

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Comparação de métodos de detecção de reações
colorimétricas em papel: Aplicação na determinação de
nitrito**

Uberlândia
2025

MARIA EDUARDA DOS SANTOS ANTONIO

**Comparação de métodos de detecção de reações
colorimétricas em papel: Aplicação na determinação de
nitrito**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de bacharel em

Área de concentração: Química Industrial

Orientador: João Flávio da Silveira Petrucci

Uberlândia

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Curso de Graduação em Química Industrial
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1A, Sala 1A233 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-
MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3239-4103 - coqin@iqufu.ufu.br



ATA DE DEFESA - GRADUAÇÃO

| | | | | | |
|--|---|-----------------|-------|-----------------------|-------|
| Curso de Graduação em: | Química Industrial | | | | |
| Defesa de: | Trabalho de Conclusão de Curso - GQB056 | | | | |
| Data: | 24/09/2025 | Hora de início: | 14:00 | Hora de encerramento: | 15h30 |
| Matrícula do Discente: | 12011QID016 | | | | |
| Nome do Discente: | Maria Eduarda dos Santos Antonio | | | | |
| Título do Trabalho: | Comparação de métodos de detecção de reações colorimétricas em papel: Aplicação na determinação de nitrito | | | | |
| A carga horária curricular foi cumprida integralmente? | <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não | | | | |

Reuniu-se virtualmente na sala virtual <https://conferenciaweb.rnp.br/sala/joao-flavio-da-silveira-petruci>, a Banca Examinadora, designada pelo Coordenador do Curso de Graduação em Química Industrial, assim composta: Prof. Dr. João Flávio da Silveira Petrucci - **Orientador**; Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva - Titular; Doutoranda Josiele Aparecida Magalhães Conrado - Titular e Prof. Dr. Edson Nossol - Suplente.

Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa, Dr. João Flávio da Silveira Petrucci, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao(à) discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do curso.

A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a) Nota: 90 pontos
 Reprovado(a)

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Josiele Aparecida Magalhães Conrado, Usuário Externo**, em 30/09/2025, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Flávio da Silveira Petrucci, Professor(a) do Magistério Superior**, em 07/10/2025, às 12:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sidnei Gonçalves da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/10/2025, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6692407** e o código CRC **D3D653AD**.

Referência: Processo nº 23117.065438/2025-98

SEI nº 6692407

MARIA EDUARDA DOS SANTOS ANTONIO

Comparação de métodos de detecção de reações colorimétricas em papel: Aplicação na
determinação de nitrito

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de bacharel em

Área de concentração: Química Industrial

Uberlândia, 24 de Setembro de 2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Flávio da Silveira Petrucci (Orientador – UFU)

Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva (Examinador – UFU)

Doutoranda - Josiele Aparecida Magalhães Conrado (Examinadora – UFU)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, pelo amor incondicional, apoio e incentivo em cada etapa da minha vida acadêmica. Vocês sempre acreditaram em mim e me deram forças para seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores.

À minha família, que esteve ao meu lado com palavras de carinho, compreensão e motivação, contribuindo de forma essencial para que eu pudesse chegar até aqui.

À Maria Eduarda Telles e meus amigos que tornaram esta caminhada mais leve, oferecendo companheirismo, risadas e apoio nos momentos de dificuldade. A presença de vocês foi fundamental para que esta trajetória se tornasse mais significativa e especial.

Ao meu orientador, Profº. Drº. João Flávio da Silveira Petrucci, pela orientação, paciência, dedicação depositada em mim ao longo deste trabalho. Ao colega Caio César Souza Machado, aluno de doutorado, pela disponibilidade, pelas contribuições valiosas e pela generosidade em compartilhar conhecimento, o que foi essencial para a realização deste trabalho.

A todos, minha sincera e eterna gratidão.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo comparar diferentes sistemas de detecção de reações colorimétricas em dispositivos microfluídicos em papel (μ PADs), utilizando a reação de Griess para determinação de nitrito em soluções aquosas. Foram avaliados métodos baseados em captura e tratamento de imagem por scanner e smartphone, além de uma plataforma dedicada (SmartPad) que utiliza um sensor digital de luz multicanal (AS7341). As curvas analíticas obtidas apresentaram altos coeficientes de correlação ($R^2 > 0,99$), evidenciando a robustez das metodologias. Entre os resultados, observou-se que o canal verde (G) foi o mais sensível pelo método que utiliza análise de imagens digitais, corroborando estudos anteriores que este canal como sendo a cor complementar do produto formado (rosa). A comparação dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) revelou que as medidas realizadas no scanner foram mais adequadas para baixas concentrações de nitrito, enquanto o SmartPad demonstrou desempenho consistente, ainda que com LOD mais elevado. Os resultados indicam que estes dispositivos simples, possibilitam análises in loco confiáveis, ampliando as perspectivas do uso de μ PADs para a detecção de nitrito.

Palavras-chave: Microfluídica em papel; reação de Griess; nitrito; detecção colorimétrica; análise digital de imagens.

ABSTRACT

This study aimed to compare different systems for detecting colorimetric reactions in paper-based microfluidic devices (μ PADs), using the Griess reaction for the determination of nitrite in aqueous solutions. Image capture and processing methods using a scanner and a smartphone were evaluated, along with a dedicated platform (SmartPad) that employs a multichannel digital light sensor (AS7341). The analytical curves obtained showed high correlation coefficients ($R^2 > 0.99$), demonstrating the robustness of the methodologies. Among the results, it was observed that the green channel (G) was the most sensitive in the method based on digital image analysis, corroborating previous studies that identified this channel as complementary to the color of the reaction product (pink). A comparison of the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) revealed that measurements performed using the scanner were more suitable for low concentrations of nitrite, while the SmartPad showed consistent performance, albeit with a higher LOD. The results indicate that these simple devices enable reliable on-site analyses, expanding the prospects for the use of μ PADs in nitrite detection.

Keywords: paper-based microfluidics; Griess reaction; nitrite; colorimetric detection; digital image analysis.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1: | Esquema da reação de Griess | 16 |
| Figura 2: | Representação dos processos de utilização dos μ PADs..... | 16 |
| Figura 3: | Obtenção dos dados por meio do scanner..... | 19 |
| Figura 4: | Esquema de obtenção de imagem com o celular | 19 |
| Figura 5: | SmartPad..... | 20 |
| Figura 6: | Da esquerda para direita as aplicações de A a G..... | 21 |
| Figura 7: | Da esquerda para direita as aplicações de A' a G' | 22 |
| Figura 8: | Primeira fileira com intervalo entre as aplicações. Segunda fileira sem intervalos..... | 22 |
| Figura 9: | Testes de volume..... | 22 |
| Figura 10: | Aplicação de 3 μ L no μ PADc..... | 23 |
| Figura 11: | Aplicação respectivamente com 0 mg/L, 1mg/L, 10mg/L, 100 mg/L e 1000mg/L..... | 23 |
| Gráfico 1: | Concentração (de 0 a 1000 mg/L) por intensidade..... | 23 |
| Gráfico 2: | Concentração (de 0 a 100 mg/L) por intensidade..... | 24 |
| Gráfico 3: | Análise do μ PAD _Q no SmartPad..... | 25 |
| Gráfico 4: | Análise do μ PAD _C no scanner..... | 25 |
| Gráfico 5: | Análise do μ PAD _Q no scanner..... | 26 |
| Gráfico 6: | Análise do μ PAD _C no celular..... | 26 |
| Gráfico 7: | Análise do μ PAD _Q no celular..... | 27 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1: | Testes de aplicação de nitrito e Griess..... | 21 |
| Tabela 2: | Testes de aplicação de Griess e nitrito | 21 |
| Tabela 3: | Resultados das análises dos métodos detecção no canal verde (G)..... | 27 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 | DESENVOLVIMENTO..... | 12 |
| 2.1 | Importância das análises químicas para aplicações remotas | 12 |
| 2.2 | Detecção colorimétrica utilizando tratamento de imagens digitais | 13 |
| 2.3 | Microfluídica em papel..... | 14 |
| 2.4 | Nitrito e sua detecção em μPADs | 15 |
| 3 | OBJETIVO..... | 17 |
| 3.1 | Objetivo Geral..... | 17 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 17 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 4.1 | Reagentes e soluções | 18 |
| 4.2 | Fabricação dos μPAD's | 18 |
| 4.3 | Equipamentos para obtenção de imagens | 18 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 21 |
| 5.1 | Otimização dos μPAD's..... | 21 |
| 5.2 | Resultados analíticos | 24 |
| 5.2.1 | <i>Figuras de Mérito</i> | 24 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 29 |
| | REFERÊNCIAS..... | 30 |

