior quantificação com reagente de Griess modificado.

Cádmio é um agente redutor muito citado, porém é difícil de ser preparado e ativado, é tóxico e aumenta os custos de descarte.^{23,44} O uso de enzimas é preferido em relação aos métodos de redução química devido à sua vantagem de evitar o uso de reagentes tóxicos. A maioria dos métodos biológicos utiliza *Nitrato Redutase* (NaR) ou um microorganismo contendo NaR para a redução de nitrato em nitrito.²⁹

Jayawardane *et al.* (2014) desenvolveram um método com zinco em pó para redução de nitrato em nitrito em μ PADs, apresentando boa eficiência de conversão.²³ Este método pode substituir os metais como cádmio ou vanádio, além de apresentar menor custo e estabilidade maior que o uso de enzimas.

2.2.2 Fósforo

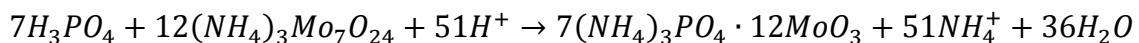
O fósforo, assim como o nitrogênio, são elementos essenciais classificados como macronutrientes devido às quantidades relativamente grandes requeridas pelas plantas. Ele é componente estrutural de coenzimas, fosfoproteínas, fosfolipídeos e ácidos nucléicos.^{28,29,49} O fósforo se apresenta em geral como fosfatos inorgânicos e orgânicos em formas dissolvidas e particuladas, desempenhando papel importante na transferência de energia na célula, respiração, fotossíntese, divisão celular e em diversos outros processos metabólicos, como nas substâncias de reserva.^{49,50} Sua carência reduz o crescimento da planta, provocando o aparecimento de necroses nas folhas e pecíolos.⁴⁹

As limitações na disponibilidade de fósforo no início do ciclo vegetativo podem resultar em restrições no desenvolvimento, das quais a planta não se recupera

posteriormente, mesmo aumentando o suprimento de fósforo.⁴⁹ Sua deficiência pode causar a produção de caules delgados e a morte das folhas mais velhas. A maturação da planta também pode ser retardada, sendo seu suprimento essencial desde os estágios iniciais de crescimento da planta.²⁸

O ortofosfato é a principal forma de fósforo biodisponível e comumente medido por espectrofotometria.⁵¹ A principal metodologia para sua quantificação envolve a formação do ácido molibdofosfórico e sua subsequente redução, resultando no complexo de fosfomolibdênio de cor azul, azul de molibdênio.^{51,52} A quantidade do complexo formado reflete a concentração de fósforo presente como fosfato inorgânico na amostra.

A reação entre fosfato e molibdato de amônio em meio ácido segue uma relação estequiométrica 1:12. O produto é amarelo e apresenta baixa absorvividade molar, de modo que um agente redutor, geralmente ácido ascórbico, é usado para reduzir o Mo(VI) a Mo(V), formando um complexo azul.⁵³



Porém, o agente redutor ácido ascórbico se oxida facilmente, tornando seu uso em microdispositivos inviável. Como alternativa, o ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico (ANS) é mencionado.⁵²

Uma alternativa é a reação recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para determinação de fosfato em fertilizantes e corretivos. A reação envolve a reação do fosfato com reagentes vanadato e molibdato de amônio com consequente formação de um complexo de coloração amarela, medido em entre 400 – 420 nm. A presença de ferro interfere nos resultados.⁵⁴

2.2.3 Potássio

Potássio é um dos macronutrientes mais consumidos pela planta, juntamente com o nitrogênio e o fósforo. Ele participa de funções metabólicas tais como fotossíntese, abertura e fechamento de estômatos, metabolismo de carboidratos e proteínas e na divisão celular. Atua na atividade enzimática, favorece a formação de raízes, amadurecimento dos frutos, absorção de água do solo e manutenção do pH das células e tecidos.⁵⁵

A carência de potássio provoca crescimento reduzido da planta, síntese ineficiente das proteínas, além do desenvolvimento deficiente do sistema radicular, prejudicando seu crescimento, absorção de água e nutrientes.⁵⁵

Muitos métodos tem sido propostos para quantificação de potássio, envolvendo e.g. fotometria de chama^{54,56,57} e tetrafenilborato de sódio, com formação de precipitado branco em soluções neutras ou na presença de ácido acético.^{54,56,57}

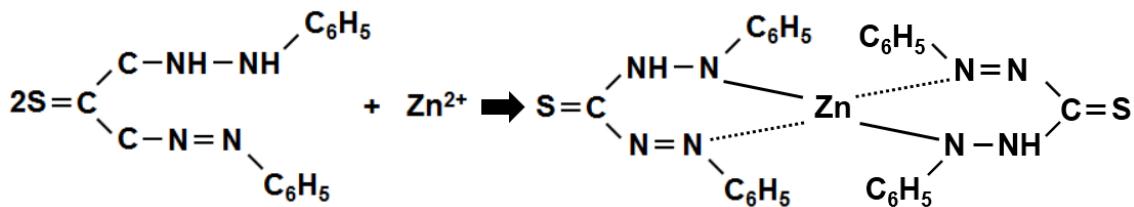
Análises qualitativas utilizando como agente precipitante hexanitritocobaltato(III) de sódio^{56,57}, hexanitrodifenilamina (*dipicrylamine*)^{56,57} ou ácido hexacloroplatínico^{56,57} também são mencionados. Hexanitritocobaltato(III) de sódio forma precipitado amarelo somente em solução de ácido acético e quantidades maiores de sódio (ou se o reagente for adicionado em excesso), forma-se um sal misto. Iodetos e outros agentes redutores devem ser removidos antes da aplicação do teste. A hexanitrodifenilamina forma precipitado cristalino laranja e pode ser explorada na presença de 80 vezes mais sódio e 130 vezes mais lítio relativamente a potássio. Já o ácido hexacloroplatínico forma precipitado branco em solução de 75% de etanol. Em todos os ensaios, os íons amônio são interferentes em potencial e precisam ser eliminados.^{56,57}

2.2.4 Zinco

Zinco é constituinte de várias enzimas e proteínas e desempenha um papel significativo em uma ampla gama de processos. É também utilizado na formação da clorofila, alguns carboidratos e na conversão de amido em açúcar. Sua carência no solo provoca redução do crescimento vegetal, impedindo o alongamento dos caules, a expansão foliar e a frutificação.^{58,59}

A determinação espectrofotométrica de zinco pode ser conduzida empregando-se diferentes reagentes cromogênicos, como a ditizona, zincon, 1-2(2-piridilazo)-2-naftol ou derivados deste, como o reagente 5-Cl-B-PAN. O ensaio da difeniltiocarbazona (Figura 5) é um método estabelecido e muito mencionado na literatura, o qual permite quantificar pequenas quantidades de zinco. O zinco presente na amostra reage com ditizona em clorofórmio com posterior formação de cor vermelha, sendo a intensidade da cor proporcional à quantidade de zinco.⁶⁰ A presença de íons Cu²⁺, Hg²⁺, Hg₂²⁺, Ag⁺, Au³⁺ e Pd²⁺ podem interferir na determinação.^{56,57}

Figura 5 – Mecanismo de reação do zinco com ditizona.



Fonte: Adaptado de VOGEL, 1979.

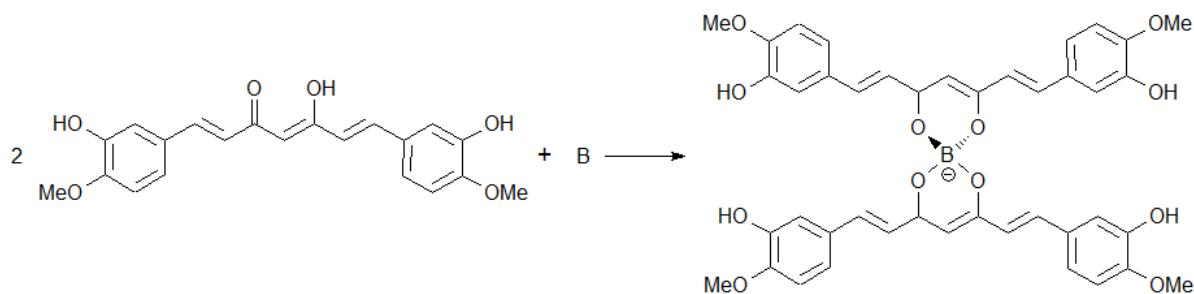
2.2.5 Boro

Muitas funções do boro no metabolismo vegetal ainda são pouco claras, porém o boro participa de vários processos metabólicos, como na síntese e integridade da parede celular, síntese de ácidos nucleicos, transporte de carboidratos, metabolismo de RNA e respiração.⁶¹⁻⁶⁴

Plantas deficientes em boro podem exibir uma ampla variedade de sintomas, dependendo da espécie e da idade. Um sintoma característico é a necrose preta de folhas jovens e a presença de caules rígidos e quebradiços. Frutos, raízes e tubérculos podem exibir necrose ou anormalidades relacionadas a desintegração de tecidos internos.²⁸

A azometina-H é muito citado na literatura, porém se oxida facilmente e ferro é um interferente.^{65,66} Um método proposto para sua determinação envolve curcumina em solução etanólica acidificada com ácido sulfúrico. A conjugação das cargas formadas torna a molécula da rosacianina extremamente cromofórica, tornando este método colorimétrico bastante sensível. O aparecimento de coloração avermelhada intensa indica a formação de rosocianina, que é definida como um complexo entre o boro e dois equivalentes de curcumina.⁶⁷

Figura 6 – Mecanismo de reação boro com curcumina.



2.2.6 Cobre

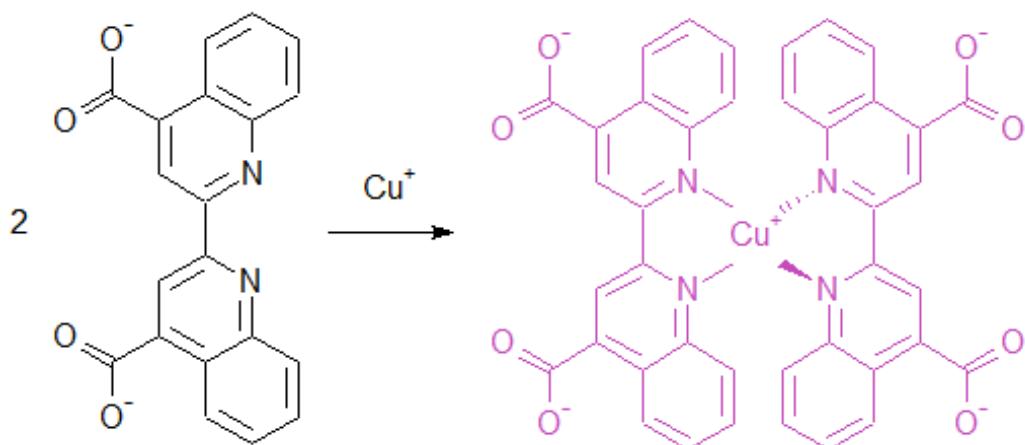
Cobre está associado a enzimas envolvidas em reações redox. Um exemplo de tal enzima é a plastocianina, a qual está envolvida na transferência de elétrons durante as reações dependentes de luz da fotossíntese.²⁸

O sintoma inicial da deficiência de cobre em muitas espécies de plantas é a produção de folhas verde escuras, que podem conter manchas necróticas, podendo também ficarem retorcidas ou malformadas. Sob extrema deficiência de cobre, as folhas podem cair prematuramente e as flores serem estéreis.²⁸

Para a quantificação de cobre foi utilizado ácido bicinconínico (BCA). Este reagente é empregado em ensaio para a quantificação de proteínas pela reação de biureto.⁶⁸

BCA é um reagente cromogênico específico para cobre monovalente. Duas moléculas de BCA reagem com um íon de cobre monovalente, formando um complexo de cor púrpura (Figura 6). A quantidade de cobre reduzido é proporcional à concentração de proteína.

Figura 7 – Complexo entre cobre monovalente e ácido bicinconínico.



Fonte: Adaptado de VOGEL, 1979.

2.2.7 Ferro

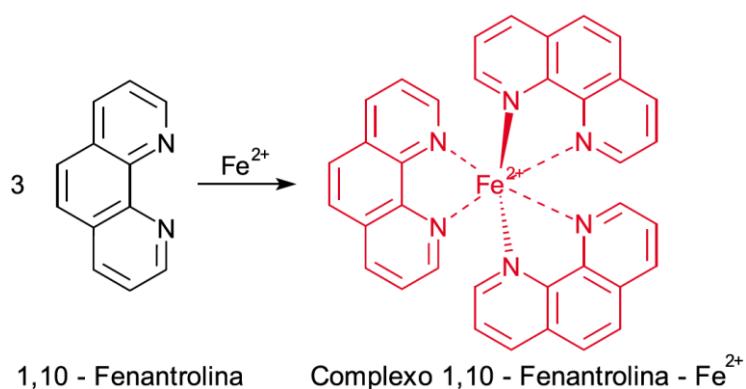
Ferro tem um importante papel como componente de enzimas envolvidas em reações de transferência de elétrons, como citocromos. Nesse papel, ele é reversivelmente oxidado de Fe^{2+} a Fe^{3+} durante a transferência de elétrons.²⁸

Um sintoma característico da deficiência de ferro é a clorose entre as nervuras. Esse sintoma aparece inicialmente nas folhas mais jovens, porque o ferro não pode ser mobilizado das folhas mais velhas. Sob condições de deficiência extrema ou prolongada, as nervuras podem também se tornar cloróticas, fazendo toda a folha se tornar branca. As folhas se tornam cloróticas porque o ferro é necessário para a síntese de alguns dos complexos constituídos por clorofila e proteína no cloroplasto. A baixa mobilidade do ferro provavelmente é devida a sua precipitação nas folhas mais velhas como óxidos insolúveis ou fosfatos. A precipitação do ferro diminui a subsequente mobilização do metal.²⁸

A solução de 1,10-fenantrolina é incolor, porém, na presença de Fe^{2+} em meio ácido torna-se laranja-vermelho devido à formação do complexo catiônico $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}_{(\text{aq})}$, cujo comprimento de onda de máxima absorção é 510 nm (Figura 8). A intensidade da cor é independente da acidez no intervalo de pH de 3 a 12 e é estável por longos períodos. A solução de cloridrato de hidroxilamina é bastante utilizada para reduzir o Fe^{3+} ao estado bivalente e poder assim ser mensurada pela reação com 1,10-fenantrolina.^{57,69}

Determinação pode ser aplicado em águas naturais, tratadas e efluentes domésticos ou industriais. Este método detecta uma concentração de até 10 $\mu\text{g/L}$ utilizando-se um espectrofotômetro.⁷⁰

Figura 8 – Complexo entre ferro bivalente e 1,10-fenantrolina.



2.2.8 Cobalto

Cobalto é considerado um elemento de ocorrência natural, assim como o alumínio e o selênio, que não são essenciais e podem se acumular em tecidos vegetais. O cobalto é parte da cobalamina (vitamina B12 e seus derivados), um

componente de várias enzimas em microrganismos fixadores de nitrogênio. Sua deficiência bloqueia o desenvolvimento e a função dos nódulos de fixação de nitrogênio, mas as plantas que não fixam nitrogênio não requerem cobalto. As culturas vegetais normalmente contém apenas quantidades relativamente pequenas desse elemento.²⁸

A determinação de cobalto pode ser realizada através de reação com nitrito de sódio em meio ácido com formação do complexo amarelo de hexanitrocobaltato (III) de potássio, $K_3[Co(NO_2)_6]$. A cor amarela apresenta contraste com o fundo branco do papel e pode ser empregada tanto em dispositivos de papel, quanto poliéster toner.⁵⁷

2.3 Métodos de extração

Para que a disponibilidade de qualquer nutriente no solo seja corretamente avaliada, a seleção de um extrator adequado é fundamental.⁷¹ Porém, na literatura há estudos que contribuem para uma padronização de metodologias de extração e determinação dos micronutrientes. Estas metodologias são em função do interesse analítico.² Na literatura existem vários métodos de extração geralmente envolvendo soluções de ácido cítrico a 2%^{54,72}, citrato neutro de amônio⁵⁴, Mehlich-1^{2,71,73} e Mehlich-3.^{2,71,73}

Segundo Mielki *et al.* (2016), a solução extratora Mehlich-1 é composta de ácidos fortes, atuando nas formas lábeis e não lábeis de metais e é relevante na avaliação de suas disponibilidades. Já o uso da solução extratora Mehlich-3 é um método de extração multi-elementar. Porém os resultados com diversos extractores ainda não são consistentes e a correlação entre as concentrações no solo e na planta varia de baixa e não significativa para alta e significativa.⁷³

MAPA (2014) emprega como solução extratora ácido cítrico 2% (m/v) para determinação de fosfato, ferro e potássio, água para determinação de fosfato, potássio e boro e citrato neutro de amônio para determinação de fosfato, ferro, potássio em fertilizantes e corretivos.

2.4 Dispositivos microfluídicos

O interesse em dispositivos microfluídicos de baixo custo, bem como nas técnicas emergentes de microfabricação, aumentaram consideravelmente nos últimos

anos.⁷⁴ O principal estímulo para o rápido crescimento e desenvolvimento da tecnologia microfluídica na área acadêmica veio após o fim da guerra fria, com estímulo financeiro proveniente da Agência de Projetos de Pesquisa Avançada de Defesa (DARPA) dos EUA na década de 1990. Este programa foi realizado para desenvolver detectores de ameaças químicas e biológicas, devido ao perigo de ameaças militares e terroristas.¹⁰

Com o aprimoramento de dispositivos microfluídicos, as características atrativas como ensaios simultâneos, redução do tempo de análise, volume de reagentes consumidos e volume de amostra necessário para análise tornaram-se evidentes.^{9,75}

Nos últimos anos houve um grande interesse em desenvolver dispositivos microfluídicos que atendam às necessidades atuais, como diagnóstico humano e veterinário, segurança alimentar, ambiental e drogas de abuso, assim como na busca de novos materiais. Hoje existe um grande número de publicações abordando materiais como papel, poliéster-toner, vidro, PDMS ou tecido.^{9,74}

Técnicas de microfabricação usando impressoras à base de toner e folhas de transparência e impressoras a base de cera e papel cromatográfico surgiram recentemente como duas plataformas promissoras para a produção de dispositivos microfluídicos devido ao seu baixo custo.^{74,76}

2.3.1 Papel (μ PADs)

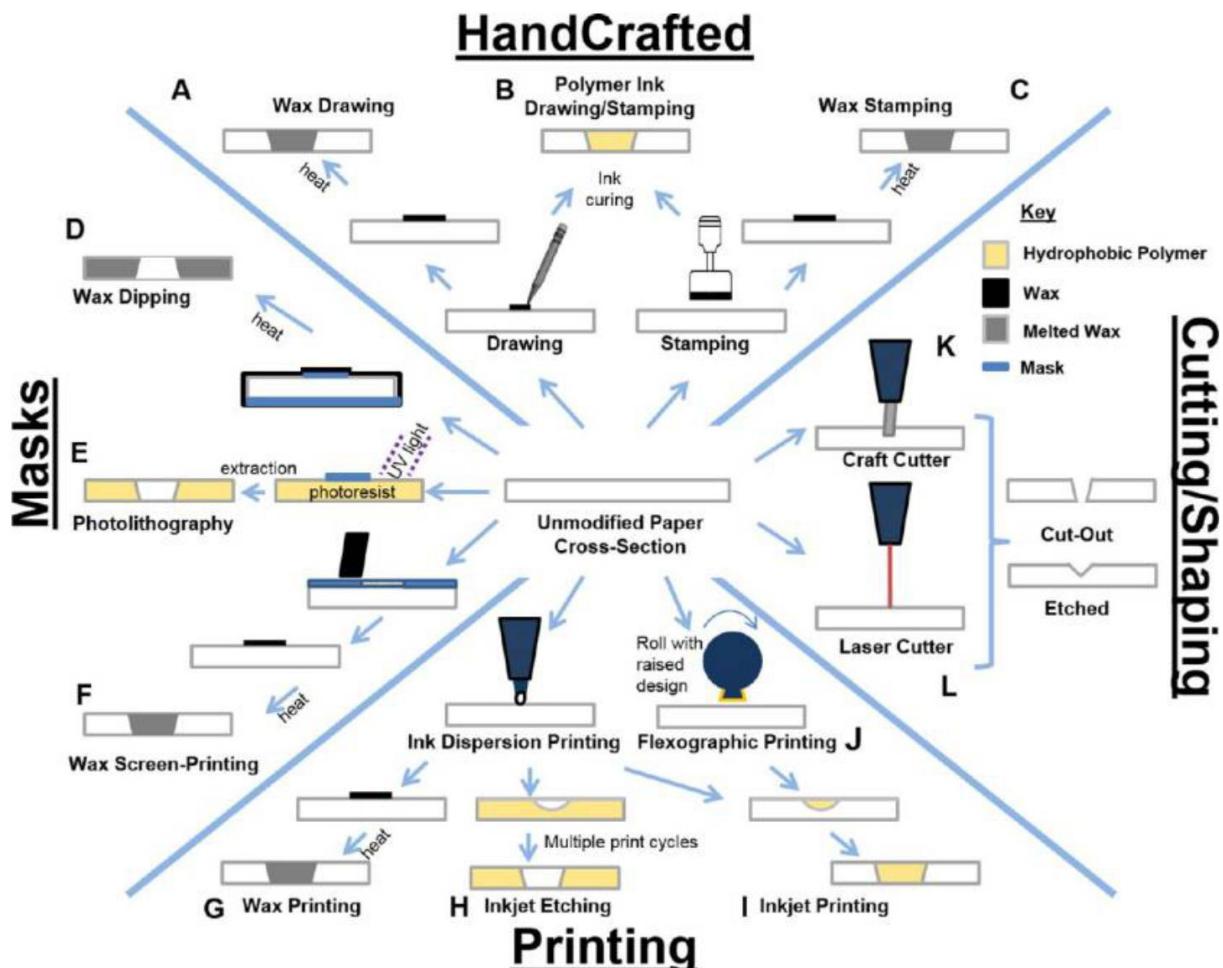
A impregnação de tiras de papel com materiais hidrofóbicos como parafina e cera para evitar a contaminação cruzada de zonas de reação remonta a 1902. A primeira técnica de fabricação para a impregnação de papel com parafina para criar espaços confinados para testes de pontos qualitativos apareceu em 1937.⁹ Porém, os dispositivos μ PADs ganharam repercussão quando reintroduzidos por Whitesides *et al.* (2007) para detecção de várias substâncias simultaneamente. Esta abordagem utilizava papel padronizado ou padronizado e estampado como plataforma para manipulação microfluídica de amostras líquidas que eram transportadas nos canais hidrofóbicos e reagiam nas zonas de detecção, permitindo realizar múltiplos ensaios a partir de uma única aplicação de amostra.^{8,11,23,77}

Papel, ou genericamente, membranas porosas, tem sido utilizado em aplicações que variam desde testes pontuais para metais até ensaios

imunocromatográficos de fluxo lateral (LFIA). O papel apresenta muitas vantagens: é onipresente, barato, fácil de armazenar, transportar, manipular e sua superfície apresenta grupos funcionais orgânicos que podem ser manipulados facilmente. Quando seco, absorvem os fluidos por capilaridade, sua cor branca proporciona um forte contraste com testes coloridos, elevada relação superfície – volume e apresenta a propriedade de filtrar partículas (sólidos, géis, células) a partir de uma amostra.^{11–14,74}

Os μ PADs podem ser modelados em 2D ou 3D para transportar os fluidos nas dimensões horizontal ou horizontal e vertical, respectivamente. Os métodos comuns de fabricação dependem da criação de barreiras através do corte seletivo no papel ou dentro do próprio papel.^{9,78} Os canais podem ser desenhados no papel através de impressão com cera^{9,12}, impressão por jato de tinta¹², impressão flexográfica^{9,12}, fotolitografia^{12,13} e corte ou moldagem de papel (Figura 9).¹²

Figura 9 – Métodos de fabricação de μ PADs.



Fonte: Adaptado de Cate *et al.*, 2014.

Atualmente, μ PADs utilizam zonas de detecção múltiplas para diferentes analitos. Após a fabricação de padrões hidrofóbicos em papel, são depositados reagentes nas zonas de detecção. Em tais ensaios multiplex, ocorrem reações enzimáticas ou químicas entre o analito na amostra e os reagentes previamente imobilizados.⁹

O efeito do tipo de substrato de papel na intensidade de cor foi estudado para detecção de glicose e o papel cromatográfico Whatman, foi considerado o melhor.⁷⁹

A abordagem de impressão de cera é o melhor método de padronização. A cera rapidamente se funde com as fibras do papel através do calor para criar uma barreira tridimensional hidrofóbica.^{12,74} As razões para sua ampla aceitação estão relacionadas ao custo relativamente baixo da impressora de cera, velocidade de impressão, tratamento simples pós-impressão (aquecimento), flexibilidade nos recursos de impressão (criados em um software gráfico), fabricação em escala industrial possível e inércia aos reagentes químicos.^{9,11,74}

As vantagens de utilizar reagentes em μ PADs são o número de passos reduzidos para o analista e o peso ser menor.

