



**UNICAMP**

**Universidade Estadual de Campinas**

**Instituto de Química**

**Departamento de Química Analítica**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

Tese de Doutorado

**Construção e Avaliação de Microsistemas  
para Análise em Fluxo**

Alexandre Fonseca

Orientador: Prof. Dr. Ivo M. Raimundo Jr.

Campinas / 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP

F733c Fonseca, Alexandre.  
Construção e avaliação de microsistemas para  
análise em fluxo / Alexandre Fonseca. -- Campinas, SP:  
[s.n], 2008.

Orientador: Ivo Milton Raimundo Júnior.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto  
de Química.

1. Microfabricação. 2. Fotolitografia. 3. Química  
verde. 4. Análise em fluxo. I. Raimundo Júnior, Ivo Milton.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Química. III. Título.

**Título em inglês:** Construction and evaluation of microsystems for flow analysis

**Palavras-chaves em inglês:** Microfabrication, Photolithography, Green chemistry,  
Flow analysis

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Ivo Milton Raimundo Júnior (orientador), Claudimir Lúcio do Lago  
(IQ-USP), Mauro Korn (DCET-UNEB), Marco Aurélio Zezzi Arruda (IQ-UNICAMP), Dosil  
Pereira de Jesus (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 11/07/2008

*Este trabalho é dedicado  
à minha esposa Alessandra  
e aos meus pais Sebastião e Maria Ivone.*

## Agradecimentos

- À Deus.
- À toda minha família, que sempre me apoiou.
- Ao Prof. Ivo M. Raimundo Jr, pela orientação, amizade, paciência e oportunidade.
- Ao Prof. Luiz Otávio Saraiva Ferreira pela enorme contribuição ao desenvolvimento do projeto.
- Aos professores Célio Pasquini e Jarbas José Rodrigues Rohwedder pela ajuda e sugestões valiosíssimas.
- Aos amigos Emerson e Fabiano pela companhia e ajuda incondicional em etapas importantíssimas do trabalho.
- Aos amigos Élcio e Alexey da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP.
- Aos amigos do Grupo de Instrumentação e Automação em Química Analítica (GIA) da UNICAMP: Lucas, Juliana, Sílvia, Carol, Karime, Claudete, Eliane, Fernandão, Pedro, Alberto, Anderson, Flávia, Renata, Evelyn, Kássio, Heitor, Bitão e Klécia.
- Aos amigos do laboratório de Química Ambiental (LQA) da UNICAMP: Aluísio, Juliano, Débora, Nívea, Marco, Amanda, Cris, Fernando, Cassiana e Matheus.
- Aos amigos da UFPB: Renato, Gledson e Márcio.
- Ao pessoal das oficinas do IQ. Em especial ao Mário da mecânica fina.
- Ao Daniel pelas excelentes micrografias.
- Ao Instituto de Química da UNICAMP pela infra-estrutura.
- Ao CNPq (processo 479542/2004-0) pelo financiamento do projeto.
- À CAPES pela oportunidade de paritipação no projeto PROCAD (projeto-0081/05-1)
- À UNICAMP pela bolsa de Doutorado concedida no Programa Piloto para Instrutores Graduados (PIG) / Programa de Estágio Docente – A (PED-A) e principalmente, pela oportunidade singular de atuação nestes programas tão enriquecedores.
- À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

# Curriculum Vitae

---

## Formação Acadêmica:

2004 – 2008: **Doutorado em Ciências**

Universidade Estadual de Campinas

Título: *Construção e Avaliação de Microsistemas para Análise em Fluxo*

2002 – 2004: **Mestrado em Química Analítica**

Universidade Estadual de Campinas

Título: *Desenvolvimento de um Fotômetro Multicanal Baseado em um Arranjo de Diodos Emissores de Luz*

1998 – 2002: **Licenciatura em Química**

Universidade Federal de São Carlos

---

## Experiência Profissional Acadêmica

1. Bolsista do Programa Piloto para Instrutores Graduados do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Atuação como docente supervisionado em disciplinas teóricas e experimentais desta instituição (2º. sem/2004 à 1º sem/2008)

---

## Publicações

1. FONSECA, A.; RAIMUNDO JR, I. M.; FERREIRA, L. O. S.; ROHWEDDER, J. J. R. *Construction and evaluation of a flow injection micro-analyser based on urethane acrylate resin*. *Analytica Chimica Acta*, v. 603, p. 159-166, 2007.
2. FONSECA, A.; RAIMUNDO JR, I. M. *A simple method for water discrimination based on an light emitting diode (LED) photometer*. *Analytica Chimica Acta*, v. 596, p. 66-72, 2007.
3. FONSECA, A.; RAIMUNDO JR, I. M. *A multichannel photometer based on an array of light emitting diodes for use in multivariate calibration*. *Analytica Chimica Acta*, v. 522, p. 223-229, 2004.

---

## Trabalhos apresentados em congressos Nacionais

1. *Um Analisador FIA Miniaturizado com Detecção Biamperométrica para Determinação de Fármacos*. 14º Encontro Nacional de Química Analítica. João Pessoa PB 2007. (Autor colaborador)
2. *Avaliação do Uso de um Microcontrolador Programável para Automação de um Sistema de Análise por Injeção em Fluxo Miniaturizado*. 14º Encontro Nacional de Química Analítica. João Pessoa PB 2007. (Autor principal)

3. *Construção de um microssistema voltamétrico para análise em fluxo empregando fotopolímero a base de poliuretano.* 29<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Águas de Lindóia –SP 2006. (Autor colaborador)
4. *Desenvolvimento de um Microssistema de Análise por injeção em Fluxo com Detecção Fotométrica.* 29<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Águas de Lindóia –SP 2006. (Autor principal)
5. *Desenvolvimento de um Sistema de Análise em Fluxo Miniaturizado.* 28<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas – MG 2005. (Autor principal)
6. *Aplicação de um Fotômetro Multicanal Baseado em um Arranjo de Diodos Emissores de Luz para a Classificação de Águas Minerais.* 27<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Salvador - BA 2004. (Autor principal)
7. *Um sensor óptico descartável para a determinação de metais pesados em águas.* 27<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Salvador-BA 2004. (Autor colaborador)
8. *Desenvolvimento de um Fotômetro Multicanal Baseado em Um Arranjo de Diodos Emissores de Luz.* 26<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas-MG 2003. (Autor principal)
9. *Caracterização Voltamétrica da Eletrodeposição da liga Zn/Mn.* 24<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas-MG 2001 (Autor principal)

---

### **Trabalhos Apresentados em Congressos Internacionais**

1. *A Flow injection Micro-Analyser.* Flow Analysis 10<sup>th</sup> International Conference. Cidade do Porto – Portugal 2006. (Autor principal)
2. *Fluorimetric Detection in a microfluidic system.* **Europtrode IX:** Ninth International Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors, Dublin-Ireland, 2008 (Autor Principal)

---

## **CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICROSSISTEMAS PARA ANÁLISE EM FLUXO**

### **Resumo:**

Este trabalho descreve a construção, caracterização e aplicação de microssistemas para análise em fluxo. A ablação por laser foi utilizada para o desenvolvimento de um sistema em poli(metilmetacrilato), cujos canais, com seções transversais retangulares medindo 200  $\mu\text{m}$  de largura e 4,5 mm de profundidade, foram selados com um filme plástico adesivo. Este dispositivo suportou vazões de até 2,0  $\text{mL min}^{-1}$  sem apresentar vazamentos e a sua aplicação para a determinação fotométrica de Fe(II) em medicamentos proporcionou resultados que não diferiram significativamente daqueles obtidos por espectrometria de absorção atômica ao nível de 95 % de confiança. A fotolitografia profunda no ultravioleta foi empregada para a construção de microssistemas em resina a base de uretana-acrilato. Os canais com seções transversais triangulares e dimensões entre 200 e 600  $\mu\text{m}$  foram selados com uma camada do próprio substrato, formando uma estrutura monolítica que suportou vazões de até 3,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Fibras ópticas plásticas e agulhas hipodérmicas foram acopladas aos dispositivos e utilizadas para a integração dos sistemas ópticos de detecção e para o acesso das soluções de trabalho, respectivamente. Um microssistema com célula integrada para detecção fluorimétrica e dois pontos de confluência foi aplicado à determinação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em águas minerais. Outros dois dispositivos foram aplicados separadamente à determinação fotométrica de íons Cr(VI) em águas contaminadas e em ligas metálicas e à determinação de íons  $\text{Cl}^-$  em águas minerais. Para todas as aplicações, as concentrações determinadas através dos métodos com os microssistemas foram concordantes com aquelas determinadas através dos métodos em batelada (espectrofotometria e volumetria de complexação). A geração de volumes extremamente pequenos de resíduos (cerca de 25 mL de solução para uma jornada de 8 horas de trabalho) indicou que os dispositivos propostos cumprem adequadamente os requisitos estabelecidos pela Química Verde.

---

## CONSTRUCTION AND EVALUATION OF MICROSYSTEMS FOR FLOW ANALYSIS

### **Abstract:**

This work describes the construction, characterization and application of microsystems for flow analysis. Laser ablation was employed for the development of a system in poly(methylmethacrylate), whose channels, with rectangular cross sections measuring 200  $\mu\text{m}$  width by 4,5 mm depth, were sealed with an adhesive plastic film. This device supported flow rates up to 2.0  $\text{mL min}^{-1}$  without leaking and its application for the photometric determination of Fe(II) in medicines provided results that did not differ significantly of those obtained by flame atomic absorption spectrometry at a confidence level of 95 %. The deep UV-photolithography was used for the construction of microsystems in urethane / acrylate based resin. The channels with triangular cross sections and dimensions between 200 and 600  $\mu\text{m}$  were sealed with a layer of the same resin, forming a monolithic structure that supported flow rates up to 3.0  $\text{mL min}^{-1}$ . Plastic optical fibers and hypodermic needles were coupled to the devices and used for the integration of the optical detection systems and for the access of the working solutions, respectively. A microsystem with an integrated flow cell for fluorimetric detection and two confluence points was applied to the determination of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  in mineral waters. Other two devices were separately applied to the photometric determination of Cr(VI) in contaminated waters and in metallic alloys, and to the determination of  $\text{Cl}^-$  in mineral waters. For all the applications, the concentrations obtained agreed with those determined by batch methods (spectrophotometry and complexometric titration). The generation of extremely small volumes of residues (ca. 25  $\mu\text{L}$  of solution after an 8-h working day) indicates that the proposed devices appropriately accomplish the requirements established by the Green Chemistry.