1 INTRODUÇÃO

O interesse por soluções acessíveis, portáteis e de baixo custo para análises químicas tem crescido de forma significativa nos últimos anos, especialmente em áreas críticas como saúde, segurança alimentar e monitoramento ambiental. Nesse cenário, a tecnologia lab-on-a-chip se apresenta como uma alternativa promissora, pois permite integrar etapas como pré-tratamento de amostras, reações químicas, detecção de sinais e processamento em um único dispositivo (LOPEZ-RUIZ et al., 2014). Uma das manifestações mais difundidas dessa tecnologia são os dispositivos microfluídicos de papel (μ PADs), que utilizam o papel como plataforma para condução de líquidos por ação capilar, dispensando equipamentos complexos e permitindo análises rápidas e de baixo custo (YETISEN; AKRAM; LOWE, 2013; GONG & SINTON, 2017).

Entre os diversos analitos que podem ser detectados por μ PADs, o nitrito (NO_2^-) merece destaque devido à sua presença em alimentos processados, águas e fluidos biológicos, e pelos riscos à saúde associados à sua concentração elevada. A detecção colorimétrica do nitrito é comumente realizada por meio da reação de Griess, que gera uma coloração rosa característica proporcional à concentração do analito. Esta mudança de cor constitui a base da análise, podendo ser avaliada visualmente ou quantificada por métodos digitais utilizando câmeras, smartphones ou scanners (WANG et al., 2017; LI et al., 2018; LOPEZ-RUIZ et al., 2014).

Nos últimos anos, a quantificação digital da cor, por meio de reações colorimétricas, tem se consolidado como uma estratégia eficiente para μ PADs, permitindo a construção de curvas de calibração sensíveis e facilitando a detecção de baixas concentrações de analitos. Essa abordagem combina simplicidade operacional com alta sensibilidade, ampliando as possibilidades de aplicação em campo e em situações que exigem resultados rápidos e confiáveis (FERREIRA et al., 2020; LI et al., 2018; ZHANG et al., 2014). Além disso, o uso de ferramentas de tratamento de imagens, como softwares de análise de cor, permite relacionar de maneira direta a intensidade da cor à concentração do analito, otimizando a interpretação dos resultados e minimizando erros subjetivos (LOPEZ-RUIZ et al., 2014; WU et al., 2017).

Portanto, o desenvolvimento e a comparação de métodos de detecção colorimétrica em μ PADs, especialmente para nitrito, representam uma área de grande relevância científica e prática, promovendo a criação de dispositivos acessíveis, portáteis e capazes de fornecer resultados precisos em contextos remotos ou com recursos limitados.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Importância das análises químicas para aplicações remotas

A análise química é um componente fundamental da Química Analítica, sendo definida como o conjunto de procedimentos destinados à identificação, caracterização e quantificação da composição da matéria (HARRIS, 2017). Tradicionalmente, essas análises eram conduzidas por meio de técnicas clássicas, como gravimetria e volumetria, que, embora simples e acessíveis, apresentam limitações quanto à sensibilidade e ao tempo de execução, sendo utilizadas principalmente em controle de qualidade farmacêutico e análises de águas (VOGEL, 2002; MENDHAM et al., 2013). Com o avanço da instrumentação científica, surgiram métodos modernos que permitem maior rapidez, seletividade e limites de detecção mais baixos, consolidando-se como ferramentas indispensáveis tanto para a pesquisa quanto para a indústria (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

As técnicas instrumentais podem ser classificadas de acordo com o princípio físico-químico empregado. As técnicas eletroanalíticas, por exemplo, baseiam-se na medição de propriedades elétricas de sistemas químicos, como potencial, corrente ou condutividade, e são amplamente aplicadas em análises de pH e no monitoramento de metais pesados em amostras ambientais. Uma característica relevante dessas técnicas é a possibilidade de miniaturização, permitindo aplicações *in situ* (HARRIS, 2017). A espectrofotometria, por outro lado, explora a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo a espectrofotometria UV-Vis particularmente utilizada para a análise de compostos orgânicos e inorgânicos em águas, com destaque para programas de monitoramento de poluição hídrica, devido à alta sensibilidade e rapidez (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2014). Técnicas de separação, como cromatografia líquida e gasosa ou eletroforese, são essenciais quando a matriz é complexa e a presença de interferentes inviabiliza análises diretas. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é frequentemente utilizada para quantificação de fármacos e metabólitos, enquanto a cromatografia gasosa se aplica à análise de poluentes voláteis, oferecendo elevada seletividade e compatibilidade com detectores sensíveis, como espectrometria de massas (WILLARD et al., 1988).

Existem diversos cenários em que a obtenção de resultados diretamente no local é indispensável, incluindo monitoramento ambiental em tempo real para detecção de contaminantes em corpos hídricos após acidentes industriais, controle agrícola por meio de análises rápidas de nutrientes em solos, segurança alimentar para identificar adulterantes ou

contaminantes em produtos perecíveis, e diagnósticos clínicos rápidos utilizando biossensores portáteis. Embora muitas técnicas instrumentais tenham sido desenvolvidas originalmente para laboratórios, o avanço tecnológico permitiu a criação de equipamentos portáteis, como espectrofotômetros de campo, sensores eletroquímicos miniaturizados e sistemas cromatográficos compactos, garantindo a aplicação confiável de métodos analíticos em contextos remotos e emergenciais (TRINH et al., 2024)

2.2 Detecção colorimétrica utilizando tratamento de imagens digitais

A detecção colorimétrica utilizando tratamento de imagens digitais tem se consolidado como uma ferramenta promissora para análises químicas rápidas, acessíveis e de baixo custo. A lógica desse tipo de abordagem é simples, mas extremamente eficaz: a reação química gera uma variação de cor em um dispositivo, geralmente um substrato sólido, como papel, e essa informação é posteriormente capturada por câmeras digitais, smartphones ou scanners. Uma vez digitalizada, a imagem pode ser processada por softwares de análise como ImageJ, Adobe Photoshop, Adobe Illustrator, MATLAB ou Python, permitindo que os valores numéricos de cor sejam extraídos a partir de modelos como RGB (Red, Green, Blue), CMYK (Ciano, Magenta, Amarelo e Preto) ou HSV (Matiz, Saturação e Valor). A partir desses dados, torna-se possível estabelecer uma relação entre a intensidade da cor registrada e a concentração do analito de interesse, possibilitando a construção de curvas de calibração confiáveis e reproduutíveis. A vantagem desse método reside na possibilidade de se utilizar dispositivos portáteis e amplamente disponíveis, como os próprios smartphones, dispensando a necessidade de equipamentos laboratoriais caros ou sofisticados.