A técnica de detecção analítica mais comum para μ PADs é a colorimétrica, porque a análise é relativamente simples e a tecnologia é compatível com sistemas de notificação baseados em *smartphones*, necessitando de treinamento simples para o operador.¹²

2.3.2 Poliéster-Toner (PT)

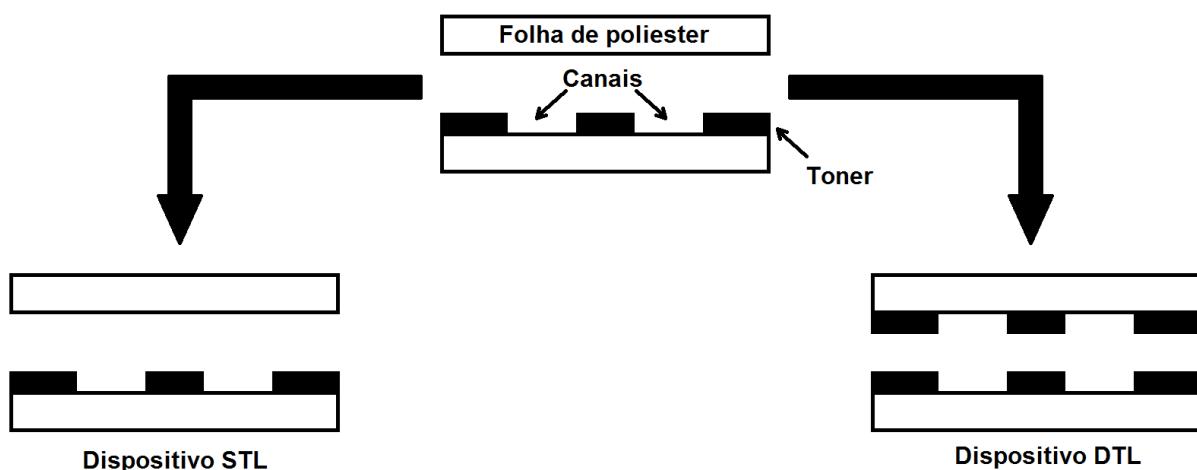
Assim como dispositivos microfluídicos à base de papel com cera, o toner apresenta-se promissor como agente hidrofóbico limitador de soluções em microcanais e reservatórios. Tan *et al.* (2001) introduziram pela primeira vez uma máquina de fotocópia na fabricação de microchips PDMS utilizando filme de poliéster.⁸⁰ Em 2003, Lago *et al.* demonstraram que dispositivos microfluídicos poderiam ser formados diretamente em filmes transparentes combinando impressão a laser e etapas de laminação.^{74,75,81} A técnica não requer qualquer instrumentação sofisticada, precisando somente de um computador equipado com software gráfico, uma impressora laser de escritório e uma laminadora.

O toner aplicado sobre o poliéster é um compósito em pó à base de poliestireno, poliacrilato e óxido de ferro. O toner começa como um pó, torna-se um fluido, e termina como uma estrutura sólida na superfície da folha de transparência.⁷⁴

Nesta tecnologia, o *layout* desejado é desenhado em qualquer *software* gráfico e, em seguida, enviado para a impressora a laser, que seletivamente deposita uma camada de toner em uma película de poliéster. Após a impressão, a camada de toner define não apenas a parede do canal, mas também a profundidade do canal.⁷⁴

Ao contrário do que ocorre no μ PAD com cera, em que o canal é delimitado no papel aquecido para fundir a cera, no PT o canal microfluídico é definido pelas regiões brancas do desenho, que é interpretado pela impressora como uma instrução para evitar a deposição de partículas de toner e sua vedação proporcionada por um passo de laminação. O dispositivo assim impresso pode ser laminado contra uma peça de poliéster em branco perfurada ou uma imagem espelhada do dispositivo. Dispositivos microfluídicos de PT podem apresentar uma camada de toner (STL) ou dupla camada de toner (DTL) (Figura 10).^{74,76}

Figura 10 – Impressão de dispositivos PT com estruturas STL e DTL.



Fonte: Adaptado de COLTRO *et al.*, 2010.

2.5 Método de detecção

As técnicas de detecção se baseiam em sensores eletroquímicos, colorimétricos, quimiluminescentes, eletroquimiluminescentes, fluorescentes, entre outros. A detecção colorimétrica representa o método mais simples e utilizado para a detecção em μ PADs devido à sua fácil operação e leitura do sinal.^{9,74} As áreas de

detecção são criadas no papel por deposição de reagentes ou enzimas. Quando a solução de amostra atinge a zona de detecção, é realizada uma reação química entre o composto alvo e os reagentes, desenvolvendo-se uma cor. A intensidade desta cor pode ser utilizada para análise quantitativa através da obtenção de uma curva analítica com um leitor portátil, *scanner* ou *smartphone*.^{9,14,74}

A presença de *smartphones*, celulares com câmera ou *scanners*, associada aos meios de comunicação existentes, criaram oportunidades para seu uso como ferramenta analítica e de telemedicina. O operador pode capturar a imagem do dispositivo e transmitir a imagem para outro operador analisar a imagem. Após a captura das imagens, o emprego de um *software* para o tratamento de imagens como *PhotoShop* ou *ImageJ* é utilizado. Com base nos valores de escala de cinza ou cores como RGB usando um *software* de imagem, pode-se correlacionar sua intensidade com a concentração do analito alvo.⁹

A análise da intensidade de cores das imagens mais adotadas são RGB e escala de cinza. Existem outros métodos de análise de imagens como CMYK, RYB e CMY. RGB é a abreviatura do sistema de cores aditivas formado por vermelho (Red), verde (Green) e azul (Blue) e escala de cinza é a conversão da cor da imagem para um nível aproximado de cinza.

Entretanto os leitores baseados em *smartphones* apresentam limitações. Uma desvantagem da detecção colorimétrica em *µPADs* é a não homogeneidade da distribuição de cor, dificultando o resultado final. Além disso, os resultados são influenciados pela luz ambiente, distância focal e cor de fundo do papel ou da amostra, o que não acontece quando o meio adotado para aquisição de imagem se faz com o uso de *scanner*. Uma solução seria a construção de curvas analíticas com base nos valores de cromaticidade.⁹ Outra opção seria o processamento das imagens geradas em escala de cores assim como no tratamento de imagens obtidas por *smartphone*, adotando escala de cores como mencionado.⁷⁴

As especificações técnicas tanto de *scanners* ou *smartphones* influenciam na qualidade final da imagem e seu custo (Tabela 4). Os *smartphones* apresentam características como megapixel, abertura e velocidade do obturador, estabilização de imagem, HDR, lentes entre outros.

Tabela 4 – Custo de equipamentos para aquisição de imagem.

Equipamento	Custo (R\$)
<i>Smartphone</i>	800,00 - 6400,00
<i>Scanner</i>	930,60 – 30199,00
Máquina fotográfica	299,00 – 45000,00

Fonte: Autoria própria. Dados coletados em 05/09/2017.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de uma plataforma de baixo custo para determinação semi-quantitativa simultânea de micro- e macro-nutrientes em amostras de solos.

Os objetivos específicos foram:

- Estudar a viabilidade da construção de dispositivos microfluídicos, híbridos ou não, em poliéster-toner e papel;
- Investigar o comportamento dos fluidos nas plataformas miniaturizadas;
- Avaliar a influência da largura dos canais na capilaridade nos dispositivos híbridos em poliéster-toner e papel;
- Avaliar a sensibilidade de detecção nos dispositivos em papel e híbridos em poliéster-toner e papel;
- Estudar a estabilidade dos reagentes utilizados;
- Validar os dispositivos microfluídicos com material de solo certificado, ou outro material de referência disponível.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solução extratora de ácido cítrico 2%

A solução de ácido cítrico a 2,0% (m/v) foi preparada conforme proposto em MAPA (2014).⁵⁴ Pesou-se 1,000 g de ácido cítrico monoidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), transferiu-se em seguida para um balão de 50 mL e completou-se o volume com água desionizada.

4.2 Solução extratora de citrato neutro de amônio

A solução de citrato neutro de amônio foi preparada conforme proposto em MAPA (2014).⁵⁴ Pesaram-se 7,40 g de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), dissolvendo-as em 30 mL de água desionizada. Em seguida foram adicionados 6,9 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH) e o pH foi ajustado para 7,0. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e seu volume completado com água desionizada.

4.3 Determinação de nitrito (NO_2^-)

A determinação de nitrito foi realizada explorando-se a reação de Griess-Ilosvay.^{23,35,57} Foram preparadas soluções de sulfanilamida ($C_6H_8N_2O_2S$) e dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina, NED ($C_{12}H_{16}Cl_2N_2$ P.A.). A solução NED foi preparada pesando-se 10 mg de NED e dissolvendo-as em 5,00 mL de água desionizada. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e seu volume completado com água desionizada. A solução de sulfanilamida foi preparada dissolvendo-se 100 mg de sulfanilamida em 5,00 mL de água desionizada e acrescentado 1,0 mL de HCl. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e seu volume completado com água desionizada.³⁵

A construção dos dispositivos foi adicionada 4 μL da solução de NED e uma adição de 4 μL da solução de sulfanilamida em outro lado do dispositivo. Os reagentes quando misturados, são muito sensíveis e a separação das soluções no papel foi realizada para impedir o contato direto entre elas. Foi aguardado a solução secar no dispositivo entre cada adição.

A curva analítica foi construída com uma solução estoque de nitrito de sódio ($NaNO_2$). Dissolveram-se 50 mg de $NaNO_2$ e transferiu-se para um balão volumétrico

de 10 mL, completando com água desionizada. Com a solução estoque de NaNO₂, foi realizado uma curva analítica nas concentrações de 10 a 1000 mg/L de NO₂⁻.

4.4 Determinação de nitrato (NO₃⁻)

Foi adotada a metodologia proposta por Svehla (1996) e Jayawardane *et al.* (2014), onde se faz o uso de zinco metálico em pó como agente redutor para conversão de nitrato a nitrito.^{23,57} Uma suspensão de pó de zinco foi preparada na concentração de 100 mg mL⁻¹ em água desionizada.²³ A solução de Griess foi preparada conforme descrito no item anterior.

A construção dos dispositivos foi confeccionada conforme no item anterior, porém com adição de 10 µL da suspensão de zinco metálico no canal, para proporcionar a redução do nitrato à nitrito. Foi aguardado a solução secar no dispositivo entre cada adição.

A curva analítica foi construída com uma solução estoque de nitrato de sódio (NaNO₃). Dissolveu-se 50 mg de NaNO₃ e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, completando com água desionizada. Com a solução estoque de NaNO₃, foi realizado uma curva analítica nas concentrações de 10 a 1000 mg/L de NO₃⁻.

4.5 Determinação de boro

Para determinação de boro foi adotada uma solução etanólica de curcumina a 0,1%. Pesou-se 20 mg de curcumina, transferindo-a para um balão volumétrico de 10 mL e completando-o com etanol P.A., resultando em uma solução de 2 mg/mL.⁸²

Os dispositivos de papel foram confeccionados através de uma adição de 2 µL da solução de curcumina e uma adição de 2 µL da solução de H₂SO₄ 30%. Foi aguardado a solução secar no dispositivo entre cada adição.

A construção da curva analítica foi realizada com solução estoque de tetraborato de sódio (Na₂B₄O₇·10H₂O). Foram pesadas 50 mg de Na₂B₄O₇·10H₂O e transferido para um balão volumétrico de 50 ml, completando com água desionizada. Com a solução estoque foi construída uma curva analítica nas concentrações de 10 a 1000 mg/L de BO₃.

4.6 Determinação de cobalto

A solução de nitrito de sódio (NaNO_2) foi preparada na concentração de 500 mg/mL em água desionizada.⁵⁷ Uma solução de $\text{HNO}_{3(\text{aq})}$ P.A. 5% foi preparada diluindo 770 μL de $\text{HNO}_{3(\text{aq})}$ P.A. 65% em um balão de 10mL com água desionizada.

Os dispositivos de papel foram confeccionados através de uma adição de 4 μL da solução de NaNO_2 e uma adição de 4 μL $\text{HNO}_{3(\text{aq})}$ P.A. 5%. Foi aguardado a solução secar no dispositivo a temperatura ambiente entre cada adição.

A construção da curva analítica foi feita com solução estoque de cloreto de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) pesando-se 50 mg e dissolvendo-o em 50 mL de água desionizada. Com a solução estoque foi construída uma curva analítica nas concentrações de 10 a 1000 mg/L de Co^{2+} .

4.7 Determinação de ferro

Foi preparada uma solução tampão de acetato dissolvendo-se 9,04 g de acetato de sódio anidro (NaHAc P.A.) em 40 mL de água desionizada e adicionado 10 mL de ácido acético glacial, resultando numa solução de acetato de $6,3 \text{ mol L}^{-1}$. O pH foi ajustado para 4,5 com adição de ácido acético glacial e aferido em balão volumétrico de 50 mL.⁶⁹

A solução de 1,10-fenantrolina foi preparada na concentração de 8 mg mL^{-1} e a solução de cloridrato de hidroxilamina preparada na concentração de 100 mg mL^{-1} . Ambas as soluções foram preparadas com solução tampão de acetato pH 4,5.⁶⁹

Os dispositivos de papel foram confeccionados através de uma adição de 4 μL da solução de 1,10-fenantrolina para detecção de Fe^{2+} nos dispositivos. Para detecção de Fe^{3+} no dispositivo, houve uma adição de 4 μL da solução de cloridrato de hidroxilamina, sendo que entre cada adição foi aguardado o dispositivo secar em temperatura ambiente.

Para construção da curva analítica de Fe^{2+} e Fe^{3+} , foram preparadas soluções com sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Para ambas as soluções, foram pesadas 50 mg e transferido para balões volumétricos de 10 ml, completando-o com água desionizada. As soluções estoque de Fe^{2+} e Fe^{3+} foram então utilizadas para construção da curva analítica nas concentrações de 10 a 550 mg/L.

4.8 Determinação de fosfato

A detecção e quantificação do íon fosfato foi realizada mediante reação colorimétrica descrita segundo MAPA (2014). O reagente compreende a mistura do molibdato de amônio e metavanadato de amônio. A solução de molibdato foi preparada dissolvendo 1,000 g de molibdato de amônio (NH_4MoO_4 P.A.) em 20 mL de água desionizada. A solução de metavanadato foi preparada dissolvendo 50 mg de metavanadato de amônio (NH_4VO_3 , P.A.) em 10 mL de água desionizada e adicionado 9 mL de HNO_3 P.A. 65%. As soluções foram transferidas para um balão volumétrico de 50 mL e seu volume completado com água desionizada. O produto desta solução com fosfato forma um complexo de cor amarela.⁵⁴

Os dispositivos de papel foram confeccionados através de uma adição de 4 μL da solução reagente para detecção de fosfato nos dispositivos. A curva analítica foi realizada com uma solução estoque de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4 P.A.). Dissolveu-se 100 mg de KH_2PO_4 (seco por duas horas a 150 °C) e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, completando com água desionizada. Com a solução estoque foi realizado uma curva analítica nas concentrações de 10 a 2000 mg/L de PO_4^{3-} .

4.9 Determinação de cobre

Foi preparada uma solução tampão de acetato dissolvendo-se 9,04 g de acetato de sódio anidro (NaHAc P.A.) em 40 mL de água desionizada e adicionado 10 mL de ácido acético glacial, resultando numa solução de acetato de 6,3 mol L⁻¹. O pH foi ajustado para 4,5 com adição de ácido acético glacial e aferido em balão de 50 mL. A solução de cloridrato de hidroxilamina foi preparada na concentração de 100 mg mL⁻¹ com solução tampão de acetato pH 4,5.⁶⁹

Os dispositivos de papel foram confeccionados através de uma adição de 4 μL da solução de cloridrato de hidroxilamina e 4 μL do ácido bicinconílico, sendo que entre cada adição foi aguardado o dispositivo secar em temperatura ambiente.

A construção da curva analítica foi feita com solução de sulfato de cobre pentaídratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Foram pesadas 50,00 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e transferido para um balão volumétrico de 10 ml, completando com água desionizada. Com a solução estoque de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, foi construída uma curva analítica nas concentrações de 10 a 550 mg/L de Cu^{2+} .

4.10 Determinação de zinco

Foi adotada a reação com ditizona e sua relação estequiométrica com zinco é 2:1. A solução de ditizona foi preparada pesando 30 mg de ditizona ($C_{13}H_{12}N_4S$) e transferindo para balão volumétrico de 10 mL e adicionado clorofórmio.^{56,57,60}

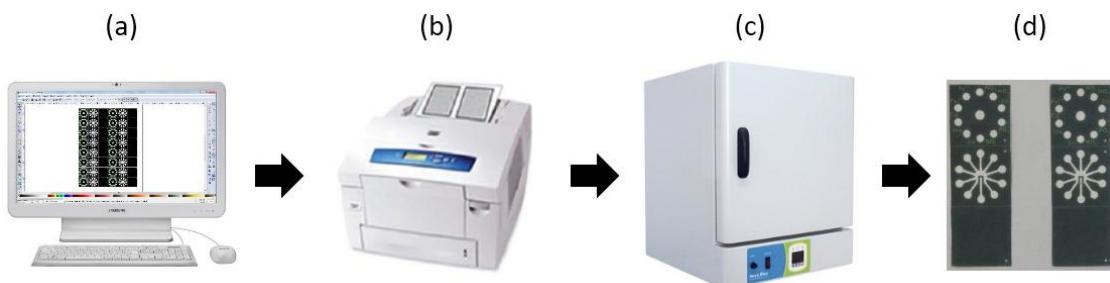
Os dispositivos de papel foram confeccionados através de uma adição de 4 μL da solução ditizona e aguardado o dispositivo secar em temperatura ambiente.

A construção da curva analítica foi realizada com solução de cloreto de zinco ($ZnCl$). Foram pesadas 50 mg de $ZnCl$ e transferidas para um balão volumétrico de 50 ml, completando com água desionizada. Foi realizada uma curva analítica variando as concentrações de 1 a 10 mg/L de Zn^+ .

4.11 Construção dos microchips em papel

A confecção dos μ PADs está esquematizada na Figura 11. Foi adotado como material suporte papel cromatográfico Whatman Nº 1. O layout dos dispositivos foi criado em software gráfico *Inkscape 0.91* e a cera depositada sobre a superfície do papel com uma impressora de cera. O papel impresso foi submetido a 130 °C por um período de 3 min em estufa. A cera se fundiu às fibras do papel, formando os padrões hidrofóbicos.

Figura 11 – Processo de fabricação dos dispositivos de papel. (a) desenho do microdispositivo; (b) impressão de cera na superfície do papel; (c) fusão e permeação da cera no papel por aquecimento na estufa; (d) dispositivo finalizado.



Fonte: Autoria própria.

4.12 Construção dos microchips em poliéster-toner

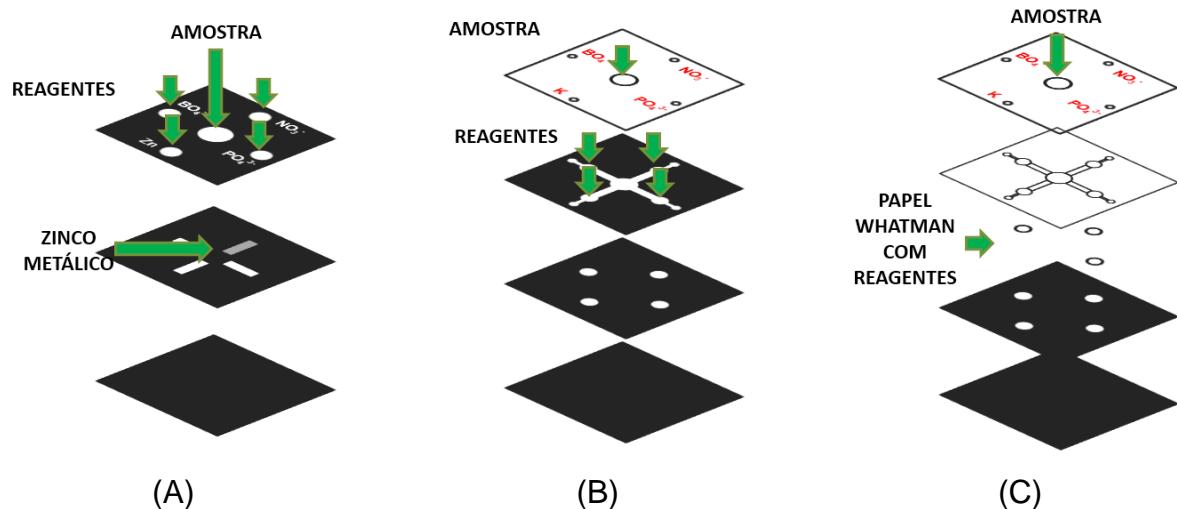
Os dispositivos microfluídicos de politereftalato de etileno (PET) foram fabricados por um processo de impressão direta de toner de acordo com o procedimento descrito por Duarte *et al.* (2012), com pequenas modificações.⁷⁶

Primeiramente foi depositada uma camada de toner em uma folha de PET através de uma impressora a laser. Esta folha foi então transferida para uma cortadora a laser para que os canais, *spots* e furos para acesso da solução fossem criados. O *layout* foi realizado em software gráfico *Inkscape 0.91*. Seguindo o *layout* projetado, o dispositivo foi montado, alinhado e laminado, utilizando um laminador de escritório padrão a 120 °C a uma taxa de deslocamento de 30 cm min⁻¹.^{76,83}

4.13 Layout dos dispositivos microfluídicos

Os *layouts* para construção dos dispositivos estão mostrados na Figura 12. São apresentados os *layouts* construídos em papel cromatográfico (Figura 12 – A), poliéster toner (Figura 12 – B) e híbrido de poliéster toner e papel cromatográfico (Figura 12 – C).

Figura 12 – *Layout* dos dispositivos. (A) em papel cromatográfico Whatman; (B) em poliéster - toner; (C) híbrido em poliéster – toner e papel cromatográfico Whatman.



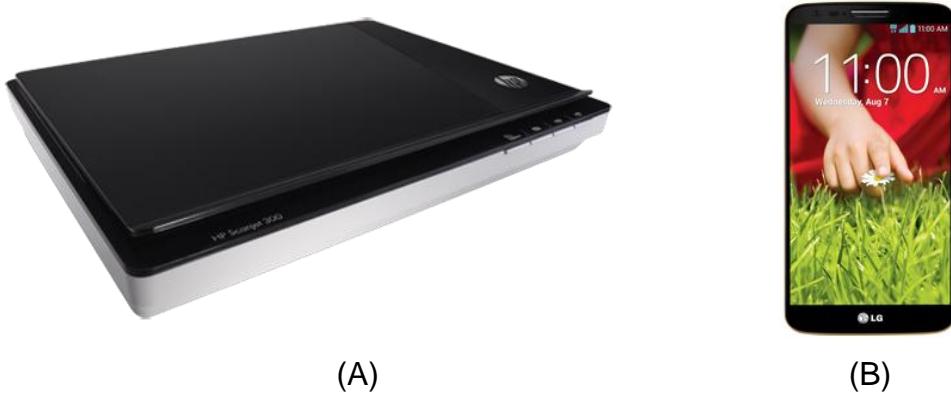
Fonte: Autoria própria.

4.14 Detecção

Um *smartphone* e um *scanner* foram utilizados para detecção. Através da aquisição das imagens, foi avaliada a influência da iluminação e da umidade do dispositivo na qualidade das imagens, pois são fatores que afetam o processamento de dados.⁸⁴ As imagens capturadas foram tratadas com software *ImageJ*, para se obter a intensidade de cada cor contida em cada *spot*. A intensidade de cada cor foi correlacionada à concentração e uma curva analítica foi construída.

O *scanner* utilizado era um HP scanjet 300 (Figura 13– A). As imagens foram digitalizadas no modo colorido com resolução de 200 *pixels* por polegada. O *smartphone* utilizado é um LG-D805 (Figura 13 – B) com câmera de 13 MP.

Figura 13 – Captura de imagem. (A) Scanner; (B) Smartphone.



Fonte: (A) <https://ssl-product-images.www8hp.com/digmedialib-prodimglowres/c03247774.png> (B) <http://www.lg.com/br/images/celulares/g2-d805-gold/gallery/medium-01.jpg>

Como a distância focal influencia a qualidade da imagem final, foi adaptado um suporte para aquisição de imagem por *smartphone*. A distância entre o *smartphone* e o dispositivo ficaram fixados em 130 mm de distância (Figura 14).

Figura 14 – Sistema para aquisição de imagem com *smartphone* LG-D805.