# ÍNDICE

<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>xix</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>xx</b>
<b>Capítulo 1: Introdução e Objetivos .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.1 Introdução - 3 -</b>	
1.1.1 <i>Técnicas de microfabricação</i> .....	- 5 -
1.1.1.1 Técnicas Clássicas.....	- 6 -
1.1.1.1.1 Fotolitografia com Corrosão por via Úmida .....	- 6 -
1.1.1.1.2 Fotolitografia com corrosão por via seca.....	- 9 -
1.1.1.2 Microfabricação em polímeros .....	- 11 -
1.1.1.2.1 Seleção do material de construção .....	- 11 -
1.1.1.2.2 Ablação à laser .....	- 12 -
1.1.1.2.3 Moldagem por pressão à quente .....	- 13 -
1.1.1.2.4 Moldagem por injeção .....	- 14 -
1.1.1.3 Outras alternativas .....	- 15 -
1.1.1.4 Técnicas empregadas para a selagem dos canais.....	- 16 -
1.1.2 <i>Microsistemas para análise em fluxo</i> .....	- 17 -
<b>1.2 Objetivos.....</b>	<b>- 22 -</b>
<b>Capítulo 2: Sistema de Análise em Fluxo em poli(metilmetacrilato).....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>2.1 Sistema de análise em fluxo à base de PMMA.....</b>	<b>- 25 -</b>
2.1.1 <i>Parte Experimental</i> .....	- 25 -
2.1.1.1 Fabricação.....	- 25 -
2.1.1.2 Avaliação da selagem e das conexões com o mundo exterior .....	- 27 -
2.1.1.3 Avaliação do sistema para a determinação fotométrica de íons Fe <sup>2+</sup> em medicamentos... ..	- 27 -
2.1.1.3.1 Sistema de Detecção: Adaptação de células de fluxo .....	- 27 -
2.1.1.3.2 Configurações de fluxo em linha única: Injeção direta e hidrodinâmica da amostra .....	- 28 -
2.1.1.3.3 Reagentes e soluções .....	- 31 -
2.1.2 <i>Resultados e Discussão</i> .....	- 32 -
2.1.2.1 Avaliação da selagem e das conexões com o mundo exterior .....	- 33 -
2.1.2.2 Avaliação do sistema para a determinação fotométrica de íons Fe <sup>2+</sup> em medicamentos .....	- 33 -

<b>Capítulo 3: Construção de Microssistemas em Uretana-Acrilato .....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>3.1 Construção de Microssistemas em Uretana-Acrilato.....</b>	<b>- 41 -</b>
3.1.1 Resinas à base de Uretana – Acrilato .....	- 41 -
3.1.2 Parte experimental.....	- 42 -
3.1.2.1 Gravação dos Canais.....	- 42 -
3.1.2.2 Estratégias desenvolvidas para selagem dos microssistemas.....	- 46 -
3.1.2.2.1 Selagem com filme plástico adesivo.....	- 47 -
3.1.2.2.2 Selagem com preenchimento prévio dos canais.....	- 47 -
3.1.2.2.3 Selagem empregando camada de resiste com superfície não polimerizada.....	- 48 -
3.1.2.3 Fabricação com uma expositora “Home-Made” .....	- 49 -
3.1.2.4 Conexões com o mundo macroscópico .....	- 51 -
3.1.2.5 Caracterização .....	- 52 -
3.1.3 Resultados e Discussão .....	- 53 -
3.1.3.1 Caracterização .....	- 53 -
3.1.3.2 Estratégias para selagem dos microssistemas.....	- 61 -
3.1.3.2.1 Selagem com filme plástico adesivo.....	- 61 -
3.1.3.2.2 Selagem com preenchimento prévio dos canais.....	- 62 -
3.1.3.2.3 Selagem empregando camada de resiste com superfície não polimerizada.....	- 62 -
 <b>Capítulo 4: Microssistemas em Uretana-Acrilato (UA) com célula integrada para detecção fotométrica.....</b>	<b>- 65 -</b>
<b>4.1 Microssistemas em UA com célula integrada para detecção fotométrica.....</b>	<b>- 67 -</b>
4.1.1 Parte experimental.....	- 67 -
4.1.1.1 Integração da célula de fluxo para detecção fotométrica.....	- 67 -
4.1.1.2 Integração do sistema de amostragem e da bobina de reação .....	- 68 -
4.1.1.3 Determinação de íons cloreto em águas minerais.....	- 70 -
4.1.1.3.1 Reagentes e Soluções.....	- 73 -
4.1.1.3.2 Método de Referência .....	- 73 -
4.1.1.4 Determinação de íons Cr(VI) em águas contaminadas e em ligas de Ni-Cr. ....	- 74 -
4.1.1.4.1 Reagentes e soluções .....	- 75 -
4.1.1.4.2 Método de Referência .....	- 76 -
4.1.2 Resultados e discussão .....	- 77 -
4.1.2.1 Integração da célula de fluxo .....	- 77 -
4.1.2.2 Caracterização dos dispositivos.....	- 79 -
4.1.2.3 Determinação de íons cloreto em águas minerais.....	- 85 -
4.1.2.4 Determinação de íons Cr(VI) em águas contaminadas e em ligas de Ni-Cr. ....	- 89 -

<b>Capítulo 5: Microssistemas em Uretana Acrilato (UA) com célula integrada para detecção fluorimétrica .....</b>	<b>- 95 -</b>
<b>5.1 Microssistemas em UA com célula integrada para detecção fluorimétrica.....</b>	<b>- 97 -</b>
5.1.1 <i>Parte Experimental</i> .....	- 97 -
5.1.1.1 Integração da célula de fluxo para detecção fluorimétrica.....	- 97 -
5.1.1.2 Determinação de Fluoresceína em soluções aquosas .....	- 98 -
5.1.1.2.1 Reagentes e soluções .....	- 100 -
5.1.1.3 Determinação de íons cálcio e magnésio em águas minerais.....	- 100 -
5.1.1.3.1 Reagentes e soluções .....	- 103 -
5.1.1.3.2 Método de Referência .....	- 104 -
5.1.2 <i>Resultados e discussão</i> .....	- 105 -
5.1.2.1 Microssistemas.....	- 105 -
5.1.2.2 Determinação de fluoresceína em soluções aquosas .....	- 106 -
5.1.2.3 Determinação de íons cálcio e magnésio em águas minerais.....	- 109 -
<b>Capítulo 6: Conclusões e Perspectivas .....</b>	<b>- 115 -</b>
<b>6.1 Conclusões e Perspectivas.....</b>	<b>- 117 -</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>- 119 -</b>
<b>Apêndice A: Microssistemas em resina de poliéster e em elastômero para flexografia.....</b>	<b>- 127 -</b>
<b>A.1: Microssistemas em resina de poliéster e em elastômero para flexografia.....</b>	<b>- 129 -</b>
A.1.1 Microssistema em resina de poliéster .....	- 129 -
A.1.2 Microssistema FIA em fotopolímero para flexografia .....	- 131 -
<b>Apêndice B: Instrumentação.....</b>	<b>- 135 -</b>
<b>B.1 Instrumentação .....</b>	<b>- 137 -</b>
B.1.1 LED e fotodiodo .....	- 137 -
B.1.2 Mini-bombas de pistão e mini-válvulas solenóides .....	- 138 -
B.1.3 Automação com um microcontrolador programável.....	- 142 -

B.1.4 Implementação de uma mini-fotomultiplicadora .....	- 148 -
B.1.5 Avaliação do módulo de controle na automação de uma determinação fotométrica com um microsistema.....	- 148 -
B.1.6 Resultados e discussão .....	- 149 -
B.1.6.1 Avaliação do módulo de controle na automação de uma determinação fotométrica com um microsistema.....	- 149 -

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Concentrações médias de Fe(II) em mg g <sup>-1</sup> encontradas para as determinações realizadas em triplicata com sistema FIA proposto e por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS)..	- 38 -
<b>Tabela 3.1:</b> Relação entre as larguras das linhas da máscara e as dimensões dos canais .....	- 59 -
<b>Tabela 4.1:</b> Dimensões e volumes de algumas regiões dos microssistemas propostos .....	- 80 -
<b>Tabela 4.2:</b> Estudo de dispersão para os diferentes volumes de amostra injetados.....	- 84 -
<b>Tabela 4.3:</b> Determinação de íons cloreto em águas minerais e de torneira.....	- 88 -
<b>Tabela 4.4:</b> Determinação de Cr(VI) em águas subterrâneas contaminadas e em ligas de Ni-Cr....	- 92 -
<b>Tabela 5.1:</b> Dimensões e volumes de algumas regiões dos sistemas propostos.....	- 106 -
<b>Tabela 5.2:</b> Condições utilizadas com o sistema FIA miniaturizado proposto (µFIA) e com um sistema FIA convencional [60] em termos do consumo de hidróxido de potássio para a injeção de 50 amostras..	- 113 -
<b>Tabela 5.3:</b> Condições utilizadas com o sistema FIA miniaturizado proposto (µFIA) e com um sistema FIA convencional [60] em termos do consumo de calceína para a injeção de 50 amostras.....	- 113 -
<b>Tabela 5.4:</b> Concentrações totais de íons Ca <sup>2+</sup> e Mg <sup>2+</sup> determinadas através do método fluorimétrico com o microssistema FIA e por volumetria de complexação com EDTA. ....	- 114 -

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Processo de gravação de canais por fotolitografia com corrosão por via úmida. Os detalhes estão descritos no texto..... - 7 -
- Figura 1.2:** Ilustração de perfis obtidos por corrosão anisotrópica e isotrópica de silício com orientação <100> [4]. ..... - 8 -
- Figura 1.3:** Esquema de um reator típico utilizado em corrosão por íon reativo (RIE)..... - 9 -
- Figura 1.4:** Processos envolvidos na corrosão química por via seca de substrato. .... - 10 -
- Figura 1.5:** Processo de fabricação por ablação à laser..... - 12 -
- Figura 1.6:** Técnica de microfabricação por pressão à quente: empregando fio metálico (a) e empregando molde em silício (b)..... - 14 -
- Figura 2.1:** Sistema FIA miniaturizado fabricado em PMMA. A-D: canais de acesso com tubos de Tygon®. O percurso entre A e D é de 53 cm e a superfície inferior do dispositivo apresenta-se selada com filme plástico adesivo. .... - 26 -
- Figura 2.2:** Célula de fluxo em “U” com caminho óptico de 10 mm. FO: Fibras ópticas plásticas com 1,0 mm de diâmetro, S: Suporte em teflon C: Célula e T: Tampa do suporte. Célula gentilmente fornecida pelo Prof. C. J. Patton (USGS, Denver, USA) ..... - 28 -
- Figura 2.3:** Célula de fluxo em tubo capilar de vidro com caminho óptico de 0,7 mm. FO: fibras ópticas plásticas com 1,0 mm de diâmetro, S: suporte metálico e C: capilar. Célula gentilmente fornecida pelo Prof. C. J. Patton (USGS, Denver, USA) ..... - 28 -
- Figura 2.4:** Configuração em linha única proposta para injeção direta da amostra no. CR: solução carregadora (1-10 fenantrolina  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5), AM: soluções das amostras, BP: Bomba peristáltica (*indicação das vazões em  $\text{mL min}^{-1}$* ), V1 e V2: válvulas solenóides de três vias desligadas (*linhas pontilhadas indicam a via fechada*), D: descarte TT: tubos de Tygon® para conexão do sistema à cela de fluxo, CF: célula de fluxo, FD: fotodiodo e FO: fibras ópticas..... - 29 -
- Figura 2.5:** Configuração em linha única proposta para injeção hidrodinâmica da amostra. CR: solução carregadora (1-10 fenantrolina  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5), AM: soluções das amostras, BP: Bomba peristáltica (*indicação das vazões em  $\text{mL min}^{-1}$* ), V1-V4: válvulas solenóides de três vias desligadas (*linhas pontilhadas indicam a via fechada*), D: descarte, EA: canal de entrada da amostra, SA: Canal de saída da amostra, PA: “plug” amostragem ( $10 \mu\text{L}$ ), TT: tubos de Tygon® para conexão do sistema à cela de fluxo, CF: célula de fluxo, FD: fotodiodo e FO: fibras ópticas. .... - 30 -
- Figura 2.6:** Vista lateral dos canais gravados em PMMA (a) e ampliação mostrando detalhes das imperfeições (b). \*valores aproximados..... - 32 -
- Figura 2.7:** Célula de fluxo em vidro empregada para a realização da detecção fotométrica (a) e detalhe da janela com 0,5 mm de diâmetro (b)..... - 34 -
- Figura 2.8:** Diagrama obtido para a injeção hidrodinâmica dos padrões (a) e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  (b)..... - 35 -
- Figura 2.9:** Diagrama obtido para a injeção direta dos padrões (a) e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  (b). Picos realçados em cinza referem-se às injeções de limpeza.... - 35 -