Diversos trabalhos têm explorado essa estratégia em contextos analíticos variados. Por exemplo, APILUX et al. (2010) demonstraram a aplicação de um dispositivo em papel com detecção dual, combinando leitura colorimétrica e eletroquímica para determinação simultânea de ouro e ferro, reforçando a robustez do método quando integrado a diferentes modalidades de leitura. De modo semelhante, ZHANG et al. (2014) desenvolveram um dispositivo baseado em papel funcionalizado para detecção colorimétrica de íons cobre, utilizando a análise digital de imagens para quantificação precisa. Em outra abordagem, WU et al. (2017) aplicaram dispositivos microfluídicos de papel para a detecção de ácido ascórbico, integrando diretamente a captura de imagens por smartphones como etapa analítica central, o que ilustra a versatilidade desse tipo de sensor em diferentes contextos químicos e biológicos. Esses exemplos evidenciam que a detecção colorimétrica associada ao processamento digital de imagens não está restrita a

um único tipo de analito, mas pode ser expandida a uma variedade de espécies químicas, ambientais e biológicas.

Além disso, a eficiência dessa estratégia está relacionada ao tipo de sensor presente nos dispositivos digitais. Em smartphones, predominam sensores de imagem do tipo CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor), que oferecem alta sensibilidade e baixo consumo de energia, embora sensores CCD (Charge-Coupled Device) ainda sejam empregados em câmeras e scanners, sobretudo quando se busca maior fidelidade na captura da cor. Esses sensores funcionam pela detecção da intensidade da luz incidente em diferentes comprimentos de onda, o que é posteriormente decomposto nos canais de cor definidos pelo modelo RGB. (CAPITÁN-VALLVEY et al., 2015). Em consequência, o processo de análise depende tanto da precisão óptica do sensor quanto do algoritmo de processamento da imagem utilizado, o que justifica a integração com softwares específicos e métodos de calibração adequados.

2.3 Microfluídica em papel

O conceito por trás da fabricação de dispositivos feitos de papel ou outros materiais porosos, por meio do controle de quantidades muito pequenas de fluidos (na ordem de 10^{-6} a 10^{-9} L) que os percorrem, é conhecido como microfluídica em papel. (KUMARI et al., 2023). Desde 2007, com o trabalho de Whitesides, os dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (μ PADs) têm se destacado como uma tecnologia inovadora em vários campos como diagnósticos, segurança alimentar, monitoramento ambiental e toxicologia clínica. Esses μ PADs utilizam a porosidade e a ação capilar do papel para transportar líquidos sem a necessidade de bombas externas ou fontes de energia. Esse recurso, aliado ao baixo custo, à menor necessidade de infraestrutura laboratorial, à biocompatibilidade, à facilidade de uso e de modificação do papel, e à escalabilidade, torna os μ PADs altamente atrativos para a detecção rápida e confiável de analitos (GONG et al., 2017; FU, 2025). Além de atender aos critérios ASSURED (Acessível, Sensível, Específico, de Uso Simples, Rápido e robusto, Livre de Equipamentos e Entregável ao usuário final), conforme estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS). (KUMARI et al., 2023)

Ao longo dos últimos anos as técnicas de fabricação e os mecanismos de detecção têm sido alvo dos pesquisadores, visando aumentar a precisão, sensibilidade, reprodutibilidade, aplicabilidade, durabilidade e a capacidade de multiplexação dos μ PADs. Esses dispositivos podem ser fabricados com qualquer membrana porosa, desde que a espessura, a taxa de absorção, a distribuição dos poros e o preço sejam adequados. Dentre as técnicas de fabricação

a fotolitografia foi o primeiro método de padronização. A impressão com cera tem sido amplamente utilizada visto seu baixo custo, simplicidade de fabricação, rapidez e ausência de consumo de solventes orgânicos. Nesse método barreiras hidrofóbicas e canais hidrofílicos são formados por meio da impressão de padrões de cera na superfície do papel e posterior fusão da cera através do papel. Além disso, há tratamento por plasma, impressão por jato e de tinta, impressão por caneta de cera, corte a laser. (OZER; McMAHON; HENRY, 2020). Também foram propostos diversos substratos poliméricos e híbridos à base de papel para melhorar a resistência mecânica e a resistência química dos dispositivos lab-on-a-chip (LoC). (FU, 2025)

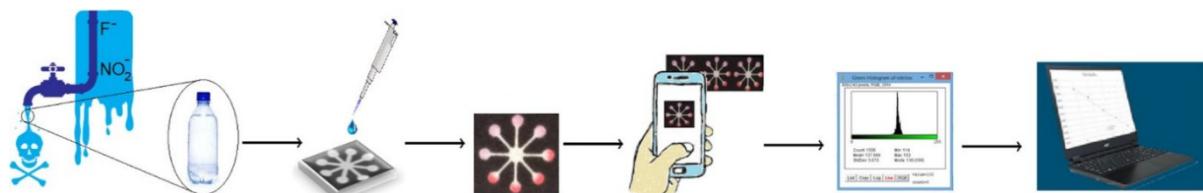
2.4 Nitrito e sua detecção em μ PADs

O nitrito está amplamente presente no cotidiano e pode ter origem natural ou antropogênica. Na indústria alimentícia, é utilizado como aditivo, inibindo a propagação de microrganismos como o *Clostridium botulinum*, além de auxiliar na fixação da cor. No meio ambiente faz parte do ciclo do Nitrogênio, e podem ser encontrados em plantas, no entanto o uso desenfreado de fertilizantes inorgânicos têm resultado numa quantidade excessiva desse íon, contaminando as plantas, solo e consequentemente a água. A ingestão excessiva de NO_2^- , pode causar sérios danos à saúde, como interferência no transporte de oxigênio do corpo a partir da transformação da hemoglobina em metahemoglobina, câncer, aborto espontâneo e defeito congênitos no sistema nervoso central. (WANG *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018)

Há muitos métodos e propostas para detecção de NO_2^- , como a espectrofotométrica, quimiluminescência, cromatografia, técnicas eletroquímicas, fluorométrica. Porém, grande parte dos procedimentos supracitados apresenta várias desvantagens, incluindo alto custo, procedimentos de preparação de amostras complicados e demorados, e nesse contexto métodos de detecção no local estão se tornando cada vez mais populares devido à simplicidade operacional, resultados instantâneos. Desse modo, o clássico ensaio de Griess, sendo simples, de baixo custo e rapidamente visível devido a reação colorimétrica, continua sendo a principal escolha para análises in loco. A reação envolve a diazotização da sulfanilamida com o nitrito presente na amostra, seguida pelo acoplamento com a N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), resultando na formação de um complexo azo com coloração rosa intensa. (LOPEZ-RUIZ *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2018; CADEADO; 2024)

Figura 1: Esquema da reação de Griess**Fonte:** CADEADO, 2024

No contexto dos μ PADs aplicados à detecção de nitrito, diversos trabalhos têm demonstrado sua aplicabilidade em diferentes matrizes, como água, alimentos e fluidos biológicos, inclusive saliva. Autores como Jayawardane (2014), Lopez-Ruiz (2014), Vidal (2018), Teepo (2019), Ferreira (2020) e Charbaji (2021) destacam a eficiência da abordagem, permitindo inclusive análises quantitativas por meio de processamento digital de imagens obtidas dos dispositivos

Figura 2: Representação dos processos de utilização dos μ PADs.**Fonte:** VIDAL et al., 2018

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Comparar a performance analítica de diferentes tipos de detectores de luz para quantificação do íon nitrito pelo método colorimétrico de Griess – Saltzann utilizando dispositivos microfluídicos em papel.