Fonte: Autoria própria.

4.15 Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

O equipamento de absorção atômica empregado encontra-se na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI no IQSC/USP. O espectrômetro é da Marca Perkin Elmer, Modelo PINAACLE 900T (Figura 15). Foi utilizado fluxo de etileno de 2,5 L/min e de ar comprimido de 10 L/min.

Figura 15 – Espectrômetro de absorção atômica.



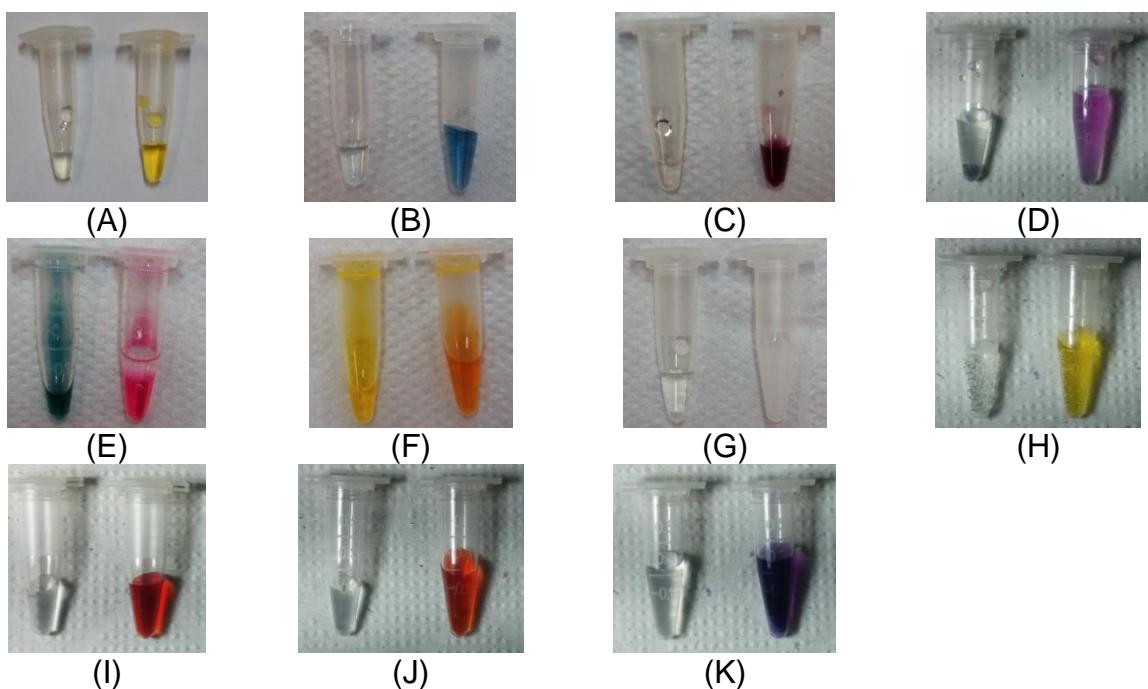
Fonte: <http://caqi.iqsc.usp.br/tecnicas-espectroscopicas/espectrometro-de-absorcao-atomica/>

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaios colorimétricos

Para a escolha dos métodos colorimétricos, foram realizados ensaios em eppendorfs. Na Figura 16 estão representados onze ensaios para o estabelecimento das condições experimentais das reações colorimétricas.

Figura 16 – Ensaios colorimétricos para determinação de micro- e macronutrientes. Os eppendorfs à esquerda contêm somente os reagentes (branco), e os da direita evidenciam a coloração do produto da reação após a adição do analito, referente as determinações: (A) fosfato com ácido molibdovanadofosfórico. (B) fosfato com reagente vanadomolibídico e posterior redução com ácido ascórbico. (C) nitrito com reagente de Griess. (D) nitrato através da redução com zinco e posterior reação com reagente de Griess. (E) zinco com ditizona. (F) boro com solução etanólica de curcumina. (G) potássio com tetrafenilborato de sódio. (H) cobalto com nitrito de sódio. (I) Fe^{2+} com 1,10-fenantrolina. (J) Fe^{3+} com 1,10-fenantrolina após redução com cloridrato de hidroxilamina. (K) cobre com ácido bicinchonínico após redução com cloridrato de hidroxilamina.



Fonte: Autoria própria.

Todos os ensaios com exceção da precipitação de potássio com tetrafenilborato de sódio apresentam-se promissores em dispositivos à base de papel. A inviabilidade deste em dispositivos à base de papel resulta da formação de precipitado de cor branca (Figura 16 – G), não apresentando contraste com o papel para detecção.

Já para aplicação em dispositivos à base de poliéster-toner, todos os ensaios colorimétricos apresentaram potencial, pois o poliéster pode receber uma camada de toner e alterar sua cor de fundo para que o resultado das reações colorimétricas e não colorimétricas tenham contraste com o fundo.

5.2 Impressão de cera

Os dispositivos de papel foram confeccionados em papel cromatográfico Whatman Nº 1 e a impressão de cera com impressora de cera da marca Xerox.

A largura nominal do canal (*software*), após impressão e após o aquecimento do papel em estufa foram medidas com um paquímetro. Este estudo foi feito em triplicata e realizado para a compreensão de como a cera percola o papel após o aquecimento, de como a largura do canal seria influenciada após o aquecimento e se a quantidade de cera aplicada sobre o papel era suficiente para permeá-lo completamente. Na Tabela 5 estão apresentados os resultados referentes à largura do canal.

Tabela 5 – Influência da largura do canal nominal (*software*), impresso e após aquecimento em estufa no papel cromatográfico Whatman Nº.1.

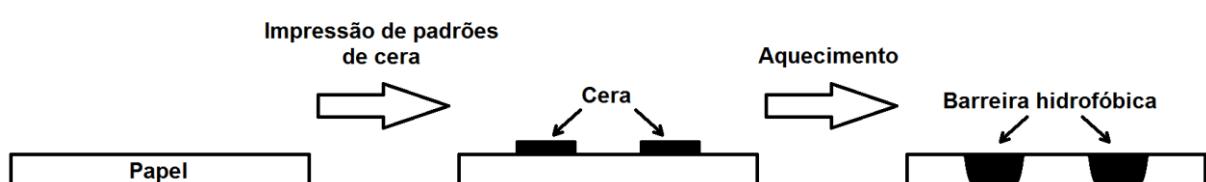
Largura nominal do canal / mm	Impresso e sem aquecimento Média ± DV	Com aquecimento / parte frontal Média ± DV	Com aquecimento / parte posterior Média ± DV
0,40	0,41 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,03
0,60	0,59 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,31 ± 0,07
0,80	0,80 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,43 ± 0,07
1,00	1,03 ± 0,02	0,45 ± 0,08	0,69 ± 0,06
1,50	1,47 ± 0,03	1,08 ± 0,04	1,22 ± 0,04
1,60	1,58 ± 0,02	1,14 ± 0,10	1,35 ± 0,06
1,80	1,72 ± 0,04	1,34 ± 0,08	1,46 ± 0,06
2,00	1,99 ± 0,03	1,64 ± 0,09	1,67 ± 0,10

Fonte: Autoria própria.

Pelos dados da Tabela 5 pode-se verificar que percolação da cera através do papel cromatográfico Whatman Nº 1 resulta na redução da largura nominal do canal. Este comportamento se deve à cera percolar vertical e horizontalmente pelo papel. O espalhamento vertical cria a barreira hidrofóbica, enquanto o espalhamento horizontal diminui a largura nominal do canal hidrofílico no papel, conforme apresentado na Figura 17. A largura do canal é influenciada pela quantidade de cera depositada sobre a superfície do papel, espessura do papel e pela temperatura e tempo em que o papel fica exposto na estufa.

Figura 17 – Impressão da cera e sua percolação através do papel.

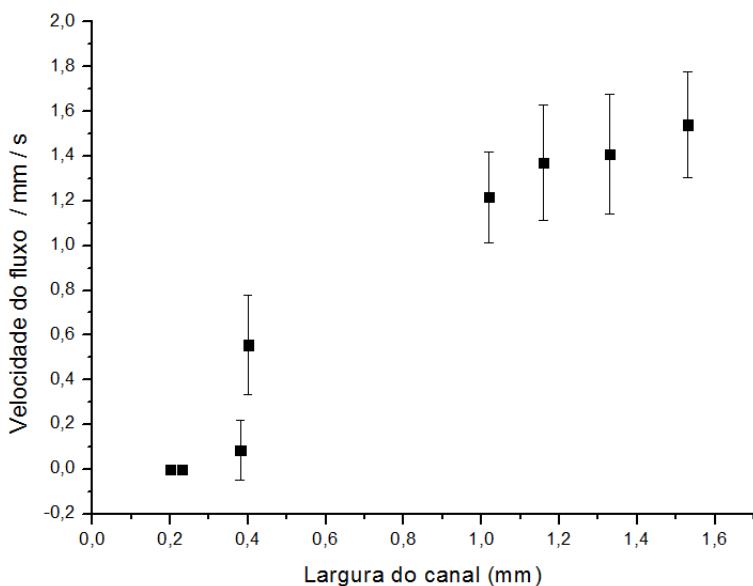
Seção transversal do papel



Fonte: Adaptado de Martinez *et al.* (2010).⁷⁴

Este comportamento da cera no papel já é relatado nos trabalhos de Carrilho *et al.* (2009)^{85,86} e Cate *et al.* (2015).¹² No entanto, este estudo foi conduzido neste trabalho para analisar como a redução da largura do canal poderia influenciar na capilaridade do papel e para verificar a reproduzibilidade entre dispositivos. Os ensaios foram conduzidos em seis experimentos. A zona de aplicação da amostra apresenta 5 mm de diâmetro e o volume aplicado sobre os dispositivos permaneceu constante em 40 µL em todos os ensaios. A distância do percurso foi de 20 mm e cronometrado manualmente. A Figura 18 apresenta os resultados dos ensaios da velocidade de percolação do fluido no interior do dispositivo.

Figura 18 – Influência da largura do canal na velocidade de percolação do fluido. Ensaio realizado com solução de corante à base de água no papel cromatográfico Whatman Nº 1 com cera.



Fonte: Autoria própria.

Os dispositivos com canais inferiores a 0,4 mm de largura não apresentaram capilaridade, devido à cera presente no papel estreitar o canal ao ponto de impedir a percolação do fluido. Entretanto, os dispositivos construídos com largura de canal igual ou superior a 0,4 mm apresentaram.

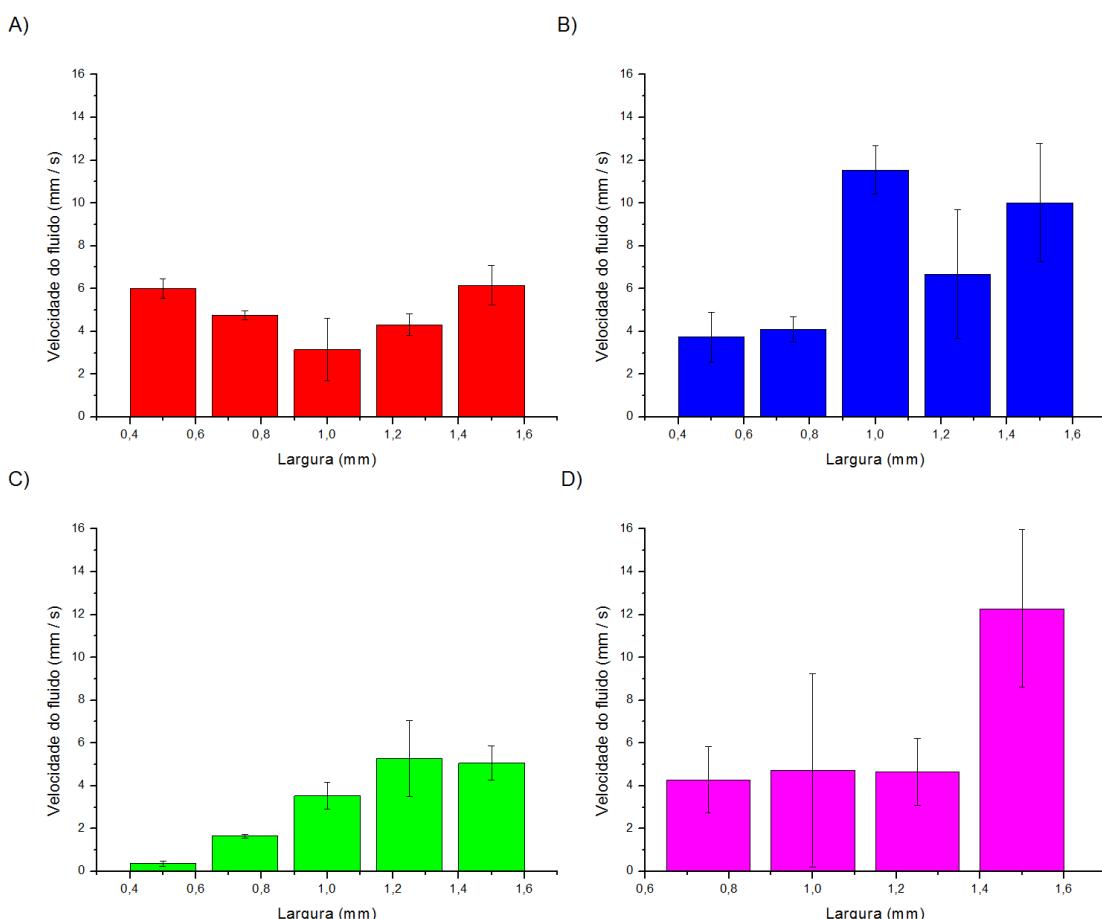
O aumento da largura do canal resultou na maior velocidade média do líquido e a construção de dispositivos com largura superior a 1,0 mm pode ser adotada, pois apresentam maior velocidade do fluxo. Os canais com largura de 0,4 mm de largura apresentaram velocidade do fluxo baixa em comparação aos demais. Uma velocidade baixa resulta no maior tempo para que o analito percorra a região de aplicação da amostra até a região reacional. Outra desvantagem da velocidade baixa, é que a evaporação da amostra no dispositivo de papel é grande e a concentração do analito na solução pode se alterar, resultando em variabilidade dos resultados. Foi adotado 2,0 mm como a largura do canal para a confecção do dispositivo.

5.3 Construção de microdispositivos de poliéster-toner

A construção de dispositivos microfluídicos à base de poliéster-toner foi conduzido para se compreender a influência da quantidade de camadas de poliéster

na velocidade do fluxo no interior do dispositivo e sua reprodutibilidade. O estudo foi realizado em triplicata. A Figura 19 apresenta um gráfico dos resultados obtidos o qual demonstra que o número de camadas de poliéster na altura do canal não apresenta influência linear com a velocidade do líquido, mas sim a largura do canal. Porém, foi verificado que o maior número de camadas influencia na difusão do reagente na parte interior do dispositivo da região reacional para o centro do dispositivo onde foi depositada a amostra, refletindo em uma menor cor da zona reacional em função do tempo. Uma solução para redução da difusão na zona reacional seria a adição de um pedaço circular de papel cromatográfico, para reduzir a difusão e melhorar a homogeneidade de reações colorimétricas, como proposto por Krauss *et al.* (2017).⁸⁷

Figura 19 – Influência da largura e o número de camadas na velocidade de percolação do fluido no interior do canal. A) Uma camada de poliéster (115 µm); B) Duas camadas de poliéster (230 µm); C) Três camadas de poliéster (345 µm); D) Quatro camadas de poliéster (460 µm).



Fonte: Autoria própria.

A altura do canal para a confecção do dispositivo com uma camada de poliéster (115 µm) e 1,5 mm de largura foi escolhida por apresentar menor custo de fabricação em função do número de camadas e fácil montagem para posterior laminação.

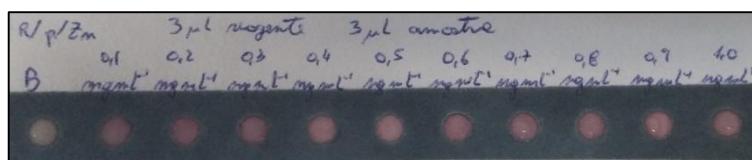
5.4 Ensaios colorimétricos em dispositivos de papel

O desenvolvimento de reações colorimétricas no papel foi investigado primeiramente de forma isolada, para analisar sua aplicação e se o produto das reações colorimétricas com seus respectivos analitos apresentava contraste com o papel para posterior detecção.

5.4.1 Detecção de zinco

A Figura 20 se refere ao ensaio colorimétrico em papel cromatográfico com as zonas reacionais delimitadas com cera.

Figura 20 – Curva analítica de zinco com ditizona.



Fonte: Autoria própria.

Uma dificuldade encontrada na preparação do dispositivo foi a aplicação do reagente no papel. O reagente percolou na cera quando foi aplicado na região reacional em excesso. Este comportamento do reagente extrapolar a região delimitada de cera no papel é devido à preparação ser realizada em clorofórmio (hidrofóbico) e a cera poder migrar em direção à região reacional, interferindo na cor de detecção do analito. Uma alternativa é realizar a aplicação do reagente em várias etapas, porém em volume menor, com intenção de concentrá-lo em um ponto, evitando-se que a solução entre em contato com a cera.

A formação de cor é um indicativo da aplicação em μ PADS, uma vez que a cor apresentou contraste com o fundo branco do papel. A justificativa para a variação da cor não ser proporcional à concentração do analito é que houve saturação do reagente já no início da curva analítica.

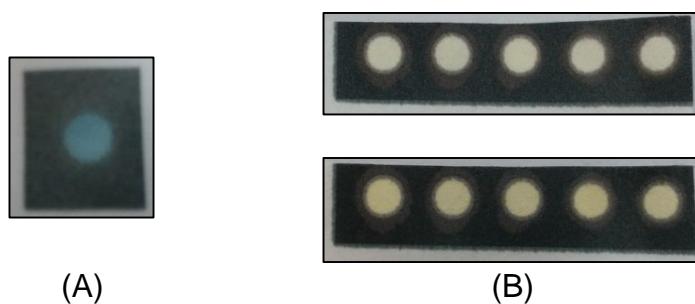
Foi então construída uma nova curva analítica, envolvendo a faixa de concentrações de 1 a 10 mg/L e a formação de cor não foi proporcional à concentração. Duas justificativas podem ser apontadas. O reagente é muito sensível e, mesmo sob menores concentrações de zinco, saturava o reagente já no início da curva analítica. Aumentar a concentração da solução de ditizona. Outra justificativa é a solubilidade da ditizona ocorrer em clorofórmio e os ensaios terem sido realizados em *eppendorfs*, onde clorofórmio apresentava-se no estado líquido. Nos μ PADS os reagentes são secos para depois o analito ser aplicado.

Desta forma, o uso de ditizona para detecção de zinco funciona, porém é necessário um estudo mais aprofundado para descobrir a faixa linear de trabalho em μ PADS, bem como a influência de outros metais na detecção do zinco.

5.4.2 Fosfato

A Figura 21 A e B se referem à determinação de fosfato envolvendo a reação de formação do composto amarelo com posterior redução com ácido ascórbico e reação com ácido molibdovanadofosfórico respectivamente.

Figura 21 – Determinação colorimétrica de fosfato. (A) Cor azul proveniente da reação do íon fosfato com reagente vanadomolíbdico e posterior redução com ácido ascórbico. Cor azul oriunda da redução de Mo(VI) a Mo(V). (B) Imagem superior: ácido molibdovanadofosfórico no papel. Imagem inferior: cor amarela proveniente da reação do íon fosfato com ácido molibdovanadofosfórico.



Fonte: Autoria própria.

Ambas as reações apresentaram contraste com o fundo branco do papel e subsequente aplicação em μ PADs. A Figura 21A apresenta a reação com reagente vanadomolíbdico reagido com fosfato e reduzido com ácido ascórbico. A cor azul

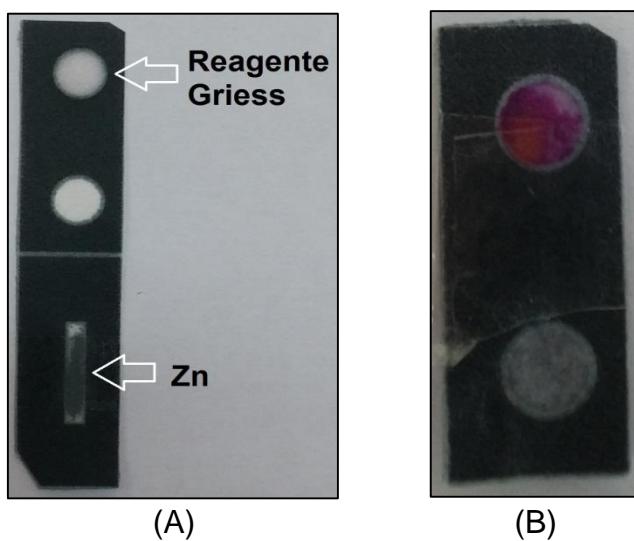
apresenta bom contraste com fundo branco do papel, mas é instável e facilmente oxidado, tornando sua aplicação limitada.

A imagem superior da Figura 21B tem apresentado o dispositivo somente com reagente e a reação com solução de fosfato na imagem inferior na Figura 21B. Esta reação apresenta melhor aplicação, pois não se faz o uso posterior de outro reagente. Essa característica o qualifica como um bom reagente para determinação de fosfato em dispositivos à base de papel ou poliéster-toner.

5.4.3 Detecção de nitrato

A Figura 22 se refere à determinação de nitrato envolvendo redução com zinco metálico em pó e posterior reação de Griess. A determinação somente de nitrito no μ PADs foi omitida, pois a mesma reação se aplica à determinação de nitrato após sua redução.

Figura 22 – Determinação de nitrato através da sua redução para nitrito com zinco metálico em pó e posterior reação de Griess. (A) Detalhe da separação do pó de zinco metálico e reagente de Griess no dispositivo. (B) Resultado da reação de Griess através da aplicação de amostra contendo nitrato. A reação ocorreu após a redução do nitrato em nitrito.



Fonte: Autoria própria.

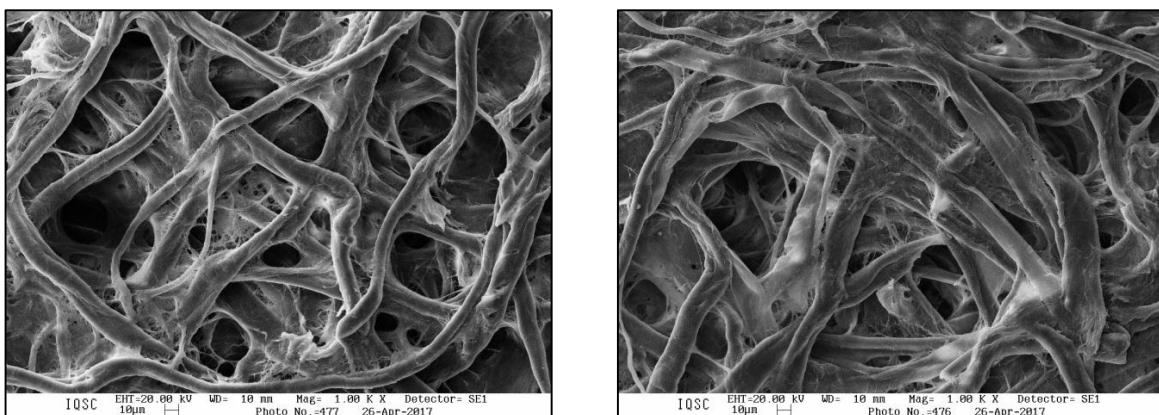
Na Figura 22A está demonstrada a aplicação do reagente de Griess e de pó de zinco metálico através de uma suspensão aquosa no canal. Após a adição da suspensão e evaporação da água, formou-se uma camada metálica de zinco particulado sobre a trilha feita no papel hidrofílico. Porém, ao manusear o papel, esta camada se desprendeu e perdeu o formato do canal, indicando que não houve uma fixação permanente. Um segundo dispositivo foi construído e uma fita adesiva foi utilizada para imobilizar o pó de zinco metálico na superfície do μ PADs. A Figura 22B mostra o dispositivo montado e a determinação realizada com uma solução padrão de nitrato.

A aplicação de zinco para redução de nitrato a nitrito funciona, porém, as soluções reagentes devem estar separadas no μ PAD. Os reagentes estando em contato direto e úmidos, reagem com dióxido de nitrogênio presente no ar atmosférico, interferindo no resultado.^{88,89} Assim como os reagentes devem estar separados antes da análise, as partículas de zinco não podem estar em contato direto com os reagentes. O zinco reage com os reagentes e impede a formação do produto colorido. Por este motivo a suspensão de zinco foi adicionada em um canal, longe da zona reacional e dos reagentes.