<b>Figura 2.10:</b> Curvas analíticas construídas a partir das médias das alturas dos picos obtidos por injeção direta ou hidrodinâmica dos padrões.....	- 37 -
<b>Figura 3.1:</b> Estrutura típica de um oligômero de Uretana-Acrilato.....	- 41 -
<b>Figura 3.2:</b> Procedimento empregado no desenvolvimento de microssistemas em uretana-acrilato por fotolitografia profunda no ultravioleta. União da moldura de borracha, placa de acrílico e máscara (a), deposição do resiste (b), fechamento com outra placa de acrílico e exposição à radiação ultravioleta (d) e (e).....	- 43 -
<b>Figura 3.3:</b> Fotografias mostrando a deposição do resiste (a) e o conjunto fechado com o auxílio de grampos (b).....	- 44 -
<b>Figura 3.4:</b> Esquema simplificado das etapas de exposição e revelação do resiste. Exposição para formação da base dos canais (a), exposição com regiões protegidas pela máscara (b) e estrutura obtida após a revelação (c).....	- 45 -
<b>Figura 3.5:</b> Fotografias da expositora comercial (Fotolight MD2-A4, Carimbos Medeiros Ltda), empregada no procedimento de fotolitografia. Detalhe do painel frontal com temporizadores (a) e detalhe dos conjuntos de lâmpadas inferiores e superiores (b).....	- 45 -
<b>Figura 3.6:</b> Espectro da lâmpada luz negra utilizada na expositora comercial.....	- 46 -
<b>Figura 3.7:</b> Esquema do procedimento de selagem dos canais proposto por Fernandes e Ferreira [45].	- 47 -
<b>Figura 3.8:</b> Esquema do procedimento proposto para a selagem com o preenchimento prévio dos canais.....	- 48 -
<b>Figura 3.9:</b> Esquema do procedimento proposto para a selagem empregando uma camada de resiste com superfície não polimerizada. Exposição controlada do resiste (a), placa de resiste com superfície não polimerizada (b), união da placa de cobertura com a placa contendo os canais (c), aplicação de fluxo de nitrogênio gasoso para geração de atmosfera livre de oxigênio (d) e exposição final para selagem irreversível do sistema (e).....	- 49 -
<b>Figura 3.10:</b> Fotografia mostrando a expositora “home-made” desenvolvida para execução do procedimento de fotolitografia (a) e desenho do suporte vazado em Duratex <sup>®</sup> empregado para apoio do substrato sobre as lâmpadas (b).....	- 50 -
<b>Figura 3.11:</b> Fotografia de um microssistema fabricado em UA com agulhas hipodérmicas adaptadas para acesso das soluções de trabalho.....	- 51 -
<b>Figura 3.12:</b> Imagem ampliada mostrando a conexão de uma agulha hipodérmica ao microssistema.....	- 53 -
<b>Figura 3.13:</b> Micrografias de varredura eletrônica obtidas para os canais gravados por fotolitografia com uma expositora comercial (seção 3.1.2.1) empregando-se uma máscara contendo linhas com 350 µm de largura. Seções transversais dos canais selados (a) e (b), detalhes de um canal aberto em curva (c) e (d) e detalhes dos canais abertos para a integração de uma célula de fluxo fotométrica (e) a (g).....	- 55 -
<b>Figura 3.14:</b> Micrografias de varredura eletrônica obtidas para os canais gravados por fotolitografia com uma expositora “home-made” (seção 3.1.2.3) empregando-se uma máscara contendo linhas com 500 µm de largura. Seções transversais dos canais selados (a) e (b), detalhes de um canal aberto em curva (c) e (d) e detalhes dos canais abertos para a integração de uma célula de fluxo fotométrica (e) a (g).....	- 56 -

**Figura 3.15:** Posição relativa entre as lâmpadas e as linhas da máscara empregada para a gravação dos canais (a) e micrografias de varredura eletrônica dos canais gravados por exposição perpendicular (b) e paralela (c) das linhas em relação às lâmpadas. Os canais foram gravados com uma expositora comercial (seção 3.1.2.1) empregando-se uma máscara com linhas de 350  $\mu\text{m}$ . ... - 57 -

**Figura 3.16:** Fotografia de um dos dispositivos empregados para o estudo (relação entre a largura das linhas e dimensões dos canais) com indicação das larguras das linhas utilizadas em  $\mu\text{m}$  (a) e micrografia eletrônica de varredura indicando a largura (l) e profundidade (p) dos canais (b). ..... - 58 -

**Figura 3.17:** Relações entre a largura (a) e profundidade (b) dos canais com a largura da linha da máscara empregada. .... - 60 -

**Figura 3.18:** Micrografias ópticas obtidas para linhas com 100  $\mu\text{m}$  de largura impressas com impressora laser em transparência (a) e através da tecnologia de fotolito (b). ..... - 61 -

**Figura 3.19:** Micrografia eletrônica de varredura obtida para a seção transversal de um canal construído a partir de uma máscara tipo fotolito com linha de 100  $\mu\text{m}$ . ..... - 61 -

**Figura 3.20:** Micrografias de varredura eletrônica mostrando as diferenças entre os canais selados sob fluxo de nitrogênio (a) e na ausência deste fluxo (b). ..... - 63 -

**Figura 4.1:** Integração de células de fluxo fotométricas aos sistemas miniaturizados. Canal para adaptação para fibra e canal de detecção separados por paredes de 0,5 mm (a) e fibras acopladas diretamente ao canal de detecção (b). CF: Células de Fluxo CNF1: canal para adaptação da fibra óptica com 1,0 mm de diâmetro, CNF: Canais para adaptação das fibras ópticas com 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro, PR: parede com 0,5 mm de espessura, CD: Canal de detecção com 5,0 mm de caminho óptico, FO: Fibras ópticas. .... - 68 -

**Figura 4.2:** Fotografia de um microsistema em UA com sistema de amostragem (SA) e bobina de reação (BR) integrados e detalhes mostrando o caminho percorrido pela amostra durante as Injeções do menor volume (a), volume intermediário (b) e maior volume (c). ..... - 69 -

**Figura 4.3:** Configuração em linha única empregada para a determinação de cloreto em águas minerais: B1 e B2: Mini-bombas de pistão; V1-V4: mini-válvulas solenóides de três vias desligadas (*linhas pontilhadas indicam a via fechada*); C: Solução Carregadora; BR: bobina de reação com 13 cm, D: descarte; PA: "plug" de amostragem de 0,30  $\mu\text{L}$ , FO: Fibras ópticas e CF: Célula de fluxo (caminho óptico de 5 mm). ..... - 70 -

**Figura 4.4:** Fotografia do sistema utilizado para a determinação fotométrica de íons cloreto em águas minerais comerciais. B1 e B2: mini-bombas de pistão, C: reservatório da solução carregadora, A: reservatório da solução de amostra, D: reservatório para descarte, S: microsistema e V: mini-válvula solenóide. .... - 71 -

**Figura 4.5:** Configuração de fluxo proposta para a determinação fotométrica de íons  $\text{Cr(VI)}$ . DFC: solução de difenilcarbazida 0,05 % m/m em acetona 0,4% v/v, BP: Bomba peristáltica (*indicação das vazões em  $\mu\text{L min}^{-1}$* ), V1-V4: válvulas solenóides de três vias desligadas (*linhas pontilhadas indicam a via fechada*), BR: bobina de reação com 15 cm, D: descarte, CF: célula de fluxo, FD: fotiodo e FO: fibras ópticas. .... - 74 -

**Figura 4.6:** Curvas analíticas obtidas para a determinação de  $\text{Fe}^{2+}$  através do método fotométrico com o-fenantrolina empregando-se microsistemas com diferentes posicionamentos das fibras. .... - 78 -

**Figura 4.7:** Fotografia geral do microsistema proposto com indicação do sistema de amostragem (SA), bobina de reação (BR) e célula de fluxo (CF). ..... - 79 -

- Figura 4.8:** Imagens em seqüência (1, 2 e 3) para o procedimento de amostragem hidrodinâmica realizado com “plugs” de amostra de 0,09  $\mu\text{L}$  (a) e 0,22  $\mu\text{L}$  (b) à vazão de 300  $\mu\text{L min}^{-1}$ . CO: canal obstruído durante a seleção do volume de amostragem (preenchido previamente com água)..... - 82 -
- Figura 4.9:** Imagem mostrando o alargamento do “plug” de amostragem ao se utilizar a aspiração da amostra com vazões elevadas (aproximadamente 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ). A: Regiões onde a amostra avança sobre o reagente ..... - 82 -
- Figura 4.10:** Diagrama obtido para a injeção de “plugs” de amostras com diferentes volumes e fotografia indicando os referidos “plugs”. ..... - 83 -
- Figura 4.11:** Determinação fotométrica de íons cloreto em águas. Diagrama para injeções dos padrões (0,0-10,0  $\text{mg L}^{-1}$  em  $\text{Cl}^-$ ) e das amostras (a) e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  do analito (b). ..... - 86 -
- Figura 4.12:** Curva analítica construída com o uso do microssistema para a determinação de cloreto na faixa de concentração de 2,0 a 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  do analito. .... - 87 -
- Figura 4.13:** Determinação fotométrica de íons  $\text{Cr(VI)}$  em ligas de Ni-Cr e em águas contaminadas. Diagrama para injeções dos padrões (0,0-1,5,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) e das amostras (a) e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com 1,2  $\text{mg L}^{-1}$  do analito (b). R: Resposta indesejável obtida antes do sinal analítico. Picos em cinza referem-se às injeções para limpeza do sistema. .... - 89 -
- Figura 4.14:** Ampliação para o pico de limpeza obtido durante a substituição do padrão de 0,9  $\text{mg L}^{-1}$  pelo padrão de 1,2  $\text{mg L}^{-1}$  mostrando o aumento da resposta indesejável (R) ocasionada pelo aumento da vazão de amostragem. .... - 90 -
- Figura 4.15:** Curva analítica construída com o uso do microssistema para a determinação de  $\text{Cr(VI)}$  na faixa de concentração de 0,3 a 1,5  $\text{mg L}^{-1}$  do analito. .... - 91 -
- Figura 4.16:** Relação entre as concentrações determinadas através do método proposto e do método espectrofotométrico em batelada. .... - 93 -
- Figura 5.1:** Integração de uma célula de fluxo fluorimétrica ao sistema miniaturizado à base de uretana-acrilato. CF: Célula de Fluxo, CNF: Canais para fibras ópticas com 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro, FO: Fibras ópticas plásticas com 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro. .... - 98 -
- Figura 5.2:** Configuração em linha única com microssistema empregado para a determinação de fluoresceína em soluções aquosas. B1-B2: Mini-bombas de pistão; V1-V4: Mini-válvulas solenóides (desligadas); C: Solução Carregadora ( $\text{NaHCO}_3$  0,4  $\text{mmol L}^{-1}$ ); D: descarte; PA: “plug” de amostragem de 0,52  $\mu\text{L}$ ; BR: Bobina de reação com 13 cm; CF: Célula de fluxo, FBO: fibras ópticas, FTO: Filtro passa faixa (espectro de transmitância apresentado na Figura 5.8), FMP: Fotomultiplicadora. .... - 99 -
- Figura 5.3:** Microssistema FIA empregado para a determinação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em amostras de águas minerais. C1 e C2: Canais de acesso para confluência. .... - 101 -
- Figura 5.4:** Configuração com confluência empregada para a determinação fluorimétrica de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em amostras de águas minerais. B1-B3: mini-bombas de pistão; V1-V5: Mini-válvulas solenóides (desligadas); C1: solução carregadora ( $\text{KOH}$  0,02  $\text{mol L}^{-1}$ ); C2: solução do reagente (fluorexon 10  $\text{mgL}^{-1}$  em  $\text{KOH}$  0,02  $\text{mol L}^{-1}$ ) D: descarte; PA: “plug” de amostragem de 2,40  $\mu\text{L}$ ; P: ponto de confluência; BR: Bobina de reação com 15 cm CF: célula de fluxo, FBO: fibras ópticas, FTO: filtro passa faixa (espectro de transmitância apresentado na Figura 5.8), FMP: fotomultiplicadora. .... - 102 -
- Figura 5.5:** Microssistemas com células para detecção fluorimétrica desenvolvidos a partir de máscaras fotolitográficas com linhas de 400  $\mu\text{m}$  de largura (a) e 600  $\mu\text{m}$  de largura (b). SA: sistema de amostragem, BR: bobina de reação e CF: célula de fluxo. .... - 105 -