3.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições da reação colorimétrica em dispositivos dois microfluídicos em papel;
- Obter parâmetros analíticos tais como precisão, linearidade e limite de quantificação e detecção;
- Avaliar os resultados obtidos pelo scanner, celular e SmartPad.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

O reagente de Griess-Saltzman foi preparado da seguinte maneira: 50 mL de água destilada foi adicionada em um balão volumétrico de 100 mL, seguido da adição de 10 mL de ácido fosfórico 85% (Vetec, Brasil). Posteriormente, dissolveu-se 0,995g de sulfanilamida nessa solução. Em seguida, adicionou-se 0,103 g de dicloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (pureza >98%, Sigma – Aldrich, Alemanha), o volume foi completado com água deionizada e a solução homogeneizada (BAIRD; EATON; RICE, 1990b). Já a solução estoque contendo 1000 mg. L⁻¹ de nitrito foi preparada dissolvendo 0,149 g de nitrito de sódio (NaNO₂, Exodo Científica, Brasil) em 100 mL de água destilada, em um balão volumétrico de 100 mL. Posteriormente, foram preparadas soluções de referência de nitrito na faixa de 1,0 mg. L⁻¹ a 1000 mg. L⁻¹, por diluições sucessivas da solução estoque.

4.2 Fabricação dos μPAD's

Para esse trabalho foram preparados dois tipos de μPAD's: um circular, com barreiras de cera hidrofóbicas, denominado μPAD_C e um quadrado, sem barreiras, μPAD_Q. O μPAD_C foi desenhado no software gráfico InkscapeTM e fabricado utilizando papel de filtro quantitativo (Whatman 1, Whatman, Millipore, EUA) e uma impressora de cera (Xerox ColorQube 8580, New York, Estados Unidos). Após a impressão, os dispositivos passaram 3 minutos em uma chapa de aquecimento (GT-CAD5L) a temperatura de 200 °C, para que a cera penetrasse no papel. Já o μPAD_Q foi feito utilizando o mesmo substrato, no entanto foi cortado com as dimensões de 1cm x 1cm e em seguida embebido em álcool, para remover impurezas solúveis, homogeneizar a estrutura do papel e melhorar sua estabilidade analítica, e em seguida seco lentamente em um dessecador por 24 horas.

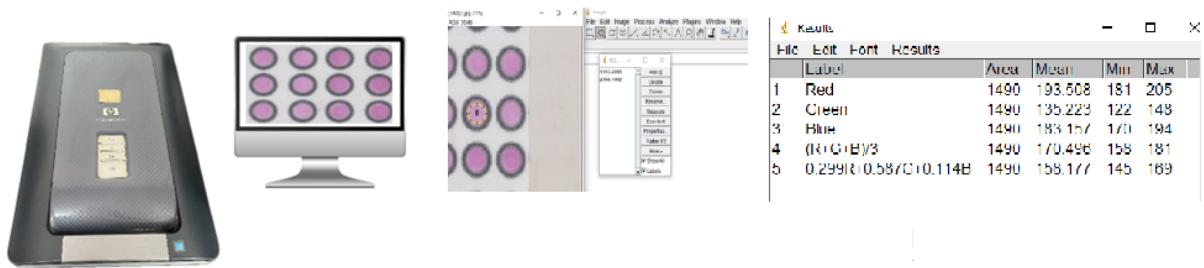
4.3 Equipamentos para obtenção de imagens

Para a obtenção das imagens utilizou-se o scanner HP Deskjet G4050 e o smartphone Iphone 13 Mini.

4.2.1 Scanner

Os µPADs foram colocados ao centro do scanner HP Deskjet G4050 e foram escaneados com uma resolução de 300 dpi (pontos por polegada). Após a obtenção da imagem digital, utilizando o software ImageJ® as áreas de interesse foram selecionadas e extraíram-se os parâmetros de intensidade de cor em RGB. Em seguida os dados foram exportados e tratados no Microsoft Excel.

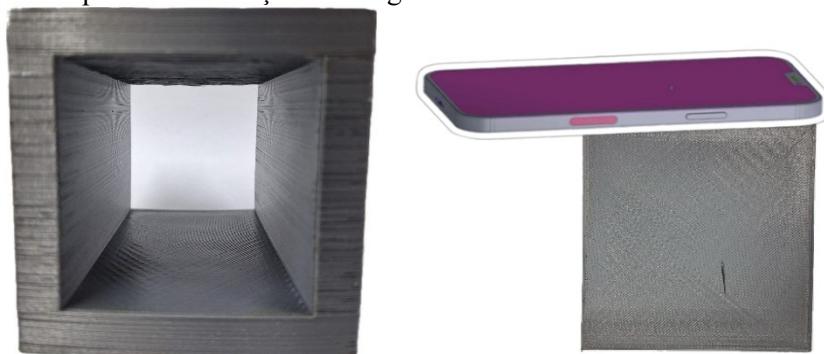
Figura 3- Obtenção dos dados por meio do scanner



4.2.2 Smartphone

No trabalho de Capitán-Vallvey et al., 2015 a construção de um ambiente controlado para a aquisição de imagens é discutida, visto que iluminação é um fator que tem uma grande influência no momento da obtenção das imagens. Desse modo a fim de padronizar a quantidade de iluminação, o celular foi posicionado numa caixa com duas aberturas, conforme a Figura 4, e as fotos foram tiradas com flash. Posteriormente o tratamento dos dados foi feito da mesma forma que o scanner

Figura 4- Esquema de obtenção de imagem com o celular



4.2.3 SmartPad

O SmartPad consiste em uma mesa giratória automatizada acoplada com um sensor AS7341 e 17 espaços (1 para referência e 16 spots para amostras) para posicionar os spots de μ PAD's com dimensões de 1x1 cm. Para a aquisição dos dados, foram selecionados na interface a quantidade de spots a serem analisados, os parâmetros de ganho (16x), a corrente do LED (70mA) e a opção de cálculo direto dos valores de absorbância. Os resultados foram copiados na extensão .txt e posteriormente para o Microsoft Excel para construção de uma curva analítica.

Figura 5- SmartPad



5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Otimização dos µPAD's

Para que a reação colorimétrica ocorresse nas melhores condições sob a superfície do papel, foram avaliados parâmetros como o volume de adição do reagente de Griess e da solução padrão de nitrito, a ordem de adição, o tempo de secagem e a faixa de concentração adequada. As tabelas 1 e 2 apresentam testes realizados no µPAD_Q, com volumes de até 12 µL, variando a quantidade e ordem entre aplicações do reagente e do padrão com concentração de 1000 mg. L⁻¹. Nesses testes, as imagens foram registradas em um smartphone (Iphone 13 Mini) 10 minutos após as adições

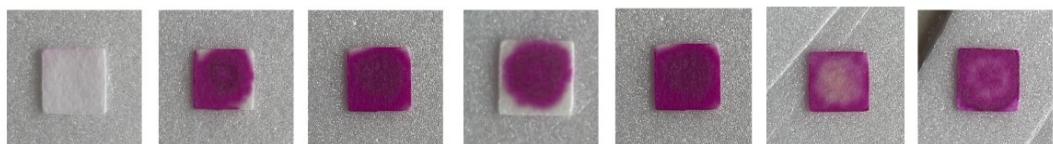
Tabela 1: Testes de aplicação de nitrito e Griess

| Teste | Nitrito (µL) | Griess (µL) |
|-------|--------------|-------------|
| A | 0 | 12 |
| B | 6 | 6 |
| C | 4 | 8 |
| D | 8 | 4 |

Tabela 2: Testes de aplicação de Griess e nitrito

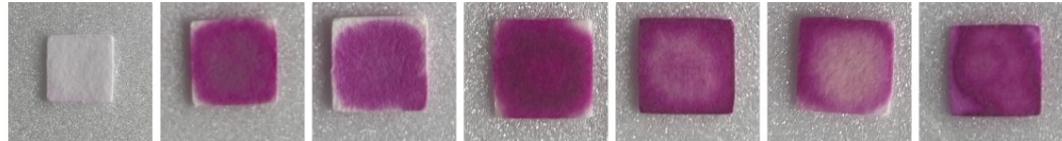
| Teste | Griess (µL) | Nitrito (µL) |
|-------|-------------|--------------|
| E | 6 | 6 |
| F | 4 | 8 |
| G | 8 | 4 |

Figura 6: Da esquerda para direita as aplicações de A a G.