Devido à camada de zinco ter se desprendido da superfície do papel, imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na Figura 23 estão apresentadas as imagens de MEV da superfície do papel para examinar a distância entre as fibras do papel. Esta figura mostra duas imagens de papel metalizado com ouro. Esse estudo foi conduzido em duas regiões distintas para compreender a morfologia da superfície do papel para fixação das partículas de zinco metálico. Os espaçamentos das fibras da superfície do papel não apresentam homogeneidade, apresentando poros e abertura entre as fibras variando entre 2 e 50 μ m.

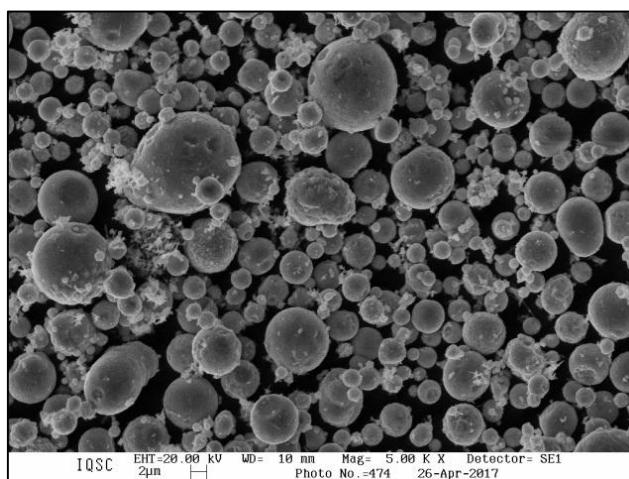
A Figura 24 mostra a imagem MEV das partículas do pó de zinco metálico.

Figura 23 – Imagens de MEV da superfície do papel cromatográfico Whatman Nº 1 sem cera em duas regiões distintas.



Fonte: Autoria própria.

Figura 24 – Imagens de MEV de partículas de pó de zinco.



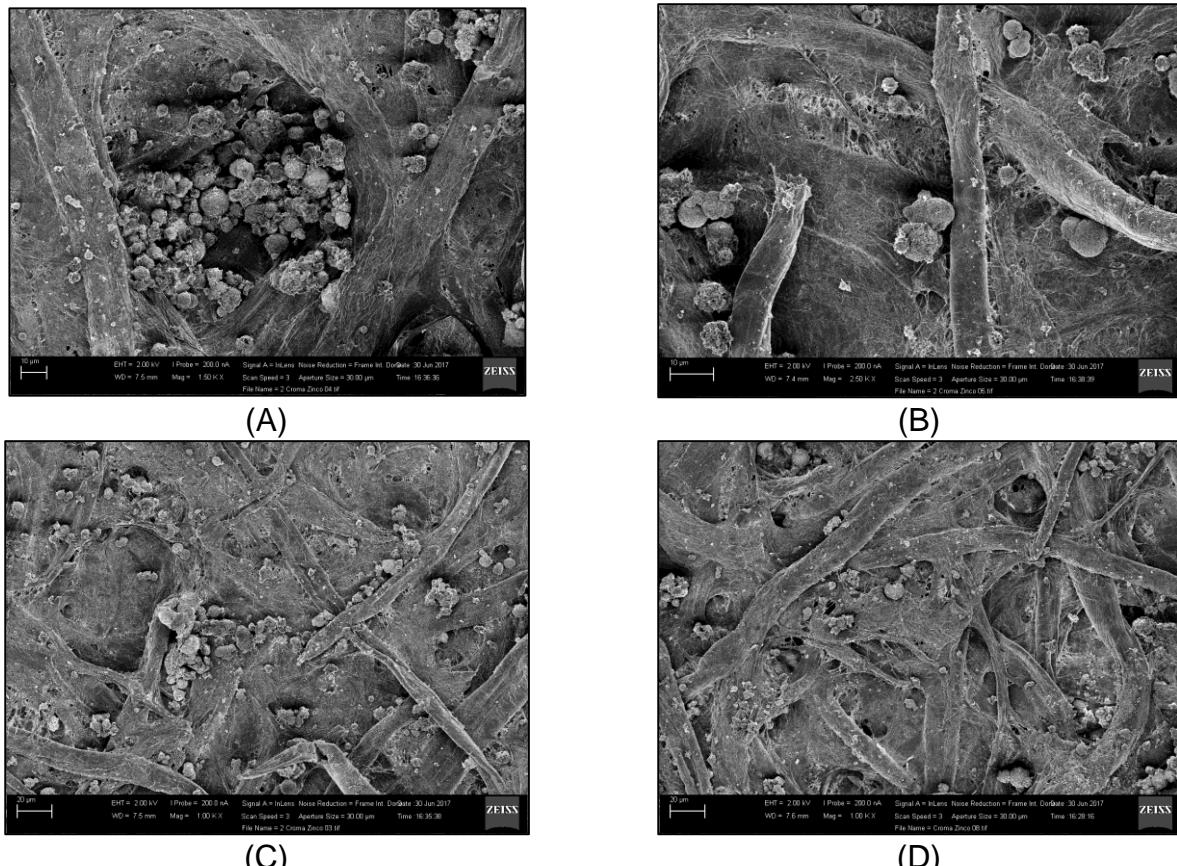
Fonte: Autoria própria.

As partículas apresentadas na Figura 24 apresentam diâmetro entre 1 e 8 µm. O diâmetro das partículas é primordial para aplicação no dispositivo, uma vez que a suspensão contendo nitrato precisa entrar em contato com o zinco para ser reduzido a nitrito. A associação do diâmetro destas partículas à distância entre as fibras na superfície do papel demonstrada na Figura 23 denota que elas deveriam percolar o papel, mas isto não ocorre.

Como durante o manuseio do μ PAD o filme de partículas de zinco que se formava na superfície do μ PAD se desprendia, ele precisava ser fixado. Foi realizado um MEV destes μ PADs após manuseio, afim de verificar se ocorre a fixação destas partículas e se as mesmas seriam suficientes para a redução do nitrato.

A Figura 25 mostra as imagens de MEV da superfície do papel de μ PAD com partículas de zinco depositadas.

Figura 25 – Imagens de MEV da superfície μ PADs com partículas de zinco depositadas. As imagens A e B apresentam escala de 10 μ m e as imagens C e D apresentam escala de 20 μ m.



Fonte: Autoria própria.

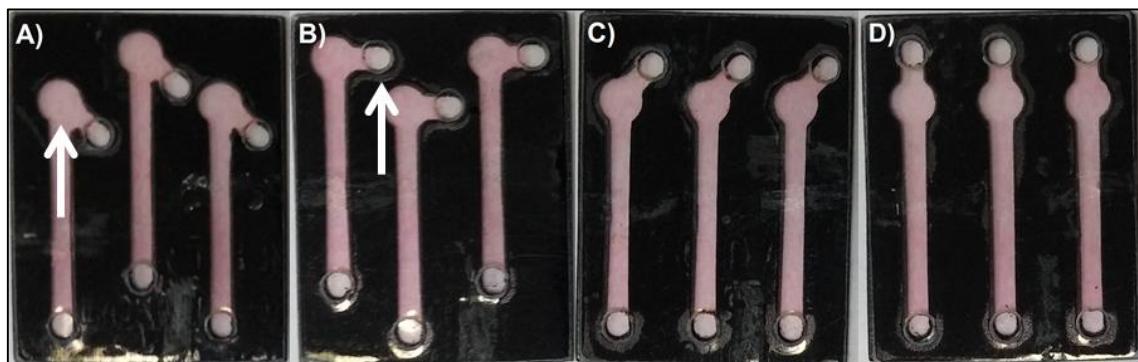
Como mostrado na Figura 25, ocorre a fixação de partículas de zinco no canal. A quantidade adsorvida nas fibras do papel talvez seja suficiente para que a redução quantitativa ocorra, mas uma otimização da quantidade de zinco depositado é necessária para que a redução ocorra. Tal otimização não foi conduzida neste trabalho, mas já existe na literatura.²³

5.5 Ensaios colorimétricos em poliéster-toner

Com os valores de largura e altura do canal no interior dos dispositivos microfluídicos à base de poliéster-toner obtidos, a montagem de dispositivos foi

realizada. Os primeiros dispositivos de poliéster-toner confeccionados neste trabalho apresentaram formação de bolha na zona reacional (seta branca indicada na Figura 26A) no momento da adição da amostra. O respiro (seta branca indicada na Figura 26B) da zona reacional apresentava o formato da Figura 26 e os dispositivos foram aqui omitidos. Devido a este problema de formação de bolhas, foi realizado o estudo em triplicata do ângulo do respiro apresentado na Figura 26 pois a bolha de ar no interior da zona reacional influencia na detecção por imagem.

Figura 26 – Influência da posição do respiro da zona reacional em dispositivo microfluídico de poliéster-toner na formação de bolhas no interior da zona reacional. (A) 45°; (B) 90°; (C) 145° e (D) 180°.



Fonte: Autoria própria.

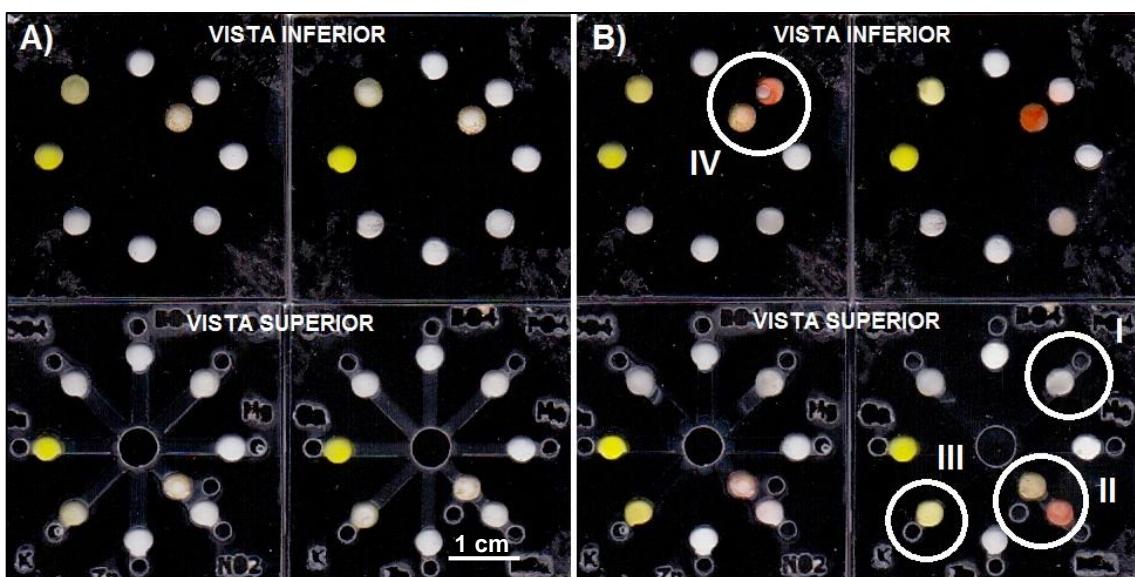
Os dispositivos apresentados na Figura 26 apresentam coloração rosa porque foram preenchidos com solução aquosa de corante vermelho e subsequentemente secos. Eles foram preenchidos com corante em solução aquosa e depois a solução retirada. As imagens A e B apresentam respectivamente ângulos de 45° e 90°. O interior da zona reacional no respiro com ângulo de 45° apresentava formação de bolha no canto superior esquerdo, assim como no respiro com ângulo de 90°. Os respiros com ângulos de 145° e 180° apresentados na Figura 26C e 26D respectivamente, não apresentaram formação de bolha em seu interior.

Pelos resultados obtidos, aumento do ângulo reduz a probabilidade de formação de bolha na zona reacional e o respiro com ângulo de 180° (Figura 26D) foi o “design” escolhido para fabricação.

Com os valores de largura e altura do canal no interior dos dispositivos microfluídicos à base de poliéster-toner obtidos e o ângulo de respiro na zona reacional, a montagem de dispositivos para determinações simultâneas foi realizado.

Este estudo foi conduzido para a compreensão do comportamento do fluido em dispositivo com vários canais e está apresentado na Figura 27.

Figura 27 – Imagem de scanner de dispositivo microfluídico para determinação simultânea de nitrito, fosfato, potássio e boro. (A) Reagentes aplicados nos dispositivos, secos em estufa e laminados posteriormente a quente. (B) Desenvolvimento de cor do produto da reação com aplicação de uma solução *mix* contendo nitrito, fosfato, potássio e boro. Círculos I – IV destacados para melhor discussão, em detalhes, no texto.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 27A indica as imagens superior e inferior de dois dispositivos somente com reagentes, e na Figura 27B as imagens superior e inferior dos mesmos dispositivos, porém com padrões aplicados no centro do dispositivo. Nos dispositivos da Figura 27 estão escritos em sua superfície os analitos boro, fosfato, magnésio, nitrito, zinco, potássio, cálcio e sulfato, pois nesta etapa os dispositivos foram confeccionados como protótipo e para compreender o comportamento da solução no interior do dispositivo. Estes analitos foram aqui mencionados porque este dispositivo se tratava de um protótipo e as possíveis reações que poderiam ser adotadas.

A reação colorimétrica para determinação de nitrito (Figura 27B na vista inferior pelo círculo demarcado pelo número II) demonstra alteração da cor, de translúcido para rosa. Este procedimento foi conduzido primeiramente em um

processo de duas etapas, porém foi constatado que a reação pode ser conduzida em uma única etapa.

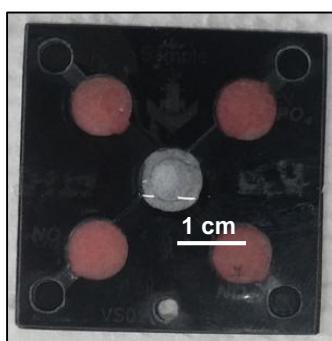
Para determinação do íon fosfato, a reação com ácido molibdoavanadofosfórico (Figura 27B na vista superior com círculo demarcado pelo número III) foi adotada. O reagente apresenta cor amarela, porém o produto da reação intensifica a cor amarela, apresentando contraste com o dispositivo e pode ser aplicado para determinação colorimétrica.

A determinação de potássio não apresentou contraste com o fundo branco no scanner (Figura 27B na vista superior com círculo demarcado pelo número I). Uma opção será a passagem de toner no poliéster para que a cor branca do precipitado apresente contraste. As reações para determinação de nitrato, zinco e boro não estão demonstradas, pois no momento deste experimento os reagentes necessários ainda não estavam disponibilizados.

Na Figura 27B na vista inferior indicado pelo círculo demarcado pelo número IV está demonstrada a formação de bolha no interior do dispositivo na zona reacional. O ângulo do respiro de 180º foi escolhido para reduzir a probabilidade de formação de bolhas, porém ocorreu a sua formação.

Para solucionar o problema da difusão na zona reacional e formação de bolhas, foi adotada a adição de papel cromatográfico Whatman nas zonas reacionais para obter uma cor mais homogênea e reduzir o efeito difusivo. Foi escolhida a reação de zinco com ditizona. Foi adicionado em conjunto, papel cromatográfico Whatman no ponto de aplicação da amostra para filtrar possíveis partículas (Figura 28). Este procedimento foi descrito pela primeira vez por Krauss *et al.* (2017)⁸⁷ como dispositivos microfluídicos híbridos de poliéster e papel. Segundo estes autores, a incorporação do papel melhorou tanto a estabilidade do reagente antes da reação para armazenamento, como uma homogeneidade e estabilidade da cor para análise de imagem.⁸⁷

Figura 28 – Dispositivo microfluídico híbrido de poliéster-toner na determinação de zinco com ditizona.



Fonte: Autoria própria.

A colocação de papel cromatográfico Whatman na região de aplicação da amostra resultou na diminuição da capilaridade, mas nada que comprometesse o funcionamento do dispositivo. O procedimento resultou na uniformidade da cor, como descrito por Krauss *et al.* (2017).⁸⁷ Entretanto, alguns reagentes para determinação colorimétrica degradaram com a temperatura da laminadora. Uma solução para o problema é utilizar laminação a frio com fita dupla face na etapa de vedação do dispositivo.

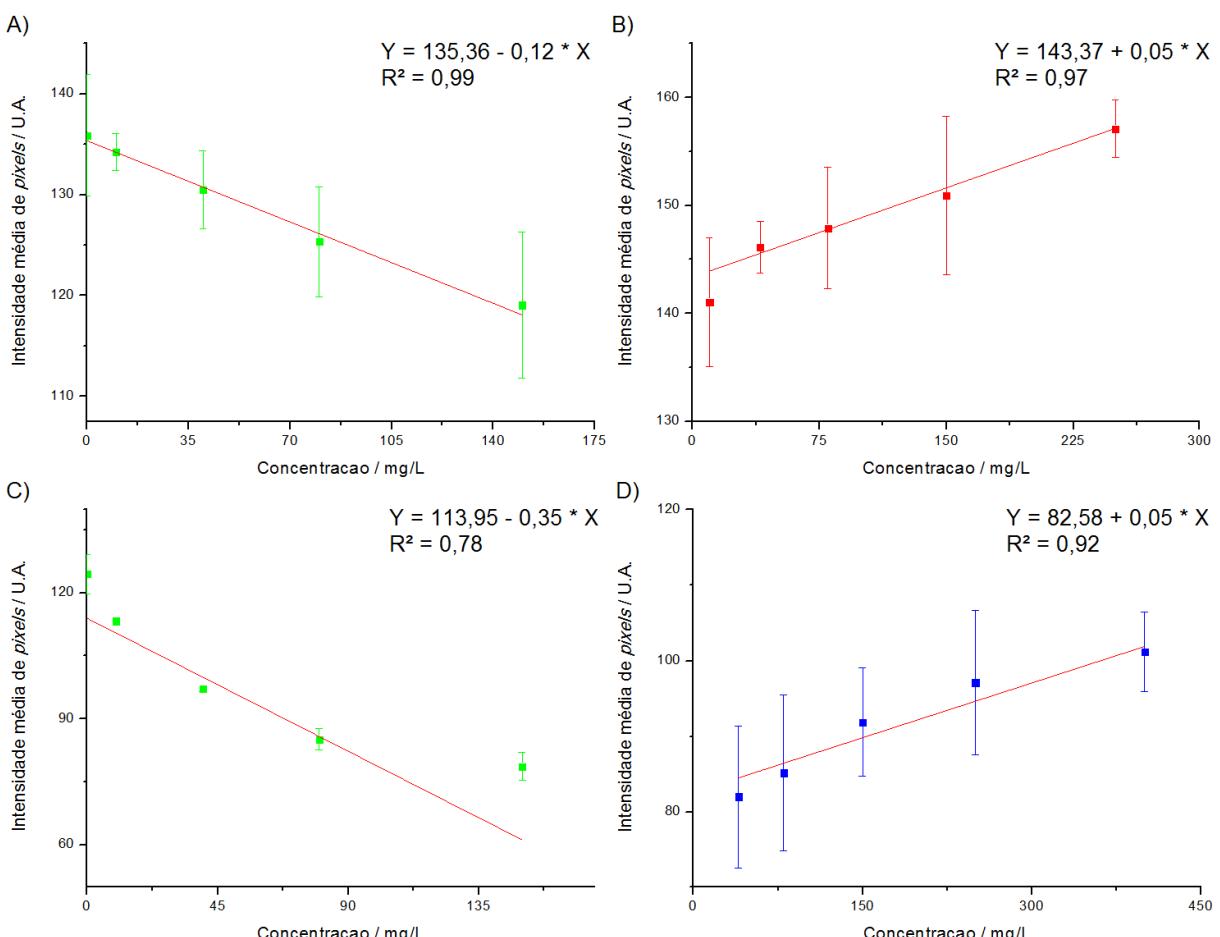
5.6 Curvas analíticas e análises quantitativas

As curvas analíticas aqui apresentadas são referentes aos dispositivos fabricados em papel (μ PADs), envolvendo os analitos boro, ferro, cobre, fosfato e cobalto em três soluções extratoras. As curvas analíticas (intensidade média de pixels vs concentração) foram construídas com 10 pontos, porém, os gráficos aqui apresentados contemplam a faixa linear de trabalho. As imagens foram capturadas com scanner e smartphone no momento da aplicação do analito (molhado) e seco após 2 h. Todas as curvas analíticas foram realizadas em triplicata e as imagens tratadas com software ImageJ, sendo adotado o sistema de cores RGB no tratamento de imagem. Os gráficos foram construídos em um dos canais RGB (vermelho, verde ou azul).

5.6.1 Boro

As Figuras 29 e 30 estão apresentadas as curvas analíticas referentes ao boro extraído com água e ácido cítrico a 2,0% (m/v), respectivamente.

Figura 29 – Curva analítica referente a boro em água ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal verde; B) Ídem com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal vermelho; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal verde; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 40 a 400 mg/L no canal azul.



Fonte: Autoria própria.

As imagens capturadas com os μ PADs molhados (Figura 29A e 29B) apresentaram maior coeficiente de determinação (R^2) em relação aos μ PADs secos (Figura 29C e 29D), assim como maior faixa linear de trabalho quando as imagens foram adquiridas com *smartphone*. No entanto a sensibilidade ficou maior nas curvas

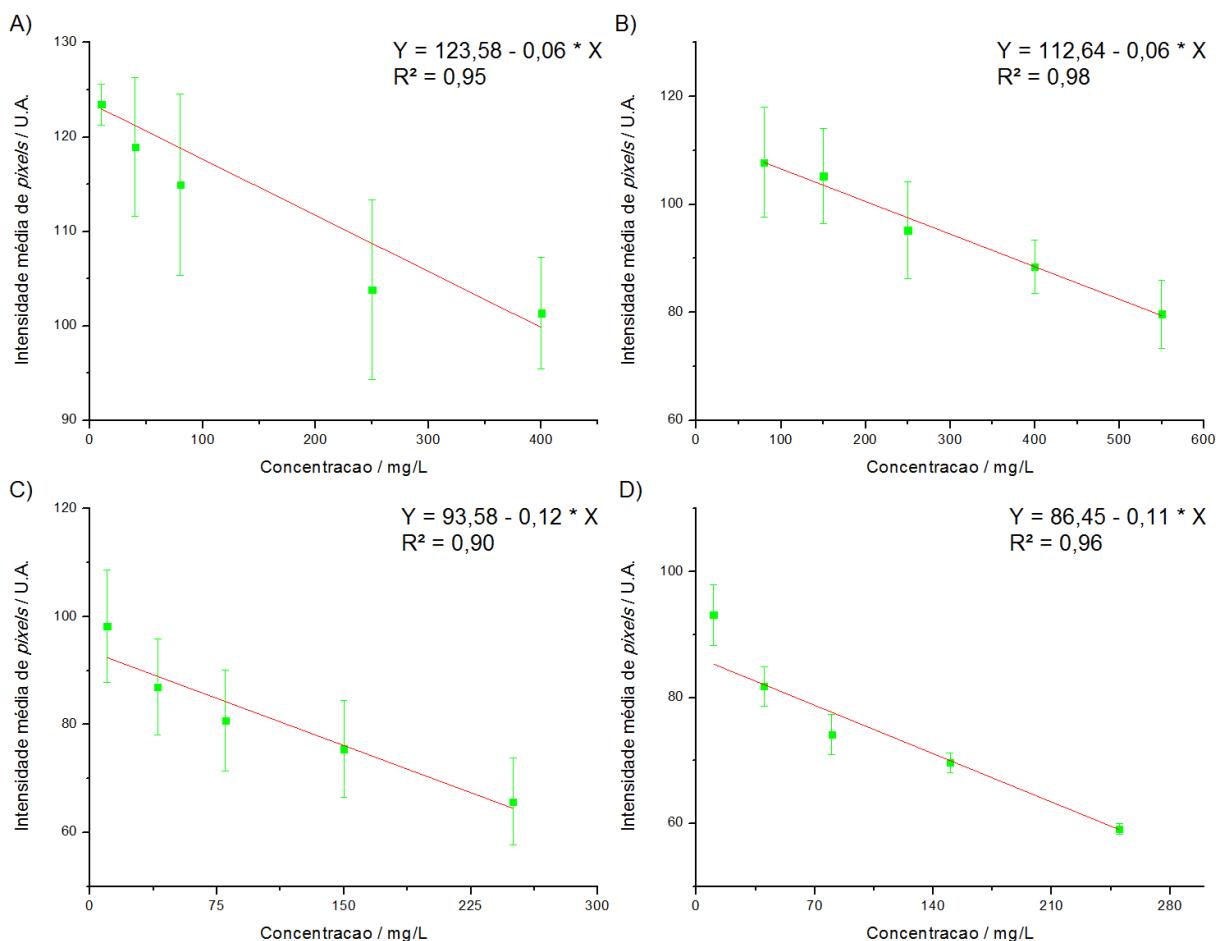
analíticas capturadas com *scanner*. Assim, para emprego de *µPADs*, se aplica a aquisição de imagens por *scanner* em dispositivos secos e molhados quando realizadas em solução de água.