- Figura 5.6:** Determinação fluorimétrica de fluoresceína em soluções aquosas. Diagrama para injeções dos padrões (2,0-1,0 mg L<sup>-1</sup>) (a) e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com 1,0 mg L<sup>-1</sup> do analito (b). Picos em cinza referem-se às injeções para limpeza do sistema..... - 107 -
- Figura 5.7:** Curva analítica construída com o uso do microssistema para a determinação de fluoresceína na faixa de concentração de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>. ..... - 107 -
- Figura 5.8:** Espectros de: Emissão do LED utilizado como fonte de excitação, emissão do fluoróforo (excitado em 470 nm), e espectro de transmitância do filtro óptico utilizado. .... - 108 -
- Figura 5.9:** Imagem obtida com microscópio digital mostrando a confluência de uma solução saturada de KMnO<sub>4</sub> com uma solução de hidroxilamina (5% m/v) (a) e imagem comparativa mostrando o bombeamento da mesma solução de permanganato em ambos os canais de confluência (b). P: ponto de confluência. .... - 109 -
- Figura 5.10:** Determinação fluorimétrica de íons Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> em águas minerais. Diagrama para injeções dos padrões (0,0-125 µmol L<sup>-1</sup> em cálcio) e das amostras (a) e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com 100 µmol L<sup>-1</sup> do analito (b). R: pequeno ruído observado antes do sinal analítico. Picos em cinza referem-se às injeções para limpeza do sistema. .... - 111 -
- Figura 5.11:** Detalhe do sinal obtido para a injeção de um padrão com 3,0 mg L<sup>-1</sup> em Ca<sup>2+</sup> a partir do microssistema empregado para a determinação de fluoresceína (Figura 5.5 (a)). ..... - 111 -
- Figura 5.12:** Curva analítica construída com o uso do microssistema para a determinação de Ca<sup>2+</sup> na faixa de concentração de 25 a 125 µmol L<sup>-1</sup> (0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>) do analito. .... - 112 -
- Figura A 1:** Esquema do processo utilizado para a construção de sistemas rígidos em resina de poliéster. Espalhamento da cera fundida sobre um molde feito em elastômero à base de uretana-acrilato (a), “sanduíche” com uma placa de vidro (b), separação do molde de cera aderido ao vidro (c), deposição da resina líquida de poliéster (d), repouso por 24 h para polimerização (e) e separação do dispositivo do molde de cera (f). .... - 130 -
- Figura A 2:** Sistema FIA miniaturizado em resina de poliéster. .... - 131 -
- Figura A 3:** Sistema FIA miniaturizado em fotopolímero para flexografia (Cyrel<sup>®</sup>-DuPont). A-D: agulhas hipodérmicas, E: detalhe da célula de fluxo, FO: fibras ópticas, CF: cela de fluxo, CD: canal de detecção. .... - 132 -
- Figura B 1:** Circuitos eletrônicos do fotômetro: Acionamento dos LEDs (a) e amplificação do sinal (b), T: Transistor, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = 10 kΩ, RV<sub>1</sub> = 100 kΩ. .... - 138 -
- Figura B 2:** Ilustração do interior de uma de uma mini-bomba pistão (LPVX-0502150 B, Lee<sup>®</sup>). MP: motor de passo bipolar, P: pistão, R: reservatório e A: canais de acesso ao reservatório.... - 139 -
- Figura B 3:** Seqüência de bits necessária ao acionamento das mini-bombas de pistão (a) e conexão dos terminais das bombas com as pontes de transistores (b). Q1-Q4 e Q5-Q8: pontes de transistores integradas ao CI-L298. .... - 140 -
- Figura B 4:** Esquema do circuito “Driver” construído para controle das mini-bombas. D1-D9: diodos BYV96E de 2A. Valores das resistências indicadas em ohms. Todos os resistores são de ¼ w com exceção dos resistores R1 e R2 (5W). O esquema do circuito oscilador é apresentado na Figura B 5.... - 140 -
- Figura B 5:** Circuito oscilador (gerador de onda quadrada) utilizado como “clock” do CI L297 na Figura B 4. P: potenciômetro utilizado para ajuste da freqüência da onda gerada. .... - 141 -

- Figura B 6:** Ilustração do interior de uma mini válvula solenóide LHDA 0531415H. P: pistão, B: bobina, M: mola em aço inoxidável 430F, S1 e S2: selos em silicone, C: corpo em politereftalato de butileno (PBT). ..... - 142 -
- Figura B 7:** Circuito eletrônico para acionamento das mini-válvulas solenóides. T: transistor (ULN2001A) e S: válvula solenóide ..... - 142 -
- Figura B 8:** Esquema do circuito eletrônico desenvolvido para controle do sistema miniaturizado com um microcontrolador PIC16F819. .... - 143 -
- Figura B 9:** Fotografia com vista geral do sistema microcontrolado. “lap-top” para visualização gráfica e armazenamento dos dados (a), microssistema FIA (b) e módulo controlador construído com base no CI PIC 16F819..... - 144 -
- Figura B 10:** Painel frontal do módulo controlador proposto. Chave de energia (a), chave “condicionamento/análise” (b), chave “aspira/dispensa” (c), chave “amostrar” (d) e potenciômetros para ajuste das vazões das mini-bombas (e). ..... - 145 -
- Figura B 11:** Fluxograma do algoritmo proposto para uma determinação fotométrica simples a partir de um módulo controlador baseado no PIC 16F819. .... - 147 -
- Figura B 12:** Esquema do sistema de análise por injeção em fluxo miniaturizado empregado para a determinação de Fe(II): B1 e B2: mini-bombas de pistão; V1-V4: mini-válvulas solenóides (desligadas); C: solução carregadora (o-fenantrolina 1mmol L<sup>-1</sup> em tampão acetato pH 4,5); D: descarte; PA: “plug” de amostragem de 0,30 µL, FO: fibras ópticas e CF: célula de fluxo com caminho óptico de 5 mm..... - 149 -
- Figura B 13:** Diagrama obtido para injeções de soluções padrão de Fe(II) com 0,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> do analito. .... - 150 -
- Figura B 14:** Curvas analíticas obtidas a partir da média das alturas dos picos obtidos para injeções sucessivas de padrões em ordem crescente (curva 1) e decrescente de concentração (curva 2). - 150 -

# Capítulo

## 1

### *Introdução e Objetivos*

## 1.1 Introdução

Atualmente, a miniaturização de sistemas de análise tem sido um dos temas mais estudados na área de instrumentação e automação em Química Analítica. O grande interesse da comunidade científica por pesquisas nesta área deve-se, em grande parte, às características intrínsecas dos dispositivos miniaturizados como portabilidade, baixo consumo de reagentes e amostras e elevada frequência analítica, as quais reduzem consideravelmente os custos da análise e a geração de resíduos, proporcionando um desempenho adequado às exigências da sociedade moderna [1].

A idéia de construir um dispositivo com dimensões diminutas, capaz de efetuar todas as operações necessárias a uma análise química foi proposta por Manz et al. [2] com o conceito de microssistemas de análise total ( $\mu$ TAS, do inglês “Micro-Total Analytical Systems”), também conhecido como laboratório em um chip (“lab-on-a-chip”) [3]. Assim como um circuito integrado contém dezenas de componentes eletrônicos que desempenham funções distintas em um pequeno “chip”, um  $\mu$ -TAS deve possuir micro-bombas, micro-válvulas, reatores e detectores, que permitam realizar todo o processamento da amostra até a detecção do analito, empregando quantidades muito pequenas de reagentes através de um procedimento rápido e totalmente automatizado. Desde a introdução deste conceito, no início dos anos 90, grandes esforços têm sido empregados para a construção de dispositivos microfluídicos que preencham, ao menos em parte, estes requisitos.

O primeiro desafio no desenvolvimento de um  $\mu$ -TAS é criar um arranjo de minúsculos canais ao longo de um substrato que permita a manipulação dos fluidos no dispositivo. Para isto, muitas tecnologias vêm sendo desenvolvidas e aplicadas na construção de protótipos em diversos materiais. A literatura mostra que os primeiros dispositivos foram desenvolvidos a partir de materiais como silício, vidro e quartzo empregando-se as técnicas muito bem estabelecidas da indústria microeletrônica [4]. Estas tecnologias, embora permitam a construção de estruturas com ótima resolução, costumam exigir condições especiais tais como o uso de equipamentos de alto custo, salas com atmosfera livre de material particulado (sala-limpa) e soluções altamente concentradas, o que as tornam caras e inadequadas para o desenvolvimento dos microssistemas em laboratórios de Química convencionais.

Recentemente, entretanto, novas estratégias de fabricação têm sido propostas e aplicadas para a fabricação de microestruturas não só nestes materiais, mas principalmente, em polímeros, empregando-se condições mais favoráveis à aplicação em pequena escala, o que tem possibilitado a muitos grupos de pesquisa a oportunidade de desenvolvimento de pesquisas nesta área.