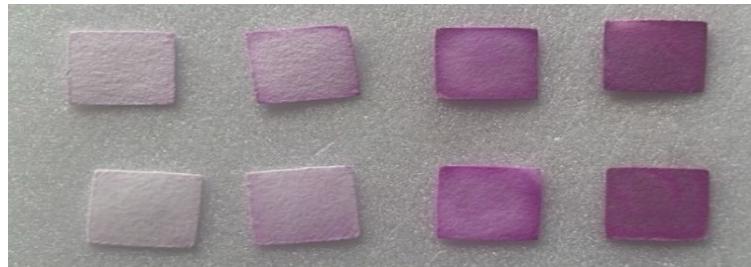
Posteriormente, foi realizado um teste semelhante ao das tabelas 1 e 2, tanto em questões de quantidades como em ordem. No entanto após a primeira aplicação, seja do reagente ou do padrão de nitrito, esperou-se 10 minutos de secagem para que as fotos fossem obtidas.

Figura 7: Da esquerda para direita as aplicações de A' a G'



Foi observado que no teste E' apresentou uma dispersão mais uniforme sobre o papel. Também foram feitos testes para verificar se havia alguma mudança de cor significativa ao longo do tempo após as duas adições. Na primeira fileira, as fotos foram capturadas 10 minutos após as duas aplicações; já na segunda, esperou-se 10 minutos de secagem entre as aplicações e em seguida mais 20 minutos após a última.

Figura 8: Primeira fileira sem intervalo entre as aplicações. Segunda fileira com intervalos

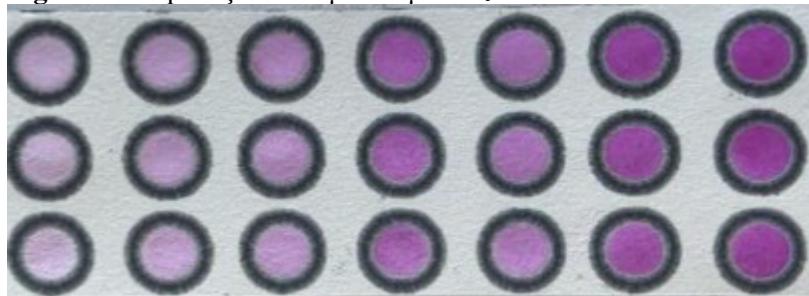


Também foram realizados testes no μ PAD_C, sendo o volume ideal adicionado de 3 μ L.

Figura 9: Testes de volume

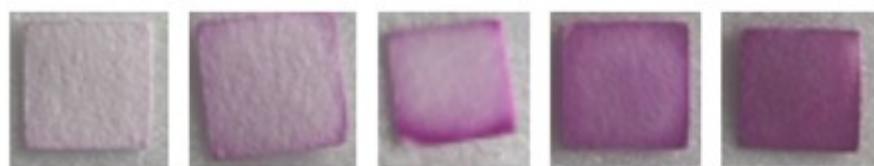


Figura 10: Aplicação de 3 μ L no μ PAD_c



Em relação a faixa de concentração, inicialmente foram feitas aplicações de concentrações de nitrito de 0 mg/L, 1mg/L, 10mg/L, 100 mg/L e 1000mg/L

Figura 11: Aplicação respectivamente com 0 mg/L, 1mg/L, 10mg/L, 100 mg/L e 1000mg/L



Os gráficos abaixo foram plotados com base de uma curva analítica relacionando intensidade do sinal de RGB e as concentrações na aplicação E'

Gráfico 1: Concentração (de 0 a 1000 mg/L) por intensidade

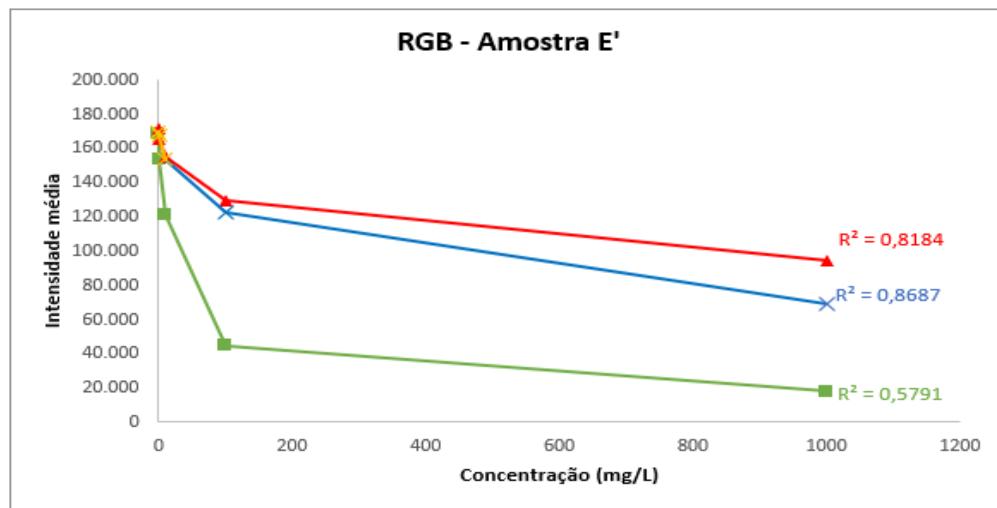
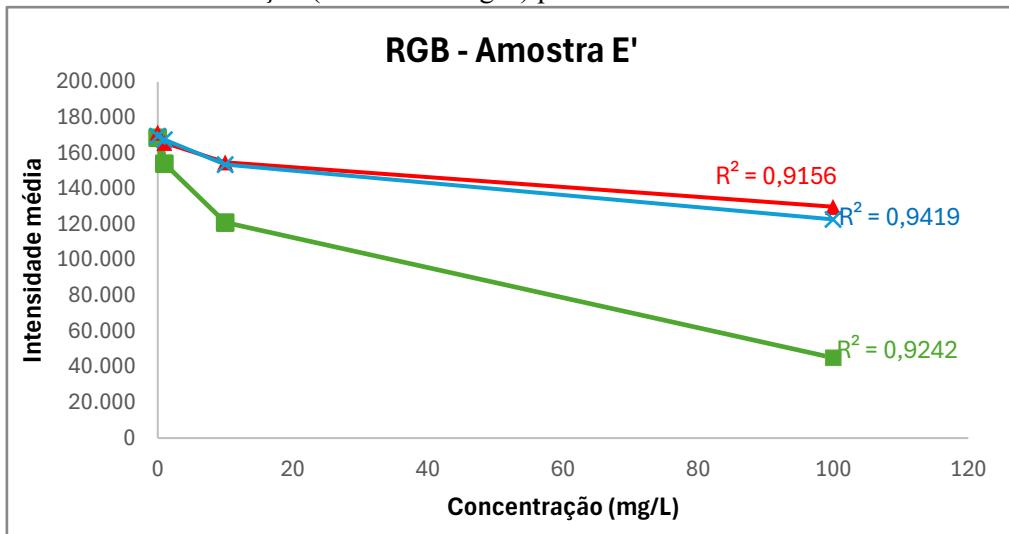