O canal verde foi escolhido para as imagens capturadas por *scanner* porque levou à obtenção de melhor coeficiente de determinação quando molhado. Porém a curva analítica construída com imagem capturada do *µPAD* molhado apresentou $R^2 = 0,99$ com sensibilidade de $-0,12 \text{ pixel/mg/L}$, contra um $R^2 = 0,78$ e sensibilidade de $-0,35 \text{ pixel/mg/L}$ quando seco. Apesar da redução de 21,12 % do coeficiente de determinação, ocorreu um aumento da sensibilidade em 205 %.

As curvas construídas com imagens capturadas com *smartphone* se comportaram diferente em canais de cor diferentes. Quando molhados os *µPADs*, o canal vermelho apresentou um $R^2 = 0,97$, e quando seco um $R^2 = 0,92$. No entanto, ao contrário do que aconteceu com as imagens capturadas com *scanner*, a sensibilidade diminuiu de $0,06 \text{ pixel/mg/L}$ quando molhado, para $0,05 \text{ pixel/mg/L}$ quando seco, um decréscimo de 12,35%.

Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram uma diminuição da sensibilidade de 52,18% quando molhados (Figura 29A e 29B) e de 2,20% no R^2 . Quando secos (Figura 29C e 29D), uma diminuição da sensibilidade de 86,27% e um aumento do R^2 de 18,23% foram observados. Vale ressaltar que os valores da intensidade média dos *pixels* caem de molhado para seco quando a aquisição das imagens foi realizada com *scanner*.

Figura 30 – Curva analítica referente a boro em ácido cítrico 2% (m/v) ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 400 mg/L no canal verde; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 550 mg/L no canal verde; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal verde; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal verde.



Fonte: Autoria própria.

As imagens capturadas com os μ PADs molhados para determinação de boro em ácido cítrico 2% (m/v) (Figura 30A e 30B) apresentaram maior coeficiente de determinação (R^2) e menor sensibilidade em relação aos μ PADs secos (Figura 30C e 30D), assim como maior faixa linear de trabalho quando as imagens foram adquiridas molhadas. Ambas as formas de aquisição de imagens em μ PADs molhados são apropriadas quando realizadas em solução de ácido cítrico 2% (m/v).

O canal verde foi escolhido para as imagens capturadas por *scanner* e *smartphone* nos μ *PADs*, porque levaram a uma melhor linearidade. Porém a curva analítica construída com imagem molhada e captura com *scanner* (Figura 30A), apresentou $R^2 = 0,95$ e sensibilidade de $-0,06 \text{ pixel/ppm}$, contra um $R^2 = 0,90$ e sensibilidade de $-0,12 \text{ pixel/ppm}$ quando seco (Figura 30C).

As curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *smartphone* apresentaram comportamento parecido quando molhados e secos. A sensibilidade aumentou 81,58%, de $-0,06 \text{ pixel/ppm}$ quando molhado (Figura 30B), para $-0,11 \text{ pixel/ppm}$ quando seco (Figura 30D), e uma redução do R^2 de 2,52% para 0,96 quando seco.

Comparando as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone*, temos um aumento da sensibilidade de 1,79% quando molhados (Figura 30A e 30B) e redução de 5,78% quando secos (Figura 30C e 30D).

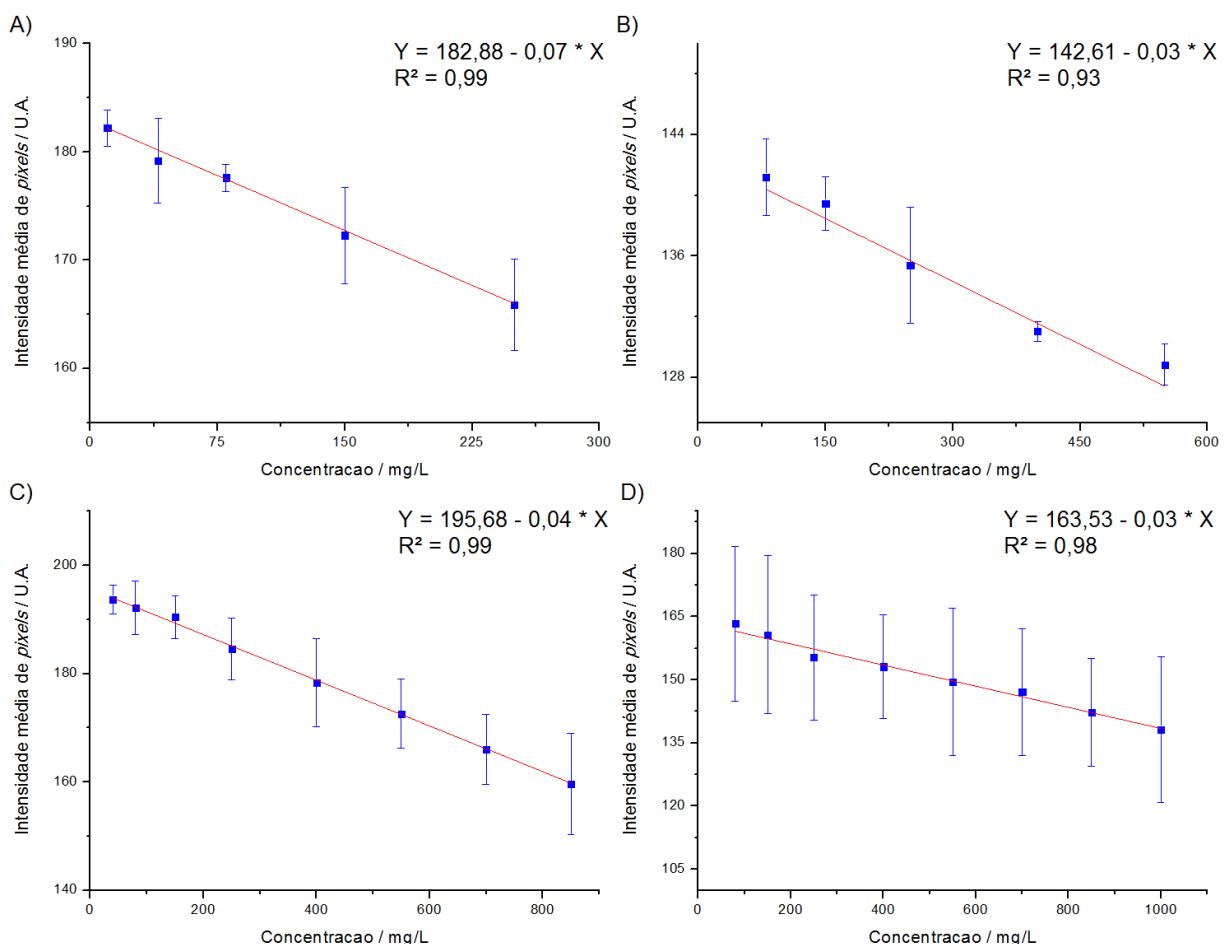
Os dados referentes a curva analítica do boro em solução de citrato neutro de amônio não estão apresentados porque não apresentaram boa linearidade.

Comparando as curvas analíticas obtidas, todas apresentaram bons resultados, entretanto, quando as imagens foram capturadas com *scanner*, a curva analítica construída em água apresenta melhor coeficiente de determinação e sensibilidade. Já quando a aquisição da imagem foi adquirida com *smartphone*, a curva analítica preparada com solução de ácido cítrico 2% (m/v) apresentou melhor coeficiente de determinação e sensibilidade. Ambas as soluções podem ser aplicadas em μ *PADs*, mas o tempo para secar o μ *PAD* e o meio de aquisição das imagens devem ser considerados.

5.6.2 Cobalto

Nas Figuras 31 e 32 estão apresentadas as curvas analíticas do analito cobalto construída em solução de água e ácido cítrico 2% (m/v), respectivamente.

Figura 31 – Curva analítica referente ao cobalto em água ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 550 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 40 a 850 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 1000 mg/L no canal azul.



Fonte: Autoria própria.

Nas Figuras 31A e 31B temos os gráficos das imagens capturadas com os μ PADs molhados, onde apresentam menores coeficientes de determinação (R^2) quando comparados com μ PADs secos (Figura 31C e 31D). Os gráficos construídos

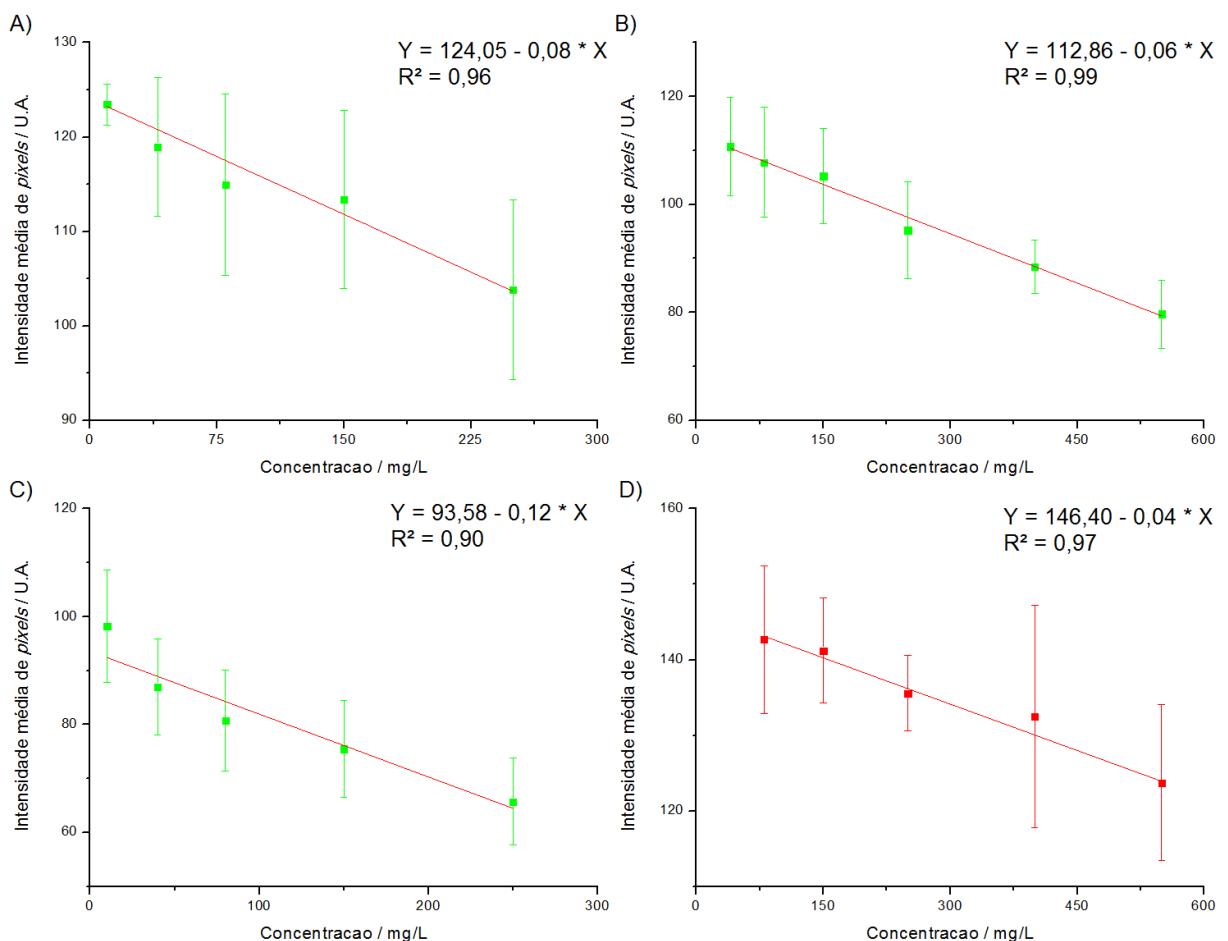
com imagens adquiridas de *smartphone* apresentaram maior faixa linear de trabalho, porém menor sensibilidade quando comparado as imagens adquiridas com *scanner*.

O canal azul foi escolhido para as imagens capturadas por *scanner* e *smartphone*, porque apresentaram melhor linearidade. Porém a curva analítica construída com imagem capturada com *scanner* molhado (Figura 31A) apresentou $R^2 = 0,99$ com uma sensibilidade de $-0,07 \text{ pixel/mg/L}$, contra um $R^2 = 0,99$ e sensibilidade de $-0,04 \text{ pixel/mg/L}$ quando seco (Figura 31C). Não houve diferença entre os coeficientes de determinação (R^2), mas uma diminuição da sensibilidade de 37,49% e um aumento da faixa linear de trabalho (Figura 31C).

Curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *smartphone* em μPADs molhado (Figura 31B) apresentaram de $R^2 = 0,93$ com uma sensibilidade de $-0,03 \text{ pixel/mg/L}$, contra um $R^2 = 0,98$ e sensibilidade de $-0,03 \text{ pixel/mg/L}$ quando seco (Figura 31D). Houve uma redução de 9,22% na sensibilidade, mas um aumento na faixa linear de trabalho (Figura 31D) e de 5,48% no coeficiente de determinação (R^2).

Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram uma diminuição da sensibilidade de 59,04% quando molhados (Figura 31A e 31B) e 40,51% quando secos (Figura 31C e 31D) respectivamente. Em ambos ocorreu um aumento da faixa linear de trabalho quando a aquisição de imagens foi realizada nos μPADs secos. Vale ressaltar que os valores da intensidade média dos *pixels* caem de molhado para seco em ambas na forma de aquisição de imagem realizado por *scanner*. Utilizando *smartphone*, houve um aumento da intensidade média dos *pixels*.

Figura 32 – Curva analítica referente ao cobalto em ácido cítrico 2% (m/v) ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal verde; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 40 a 550 mg/L no canal verde; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal verde; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 550 mg/L no canal vermelho.



Fonte: Autoria própria.

As imagens capturadas nos μ PADs molhados (Figura 32A e 32B) apresentaram maior coeficiente de determinação (R^2) em relação aos μ PADs secos (Figura 32C e 32D), assim como maior faixa linear de trabalho quando as imagens foram adquiridas com *smartphone*. No entanto a sensibilidade ficou maior nas curvas analíticas capturadas com *scanner*, com destaque ao μ PAD seco.

O canal verde escolhido para as imagens capturadas por *scanner* apresentou melhor linearidade. Ambas apresentaram faixa linear de trabalho similar. Porém a

curva analítica construída com imagem capturada com *scanner* molhado (Figura 32A), apresentou de $R^2 = 0,96$ com uma sensibilidade de $-0,08 \text{ pixel/mg/L}$, contra $R^2 = 0,90$ quando seco (Figura 32C) e sensibilidade de $-0,12 \text{ pixel/mg/L}$. Apesar da redução de 6,21% do coeficiente de determinação (R^2), ocorreu um aumento da sensibilidade do método de 42,86%.

As curvas construídas com imagens capturadas com *smartphone* apresentaram linearidade melhor em canais diferentes, compreendendo a mesma faixa linear de trabalho. Quando molhados (Figura 32B), o canal verde apresentou um $R^2 = 0,99$, e quando seco (Figura 32D) o canal vermelho apresentou $R^2 = 0,96$, uma redução de 2,38%. Também foi observado uma redução na sensibilidade de 32,91% entre o μPAD molhado e seco respectivamente (Figura 32B e 32D).

Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram uma diminuição da sensibilidade de 25,26% quando molhados (Figura 32A e 32B) e de 6,21% no R^2 . Quando secos (Figura 32C e 32D), uma diminuição da sensibilidade de 64,90% e um aumento do R^2 de 7,32% são observados. Ambos demonstram maior faixa linear de trabalho quando as imagens foram adquiridas por *smartphone*. Vale ressaltar que os valores da intensidade média dos *pixels* caem de molhado para seco em ambas na forma de aquisição de imagem realizado por *scanner*. Na aquisição de imagem utilizando *smartphone*, houve um aumento da intensidade média dos *pixels* quando seco.

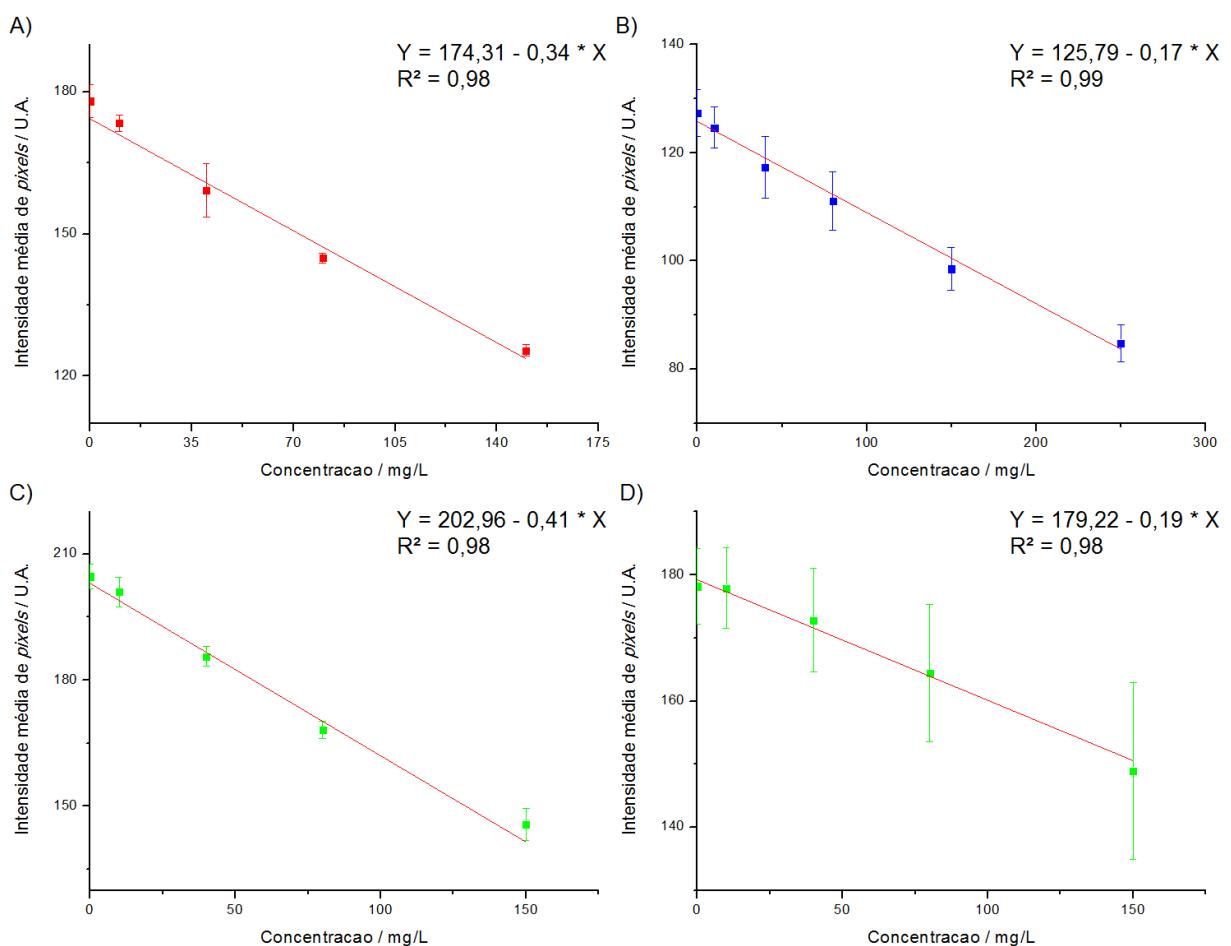
Os dados referentes a curva analítica do cobalto em solução de citrato neutro de amônio não estão apresentados porque não apresentaram linearidade.

Ambas as soluções podem ser aplicadas para uso nos μPADs , mas o tempo para secar o μPAD e o tempo e meio de aquisição das imagens devem ser considerados. Assim, quando comparamos os meios de aquisição de imagens em relação as curvas analíticas construídas, as curvas analíticas dos μPADs construídas em solução de ácido cítrico 2% apresentam resultados mais promissores, com maior sensibilidade. Os coeficientes de determinação são menores, quando comparados com as curvas analíticas construídas em água.

5.6.3 Cobre

Na Figura 33, 34 e 35 estão apresentadas as curvas analíticas do analito cobre construídas em soluções de água, ácido cítrico 2% (m/v) e citrato neutro de amônio respectivamente.

Figura 33 – Curva analítica referente ao cobre em água ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal vermelho; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 250 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal verde; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal verde.



Fonte: Autoria própria.

As imagens capturadas nos μ PADs molhados (Figura 33A e 32B) apresentaram menor sensibilidade em relação aos μ PADs secos (Figura 33C e 33D).

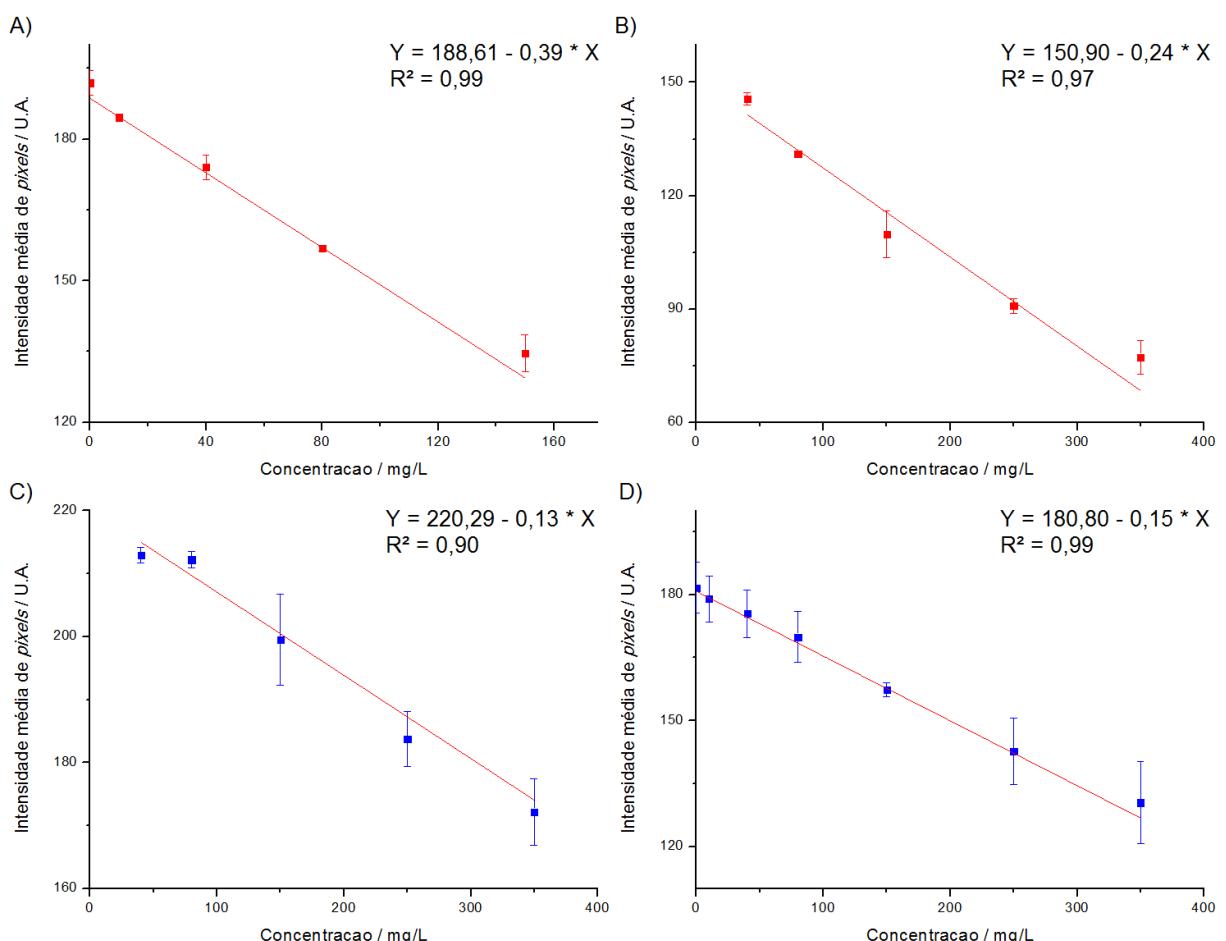
A maior faixa linear de trabalho e coeficiente de determinação foi observado no μ PAD molhado com imagem capturada com *smartphone*. No entanto a sensibilidade ficou maior nas curvas analíticas capturadas com *scanner*, com destaque ao μ PAD seco.

As curvas analíticas construídas a partir de imagens dos μ PADs capturadas com *scanner* apresentaram linearidade em canais diferentes, compreendendo a mesma faixa linear de trabalho. Quando molhado (Figura 33A), o canal vermelho apresentou um $R^2 = 0,98$, e $R^2 = 0,98$ no canal verde quando seco (Figura 33C), um aumento de 0,52 %, assim como um aumento na sensibilidade de 21,28% entre o μ PAD molhado e seco respectivamente (Figura 33A e 33C).