Nos últimos anos, os polímeros se tornaram uma excelente alternativa para a construção de microssistemas devido, principalmente, ao grande número de materiais disponíveis com diferentes propriedades químicas e físicas e à sua excelente biocompatibilidade [4 e 6]. Alguns trabalhos demonstram que, dependendo do tipo do polímero e da técnica empregada, um protótipo pode ser fabricado de forma simples e eficiente em apenas algumas horas, caracterizando um processo de prototipagem rápida [7], o qual é extremamente adequado para a aceleração dos estudos realizados nesta área.

Com o objetivo de atender a grande demanda da área bioanalítica por métodos simples e rápidos, capazes de processar um elevado número de amostras em tempo reduzido, estas novas tecnologias e materiais têm sido aplicados amplamente no desenvolvimento de microdispositivos para análises bioquímicas que empregam eletroforese [8]. Apesar disto, muitos trabalhos publicados recentemente têm demonstrado o uso eficiente destas mesmas estratégias para a construção de microssistemas para análise em fluxo ( $\mu$ FIA), os quais podem ser aplicados para a automação de diversos métodos analíticos de via úmida com desempenho superior ao demonstrado pelos sistemas FIA convencionais em relação a muitas figuras de mérito.

Neste contexto, o presente trabalho propõe novas estratégias para o desenvolvimento rápido e eficiente de sistemas analíticos miniaturizados em polímeros e a construção de microssistemas de análise em fluxo para a determinação fotométrica e fluorimétrica de espécies químicas.

### **1.1.1 Técnicas de microfabricação**

Nesta seção, algumas das técnicas usualmente empregadas para o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos serão brevemente descritas. Para um maior e melhor aprofundamento, o leitor pode e deve consultar excelentes artigos de revisão disponíveis na literatura [6, 9-11] e livros específicos sobre o assunto [4].

De uma maneira geral, as técnicas de microfabricação podem ser divididas em dois grandes grupos: o das técnicas clássicas, empregadas para o desenvolvimento de estruturas microscópicas em vidro silício e quartzo e o das técnicas de microfabricação em polímeros. As técnicas do primeiro grupo estão bem estabelecidas e vêm sendo empregadas com grande sucesso na construção de circuitos integrados (CI) pela indústria microeletrônica. As técnicas do segundo grupo são relativamente novas e baseadas, em sua maioria, na replicação da estrutura de um molde sobre a superfície de um polímero. É importante destacar, entretanto, que esta discriminação entre as técnicas é feita apenas para um melhor entendimento das mesmas e não significa, como será visto adiante, que não haja pontos em comum entre elas.

Para todas as tecnologias que serão descritas a seguir, o procedimento de construção dos dispositivos consiste basicamente em gravar os pequenos canais sobre um substrato plano, utilizando uma estratégia específica para transferência de imagens. Após este passo inicial, a estrutura deve ser selada com uma camada do mesmo substrato ou de outro material, com o objetivo de permitir a movimentação dos fluidos ao longo dos canais. Vale ressaltar, entretanto, que as técnicas de gravação e de selagem são independentes e, por este motivo, são apresentadas separadamente nesta breve discussão.

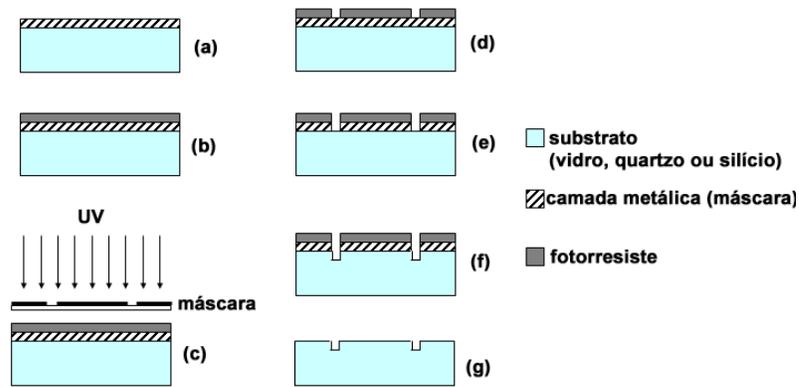
### 1.1.1.1 Técnicas Clássicas

#### 1.1.1.1.1 Fotolitografia com Corrosão por via Úmida

Como o próprio nome sugere, esta técnica compreende duas etapas distintas que permitem a gravação dos canais sobre o substrato sólido, a etapa fotolitográfica e a corrosão por soluções ácidas ou básicas concentradas. A etapa fotolitográfica consiste em criar um caminho, usualmente em polímero, que irá orientar a corrosão através da superfície do material. Na etapa de corrosão, os canais são gravados e o perfil dos mesmos é definido.

Conforme ilustrado na Figura 1.1(a), o processo é iniciado pela aplicação de uma camada extremamente fina (poucas centenas de angstroms) de um metal, usualmente cromo, sobre o substrato de vidro, silício ou quartzo. Esta camada pode ser depositada a partir da vaporização térmica do metal e é utilizada para suportar uma camada de polímero fotossensível líquido (fotorresiste), a qual é normalmente aplicada sobre a superfície do substrato por meio da técnica de recobrimento por rotação (“*spin coating*”) (Figura 1.1(b)). Após esta preparação, regiões específicas do fotorresiste são expostas à radiação ultravioleta, posicionando-se uma máscara apropriada entre a fonte de radiação e o conjunto substrato / fotorresiste (Figura 1.1(c)). Esta máscara é construída a partir de uma lâmina de vidro (transparente para o UV próximo) ou quartzo (transparente para o UV profundo) recoberta com uma camada metálica que determina a configuração desejada dos canais.

Durante a exposição do conjunto à radiação ultravioleta, pode-se obter dois resultados diferentes dependendo do tipo de fotorresiste empregado. Se este for do tipo positivo, as regiões expostas à radiação se tornam mais solúveis que as regiões não expostas e uma estrutura em relevo, que é a exata cópia das regiões opacas da máscara é obtida após a eliminação das regiões mais solúveis com o uso de um solvente adequado. Se o fotorresiste for do tipo negativo, as regiões expostas à radiação se tornam menos solúveis (devido à sua polimerização) que as regiões expostas e, deste modo, obtém-se uma estrutura em relevo que é a cópia exata das regiões transparentes da máscara. A Figura 1.1(d) mostra o resultado da revelação (eliminação das regiões mais solúveis) para um resiste positivo.

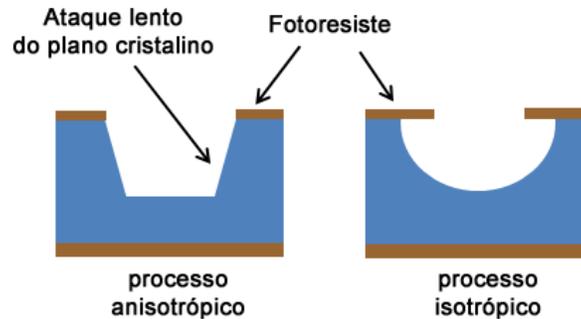


**Figura 1.1:** Processo de gravação de canais por fotolitografia com corrosão por via úmida. Os detalhes estão descritos no texto.

Com a revelação do fotorresiste, a camada de metal que ficou exposta é, então, eliminada por ataque ácido formando uma espécie de máscara que determinará os limites para a posterior corrosão via úmida do substrato (Figura 1.1 (e)). A gravação dos canais propriamente dita é efetuada ao se mergulhar o sistema em uma solução que ataca o substrato nas partes que não foram previamente protegidas com uma camada de cera ou polímero. Para a construção de microssistemas em vidro, apenas algumas soluções podem ser utilizadas para este propósito, sendo as mais típicas soluções de  $\text{HF}/\text{HNO}_3$  ou soluções de  $\text{HF} / \text{NH}_4\text{F}$ . Após a gravação dos canais, o que pode levar algumas horas (Figura 1.1 (f)), o resiste e a cobertura metálica são eliminados e o processo de selagem pode ser iniciado (Figura 1.1 (g)) .

Os canais construídos tanto por corrosão via úmida, quanto por corrosão via seca, a qual será discutida na próxima seção, podem apresentar perfis que estão intimamente relacionados com os processos envolvidos na eliminação do material. Os chamados processos isotrópicos são caracterizados por velocidades de corrosão que são semelhantes em todas as direções do sólido, enquanto que nos processos anisotrópicos a velocidade de corrosão é significativamente maior em algumas direções do que em outras. Como conseqüência, os canais produzidos por processos isotrópicos apresentam perfis arredondados, enquanto que os canais produzidos por processos anisotrópicos irão apresentar perfis mais agudos e variados, que irão depender principalmente da cristalografia do material e da

composição da solução corrosiva aplicada. A Figura 1.2 ilustra os diferentes perfis de estruturas que podem ser obtidas pela corrosão isotrópica e anisotrópica de silício com índice de Miller  $\langle 100 \rangle$  [4].



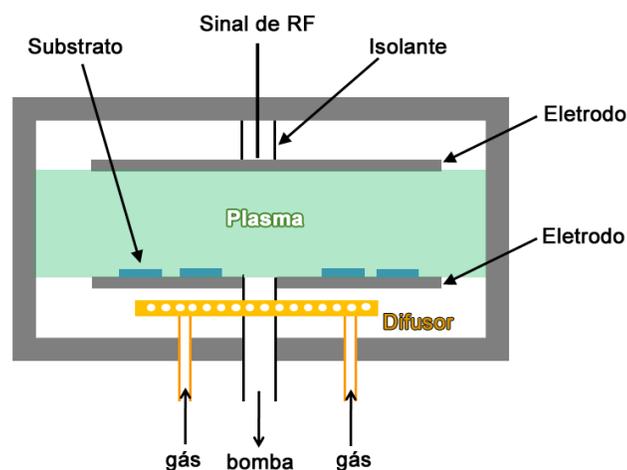
**Figura 1.2:** Ilustração de perfis obtidos por corrosão anisotrópica e isotrópica de silício com orientação  $\langle 100 \rangle$  [4].

Dependendo da aplicação final do dispositivo, haverá ou não a necessidade de se definir bem o perfil dos canais produzidos. Para a maioria das aplicações em Química Analítica, estes perfis não devem representar grandes problemas desde que as condições de operação sejam bem reproduzíveis. No entanto, se for desejável obter canais estreitos e profundos, os processos anisotrópicos serão preferidos em relação aos processos isotrópicos, onde os canais produzidos costumam apresentar larguras que são aproximadamente o dobro da sua profundidade. Em função da natureza não cristalina do vidro, processos de corrosão via úmida anisotrópicos não são possíveis para este material e conseqüentemente outros materiais como silício ou quartzo devem ser utilizados para a obtenção de canais com maiores razões de aspecto (razão entre a profundidade e a largura do canal). É importante relatar que as dimensões típicas dos canais construídos por esta técnica são de algumas dezenas de micrômetros, tanto para a largura quanto para a profundidade.