Gráfico 2: Concentração (de 0 a 100 mg/L) por intensidade



O Gráfico 1 apresenta uma baixa de linearidade, indicada pelos valores de R^2 . Segundo Martinez et al. (2010), há a saturação da cor em concentrações maiores, fazendo com que as curvas de calibração não sigam funções lineares e que apesar dos incrementos adicionais de concentração, não há uma variação significativa do sinal analítico. Assim, o comportamento da curva apresentou pouca alteração nessa faixa de concentração. Dessa forma, foi repetida a mesma curva, apresentada no Gráfico 2, mas retirando a concentração de 1000 mg.L^{-1} . Com isso, foi possível observar uma maior variação do sinal analítico, sobretudo na faixa de concentrações ainda menores, entre 0 e 30 mg.L^{-1} .

Ficou estabelecido então que a faixa de trabalho seria de 0 e 30 mg.L^{-1} nos dois μPAD 's, que a ordem de adição seria Griess e nitrito com proporções iguais entre ambos e que no μPAD_C seria adicionado um volume total de $3 \mu\text{L}$ e no μPAD_Q , $12 \mu\text{L}$.

5.2 Resultados analíticos

5.2.1 Figuras de Mérito

O desempenho analítico dos métodos de detecção foi avaliado em termos de linearidade, construindo a curva analítica relacionando o sinal analítico (absorbância) em função de diferentes concentrações de nitrito, sendo analisadas em triplicata. Já a precisão dos métodos foi determinada avaliando os coeficientes de variação de 5 medidas na concentração de 20 mg/L . Foram calculados também os limites de quantificação e detecção. Após as análises, constatou-se que, assim como no trabalho de Hakobyan et al. (2022), o canal verde (G)

apresentou, dentre os parâmetros desejados, os melhores resultados. Isso já era esperado visto que, como foi apresentado nos trabalhos de Miranda et al. (2001) e Cadeado (2024), o diazo composto apresenta absorção máxima por volta de 540 nm, o que sobrepõe a absorção no verde (500 a 560 nm) (SKOOG, 2014). Desse modo, no sensor AS7341, foram observados resultados na faixa de 515 nm e 555 nm, sendo melhores os resultados em 555 nm.