As imagens dos μ PADs para construção das curvas analíticas adquiridas com *smartphone* apresentaram linearidade em canais diferentes. Quando molhado (Figura 33B), o canal azul apresentou um $R^2 = 0,99$, e $R^2 = 0,98$ no canal verde quando seco (Figura 33D), uma redução de 1,26%, assim como um aumento na sensibilidade de 13,39%.

Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram uma diminuição da sensibilidade de 50,14% quando molhados (Figura 33A e 33B) e 53,38 % quando secos (Figura 33C e 33D) respectivamente. Vale ressaltar que os valores da intensidade média dos pixels caem nos μ PADs secos adotando o canal verde na detecção com *smartphone*, em relação ao *scanner*.

Figura 34 – Curva analítica referente ao cobre em ácido cítrico 2% (m/v) ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal vermelho; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 40 a 550 mg/L no canal vermelho; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 250 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 550 mg/L no canal azul.



Fonte: Autoria própria.

As imagens capturadas nos μ PADs molhados (Figura 34A e 34B) apresentaram maior sensibilidade em relação aos μ PADs secos (Figura 34C e 34D) assim como maior faixa linear de trabalho quando secos.

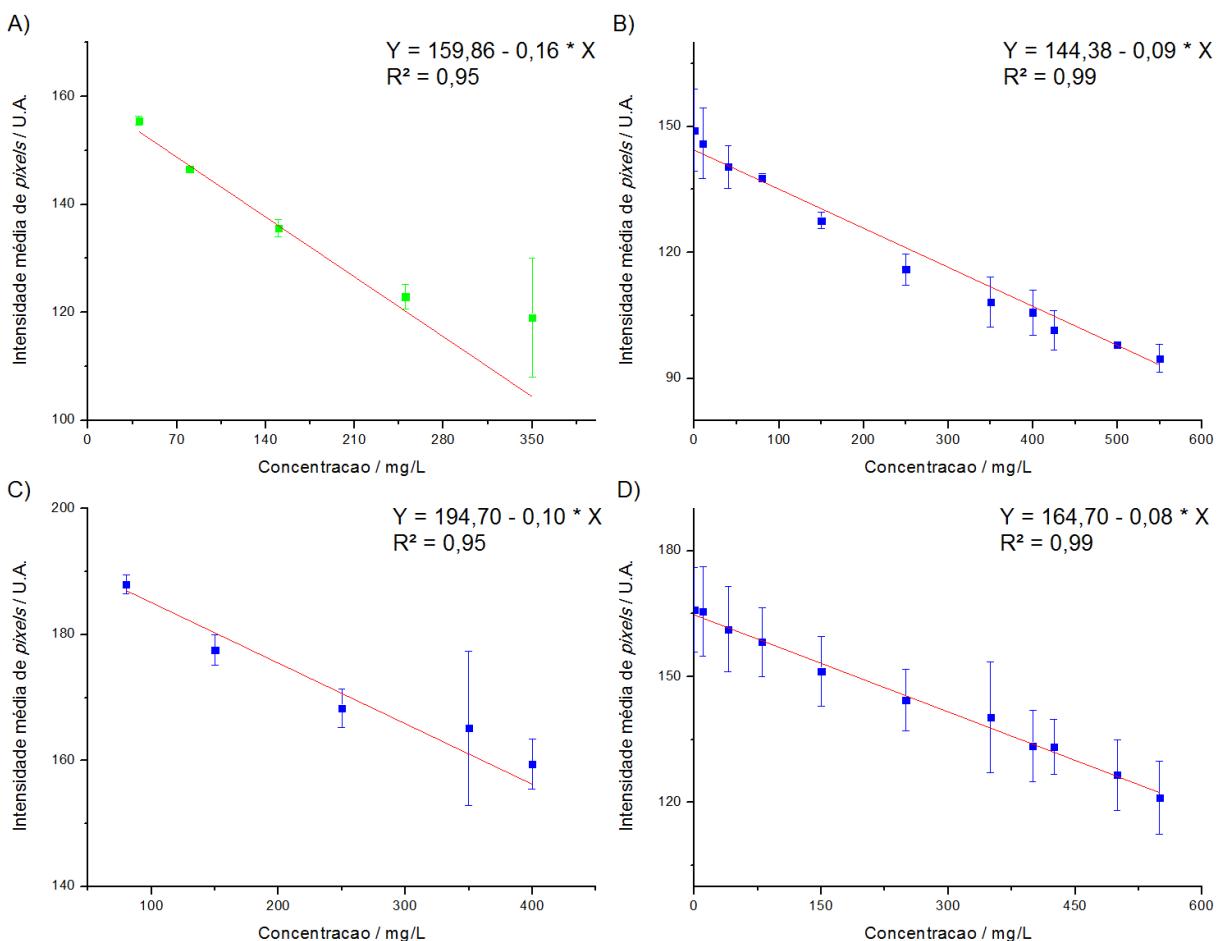
As curvas analíticas construídas a partir de imagens dos μ PADs capturadas com *scanner* apresentaram linearidade em canais diferentes, compreendendo em faixa linear de trabalho distintas. Quando molhado (Figura 34A), o canal vermelho apresentou um $R^2 = 0,99$, e $R^2 = 0,90$ no canal azul quando seco (Figura 34C), uma

redução de 9,62%, assim como redução da sensibilidade de 66,53% entre o μ PAD molhado e seco respectivamente (Figura 34A e 34C).

As imagens dos μ PADs para construção das curvas analíticas adquiridas com *smartphone* apresentaram linearidade em canais diferentes. Quando molhado (Figura 34B), o canal vermelho apresentou um $R^2 = 0,97$, e $R^2 = 0,99$ no canal azul quando seco (Figura 34D), um aumento de 2,26%, assim como uma redução da sensibilidade de 34,54%.

Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram uma diminuição da sensibilidade de 40,30% quando molhados (Figura 34A e 34B) e um aumento de 16,76% quando secos (Figura 34C e 34D) respectivamente. Vale ressaltar que os valores da intensidade média dos *pixels* caem nos μ PADs secos adotando o canal verde na detecção com *smartphone*, em relação ao *scanner*.

Figura 35 – Curva analítica referente ao cobre em citrato neutro de amônio ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal verde; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 550 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 80 a 400 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 550 mg/L no canal azul.



Fonte: Autoria própria.

As imagens capturadas com os μ PADs molhados (Figura 35A e 35B) apresentaram maior sensibilidade e coeficiente de determinação (R^2) em relação aos μ PADs secos (Figura 35C e 35D), assim como maior faixa linear de trabalho quando as imagens foram adquiridas com *smartphone*. No entanto a sensibilidade ficou maior nas curvas analíticas capturadas com *scanner*.

As curvas analíticas construídas a partir de imagens dos μ PADs capturadas com *scanner* apresentaram linearidade em canais diferentes, compreendendo em

faixa linear de trabalho distintas. Quando molhado (Figura 35A), o canal verde apresentou um $R^2 = 0,95$, e $R^2 = 0,95$ no canal azul quando seco (Figura 35C), uma redução de 0,30%, assim como redução da sensibilidade de 39,32% entre o μ PAD molhado e seco respectivamente (Figura 35A e 35C).

As imagens dos μ PADs para construção das curvas analíticas adquiridas com *smartphone* apresentaram linearidade no canal azul. Quando molhado (Figura 35B), o μ PAD apresentou um $R^2 = 0,99$, e $R^2 = 0,99$ quando seco (Figura 35D), uma redução de 0,23%, assim como uma redução da sensibilidade de 17,26%.

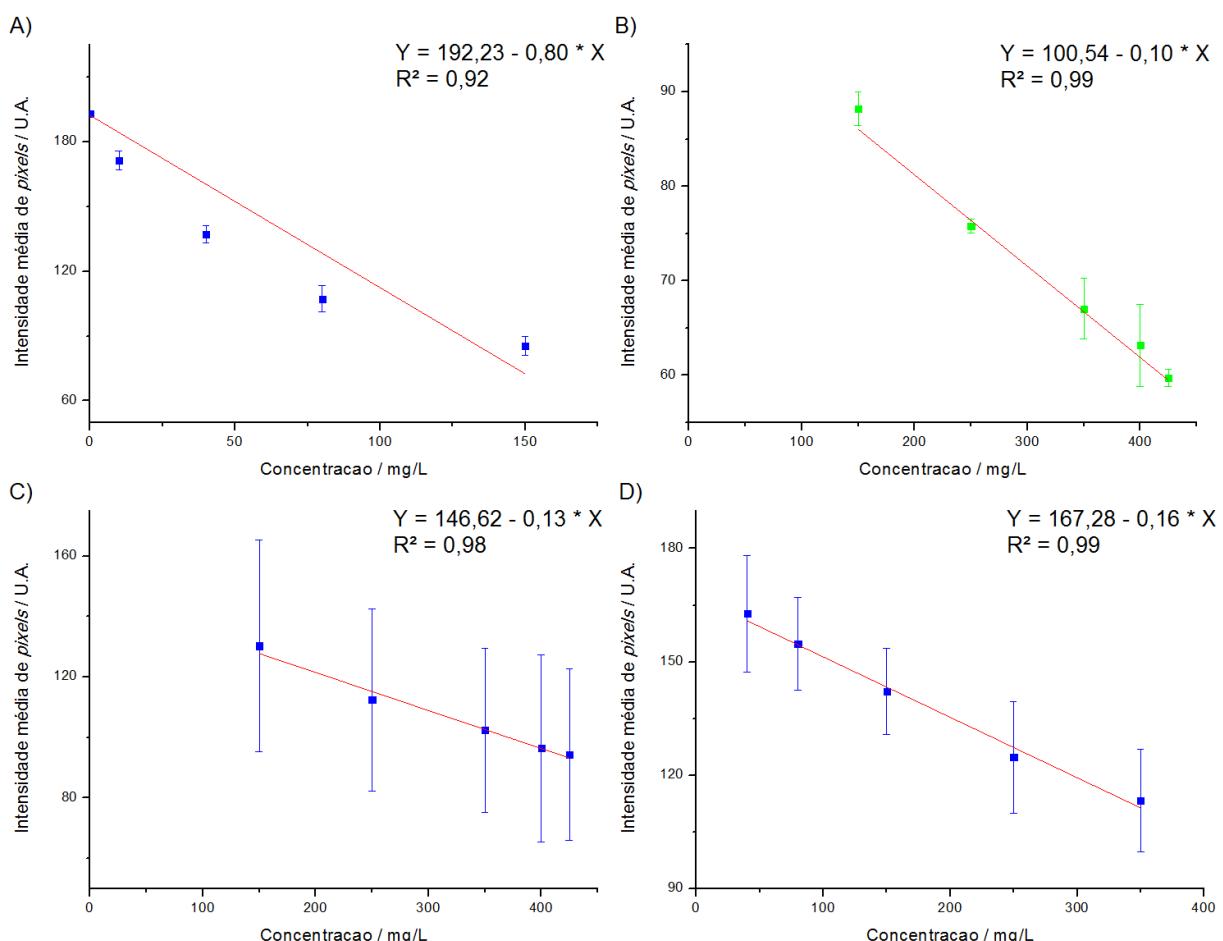
Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram uma redução da sensibilidade de 41,28% quando molhados (Figura 35A e 35B) e redução de 19,93% quando secos (Figura 35C e 35D) respectivamente. Vale ressaltar que os valores da intensidade média dos *pixels* aumentaram nos μ PADs secos adotando detecção com *smartphone*.

Todas as soluções aplicadas para construção das curvas analíticas podem ser empregadas em μ PADs, mas o tempo e o meio de aquisição das imagens devem ser considerados. As curvas apresentaram resultados similares, mas a água é um extrator ineficiente e não deve ser adotado. A curva construída com ácido cítrico 2% apresenta maior coeficiente de determinação e sensibilidade, enquanto que com citrato neutro de amônio apresentara melhor coeficiente de determinação e ampla faixa linear de trabalho, mas baixa sensibilidade quando as imagens foram adquiridas com *smartphone*.

5.6.4 Ferro (Fe^{2+})

Na Figura 36, 37 e 38 estão apresentadas as curvas analíticas do analito Fe^{2+} construídas em soluções de água, ácido cítrico 2% (m/v) e citrato neutro de amônio respectivamente.

Figura 36 – Curva analítica referente ao Fe^{2+} em água ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 150 a 425 mg/L no canal verde; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 150 a 425 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal azul.



Fonte: Autoria própria.

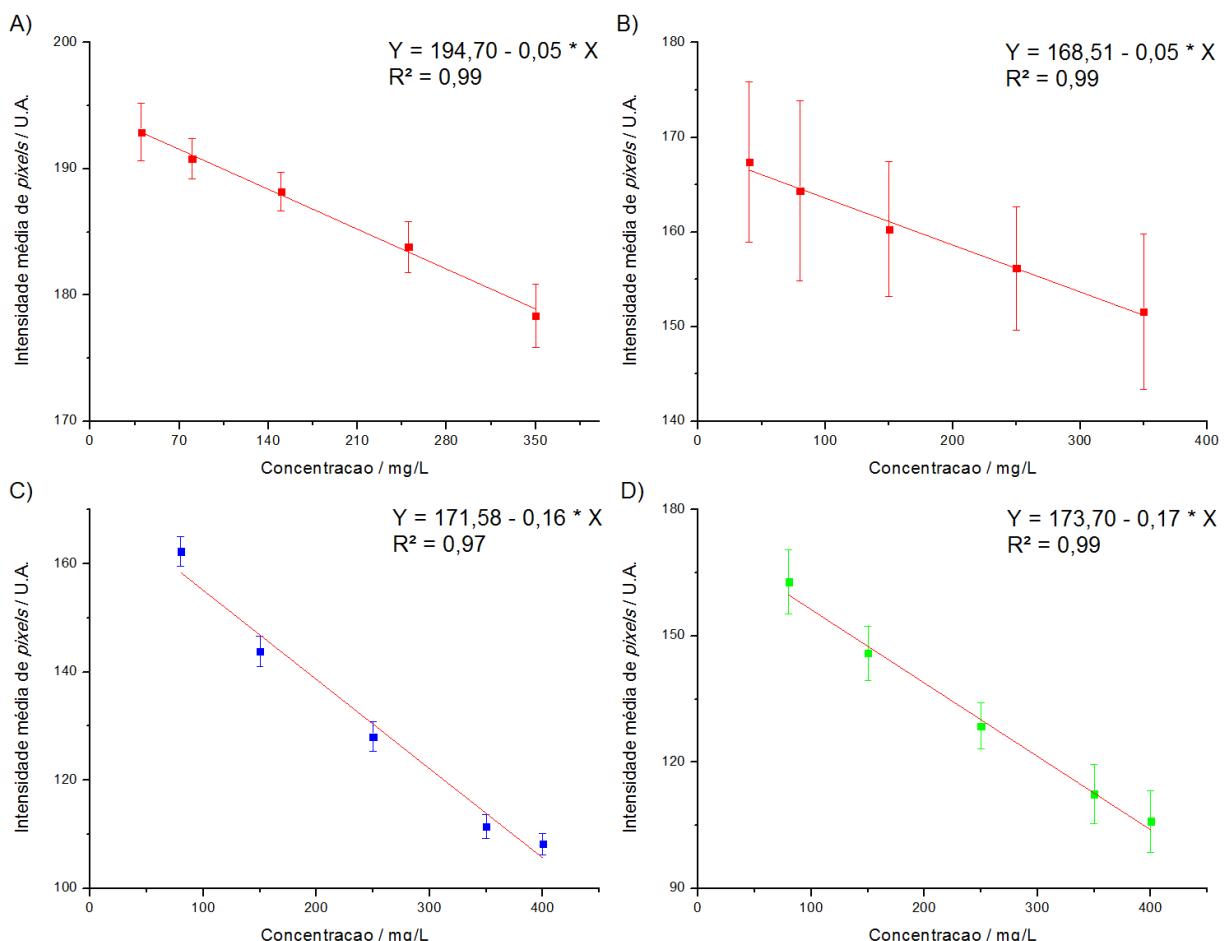
As imagens capturadas nos μ PADs molhados (Figura 36A e 36B) apresentaram menor coeficiente de determinação em relação aos μ PADs secos (Figura 36C e 36D) assim como maior faixa linear de trabalho quando secos.

As curvas analíticas construídas a partir de imagens dos μ PADs capturadas com *scanner* apresentaram melhores resultados no canal azul. Quando molhado (Figura 36A), apresentou um $R^2 = 0,92$, e $R^2 = 0,98$ quando seco (Figura 36C), um aumento de 6,55%. Houve um aumento na faixa linear de trabalho (Figura 36C) e redução na sensibilidade de 84,25% entre o μ PAD molhado e seco respectivamente (Figura 36A e 36C).

Curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *smartphone* em μ PADs molhados (Figura 36B) apresentaram um $R^2 = 0,99$ com uma sensibilidade de -0,09 pixel/mg/L, contra um $R^2 = 0,99$ e sensibilidade de -0,16 pixel/mg/L quando seco (Figura 36D). Houve um aumento de 65,31% na sensibilidade e de 0,51% no coeficiente de determinação (R^2).

Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram uma diminuição da sensibilidade de 87,89% quando molhados (Figura 36A e 36B) e um aumento de 27,11% quando secos (Figura 36C e 36D) respectivamente.

Figura 37 – Curva analítica referente ao Fe^{2+} em ácido cítrico 2% (m/v) ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal vermelho; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 40 a 350 mg/L no canal vermelho; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 80 a 400 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 400 mg/L no canal verde.



Fonte: Autoria própria.

As imagens capturadas nos μPADs molhados (Figura 37A e 37B) apresentaram menor sensibilidade em relação aos μPADs secos (Figura 37C e 37D).

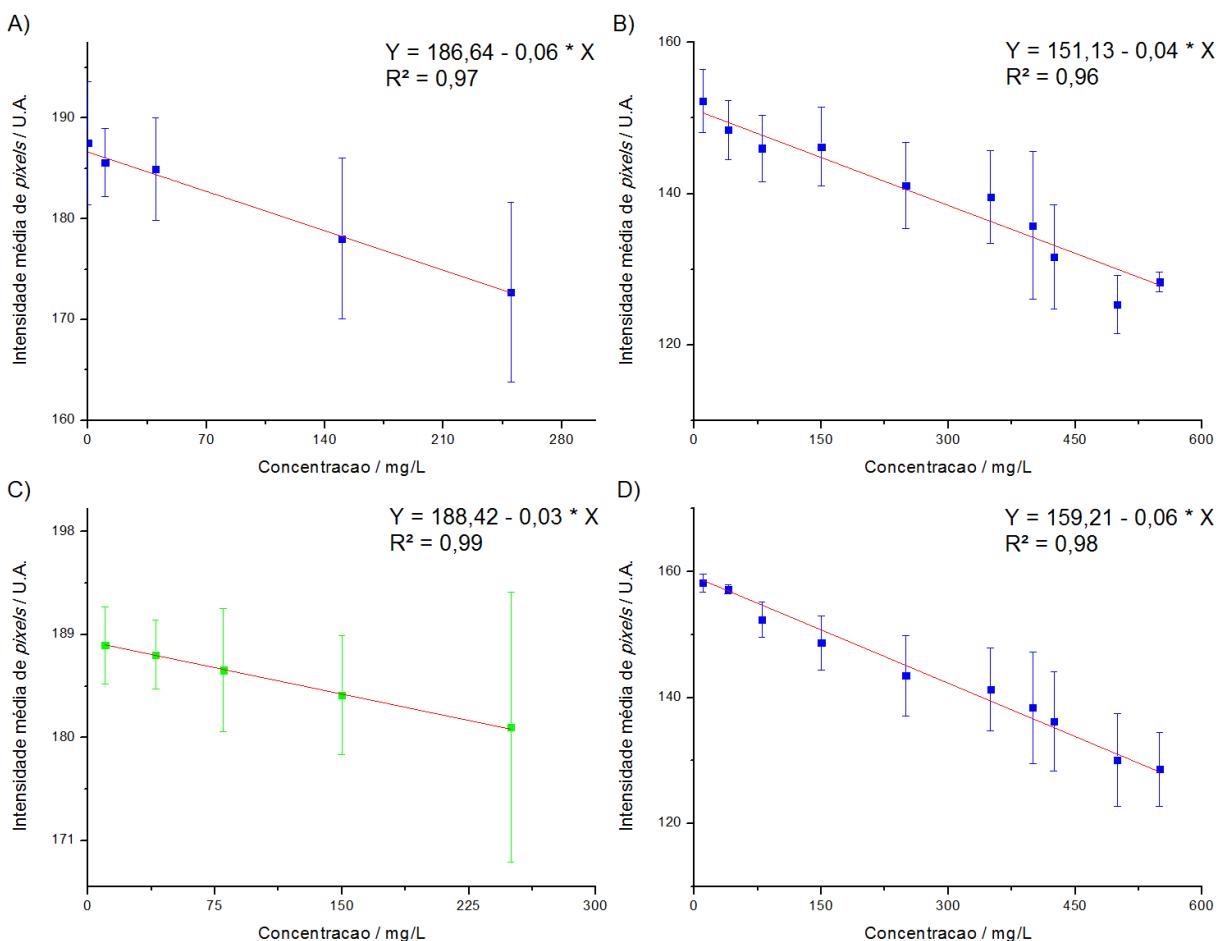
As curvas analíticas construídas a partir de imagens dos μPADs capturadas com *scanner* apresentaram linearidade em canais diferentes, compreendendo faixa linear de trabalho similar. Quando molhado (Figura 37A), o canal vermelho apresentou um $R^2 = 0,99$, e $R^2 = 0,97$ no canal azul quando seco (Figura 37C), uma redução de

1,96%, assim como um aumento na sensibilidade de 265,02% entre o μ PAD molhado e seco respectivamente (Figura 37A e 37C).

As imagens dos μ PADs para construção das curvas analíticas adquiridas com *smartphone* apresentaram linearidade em canais diferentes. Quando molhado (Figura 37B), o canal vermelho apresentou um $R^2 = 0,99$, e $R^2 = 0,99$ no canal verde quando seco (Figura 37D), um aumento de 0,26%, assim como um aumento na sensibilidade de 252,65%.

Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram um aumento da sensibilidade de 9,54% quando molhados (Figura 37A e 37B) e 5,83% quando secos (Figura 37C e 37D) respectivamente.

Figura 38 – Curva analítica referente ao Fe^{2+} em citrato neutro de amônio ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 250 ppm no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 10 a 550 ppm no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 250 ppm no canal verde; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 10 a 550 ppm no canal azul.



Fonte: Autoria própria.

Nas Figuras 38A e 38D temos os gráficos das imagens capturadas com os μPADs molhados, onde apresentam menores coeficientes de determinação (R^2) quando comparados com μPADs secos (Figura 38A e 38B). Os gráficos construídos com imagens adquiridas de *smartphone* apresentam maior faixa linear de trabalho, porém menor sensibilidade quando comparado as imagens adquiridas com *scanner*.

As curvas analíticas construídas a partir de imagens dos μPADs capturadas com *scanner* apresentaram linearidade em canais diferentes, compreendendo faixa

linear de trabalho similar. Quando molhado (Figura 38A), o canal azul apresentou um $R^2 = 0,97$, e $R^2 = 0,99$ no canal verde quando seco (Figura 38C), e uma redução da sensibilidade de 45,00% entre o μ PAD molhado e seco respectivamente (Figura 38A e 38C).

As imagens dos μ PADs para construção das curvas analíticas adquiridas com *smartphone* apresentaram melhor linearidade no canal azul. Quando molhado (Figura 38B), o canal azul apresentou um $R^2 = 0,96$, contra um $R^2 = 0,98$ no canal azul quando seco (Figura 38D), um aumento de 1,32%, assim como um aumento na sensibilidade de 33,52%.