### 1.1.1.1.2 Fotolitografia com corrosão por via seca

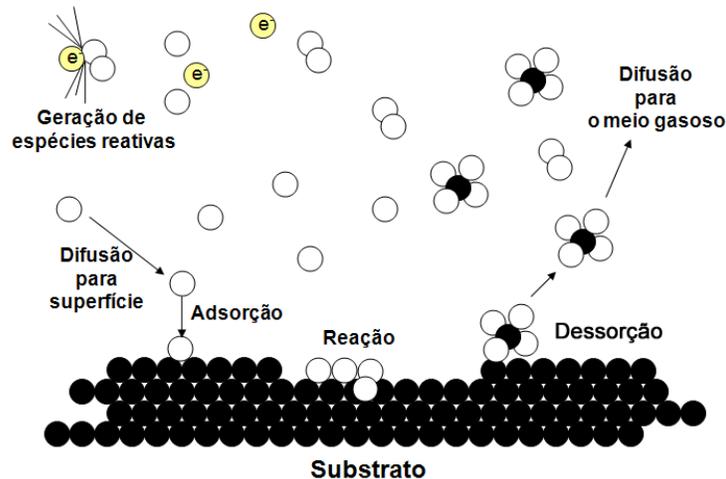
As técnicas de microfabricação com corrosão por via seca consistem em gravar estruturas sobre a superfície do material de interesse a partir da interação deste com espécies presentes em um plasma, usualmente de  $\text{CF}_4$ . Esta interação pode ser física, pelo bombardeamento de íons na superfície, química, através da reação química com espécies reativas presentes no plasma, ou por uma combinação de processos físicos e químicos dependendo das condições de operação.

Em uma das técnicas mais usuais, a Corrosão por Íon Reativo (RIE, do inglês “Reactive-Ion Etching”), a aplicação da energia de radiofrequência a um par de eletrodos imersos em uma câmara gasosa promove a aceleração de elétrons que estão dispersos no meio. A energia cinética destes elétrons é elevada a níveis que permitem romper as ligações das moléculas dos gases e levar a formação de radicais ou íons altamente reativos. O substrato, assim como na técnica de fotolitografia com corrosão por via úmida, é recoberto por uma camada de fotorresiste que define a configuração dos canais e, então, colocado entre os dois eletrodos. Com o plasma estabilizado, as regiões desprotegidas do material são atacadas pelas espécies reativas até que a profundidade desejada seja alcançada, o que irá depender, principalmente, do tempo de exposição ao plasma e da concentração relativa das espécies reativas e não reativas. O esboço de um reator típico é apresentado na Figura 1.3.



**Figura 1.3:** Esquema de um reator típico utilizado em corrosão por íon reativo (RIE).

O processo de corrosão em plasma pode ser dividido em seis etapas primárias, as quais estão ilustradas na Figura 1.4. Inicialmente, espécies reativas, como por exemplo  $\text{CF}_3^+$ ,  $\cdot\text{CF}_3$  ou  $\text{F}\cdot$ , são formadas pelo impacto de elétrons contra moléculas de  $\text{CF}_4$ . Em seguida, estas espécies difundem até a superfície do sólido onde ocorre a adsorção e a reação com o substrato. Finalmente, os produtos gasosos formados sofrem dessorção da superfície e são difundidos para o meio gasoso.



**Figura 1.4:** Processos envolvidos na corrosão química por via seca de substrato.

De uma maneira geral, esta técnica permite obter canais com melhores razões de aspecto que aqueles obtidos através da corrosão por via úmida. A escolha adequada dos gases reativos do plasma determina se as espécies iônicas irão ou não participar do ataque à superfície do substrato e, conseqüentemente, se o processo de corrosão será principalmente isotrópico ou anisotrópico ou uma combinação dos dois. Na ausência de efeitos cristalográficos, os canais terão perfis característicos de processos isotrópicos somente quando os íons não participarem da reação, enquanto que perfis anisotrópicos serão observados quando os íons participarem do processo. Isto ocorre porque os íons são acelerados de maneira perpendicular ao substrato, permitindo uma melhor seletividade do processo.

Apesar de permitir a construção de estruturas com boa razão aspecto, um equipamento completo para a fabricação de microdispositivos por RIE pode custar até US\$ 100.000 [12] e, portanto, é inviável para os laboratórios que desejam fabricar dispositivos em pequena escala. Além disso, a uniformidade dos canais ao longo do substrato é controlada pela concentração e distribuição do gás reagente dentro da

câmara, o que torna necessária a otimização de parâmetros como a pressão do sistema e a vazão do gás reagente, o que é usualmente trabalhoso. Por ser mais barata e exigir condições mais simples de trabalho, a técnica de corrosão por via úmida é preferível em relação ao ataque por corrosão por via seca quando não são necessários canais com dimensões sub-micrométricas.

### **1.1.1.2 Microfabricação em polímeros**

#### **1.1.1.2.1 Seleção do material de construção**

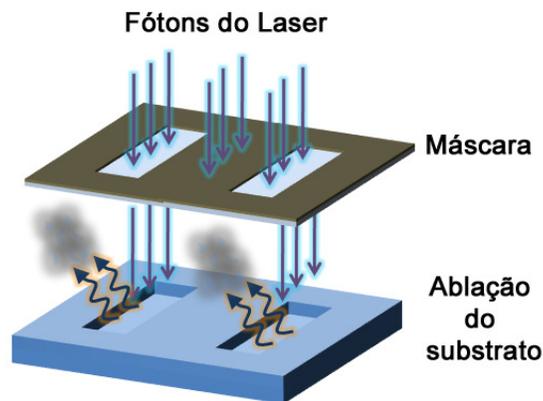
A escolha de um polímero adequado para a construção de um microssistema de análise é governada principalmente pela aplicação a que este sistema será submetido e pela aplicabilidade ou não das técnicas de fabricação que se tem disponível. Algumas das técnicas de fabricação mais usuais empregam a radiação ultravioleta [13] ou de raios-X [14] para causar a quebra do polímero e, assim, tornar possível a gravação dos canais. Dessa maneira, o material empregado deve absorver estas radiações e o produto desta exposição deve ser revelado (removido) por um revelador fotolitográfico.

Em muitos casos, a estratégia de detecção empregada no microssistema estará na forma de um monitoramento óptico, empregando, por exemplo, medidas de fluorescência ou de absorbância. Nestes casos, o material empregado deve ser transparente e não deve interagir com a luz empregada para a detecção, evitando assim o aparecimento de sinais de fundo.

Outra importante característica que um polímero deve apresentar para ser empregado na fabricação de microssistemas é que o mesmo deve ser inerte às condições de análise. Muitos polímeros são solúveis em solventes orgânicos específicos como, por exemplo, o poli(metilmetacrilato), que não é atacado por soluções concentradas de metanol mas perde a sua integridade em acetonitrila [15]. Além destas características, se o sistema for empregado em análises envolvendo eletroforese, o material de fabricação deve possuir propriedades térmicas e elétricas apropriadas para suportar os altos campos elétricos e dissipar adequadamente o calor e ainda apresentar propriedades de superfície que permitam o controle do fluxo.

### 1.1.1.2.2 Ablação à laser

No processo de fabricação por ablação à laser [13], a luz pulsada de um laser é absorvida pelo substrato, resultando em transições eletrônicas que causam a quebra das ligações da cadeia polimérica e geram ondas de choque que levam a produtos de decomposição gasosos como etileno, monóxido de carbono e dióxido de carbono, que são facilmente removidos. A Figura 1.5 mostra um esquema deste processo que utiliza uma máscara, usualmente construída em quartzo recoberto com cromo, para delimitar as regiões onde o material será retirado. Devido ao cromo não ser transparente ao laser de radiação UV, as áreas que definem a topologia do dispositivo não devem conter a camada do metal. Em muitos casos, lasers como o de fluoreto de criptônio, operando em 248 nm, com potência de aproximadamente 5 J/cm<sup>2</sup> é usado na ablação. A profundidade dos canais é determinada pela energia dos pulsos e pelo número de pulsos de laser que incidem em uma determinada área do substrato por um dado intervalo de tempo.



**Figura 1.5:** Processo de fabricação por ablação à laser

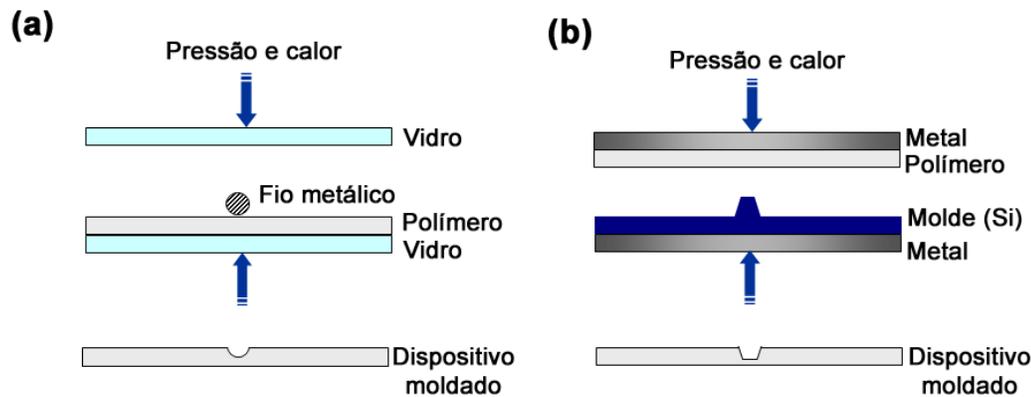
Como este processo pode ser empregado com diversos polímeros comerciais tais como poliestireno, nitrocelulose, poli(metilmacrilato) (PMMA), poli(etileno tereftalato) e poli(tetrafluoroetileno), produzindo estruturas com profundidade de até 37 µm com boa razão de aspecto, pode-se dizer que o mesmo é bastante adequado para a construção de microssistemas poliméricos. No entanto, a técnica não é muito simples e nem mesmo barata, o que pode dificultar a sua aplicação em pequena escala. Além disso, os canais apresentam, usualmente, rugosidade maior que aqueles confeccionados por técnicas de moldagem, discutidas a seguir.

Alternativamente, canais e outras estruturas podem ser gravados por um processo direto de ablação que não necessita de máscaras. Neste processo, o substrato polimérico é colocado sobre uma plataforma móvel, controlada por computador, que guia a superfície do material sob um feixe de laser de pequeno diâmetro. Do mesmo modo que o processo direto, a profundidade dos canais é determinada pela potência do laser e pelo tempo de exposição do material, mas o “*layout*” deve ser definido através do software que controla os movimentos da plataforma. Esta alternativa pode tornar o processo menos custoso por não necessitar das máscaras, mas a produção em grande escala fica prejudicada por ser relativamente demorada comparada ao processo de ablação indireto.

### **1.1.1.2.3 Moldagem por pressão à quente**

São conhecidas duas maneiras para se gravar canais sobre substratos poliméricos empregando-se moldagem por pressão à quente. Na primeira [16], um fio metálico de pequeno diâmetro (cerca de 20  $\mu\text{m}$ ) é devidamente arranjado na geometria que define as dimensões físicas dos canais e o “*layout*” topográfico do sistema. Este fio é, então, colocado sobre o substrato e pressionado contra este empregando-se duas placas de vidro numa configuração em “*sanduíche*”, como mostra a Figura 1.6 (a). Com o aquecimento em estufa à temperaturas entre 100 e 180 °C, o polímero, antes rígido, torna-se flexível e a gravação dos canais no material acontece como consequência da pressão do fio sobre a superfície. A falta de reprodutibilidade deste processo é, seguramente, a sua maior limitação, o que faz com que seja utilizado na fabricação de dispositivos utilizados em estudos iniciais.