Abaixo seguem os gráficos obtidos por cada método de detecção

Gráfico 3: Análise do μ PAD_Q no SmartPad

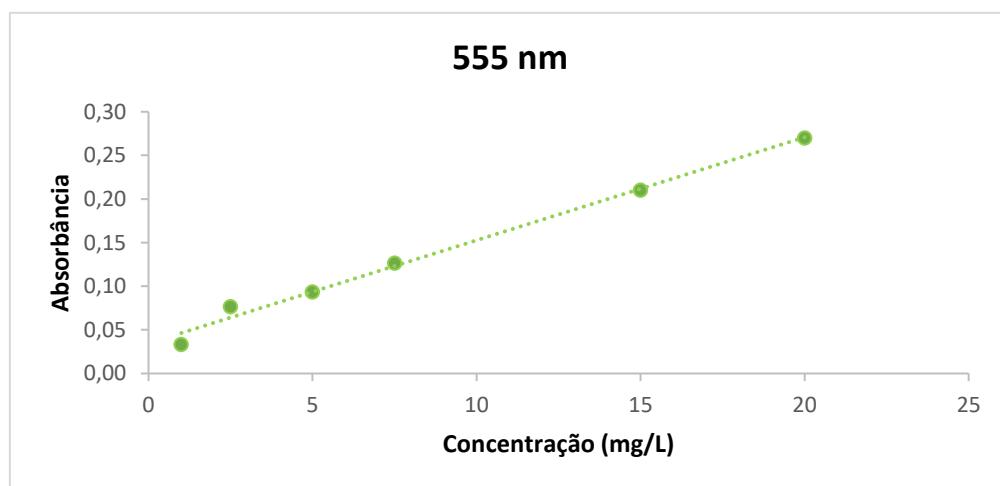


Gráfico 4: Análise do μ PAD_C no scanner

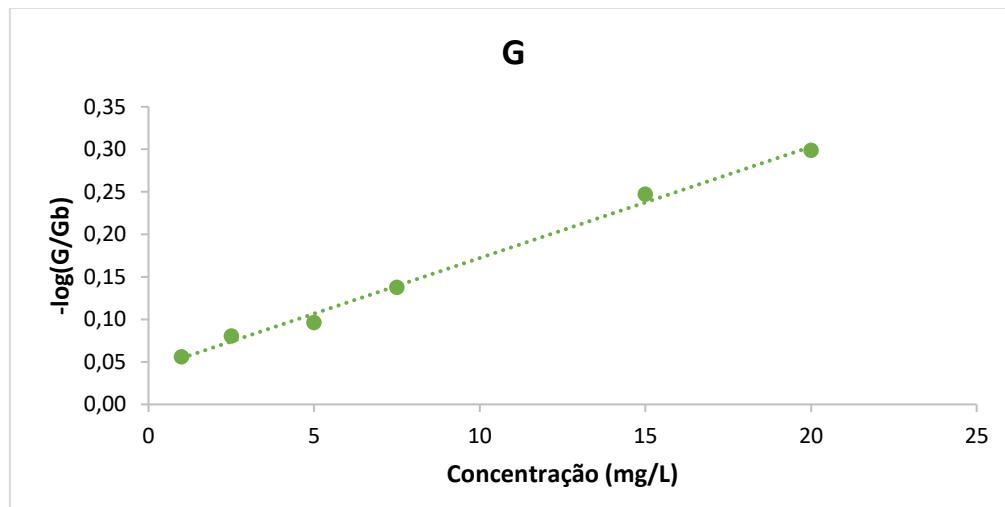


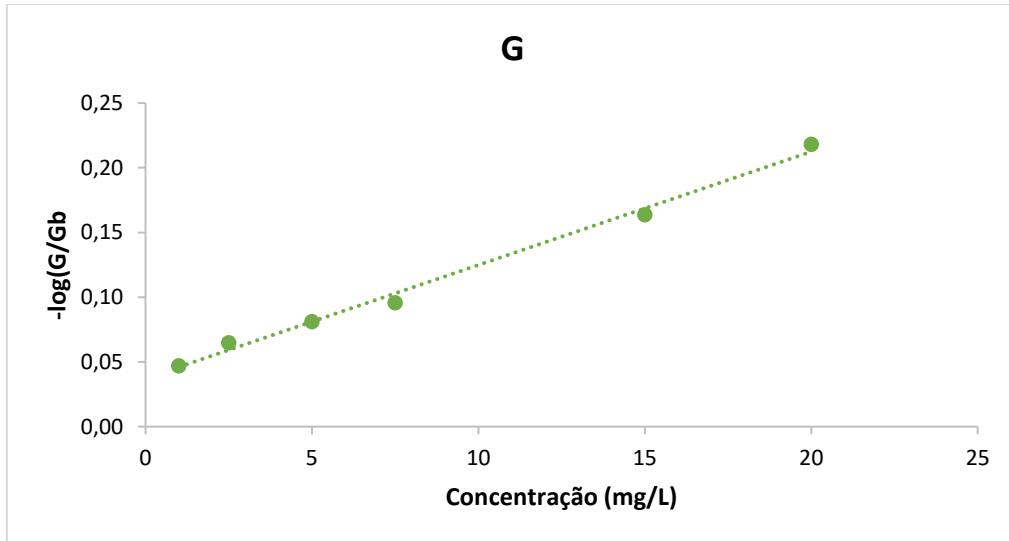
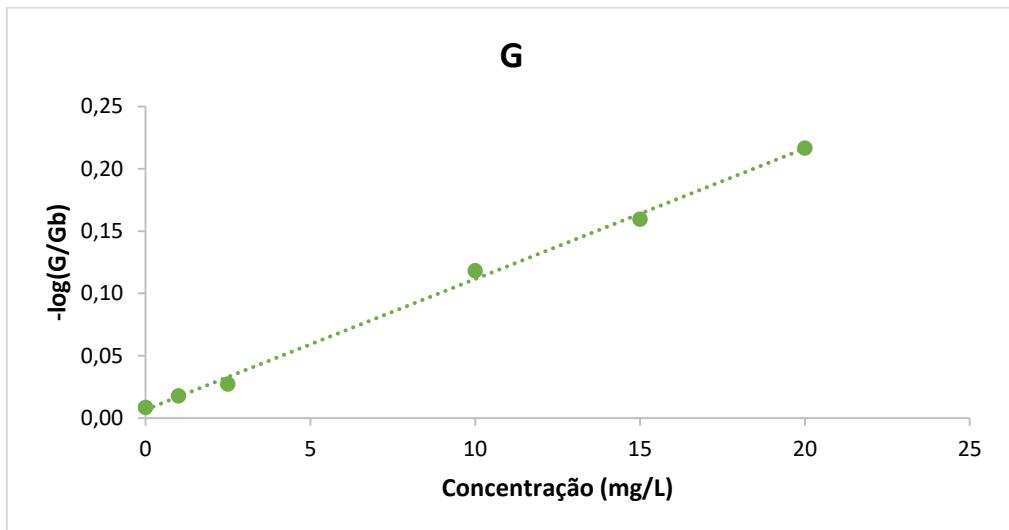
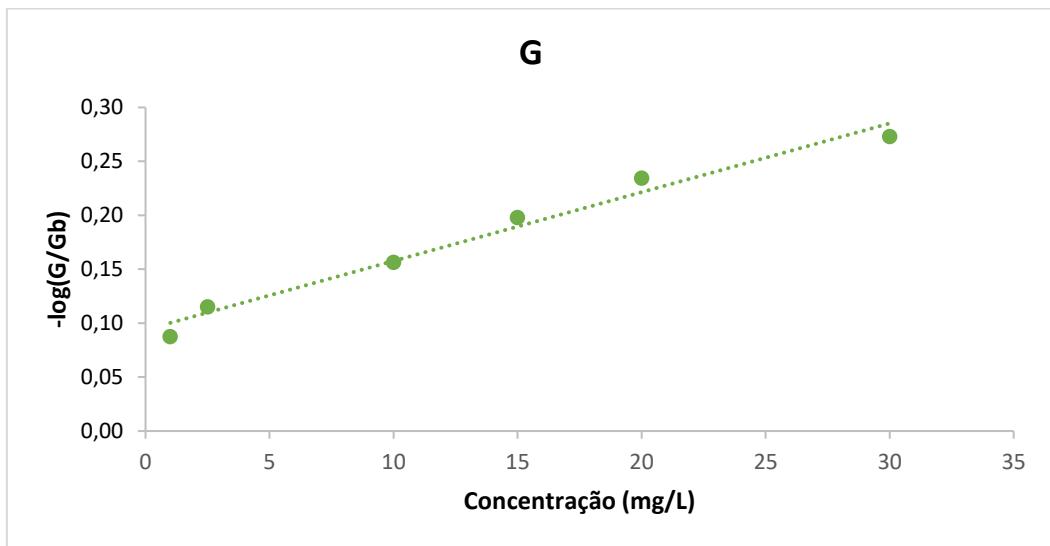
Gráfico 5: Análise do μ PAD_Q no scanner**Gráfico 6:** Análise do μ PAD_C no celular

Gráfico 7: Análise do μ PAD_Q no celular

Para comparar e resumir os dados obtidos, a Tabela 3 foi construída:

Tabela 3: Resultados das análises dos métodos detecção no canal verde (G)

| | SMARTPAD μ PAD _Q | SCANNER μ PAD _C | SCANNER μ PAD _Q | CELULAR μ PAD _C | CELULAR μ PAD _Q |
|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| MELHOR CANAL | 555 nm | G | G | G | G |
| TRATAMENTO DO SINAL | | $-\log(G/Gb)$ | $-\log(G/Gb)$ | $-\log(G/Gb)$ | $-\log(G/Gb)$ |
| CURVA ANALÍTICA | $y = 0,0118x + 0,0346$ | $y = 0,0131x + 0,0413$ | $y = 0,0088x + 0,0373$ | $y = 0,0105x + 0,0068$ | $y = 0,0064x + 0,0939$ |
| COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R^2) | $R^2 = 0,9913$ | $R^2 = 0,9945$ | $R^2 = 0,9934$ | $R^2 = 0,9975$ | $R^2 = 0,9772$ |
| COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (20mg/L) | 8,6% | 1,74% | 1,29% | 8,88% | 6,68% |
| LOD (mg/L) | 0,98 | 0,30 | 0,50 | 0,69 | 2,46 |
| LOQ (mg/L) | 3,27 | 1,01 | 1,66 | 2,28 | 8,21 |

Os resultados obtidos na comparação dos diferentes métodos de detecção de reações colorimétricas em papel revelam diferenças em termos de sensibilidade, precisão e limite de detecção e quantificação.

A análise das curvas analíticas mostra que os scanners, tanto do μ PAD_C quanto do μ PAD_Q, apresentaram bons coeficientes de correlação ($R^2 = 0,9945$ e $0,9934$, respectivamente), indicando uma boa linearidade e confiabilidade na relação entre intensidade de cor e

concentração de nitrito. O SmartPad também apresentou boa linearidade ($R^2 = 0,9913$), demonstrando potencial analítico consistente, embora ligeiramente inferior ao dos scanners. Já os dispositivos móveis apresentaram menor linearidade, especialmente quando associados ao μ PAD_Q ($R^2 = 0,9772$), possivelmente em função de variações na iluminação, angulação da câmera e processamento do sinal, fatores que afetam diretamente a precisão de medições baseadas em imagens (WU et al., 2017; ZHANG et al., 2014; CAPITÁN-VALLVEY et al., 2015).

Quanto à precisão, avaliada pelo coeficiente de variação em uma concentração de 20 mg/L, os resultados do scanner novamente se destacaram, com valores de CV variando entre 1,29% e 1,74%, enquanto os do celular apresentaram maior dispersão (6,68–8,88%), refletindo limitações inerentes à captura de imagens por dispositivos móveis, como ruído de sensores e inconsistência de iluminação. Esses achados estão alinhados com trabalhos que indicam que instrumentação dedicada, como scanners de alta resolução, tende a gerar resultados mais reproduutíveis em métodos colorimétricos baseados em papel (LOPEZ-RUIZ et al., 2014; LI et al., 2018).