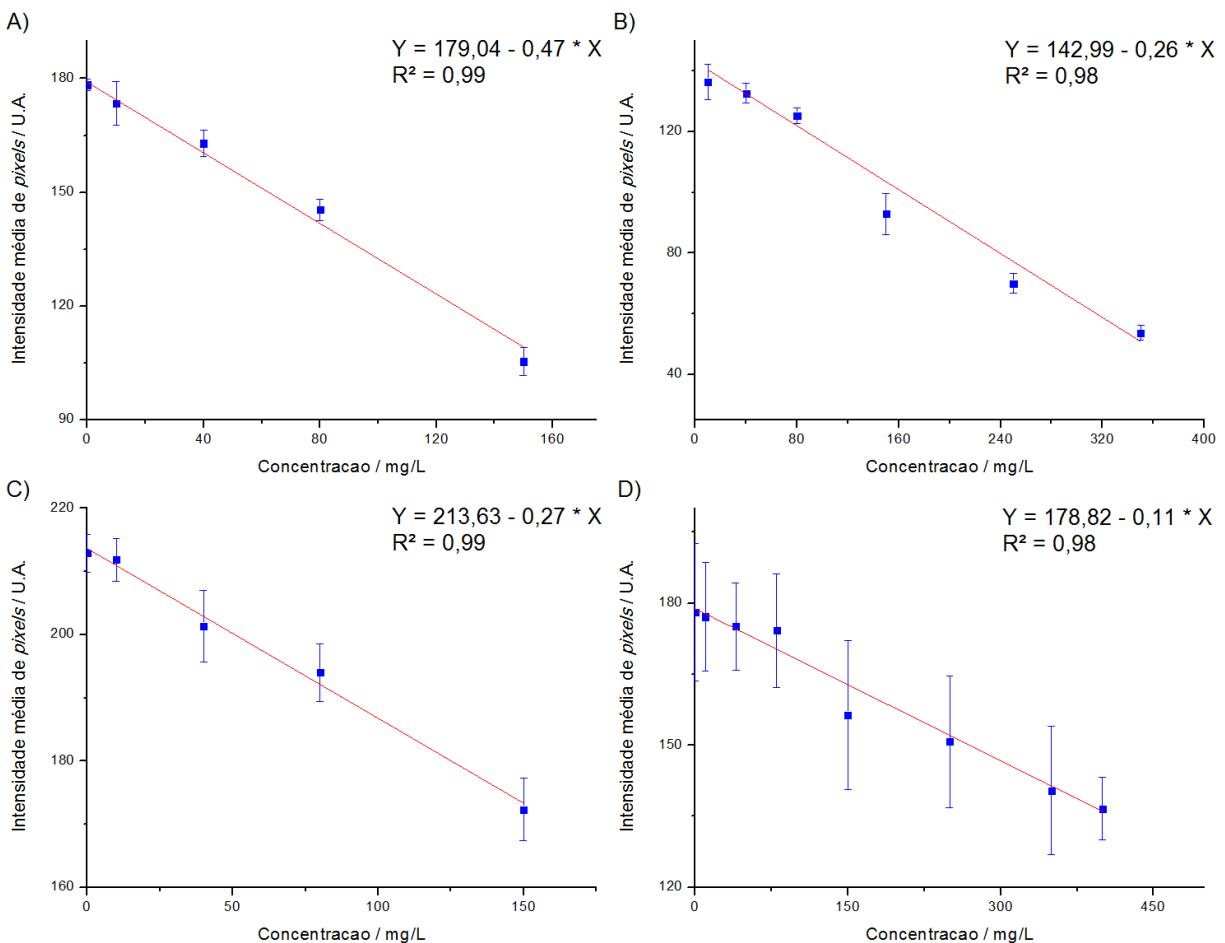
Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram uma diminuição da sensibilidade de 24,43% quando molhados (Figura 38A e 38B) e de 1,25% no R^2 . Quando secos (Figura 38C e 38D), um aumento da sensibilidade de 83,47% e redução de 2,29% no R^2 .

Comparando as curvas analíticas obtidas, todas apresentaram bons resultados, no entanto, a água é um extrator ineficiente do solo e não deve ser utilizado. A curva analítica construída com ácido cítrico 2% apresenta maior coeficiente de determinação e sensibilidade quando comparado a curva analítica preparada com solução de citrato neutro de amônio e deve ser empregada na construção de μ PADs. O tempo para realizar a aquisição de imagens e o meio adotado devem ser considerados.

5.6.5 Ferro (Fe^{3+})

Na Figura 39 e 40 estão apresentadas as curvas analíticas do analito Fe^{3+} construídas em soluções de água e ácido cítrico 2% (m/v).

Figura 39 – Curva analítica referente ao Fe^{3+} em água ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 10 a 350 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 400 mg/L no canal azul.



Fonte: Autoria própria.

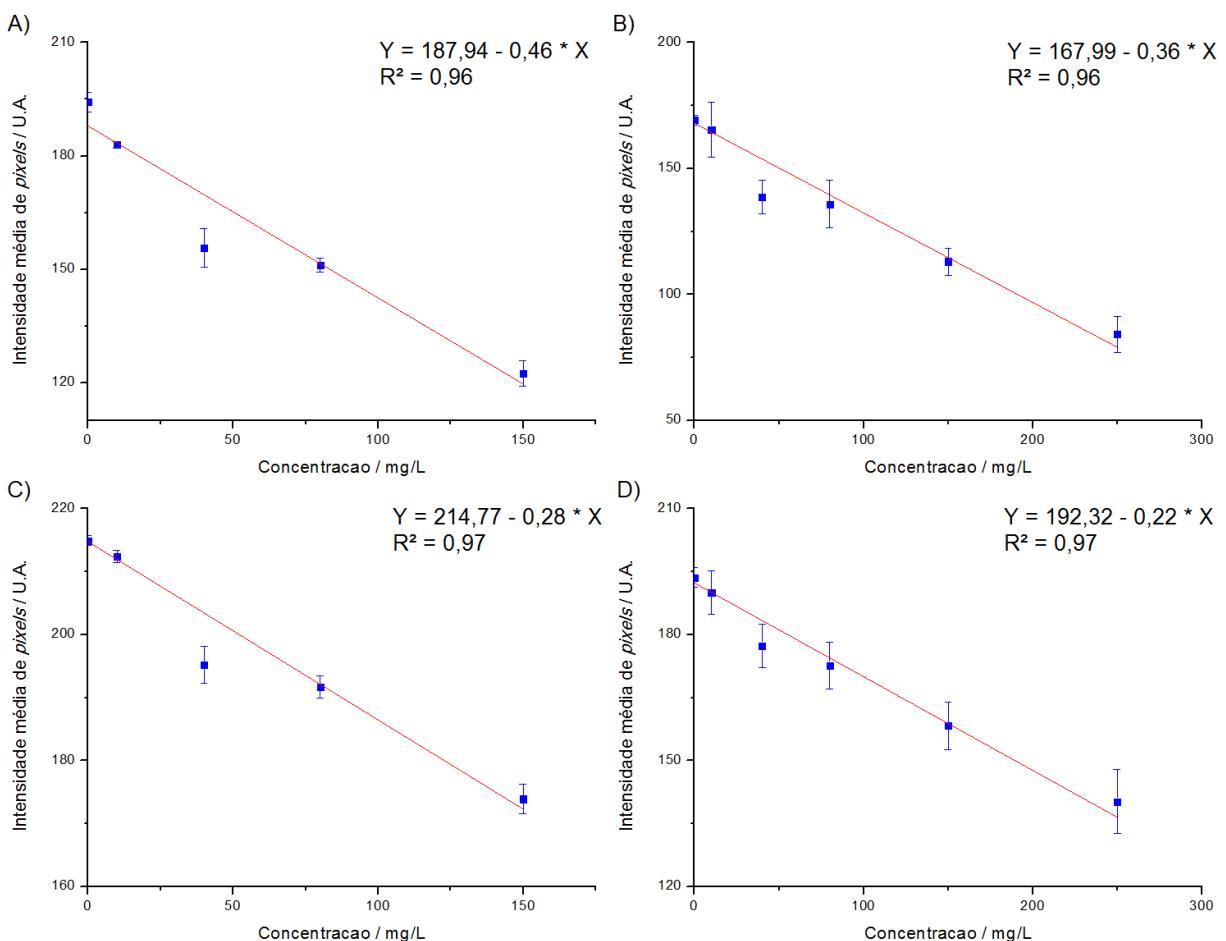
As imagens capturadas com os μPADs molhados (Figura 39A e 39B) apresentam menor coeficiente de determinação (R^2) em relação aos μPADs secos (Figura 39C e 39D), mas, maior sensibilidade.

As curvas analíticas construídas a partir de imagens dos μ PADs capturadas com scanner apresentaram linearidade no canal azul, compreendendo a mesma faixa linear de trabalho. Quando molhado (Figura 39A) o coeficiente de determinação apresentou 0,99, e 0,99 quando seco (Figura 39C), assim como redução da sensibilidade de 42,31% respectivamente (Figura 39A e 39C).

As imagens dos μ PADs para construção das curvas analíticas adquiridas com smartphone apresentaram também linearidade no canal azul. Quando seco (Figura 39D), o μ PAD apresentou um aumento de 0,46% no coeficiente de determinação e uma redução na sensibilidade de 59,38%.

Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com scanner e smartphone apresentaram uma redução no coeficiente de determinação de 0,88% e 43,46% da sensibilidade quando molhados (Figura 39A e 39B). Quando secos (Figura 39C e 39D), uma redução na sensibilidade de 60,18% e 0,66% no coeficiente de determinação. Vale ressaltar que a intensidade média dos pixels aumentaram nos μ PADs secos.

Figura 40 – Curva analítica referente ao Fe^{3+} em ácido cítrico 2% (m/v) ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 250 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 150 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 0 a 250 mg/L no canal azul.



Fonte: Autoria própria.

As imagens capturadas com os μPADs molhados (Figura 40A e 40B) apresentam coeficiente de determinação (R^2) menor em relação aos μPADs secos (Figura 40C e 40D), porém menor sensibilidade. Os gráficos gerados com imagens adquiridas com *smartphone* apresentam maior faixa linear de trabalho.

As curvas analíticas construídas a partir de imagens dos μPADs capturadas com *scanner* apresentaram linearidade no canal azul, compreendendo a mesma faixa linear de trabalho. Quando molhado (Figura 40A) o coeficiente de determinação

apresentou 0,96 e 0,97 quando seco (Figura 40C), um aumento de 0,66% e redução da sensibilidade de 37,81% (Figura 40A e 40C).

Curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *smartphone* em μ PADs molhado (Figura 40B) apresentou coeficiente de determinação de 0,96 com uma sensibilidade de -0,36 pixel/mg/L, contra um coeficiente de determinação de 0,97 e sensibilidade de -0,22 pixel/mg/L quando seco (Figura 40D), uma redução de 37,25% na sensibilidade.

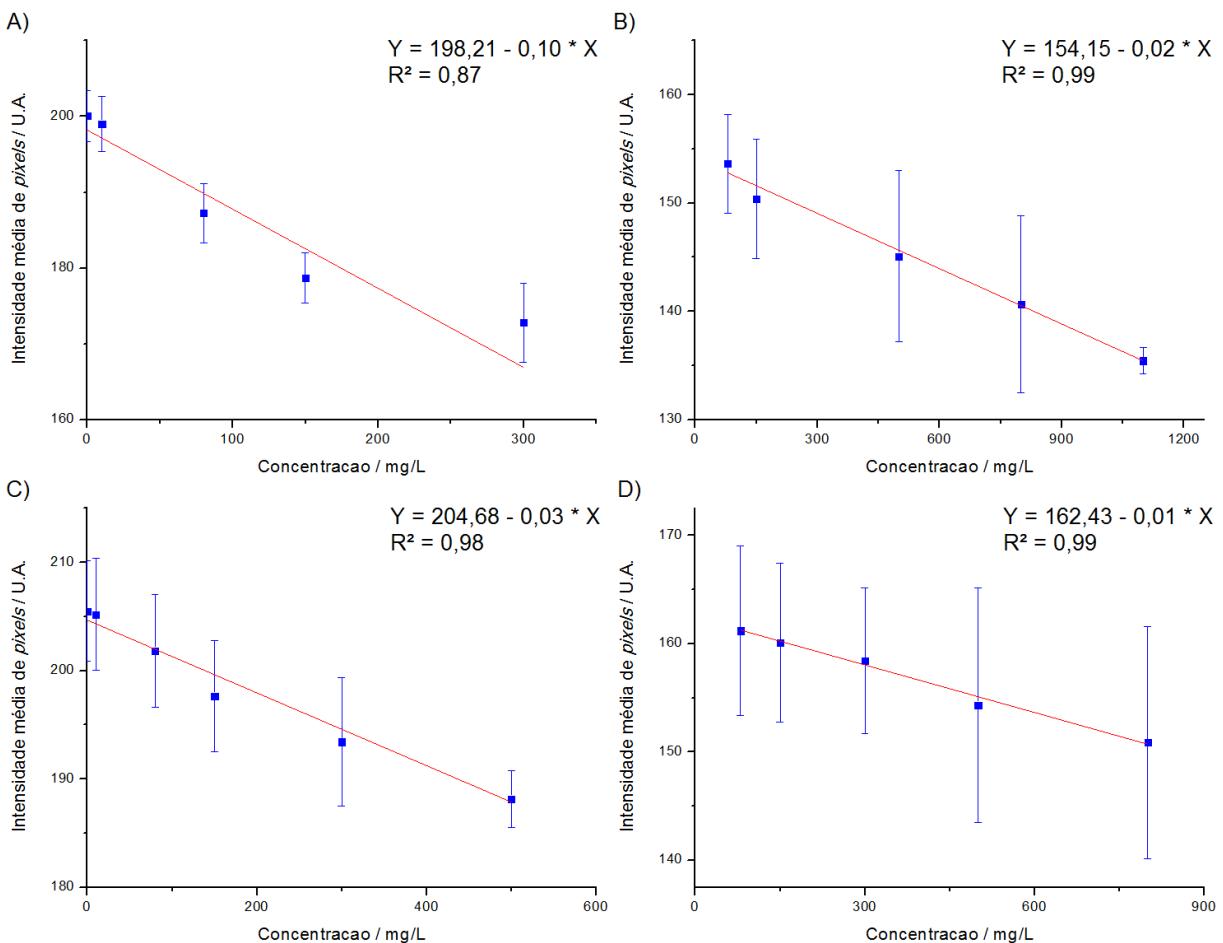
Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram uma redução na sensibilidade de 21,83% quando molhados (Figura 40A e 40B) e 21,12% quando secos (Figura 40C e 40D) respectivamente. Ocorreu um aumento da faixa linear de trabalho quando a aquisição de imagens foi realizada com *smartphone*.

Assim como o que aconteceu com a detecção de Fe²⁺ em solução de citrato neutro de amônio, não foi obtido linearidade na curva analítica para Fe³⁺. As curvas analíticas construídas em água ou ácido cítrico 2% (m/v) podem ser adotados. Quanto utilizado ácido cítrico 2% (m/v), as curvas analíticas apresentaram maior sensibilidade.

5.6.6 Fosfato

Na Figura 41 e 42 estão apresentadas as curvas analíticas do analito fosfato construída em soluções de água e citrato neutro de amônio.

Figura 41 – Curva analítica referente ao fosfato em água ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 300 mg/L no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 1100 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 500 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 800 mg/L no canal azul.



Fonte: Autoria própria.

As imagens capturadas com os μ PADs molhados (Figura 41A e 41B) apresentam maior sensibilidade em relação aos μ PADs secos (Figura 41C e 41D). Os

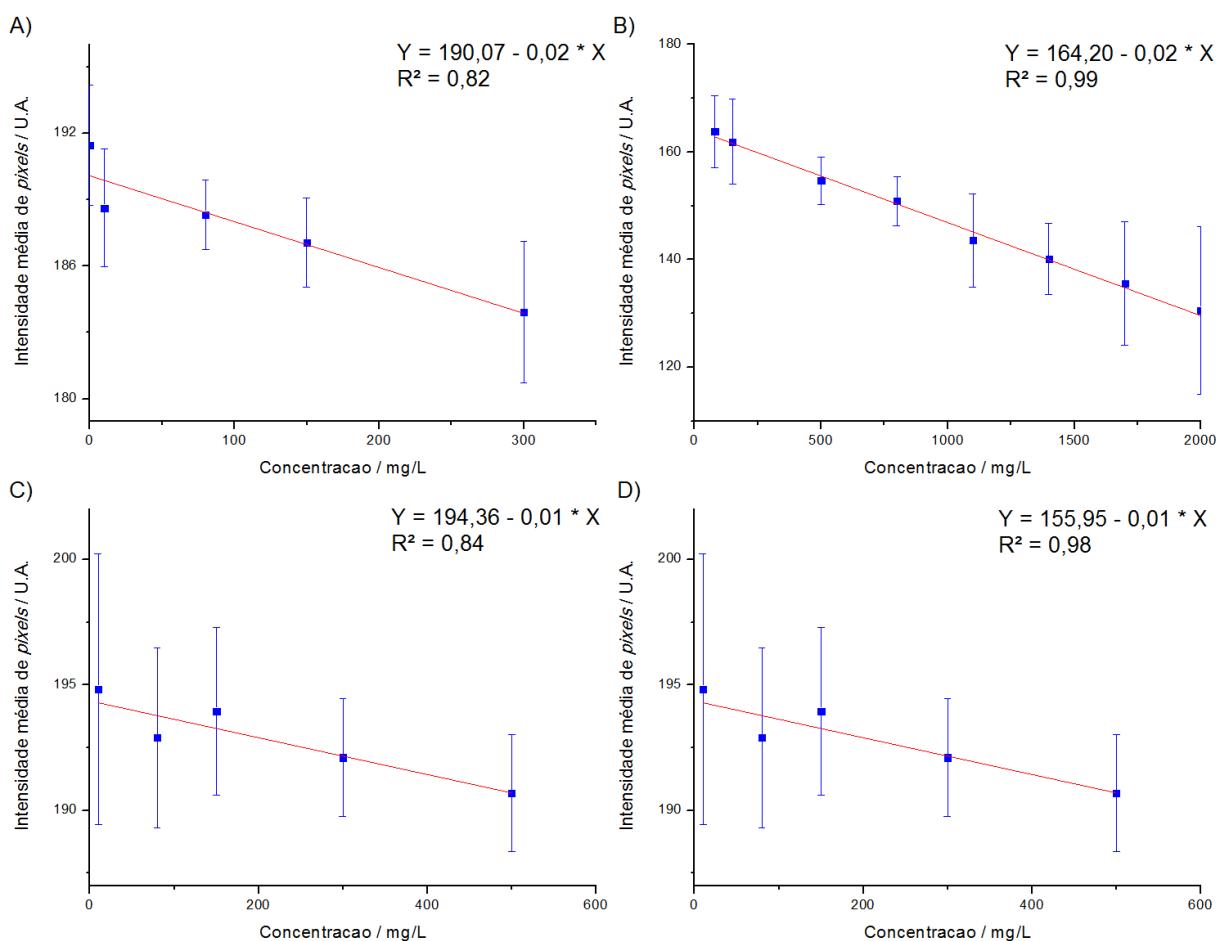
gráficos gerados com imagens adquiridas com *smartphone* apresentam maior faixa linear de trabalho.

As curvas analíticas construídas a partir de imagens dos μ PADs capturadas com *scanner* apresentaram linearidade no canal azul. Quando molhado (Figura 41A), a curva analítica apresentou $R^2 = 0,87$ e $R^2 = 0,98$ no quando seco (Figura 41C), um aumento de 12,52%, assim como uma redução da sensibilidade de 67,8% (Figura 41A e 41C).

As imagens dos μ PADs para construção das curvas analíticas adquiridas com *smartphone* apresentaram linearidade no canal azul. Os μ PADs molhado e seco apresentaram coeficiente de determinação de 0,99 e 0,99 respectivamente, e uma redução de 13,98% na sensibilidade.

Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram uma diminuição da sensibilidade de 83,70% quando molhados (Figura 41A e 41B) e 56,44% quando secos (Figura 41C e 41D). Vale ressaltar que os valores da intensidade média dos *pixels* aumentam nos μ PADs secos.

Figura 42 – Curva analítica referente ao fosfato em citrato neutro de amônio ($n = 3$). A) Curva analítica molhada com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 0 a 300 mg/L no canal azul; B) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 80 a 2000 mg/L no canal azul; C) Curva analítica seca com imagem capturada com *scanner* na faixa de concentração de 10 a 500 mg/L no canal azul; D) Ídem, com imagem capturada com *smartphone* na faixa de concentração de 10 a 1400 mg/L no canal azul.



Fonte: Autoria própria.

As imagens capturadas nos μ PADs molhados (Figura 42A e 42B) apresentaram maior sensibilidade em relação aos μ PADs secos (Figura 42C e 42D). Os μ PADs com imagem capturada com *smartphone* apresentaram maior faixa linear de trabalho, sensibilidade e coeficiente de determinação.

As curvas analíticas construídas a partir de imagens dos μ PADs capturadas com *scanner* apresentaram linearidade no canal azul, compreendendo faixa linear de trabalho distintas. Quando molhado (Figura 42A), o gráfico apresentou coeficiente de

determinação igual a 0,82 e 0,84 quando seco (Figura 42C), uma redução de 2,81%, assim como redução da sensibilidade de 64,61% entre o μ PAD respectivamente (Figura 42A e 42C).

As curvas construídas com imagens capturadas com *smartphone* adotaram canais de cor azul. Os μ PADs apresentou um $R^2 = 0,99$ quando molhado (Figura 42B) e 0,98 seco (Figura 42D). Assim como aconteceu com as imagens capturadas com *scanner*, a sensibilidade da curva diminui de $-0,02 \text{ pixel/mg/L}$ quando molhado, para $-0,01 \text{ pixel/mg/L}$ quando seco, um decréscimo de 23,17%.

Quando comparados os meios de aquisição de imagens, as curvas analíticas construídas com imagens capturadas com *scanner* e *smartphone* apresentaram um aumento da sensibilidade de 20,54% quando molhados (Figura 42A e 42B) e redução de 16,42% quando secos (Figura 42C e 42D). Já o coeficiente de determinação apresentou um aumento de 20,54% quando molhados, contra um aumento de 16,36% quando secos.

Quando comparamos os meios de aquisição de imagens em relação as curvas analíticas construídas em solução de água e citrato neutro de amônio, temos um melhor coeficiente de determinação e sensibilidade quando preparados em água, tanto quando *molhados* ou *secos*.

5.7 Extração

O solo foi obtido de uma construção próximo à USP de São Carlos, localizada entre as ruas Doutor Carlos de Camargo Salles e Jacinto Favoreto (Figura 43), devido a facilidade de coleta.

Figura 43 – Local de coleta de solo. Localização 22°00'22.5"S 47°53'42.0"W.



Após coleta as amostras foram secas e submetidas à peneiração com peneira de nylon para eliminação de material particulado grosso (Figura 44A). A fração peneirada foi denominada SPe (solo peneirado) (Figura 44B).

Figura 44 – Solo coletado. (A) Solo bruto; (B) Solo peneirado.



Fonte: Autoria própria.

Com o solo peneirado, prosseguiu-se com a extração com as soluções extratoras de água, ácido cítrico 2,0% (m/v) e citrato neutro de amônio. Na Tabela 6 estão apresentadas as massas de solo pesados para realização da extração com suas respectivas soluções extratoras.

Tabela 6 – Massa de solo pesado para extração com respectivo volume de solução extratora e tempo de agitação.

Solução extratora	Volume / mL	Massa / g	Tempo de agitação / min
Água	50	20,0157	30
Ácido Cítrico 2% (m/v)	50	20,0136	30
Citrato Neutro de Amônio	50	20,0131	30

Fonte: Autoria própria.

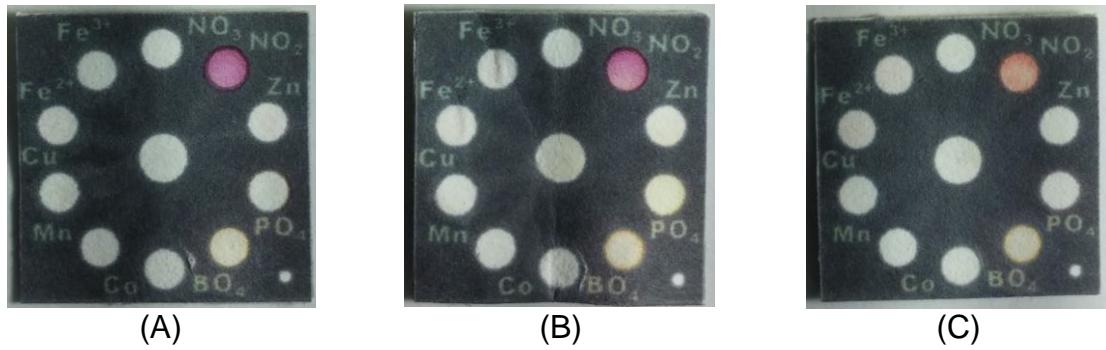
A solução foi agitada durante 30 min com um agitador magnético IKA C-MAG HS7 na velocidade 2. A solução foi filtrada por gravidade com papel Whatman Nº 1 e transferida para balão volumétrico de 50 mL. Seu volume foi posteriormente auferido com água desionizada. O extrato obtido foi encaminhado para análise.

As extrações realizadas foram utilizadas para determinação de fosfato, ferro, cobre, cobalto e boro nos μ PADs. Adicionalmente, ferro, cobre e cobalto foram determinados por espectrometria de absorção atômica em chama. Foi empregado espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer, modelo PINAACLE 900T.

5.8 Quantificação dos analitos em diferentes extratores com μ PADs e FAAS

Com objetivo de verificar a aplicação do μ PAD, foi aplicado 40 μ L da solução extratora na região central dos μ PADs. Após a solução percolar o interior dos μ PADs (Figura 45), não houve alteração de cor nos spots reacionais com todos os analitos e soluções extratoras.