O segundo processo [16, 17] é bastante semelhante ao primeiro, sendo que a principal diferença está apenas na substituição do fio metálico por moldes construídos em silício ou quartzo, através de técnicas descritas nas seções 1.1.1.1 e 1.1.1.1.2, e na prensagem em “*sanduíche*” feita agora entre duas placas de metal ao invés das placas de vidro, (Figura 1.6 (b)). Neste caso, o processo é também bastante simples e obtém-se uma melhora na reprodutibilidade em relação ao método que se emprega fios.



**Figura 1.6:** Técnica de microfabricação por pressão à quente: empregando fio metálico (a) e empregando molde em silício (b).

Os canais construídos por meio destas técnicas reproduzem muito bem as estruturas utilizadas como moldes e proporcionam baixa rugosidade às paredes. Entretanto, esta técnica só pode ser aplicada à polímeros rígidos como PMMA, o que inviabiliza a construção de dispositivos em elastômeros.

#### 1.1.1.2.4 Moldagem por injeção

Assim como a técnica de moldagem por pressão à quente, esta técnica consiste em replicar a estrutura de um molde sobre um substrato polimérico. A diferença é que o substrato a ser utilizado nesta técnica deve se apresentar inicialmente em uma forma líquida pouco viscosa para que possa então ser injetada em uma câmara que contém o molde. Após a polimerização assistida por calor, o molde é separado do polímero e obtêm-se os canais gravados sobre o polímero sólido. Novamente, pode-se utilizar moldes de silício para a confecção de microssistemas por esta técnica. Entretanto, se estruturas com melhor razão de aspecto são desejadas, deve-se utilizar um molde metálico, usualmente de níquel eletrodepositado sobre silício, construído a partir do chamado processo LIGA [14].

O processo LIGA consiste basicamente de três etapas, a litografia, a eletroformação e a moldagem, do alemão, “**L**ithographie, **G**alvanic and **A**bformung”. Na etapa litográfica, desenvolve-se uma estrutura polimérica de fotorresiste sobre a superfície de um material como silício. Em seguida, depósitos metálicos, usualmente de níquel, são formados sobre o silício a partir da eletroformação nas regiões reveladas do fotorresiste. Com a eliminação do fotorresiste remanescente, tem-se

uma estrutura metálica apoiada sobre uma lâmina de silício que pode ser utilizada no processo de moldagem de polímeros. Para que as estruturas metálicas construídas por este processo apresentem excelentes razões de aspecto, é necessário realizar o processo de fotolitografia do resiste adequado pela exposição do mesmo à um feixe extremamente colimado de raios-X. Isto deve ser feito, preferencialmente, utilizando-se as linhas de emissão desta natureza obtidas a partir de um acelerador do tipo Síncrotron.

A técnica de moldagem por injeção permite obter sistemas em materiais poliméricos rígidos, ou mesmo em elastômeros, desde que uma resina líquida destes materiais esteja disponível e seja relativamente fácil de polimerizar. No entanto, como qualquer processo de replicação por moldes, a razão de aspecto e a rugosidade das paredes dos canais estão intimamente relacionadas com a qualidade do molde construído e, como visto, um molde de ótima qualidade é muitas vezes obtido por um processo complexo, significativamente caro e que é indisponível para a maioria dos centros de pesquisa. O único acelerador Síncrotron da América do Sul encontra-se em Campinas, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) [18].

### **1.1.1.3 Outras alternativas**

Recentemente, novas alternativas ao desenvolvimento de microssistemas vêm sendo propostas. Microssistemas com canais construídos a partir de depósitos de toner de impressora a laser sobre filmes de poliéster foram desenvolvidos por do Lago et al.[19]. Belloy et al. [20] desenvolveram uma técnica de fabricação de microcanais em vidro a partir da corrosão do substrato por um feixe de partículas sólidas (jateamento), empregando máscaras e rotação do substrato. Wu e colaboradores [21] empregaram um arranjo de microlentes para a construção de microssistemas a partir de fotolitografia com escala de cinza. Watanabe [22] demonstrou a possibilidade de construir canais microfluídicos a partir da impressão das estruturas sobre vidro com uma impressora jato de tinta. Vários trabalhos têm demonstrado o uso de micro-fresas para a gravação de microcanais em PMMA [23, 24].

#### **1.1.1.4 Técnicas empregadas para a selagem dos canais**

Um dos passos mais críticos no desenvolvimento de dispositivos microfluídicos está em selar adequadamente os canais gravados no substrato para possibilitar a movimentação de fluidos ao longo destes sistemas. As duas principais categorias de técnicas utilizadas para este propósito são a selagem direta e a selagem com camada intermediária.

As técnicas de selagem direta são utilizadas em sua maioria para selar os canais abertos sobre vidro, silício ou quartzo e consistem basicamente em unir a lâmina que contém os canais e a lâmina de cobertura pela aplicação de uma dada pressão em um ambiente de alta temperatura. Em todas as técnicas desta categoria é imprescindível que ambas as lâminas apresentem superfícies extremamente planas e com baixa rugosidade e que, além disso, estejam completamente limpas, o que implica eliminar cuidadosamente todos os resíduos de coberturas que foram aplicadas durante o processo de gravação dos canais e trabalhar em ambiente livre de material particulado (sala limpa). Um exemplo de selagem direta que é utilizada para unir Si/Si, vidro/vidro ou vidro/Si é a chamada Selagem Térmica Assistida por Campo, ou, simplesmente, Selagem Anódica [4]. Nesta técnica, as lâminas são colocadas em contato, sob pressão a uma temperatura maior que 400 °C e a aplicação de um campo elétrico por meio de uma fonte de corrente contínua com tensão da ordem de 1 kV proporciona a formação de ligações químicas irreversíveis entre os substratos.

Outro exemplo de selagem direta é a selagem com ativação de superfície, a qual é normalmente aplicada para dispositivos à base de PDMS [7], mas que também pode ser utilizada para melhorar a selagem térmica em dispositivos em PMMA [25]. Neste procedimento, as superfícies dos substratos são pré-tratadas com plasma de oxigênio e outros processos químicos para aumentar a sua reatividade e, após esta etapa, ambas as placas são colocadas em contato, com ou sem auxílio de pressão externa e à altas temperaturas, possibilitando a união irreversível das mesmas. Os grandes inconvenientes da utilização desta técnica são o custo elevado para o tratamento com plasma e o pequeno intervalo de tempo com que as superfícies se mantêm ativadas, de modo que todo o procedimento de selagem, incluindo o alinhamento das estruturas, deve ser realizado de forma rápida.

As técnicas de selagem com camada intermediária podem ser utilizadas para a maioria dos substratos e requerem, na maioria das vezes, condições menos severas de limpeza que as técnicas de selagem direta, tornando o processo significativamente mais barato, em termos de condições operacionais. Além disso, como tem sido mostrado em trabalhos recentes [26, 27], algumas destas técnicas não exigem o uso de temperaturas muito elevadas, o que poderia acarretar a deformação dos canais e/ou danos aos componentes e sensores integrados aos microssistemas. Em todas as técnicas desta categoria, uma camada fina de ligante (metal ou adesivo) é depositada de maneira uniforme sobre a superfície de uma das lâminas e, após o alinhamento e contato entre as duas partes, a aplicação de uma pequena pressão em temperaturas relativamente baixas permite a união dos substratos. Um exemplo deste tipo de técnica é a chamada selagem adesiva, na qual o ligante pode ser um adesivo epóxi ou uma resina fotopolimerizável por radiação UV, que permite a selagem em temperatura ambiente. A principal limitação deste tipo de técnica é, sem dúvida, a possibilidade de entupimento dos canais pela própria camada intermediária, o que exige cuidados especiais.

### **1.1.2 Microssistemas para análise em fluxo**

Uma das primeiras propostas para a miniaturização de sistemas de análise por injeção em fluxo foi realizada por Ruzicka e Hansen em 1984 [28]. Os autores propuseram a integração dos canais, do sistema de amostragem e do sistema de detecção em um pequeno bloco de PVC. Os canais semicirculares com de seções transversais de área de  $0,8 \text{ mm}^2$  foram gravados no substrato empregando-se a moldagem por pressão, sendo o dispositivo selado com outra placa do substrato com uso de cola. Devido à pequena redução nas dimensões do sistema, não foram observadas vantagens significativas no uso deste dispositivo em relação aos sistemas em fluxo convencionais, de modo que os ganhos em termos de consumo de reagentes e de geração de resíduos foram limitados.

Atualmente, as técnicas de fabricação descritas nas seções anteriores estão sendo empregadas com maior frequência para o desenvolvimento de sistemas de

análise em fluxo miniaturizados, o que tem possibilitado ganhos efetivos em relação aos sistemas com maior escala.

A técnica de fotolitografia com corrosão por via úmida, seção 1.1.1.1.1, foi empregada por Wang e Pumera [29] para a construção de um microssistema em vidro cujos canais apresentavam 50  $\mu\text{m}$  de largura e 20  $\mu\text{m}$  de profundidade, sendo utilizada uma placa do mesmo material para a selagem assistida por pressão e alta temperatura. O dispositivo foi desenvolvido com um “layout” em cruz que permitiu a injeção de volumes muito pequenos de amostra (3 nL) e o bombeamento eletrosmótico das soluções. Para a determinação amperométrica de traços de 2,4,6-trinitrotolueno, um eletrodo de disco à base de amálgama de mercúrio/ouro foi adaptado externamente ao microssistema na extremidade do canal de saída, permitindo a determinação do analito em uma faixa linear de concentração de 20-100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O procedimento adotado pelos autores possibilitou uma frequência analítica de 150 injeções por hora, com um limite de detecção de 7,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , mostrando um ótimo desempenho do dispositivo para a determinação em questão.

Em um trabalho desenvolvido por Leelasattathkul et al. [30], a fotolitografia com corrosão por via úmida foi também empregada para a gravação, sobre vidro, de canais com 200  $\mu\text{m}$  de largura e 50  $\mu\text{m}$  de profundidade. A selagem do sistema foi realizada com uma camada de PDMS, a qual foi confeccionada com pequenos furos que permitiram o acesso das soluções de trabalho e a integração de uma célula de fluxo espectrofotométrica com 10 mm de caminho óptico. O sistema foi aplicado à determinação de íons Cu(II) em águas residuais a partir do método baseado na reação do analito com o reagente cromogênico zincon em meio básico, sendo encontrado um limite de detecção de 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As medidas foram realizadas empregando-se uma bomba peristáltica convencional para aspiração de todas as soluções ao longo dos microcanais à uma vazão de apenas 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ , o que proporcionou uma frequência analítica de 30 injeções por hora e uma redução de 200 vezes no consumo de reagentes em relação ao método em fluxo convencional.

Um microssistema FIA com canais apresentando 200  $\mu\text{m}$  de profundidade e 700  $\mu\text{m}$  de largura foi construído empregando-se a técnica de corrosão por íon reativo (seção 1.1.1.1.2) de uma placa de silício e a selagem anódica com uma placa de vidro, em um trabalho realizado por Baeza et al. [31]. O dispositivo com célula para detecção fotométrica integrada foi aplicado à determinação de íons nitrito em

águas residuais empregando-se a estratégia de multicomutação das soluções para melhorar a mistura ao longo dos canais. Diferentes frequências de comutação foram estudadas empregando-se vazões entre  $250 \mu\text{L min}^{-1}$  e  $310 \mu\text{L min}^{-1}$ , sendo encontrado um melhor desempenho em termos do limite de detecção ( $0,17 \text{ mg L}^{-1}$ ) para a menor das vazões estudadas.