A sensibilidade, avaliada por meio dos limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD), segue o mesmo padrão: o scanner apresentando os menores valores (LOD = 0,30–0,50 mg/L; LOQ = 1,01–1,66 mg/L), enquanto os celulares exibiram LOQ e LOD maiores, especialmente no μ PAD_Q (LOD = 2,46 mg/L; LOQ = 8,21 mg/L). O SmartPad apresentou desempenho intermediário (LOD = 0,98 mg/L; LOQ = 3,27 mg/L), evidenciando boa sensibilidade mesmo em um formato portátil.

Observa-se que a linearidade e precisão em dispositivos móveis com μ PAD_Q foram inferiores às obtidas com o μ PAD_C, sugerindo que a preparação do substrato pode influenciar a difusão do reagente ou a intensidade da cor capturada, fenômeno já discutido em estudos sobre μ PADs (FERREIRA et al., 2020; GONG & SINTON, 2017).

6 CONCLUSÃO

A comparação entre diferentes métodos de aquisição e tratamento de sinais colorimétricos em μ PADs permitiu verificar que todos os sistemas avaliados apresentaram correlação linear adequada para a determinação de nitrito pela reação de Griess. O canal verde mostrou-se o mais apropriado para quantificação, reforçando sua relevância em análises colorimétricas digitais. Observou-se ainda que os dispositivos analisados por scanner proporcionaram os menores limites de detecção e quantificação, sendo, portanto, mais indicados para concentrações reduzidas de nitrito. Já quando analisados por smartphone, embora apresentassem maior variabilidade, demonstraram aplicabilidade prática em situações em que a portabilidade e a rapidez são mais relevantes do que a sensibilidade analítica. O SmartPad, por sua vez, consolidou-se como uma ferramenta confiável e de fácil operação, ainda que com limites de detecção superiores aos métodos convencionais, como espectrofotômetros.

Assim, pode-se concluir que os μ PADs, aliados à análise digital de imagens, representam ferramentas eficazes, versáteis e de baixo custo para a quantificação de nitrito em diferentes matrizes. A escolha do método de detecção deve considerar o equilíbrio entre sensibilidade, portabilidade e acessibilidade, de acordo com a finalidade da aplicação. Esses resultados reforçam o potencial dos μ PADs em análises in loco, especialmente em áreas relacionadas ao monitoramento ambiental, segurança alimentar e saúde pública.

REFERÊNCIAS

- APILUX, A., et al (2010). Lab-on-paper with dual electrochemical/colorimetric detection for simultaneous determination of gold and iron. *Analytical chemistry*, 82(5), 1727–1732. <https://doi.org/10.1021/ac9022555>
- CADEADO, Alegre de Nascimento Santana. Desenvolvimento de procedimentos analíticos e aplicações IoT utilizando sensores óticos para detecção de adulterações em alimentos e contaminação de água. 2024. 117 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2024. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.309>.
- CAPITÁN-VALLVEY, L. F. et al. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*, v. 899, p. 23–56, 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.analchimacta.2015.03.030>.
- CHARBAJI, A.; HEIDARI-BAFROUI, H.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; FAGHRI, M. A new paper-based microfluidic device for improved detection of nitrate in water. *Sensors*, v. 21, n. 1, p. 102, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/s21010102>.
- FERREIRA, F. T. S. M.; MESQUITA, R. B. R.; RANGEL, A. O. S. S. Novel microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) for the determination of nitrate and nitrite in human saliva. *Talanta*, v. 219, p. 121183, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121183>.
- FU, L.-M. Microfluidic paper-based devices. *Micromachines*, v. 16, n. 3, p. 307, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/mi16030307>.
- GONG, M. M.; SINTON, D. Turning the page: advancing paper-based microfluidics for broad diagnostic application. *Chemical Reviews*, v. 117, n. 12, p. 8447–8480, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00024>.
- HAKOBYAN, L.; MONFORTE-GÓMEZ, B.; MOLINER-MARTÍNEZ, Y.; MOLINS-LEGUA, C.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. Improving sustainability of the Griess reaction by reagent stabilization on PDMS membranes and ZnNPs as reductor of nitrates: application to different water samples. *Polymers*, v. 14, n. 3, p. 464, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14030464>.
- HARRIS, Daniel C. *Quantitative Chemical Analysis*. 9. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2017.
- JAYAWARDANE, B. M.; WEI, S.; MCKELVIE, I. D.; KOLEV, S. D. Microfluidic paper-based analytical device for the determination of nitrite and nitrate. *Analytical Chemistry*, v. 86, n. 15, p. 7274–7279, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac5013249>.
- KUMARI, R.; SINGH, A.; AZAD, U. P.; CHANDRA, P. Insights into the fabrication and electrochemical aspects of paper microfluidics-based biosensor module. *Biosensors*, v. 13, p. 891, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/bios13090891>.
- LI, D.; MA, Y.; DUAN, H.; DENG, W.; LI, D. Griess reaction-based paper strip for colorimetric/fluorescent/SERS triple sensing of nitrite. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 99, p. 389–398, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.032>.

- LOPEZ-RUIZ, N.; CURTO, V. F.; ERENAS, M. M.; BENITO-LOPEZ, F.; DIAMOND, D.; PALMA, A. J.; CAPITAN-VALLVEY, L. F. Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, v. 86, n. 19, p. 9554–9562, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac5019205>.
- MARTINEZ, A. W.; et al. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, v. 82, n. 1, p. 3–10, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac9013989>.
- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>. MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*. 6. ed. Harlow: Pearson Education, 2013.
- NERY, E. W.; KUBOTA, L. T. Sensing approaches on paper-based devices: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 405, n. 24, p. 7573–7595, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6911-4>.
- OZER, T.; MCMAHON, C.; HENRY, C. S. Advances in paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, v. 92, n. 1, p. 1–17, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04647>.
- SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. *Principles of Instrumental Analysis*. 6. ed. Boston: Cengage Learning, 2009.
- SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9. ed. Boston: Cengage Learning, 2014.
- TEEPOO, S.; ARSAWISET, S.; CHANAYOTA, P. One-step polylactic acid screen-printing microfluidic paper-based analytical device: application for simultaneous detection of nitrite and nitrate in food samples. *Chemosensors*, v. 7, p. 44, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/chemosensors7030044>.
- TRINH, T. N. D.; TRAN, N. K. S.; NGUYEN, H. A.; CHON, N. M.; TRINH, K. T. L.; LEE, N. Y. Recent advances in portable devices for environmental monitoring applications. *Biomicrofluidics*, v. 18, n. 5, p. 051501, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1063/5.0224217>.
- VIDAL, E.; LORENZETTI, A. S.; LISTA, A. G.; DOMINI, C. E. Micropaper-based analytical device (μ PAD) for the simultaneous determination of nitrite and fluoride using a smartphone. *Microchemical Journal*, v. 143, p. 201–207, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.08.011>.
- VOGEL, Arthur I. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. 5. ed. London: Longman, 2002.
- WU, Mingming; CAI, Jiahui; WANG, Yawei; JI, Ke. Smartphone-based colorimetric detection of ascorbic acid using paper-based microfluidic devices. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 246, p. 69–76, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.103>.
- WILLARD, H. H.; MERRITT, L. L.; DEAN, J. A.; SETTLE, F. A. *Instrumental Methods of Analysis*. 7. ed. Belmont: Wadsworth, 1988.

YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, v. 13, n. 12, p. 2210–2251, 2013.

ZHANG, Wei; ZHANG, Zheng; ZHANG, Xiang; WANG, Shuo. Colorimetric detection of copper ions using functionalized paper-based devices combined with a digital image readout. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 55, p. 440–446, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.046>.