Figura 45 – Soluções extratoras aplicadas em μ PADs. (A) Solução extratora em água; (B) Solução extratora em ácido cítrico 2% (m/v); (C) Solução extratora em citrato neutro de amônio.



Fonte: Autoria própria.

Com objetivo de quantificar os analitos de interesse nos extratos obtidos, os extratos foram submetidos à espectrometria de absorção atômica, sendo determinados ferro, cobalto e cobre. As correspondentes curvas analíticas e sua faixa linear de trabalho estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Curvas analíticas referentes a ferro, cobre e cobalto por absorção atômica.
n = 3.

Analito	Faixa linear / mg/L	Equação	R^2
Ferro	0 – 0,25	$y = -0,00036 + 0,00010 * x$	0,99
Cobre	0 – 0,15	$y = -0,00091 + 0,09136 * x$	0,98
Cobalto	0 – 0,15	$y = -0,00020 + 0,06575 * x$	0,99

Fonte: Autoria própria.

Todas as curvas analíticas apresentaram bons coeficientes de determinação e foram utilizados para quantificação. Levando em consideração a massa de solo (Tabela 6) para extração, obteve-se a Tabela 8 onde está apresentado as concentrações dos analitos no solo.

Tabela 8 – Concentração de ferro, cobre e cobalto na amostra com diferentes soluções extratoras. Os resultados estão expressos em µg / g de solo.

Analito	Água	Ácido Cítrico 2% (m/v)	Citrato Neutro de Amônio
Ferro	0,657 ± 0,004	3,163 ± 0,045	7,555 ± 0,015
Cobre	0,025 ± 0,001	0,120 ± 0,015	0,165 ± 0,003
Cobalto	0,010 ± 0,010	0,007 ± 0,007	0,017 ± 0,017

Fonte: Autoria própria.

Como demonstrado na Tabela 8, houve um aumento na disponibilidade do ferro de forma crescente nas soluções. Citrato é um agente quelante que forma complexos solúveis com cátions, como ferro e cálcio, nos quais o cátion é retido por forças iônicas, e não por ligações covalentes, permanecendo disponíveis.²⁸ Também foi observado o mesmo comportamento para a disponibilidade de cobre.

O aumento da disponibilidade de ferro e cobre na solução de citrato neutro de amônio se deve a maior concentração do íon citrato em solução. A solução de citrato neutro de amônio apresenta 7,4 vezes mais citrato em solução quando comparado com a solução de ácido cítrico 2% (m/v).

As concentrações dos analitos nos extratos de solo apresentaram-se abaixo da faixa linear de trabalho dos μ PADs. Uma alternativa para se realizar uma extração mais eficiente, fazendo com que a concentração dos analitos nas soluções de extração se encaixem na faixa linear de trabalho dos μ PADs, será alterar a razão massa de solo ou volume de solução extratora, afim de torná-la mais concentrada. Porém, no desenvolvimento do trabalho, pesou-se 20 g de solo para 50 mL de solução extratora, a suspensão resultante apresentou dificuldade em extrair a solução das partículas de solo para realizar as análises.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As reações para determinação de nutrientes apresentaram resultados promissores para aplicação em dispositivos microfluídicos. Todos os suportes (papel, poliéster-toner e híbrido) para a construção de dispositivos microfluídicos apresentaram resultados promissores.

O método de fabricação com cera para a construção de μ PADs é simples, de baixo custo, fácil armazenamento e com fácil adaptação para a produção em escala industrial. A grande vantagem do uso deste suporte está na versatilidade de geometrias que podem ser aplicadas a ele e o baixo custo de equipamentos necessários.

A construção de μ PADs para quantificação de nitrito e nitrato apresentou problema na reproduzibilidade, o qual pode ser resolvido com aplicação de um adesivo entre as faces do dispositivo ou uma fita de dupla face. A aplicação de um adesivo deixa as faces do dispositivo em contato integral, melhorando a passagem da solução de um lado do dispositivo para o outro, aumentando a reproduzibilidade. Outra sugestão é a aplicação de uma fita de plástico, com intuito de servir como uma barreira física entre os lados do dispositivo. Esta barreira auxiliaria a solubilização do reagente depositado em um lado do dispositivo do papel. No momento da retirada da fita plástica, toda a solução com analito e reagente passaria para a outra face do dispositivo, reagindo de forma integral e melhorando a reproduzibilidade e homogeneidade do *spot* para detecção.

Os dispositivos microfluídicos à base de poliéster-toner apresentaram maior tempo de preparo e custo pelas etapas de corte, montagem e laminação, e difusão da reação colorimétrica e formação de bolhas no seu interior. A difusão da reação colorimétrica resulta na não uniformidade de cor na zona reacional e dificulta a detecção.

Os resultados obtidos da construção do dispositivo híbrido de poliéster-toner apresentaram-se como uma alternativa, pois resultou em uma homogeneidade da cor no *spot* e reduziu a probabilidade de formação de bolhas. Sua aplicação na zona de amostragem do dispositivo fez com que a velocidade do fluxo nos canais fosse reduzida, mas nada que comprometesse o funcionamento do dispositivo, além de auxiliar na etapa de filtragem e eliminação de material particulado.

As soluções de extração influenciam tanto na montagem da curva analítica, como na extração dos analitos. Assim, a escolha da solução deve ser levada em consideração no desenvolvimento da metodologia, mas o meio de aquisição das imagens (molhado ou seco) e o dispositivo de aquisição (*scanner* ou *smartphone*) devem ser considerados.

Através dos dados de quantificação dos analitos com soluções extratoras de água, ácido cítrico 2% (m/v) e citrato neutro de amônio por espectrometria de absorção atômica, verificou-se que a extração realizada com água não obteve boa extração.

As curvas analíticas referentes a boro e cobalto apresentaram resultados promissores em solução aquosa e ácido cítrico 2% (m/v). Ambas as soluções podem ser aplicadas em μ PADs, mas o tempo para secar o μ PAD e o meio de aquisição das imagens devem ser considerados.

O emprego de solução de ácido cítrico para extração de ferro e cobre do solo apresentou ótimos resultados. O pH ácido não influenciou de forma negativa nos parâmetros da curva e o citrato de favorecer a extração por ser um agente quelante. Assim, ácido cítrico é o agente a ser empregado para quantificação de ferro e cobre.

Para o fosfato, o emprego de soluções de água ou citrato neutro de amônio podem ser empregados sem dificuldades. O emprego da solução de ácido cítrico 2% (m/v) na construção da curva analítica de fosfato não apresentou linearidade. Este comportamento já era esperado, visto que em pH ácido maior, parte do HPO_4^{2-} é convertido em H_3PO_4 .

Apesar da solução de citrato neutro de amônio apresentar maior extração de ferro e cobre, seu emprego na construção da curva analítica não apresentou linearidade quando construídas para boro e cobalto.

Os resultados preliminares demonstram o grande campo que dispositivos com reações colorimétricas simples podem ser aplicados, nas áreas industrial, agrícola, alimentar ou no monitoramento e ambiental.

7. SUGESTÃO DE PRÓXIMAS ETAPAS

Realizar curva analítica dos dispositivos híbridos com objetivo de avaliar a reprodutibilidade e sensibilidade entre os dispositivos fabricados, assim como a melhor metodologia de detecção para aplicação na agricultura.

Outros meios de fabricação de μ PADs utilizando materiais mais baratos para formar as barreiras hidrofóbicas é uma opção a ser avaliada.

Na etapa de detecção, uma sugestão é o desenvolvimento de um *software* com algoritmo de tratamento de imagem para quantificação simultânea para gerar o resultado no local do ensaio.

As reações que necessitam da redução de uma espécie, como nas reações de determinação de ferro e cobre, a substituição do agente redutor hidroxilamina por um açúcar redutor, mais barato e mais estável é atrativo.⁹⁰⁻⁹²

A validação dos dispositivos de papel ou híbridos podem ser conduzida mediante uso de material certificado e comparação de seus resultados com métodos já estabelecidos com técnicas de eletroforese capilar, espectrometria de emissão e absorção atômica ou fotometria de chama.

8. REFERÊNCIAS

1. FELEMA, J., RAIHER, A. P. & FERREIRA, C. R. Agropecuária brasileira: desempenho regional e determinantes de produtividade. *Rev. Econ. e Sociol. Rural* **51**, 555–574 (2013).
2. SILVA, M. A. G. et al. Metodologias e eficiência de extratores para zinco, cobre, ferro e manganês. *Acta Sci. - Agron.* **31**, 537–545 (2009).
3. DUNGAIT, J. A. J. et al. Advances in the understanding of nutrient dynamics and management in UK agriculture. *Sci. Total Environ.* **434**, 39–50 (2012).
4. POWLSON, D. S. et al. Soil management in relation to sustainable agriculture and ecosystem services. *Food Policy* **36**, S72–S87 (2011).
5. CRAIGHEAD, H. Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature* **442**, 387–393 (2006).
6. DAW, R. & FINKELSTEIN, J. Lab on a chip. *Nature* **442**, 367–367 (2006).
7. JANASEK, D., FRANZKE, J. & MANZ, A. Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature* **442**, 374–380 (2006).
8. LISOWSKI, P. & ZARZYCKI, P. K. Microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) and micro total analysis systems (μ TAS): Development, applications and future trends. *Chromatographia* **76**, 1201–1214 (2013).
9. YETISEN, A. K., AKRAM, M. S. & LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab Chip* **13**, 2210–2251 (2013).
10. WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368–73 (2006).
11. YAMADA, K., SHIBATA, H., SUZUKI, K. & CITTERIO, D. Toward practical application of paper-based microfluidics for medical diagnostics: state-of-the-art and challenges. *Lab Chip* 1206–1249 (2017). doi:10.1039/C6LC01577H
12. CATE, D. M., ADKINS, J. A., METTAKOONPITAK, J. & HENRY, C. S. Recent developments in paper-based microfluidic devices. *Anal. Chem.* **87**, 19–41 (2014).
13. CARRILHO, E., PHILLIPS, S. T., VELLA, S. J., MARTINEZ, A. W. & WHITESIDES, G. M. Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. *Anal. Chem.* **81**, 5990–5998 (2009).
14. MARTINEZ, A. W. et al. Simple telemedicine for developing regions: Camera

- phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Anal. Chem.* **80**, 3699–3707 (2008).
15. SECHI, D., GREER, B., JOHNSON, J. & HASHEMI, N. Three-dimensional paper-based microfluidic device for assays of protein and glucose in urine. *Anal. Chem.* **85**, 10733–10737 (2013).
 16. ZHAO, C., THUO, M. M. & LIU, X. Corrigendum: A microfluidic paper-based electrochemical biosensor array for multiplexed detection of metabolic biomarkers. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 1–7 (2015).
 17. POLLOCK, N. R. *et al.* Field Evaluation of a Prototype Paper-Based Point-of-Care Fingerstick Transaminase Test. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
 18. YANG, X. *et al.* Simple paper-based test for measuring blood hemoglobin concentration in resource-limited settings. *Clin. Chem.* **59**, 1506–1513 (2013).
 19. ROHRMAN, B. A. & RICHARDS-KORTUM, R. R. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA. *Lab Chip* **12**, 3082–3088 (2012).
 20. TSAI, T., SHEN, S., CHENG, C. & CHEN, C. Paper-based tuberculosis diagnostic devices with colorimetric gold nanoparticles. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **14**, 44404 (2013).
 21. PESENTI, A. *et al.* Coupling paper-based microfluidics and lab on a chip technologies for confirmatory analysis of trinitro aromatic explosives. *Anal. Chem.* **86**, 4707–4714 (2014).
 22. CHEN, G. H. *et al.* Detection of mercury (II) ions using colorimetric gold nanoparticles on paper-based analytical devices. *Anal. Chem.* **86**, 6843–6849 (2014).
 23. JAYAWARDANE, B. M., SHEN, W., MCKELVIE, I. D. & KOLEV, S. D. Microfluidic paper-based analytical device (μPAD) for the determination of nitrite and nitrate. *Anal. Chem.* **86**, 7274–7279 (2014).
 24. KOESDJOJO, M. T. *et al.* Cost Effective Paper-Based Colorimetric Microfluidic Devices and Mobile Phone Camera Readers for the Classroom. (2015). doi:10.1021/ed500401d
 25. RAVEN, P. H., EVERET, R. F. & EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. (1996).
 26. LUZ, M. J. S., FERREIRA, G. B. & BEZERRA, J. R. C. Adubação e Correção do Solo: Procedimentos a Serem Adotados em Função dos Resultados da Análise

- do Solo. *Embrapa* 1–32 (2002).
27. AZCÓN-BIETO, J. & TALÓN, M. *Fundamentos de fisiología vegetal*. (2008).
 28. TAIZ, L., ZEIGER, E., MOLLER, I. M. & MURPHY, A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. (2017).
 29. SOHAIL, M. & ADELOJU, S. B. Nitrate biosensors and biological methods for nitrate determination. *Talanta* **153**, 83–98 (2016).
 30. HARPER, J. E. *Nitrogen Metabolism, In: Physiology and determination of crop yield*. (1994).
 31. BREDEMEIER, C. & MUNDSTOCK, C. M. Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants. *Ciência Rural* **30**, 365–372 (2000).
 32. ELLIS, P. S., SHABANI, A. M. H., GENTLE, B. S. & MCKELVIE, I. D. Field measurement of nitrate in marine and estuarine waters with a flow analysis system utilizing on-line zinc reduction. *Talanta* **84**, 98–103 (2011).
 33. CAMARGO, J. A., ALONSO, A. & SALAMANCA, A. Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* **58**, 1255–1267 (2005).
 34. SILVA, D. F. et al. *Análise de Nitrato e Amônio em Solo e Água, EMBRAPA, Documento 114*. (2010).
 35. NBR12619. Águas - Determinação de nitrito - Método da sulfanilamida e N-(1-naftil)-etilenodiamina. in *NBR 12169 4* (1992).
 36. RAMOS, L. A., CAVALHEIRO, C. C. S. & CAVALHEIRO, É. T. G. Determination of nitrite in water using a flower extract. *Quim. Nova* **29**, 1114–1120 (2006).
 37. COLMAN, B. P. Understanding and eliminating iron interference in colorimetric nitrate and nitrite analysis. *Environ. Monit. Assess.* **4**, 633–641 (2010).
 38. NBR12620. Águas - Determinação de nitrato - Métodos do ácido cromotrópico e do ácido fenoldissulfônico. in *NBR 12620 5* (1992).
 39. BITTENCOURT, V. C., CATANI, R. A. & CANGIANI, A. M. Determinação do nitrato em solos pelo método do ácido cromotrópico. (1968).
 40. JOBGEN, W. S., JOBGEN, S. C., LI, H., MEININGER, C. J. & WU, G. Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **851**, 71–82 (2007).
 41. BETTA, F. D., VITALI, L., FETT, R. & COSTA, A. C. O. Development and validation of a sub-minute capillary zone electrophoresis method for

- determination of nitrate and nitrite in baby foods. *Talanta* **122**, 23–29 (2014).
42. MERUSI, C., CORRADINI, C., CAVAZZA, A., BORROMEI, C. & SALVADEO, P. Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal. *Food Chem.* **120**, 615–620 (2010).
43. TÚMA, P. The use of polarity switching for the sensitive determination of nitrate in human cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J. Chromatogr. A* **1447**, 148–154 (2016).
44. PATTON, C. J. & KRYSKALLA, J. R. Colorimetric determination of nitrate plus nitrite in water by enzymatic reduction, automated discrete analyzer methods. *U.S. Geol. Surv. Tech. Methods* 34 (2011).
45. ISHIBASHI, T. *et al.* Negative NO₃- difference in human coronary circulation with severe atherosclerotic stenosis. *Life Sci.* **66**, 173–184 (2000).
46. NAVARRO-GONZÁLVEZ, J. A., GARCÍA-BENAYAS, C. & ARENAS, J. Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological. *Clin. Chem.* **22**, 679–681 (1998).
47. GAL, C., FRENZEL, W. & MOLLER, J. Re-examination of the cadmium reduction method and optimisation of conditions for the determination of nitrate by flow injection analysis. *Microchim. Acta* **146**, 155–164 (2004).
48. MIRANDA, K. M., ESPEY, M. G. & WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **5**, 62–71 (2001).
49. GRANT, C. A., FLATEN, D. N., TOMASIEWICZ, D. J. & SHEPPARD, S. C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *INPI — Inst. Nac. da Propri. Ind.* 1–5 (2001).
50. SANTOS, H. Q., FONSECA, D. M., CANTARUTTI, R. B., ALVAREZ, V. H. & JÚNIOR, D. N. Níveis críticos de fósforo no solo e na planta para gramíneas forrageiras tropicais, em diferentes idades. *Rev. Bras. Ciência do Solo* **26**, 173–182 (2002).
51. JAYAWARDANE, B. M., MCKELVIE, I. D. & KOLEV, S. D. A paper-based device for measurement of reactive phosphate in water. *Talanta* **100**, 454–460 (2012).
52. SANTOS, L. S., SILVA, L. S. & GRIEBELER, G. Ascorbic acid as a reducing agent for phosphorus analysis by colorimetry. *Ciência Rural* **44**, 1015–1018

- (2014).
- 53. MASINI, J. C. Demonstrando os fundamentos, potencialidades e limitações da análise por injeção sequencial. *Quim. Nova* **31**, 704–708 (2008).
 - 54. MAPA, M. da A. P. e A. *Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos*. (2014).
 - 55. ARMSTRONG, D. L. Functions of potassium in plants. *Better Crop. With Plant Food* **82**, 4–5 (1998).
 - 56. VOGEL, A. I. *Vogel's Textbook of macro and semimicro qualitative inorganic analysis*. (1979).
 - 57. SVEHLA, G. *Vogel's Qualitative Inorganic Analysis*. (1996).
 - 58. BROADLEY, M. R., WHITE, P. J., HAMMOND, J. P., ZELKO, I. & LUX, A. Zinc in plants. *New Phytol.* **173**, 677–702 (2007).
 - 59. MARTINEZ, H. E. P., POLTRONIERI, Y., FARAH, A. & PERRONE, D. Zinc supplementation, production and quality of coffee beans. *Rev. Ceres* **60**, 293–299 (2013).
 - 60. HIBBARD, P. L. A Dithizone Method for Measurement of Small Amounts of Zinc. 127–131 (1937).
 - 61. CAKMAK, I. & ROMHELD, V. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil* **193**, 71–83 (1997).
 - 62. BROWN, P. H. & HU, H. Phloem Mobility of Boron is Species Dependent : Evidence for Phloem Mobility in Sorbitol-rich Species. *Ann. Bot.* **77**, 497–506 (1996).
 - 63. LEITE, S. M. M., VALLE, C. F., BONINE, C. A. V. & MARINO, C. L. BORON INFLUENCE ON CONCENTRATION OF POLYOLS AND OTHER SUGARS IN Eucalyptus. *Rev. Árvore* **32**, 815–820 (2008).
 - 64. LUKASZEWSKI, K. M. & BLEVINS, D. G. Root Growth Inhibition in Boron-Deficient or Aluminum-Stressed Squash May Be a Result of Impaired Ascorbate Metabolism. *Plant Physiol.* **112**, 1135–1140 (1996).
 - 65. Chaves, F. S., Nogueira, A. R. de A., Souza, G. B. de & Primavesi, A. C. Avaliação de procedimento de extração e determinação de boro em amostras de solo. *Embrapa Pecuária Sudeste. Bol. Pesqui. e Desenvolvimento*, 5 41 (2006).
 - 66. Ferreira, G. B., Fontes, R. L. F., Venegas, V. H. A., Fontes, M. P. F. & Pereira,

- J. M. N. Interferência de ferro na dosagem de boro no solo com azometina-H em soluções extratoras ácidas. *Pesqui. agropecuária Bras.* **37**, 1311–1318 (2002).
67. SUETH-SANTIAGO, V., MENDES-SILVA, G. P., DECOTÉ-RICARDO, D. & LIMA, M. E. F. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. *Quim. Nova* **38**, 538–552 (2015).
68. Miwa, A. C. P., Falco, P. B. de & Calijuri, M. do C. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. *Eng. sanitária Ambient.* **13**, 236–242 (2008).
69. MENTELE, M. M., CUNNINGHAM, J., KOEHLER, K., VOLCKENS, J. & HENRY, C. S. Microfluidic paper-based analytical device for particulate metals. *Anal. Chem.* **84**, 4474–4480 (2012).
70. SABESP, N. T. N. 010. Norma Técnica NTS 010 SABESP. (2001).
71. BORTOLON, L., GIANELLO, C., WELTER, S., ALMEIDA, R. G. O. & GIASSON, E. Simultaneous extraction of phosphorus, potassium, calcium and magnesium from soils and potassium recommendations for crops in southern Brazil. *Pedosphere* **21**, 365–372 (2011).
72. ALCARDE, J. C. & PAULINO, V. T. Avaliação do fósforo em fertilizantes através da solução de ácido cítrico a 2%: técnicas de extração. *An. da Esc. Super. Agric. Luiz Queiroz* **33**, 763–773 (1976).
73. MIELKI, G. F., NOVAIS, R. F., KER, J. C., VERGUTZ, L. & CASTRO, G. F. Iron availability in tropical soils and iron uptake by plants. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* **40**, 1–14 (2016).
74. COLTRO, W. K. T., JESUS, D. P., SILVA, J. A. F., LAGO, C. L. & CARRILHO, E. Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. *Electrophoresis* **31**, 2487–2498 (2010).
75. OUYANG, Y. *et al.* Rapid patterning of ‘tunable’hydrophobic valves on disposable microchips by laser printer lithography. *Lab Chip* **13**, 1762–71 (2013).
76. DUARTE, G. R. M. *et al.* Disposable polyester-toner electrophoresis microchips for DNA analysis. *Analyst* **137**, 2692–2698 (2012).
77. MARTINEZ, A. W., PHILLIPS, S. T., BUTTE, M. J. & WHITESIDES, G. M. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 1318–1320 (2007).

78. CATE, D. M., ADKINS, J. A., METTAKOONPITAK, J. & HENRY, C. S. Recent developments in paper-based microfluidic devices. *Anal. Chem.* **87**, 19–41 (2015).
79. EVANS, E., GABRIEL, E. F. M., COLTRO, W. K. T. & GARCIA, C. D. Rational Selection of Substrates to Improve Color Intensity and Uniformity on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analyst* **33**, 395–401 (2015).
80. TAN, A., RODGERS, K., MURRIHY, J. P., O'MATHUNA, C. & GLENNON, J. D. Rapid fabrication of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) by photocopying. *Lab Chip* **1**, 7–9 (2001).
81. LAGO, C. L., SILVA, H. D. T., NEVES, C. A., BRITO-NETO, J. G. A. & SILVA, J. A. F. A Dry Process for Production of Microfluidic Devices Based on the Lamination of Laser-Printed Polyester Films. *Anal. Chem.* **75**, 3853–3858 (2003).
82. CARRILHO, E., PHILLIPS, S. T., VELLA, S. J., MARTINEZ, A. W. & WHITESIDES, G. M. Paper microzone plates. *Anal. Chem.* **81**, 5990–5998 (2009).
83. GABRIEL, E. F. M., LAGO, C. L., GOBBI, A. L., CARRILHO, E. & COLTRO, W. K. T. Characterization of microchip electrophoresis devices fabricated by direct-printing process with colored toner. *Electrophoresis* **34**, 2169–2176 (2013).
84. MORBIOLI, G. G., MAZZU-NASCIMENTO, T., STOCKTON, A. M. & CARRILHO, E. Technical aspects and challenges of Colorimetric Detection with Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PADs) - A review. *Anal. Chim. Acta* Submitted (2017). doi:10.1016/j.aca.2017.03.037
85. MARTINEZ, A. W., PHILLIPS, S. T., WHITESIDES, G. M. & CARRILHO, E. Diagnostics for the developing world: Microfluidic paper-based analytical devices. *Anal. Chem.* **82**, 3–10 (2010).
86. CARRILHO, E., MARTINEZ, A. W. & WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Anal. Chem.* **81**, 7091–7095 (2009).
87. KRAUSS, S. T., HOLT, V. C. & LANDERS, J. P. Simple Reagent Storage in Polyester-Paper Hybrid Microdevices for Colorimetric Detection. *Sensors Actuators B Chem.* **246**, 740–747 (2017).
88. Ugcione, C., Neto, J. de A. G. & Cardoso, A. A. Método colorimétrico para

- determinação de dióxido de nitrogênio atmosférico com preconcentração em coluna de C-18. *Quim. Nova* **25**, 353–357 (2002).
- 89. Filho, J. P., Flávio, J. & Alves, A. Development of a simple method for determination of NO₂ in air using digital scanner images. *Talanta* **140**, 73–80 (2015).
 - 90. NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger - Princípios de Bioquímica*. (São Paulo: Sarvier, 2002).
 - 91. BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. *Bioquímica*. (Guanabara Koogan, 2014).
 - 92. HARVEY, R. A. & FERRIER, D. R. *Bioquímica Ilustrada*. (2012).