Kruanetr et al. [32] propuseram um método simples para a determinação Fe (III) em águas baseado no uso de um microsistema de análise em fluxo. Um dispositivo planar com os canais dispostos na forma de “T” foi construído por ablação a laser do PMMA (seção 1.1.1.2.2) e selado com uma camada de PDMS, sobre a qual foram moldados os canais para acesso das soluções e uma célula de fluxo para detecção fotométrica com 10 mm de caminho óptico. Os canais construídos sobre o PMMA apresentavam  $200 \mu\text{m}$  de largura e  $50 \mu\text{m}$  de profundidade, enquanto o canal empregado para a detecção, construído sobre o PDMS, apresentava  $0,8 \text{ mm}$  de diâmetro. O procedimento utilizado pelos autores envolveu a injeção de volumes de  $5 \mu\text{L}$  das amostras em fluxo de solução do sal R-Nitroso com detecção em  $720 \text{ nm}$  do complexo formado entre o Fe(III) e o reagente cromogênico. A solução do fluido carregador foi bombeada à vazão de  $30 \mu\text{L min}^{-1}$ , proporcionando a frequência analítica de 40 injeções por hora, com geração de apenas  $2,0 \text{ mL}$  de resíduo por hora de trabalho. Os resultados obtidos para a determinação de Fe(III) em águas residuais mostraram resultados plenamente concordantes com aqueles obtidos com o método de referência (FAAS).

Em um trabalho realizado por Liu et al. [33], a ablação por laser foi também utilizada para a construção de um microsistema aplicado para a determinação da demanda química de oxigênio em águas. O dispositivo foi construído com três camadas de PMMA contendo estruturas diferentes, as quais foram alinhadas e unidas com a aplicação de pressão e calor. Canais com  $200 \mu\text{m}$  de largura e  $100 \mu\text{m}$  de profundidade foram dispostos de forma a permitir a confluência das soluções das amostras com uma solução de dicromato de potássio em meio ácido e a mistura das mesmas em uma bobina de reação com  $15 \text{ cm}$  de comprimento. Ao final desta bobina, uma câmara circular com  $3,0 \text{ mm}$  de diâmetro foi projetada para permitir a adição de outros reagentes, como o hidróxido de sódio e o luminol e para proporcionar uma maior área para detecção por quimioluminescência, a qual foi possível devido à adaptação, abaixo da câmara, de uma pequena fotomultiplicadora.

Os autores demonstraram que embora o método exija o uso de um reagente à base de crômio ( $K_2Cr_2O_7$ ), o volume de resíduo gerado é bastante pequeno devido à baixa vazão utilizada ( $150 \mu\text{L min}^{-1}$ , no total), tornando o tratamento final mais fácil e menos oneroso.

A moldagem por injeção (seção 1.1.1.2.4) foi utilizada por Destandau et al. [34] no desenvolvimento de um sistema microfluídico para análise em fluxo à base de PDMS, o qual foi aplicado à determinação fluorimétrica de íons potássio em formulações farmacêuticas. Os canais com  $200 \mu\text{m}$  de largura e  $100 \mu\text{m}$  de profundidade foram dispostos em uma configuração em forma de “Y” e selados com uma lâmina de vidro, permitindo a confluência das soluções das amostras com a solução de um sensor molecular fluorescente, especialmente desenvolvido para proporcionar sensibilidade e seletividade ao analito em questão. Os autores demonstraram que o método proposto permite a determinação de íons potássio sem a necessidade da separação prévia dos outros íons da amostra, em um ensaio que leva apenas 10 s para ser realizado.

A microusinagem tem se tornado também uma ótima alternativa para a construção de microssistemas para análise em fluxo à base de polímeros rígidos como o PMMA. Nishihama et al. [35] utilizaram uma micro-fresa e este mesmo material para construir um dispositivo microfluídico com coluna de separação integrada que permite a separação e a quantificação de proteínas em urina. A coluna foi integrada ao dispositivo em um de seus canais de entrada a partir de uma cavidade microfabricada, apresentando 30 mm de comprimento, 2 mm de largura e 1 mm de profundidade. Esta cavidade foi preenchida com cerâmica de hidroxapatita e vidro, sendo posteriormente selada com outra lâmina de PMMA por pressão e calor. O procedimento proposto pelos autores consistiu em bombear seqüencialmente, com o auxílio de uma bomba de seringa e de uma válvula de seis portas, as soluções da amostra, do eluente e do carregador confluindo as mesmas com a solução do reagente cromogênico, o qual foi empregado para a determinação fotométrica do analito. Empregando-se a vazão total de apenas  $40 \mu\text{L min}^{-1}$ , os autores obtiveram resultados bastante satisfatórios com um limite de detecção de aproximadamente  $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os testes realizados com albumina bovina.

Rainelli et al. [36] também desenvolveram um microssistema de análise por injeção em fluxo em PMMA, no qual os canais, com perfil trapezoidal medindo 150

$\mu\text{m}$  de profundidade e 180 a 360  $\mu\text{m}$  de largura, foram produzidos por microusinagem. Empregando bombas de seringa para a propulsão dos fluidos, o protótipo foi aplicado para a determinação fotométrica de íons Fe(II), cloreto e nitrito, à frequência analítica de 5 determinações por minuto, com o consumo de apenas 600  $\mu\text{L}$  dos reagentes para um período de 1 hora. O dispositivo foi também avaliado quanto à possibilidade de bombeamento eletrosmótico, sendo obtidos resultados plenamente satisfatórios.

## **1.2 Objetivos**

Este trabalho teve como objetivos a construção de microssistemas para análise em fluxo empregando-se polímeros e técnicas alternativas de microfabricação e a avaliação do desempenho analítico dos dispositivos propostos na determinação fotométrica e fluorimétrica de espécies inorgânicas.

# Capítulo 2

***Sistema de análise em Fluxo em  
poli(metilmetacrilato) (PMMA)***

## 2.1 Sistema de análise em fluxo à base de PMMA

Nesta primeira proposta, um sistema em fluxo à base de poli(metilmetacrilato) (PMMA) foi desenvolvido e aplicado à determinação fotométrica de íons  $\text{Fe}^{2+}$  em medicamentos. Conforme será discutido neste capítulo, o dispositivo não pode ser classificado como um microsistema, porém as técnicas empregadas para a gravação e selagem dos canais poderão ser utilizadas para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos em trabalhos futuros.

### 2.1.1 Parte Experimental

#### 2.1.1.1 Fabricação

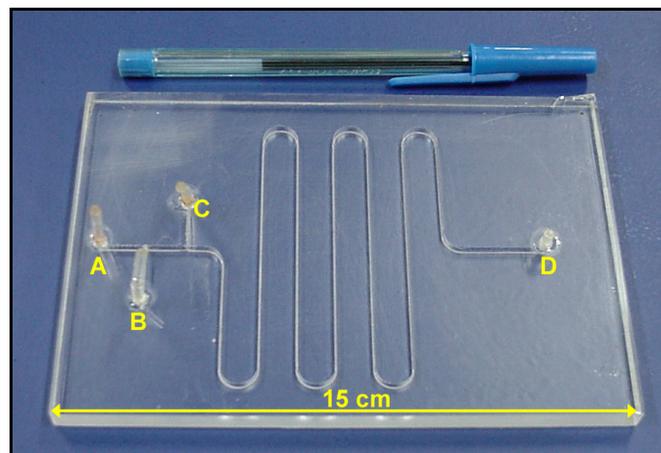
O sistema FIA miniaturizado em PMMA proposto foi construído a partir da técnica de ablação a laser deste polímero (seção 1.1.1.2.2), com posterior selagem dos canais com um filme plástico adesivo. Todo o procedimento de gravação dos canais foi realizado por pesquisadores do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS [18] empregando-se uma cortadora a laser comercial (Hamazaky<sup>®</sup>), a qual foi equipada com uma mesa móvel programável que permitiu a fixação do substrato e o deslocamento controlado do mesmo sob o feixe do laser ( $\text{CO}_2$ , 5 kw).

Para permitir a ablação de regiões específicas do polímero com controle do tempo de exposição, o software de automação da mesa móvel foi “alimentado” com as coordenadas que definiram a disposição bidimensional dos canais e com os parâmetros que controlaram a velocidade de deslocamento do substrato. Além destas variáveis, foram ajustadas também algumas propriedades do laser tais como o diâmetro do feixe e a frequência dos pulsos. É importante salientar que os parâmetros citados acima foram estabelecidos por técnicos do LNLS durante a construção do dispositivo no ano de 2002 e, infelizmente, estes valores não foram relatados ao nosso grupo de pesquisa para constar na redação deste trabalho.

Sob estas condições, canais apresentando seções transversais retangulares com 200  $\mu\text{m}$  de largura e 4,5 mm de profundidade foram gravados sobre uma das superfícies de uma placa de PMMA de 15 cm de comprimento, 10 cm de largura e 0,8 cm de espessura, seguindo a disposição apresentada na Figura 2.1, na qual o percurso entre o ponto A e o ponto D apresenta 53 cm.

Para a selagem, a placa de PMMA foi devidamente lavada com água e detergente e seca posteriormente em fluxo de ar comprimido, com o objetivo de eliminar eventuais resíduos. Em seguida, um filme plástico adesivo (Con-tact<sup>®</sup>, Vulcan) foi aplicado sobre a superfície do polímero na qual os canais foram abertos, tendo-se o cuidado de eliminar possíveis bolhas de ar. Após a aplicação, o dispositivo selado foi deixado em repouso por 72 horas, garantindo a adesão completa do filme ao PMMA.

Para permitir o acesso das soluções ao sistema, quatro furos com diâmetro de 2,5 mm foram confeccionados no substrato, do lado oposto ao que foi aplicado o plástico adesivo e a estes furos foram colados tubos de Tygon<sup>®</sup> (utilizados em sistemas FIA convencionais) com 2,0 mm de diâmetro interno. Como mostra a Figura 2.1, os furos foram confeccionados nas extremidades dos canais de acesso, indicados pelas letras A, B, C e D.



**Figura 2.1:** Sistema FIA miniaturizado fabricado em PMMA. A-D: canais de acesso com tubos de Tygon<sup>®</sup>. O percurso entre A e D é de 53 cm e a superfície inferior do dispositivo apresenta-se selada com filme plástico adesivo.

### **2.1.1.2 Avaliação da selagem e das conexões com o mundo exterior**

O sistema proposto foi submetido a um teste simples para verificar a eficiência do procedimento de selagem e da estratégia de conexão com o mundo exterior. Neste teste, uma bomba peristáltica foi empregada para impulsionar água destilada ao longo dos canais, aumentando-se gradativamente a vazão do fluido. Durante este procedimento, realizado por aproximadamente 1 hora, foi efetuada a inspeção visual das conexões e da junção entre a superfície do polímero e a camada de selagem (filme adesivo) com o objetivo de verificar possíveis vazamentos e/ou irregularidades.

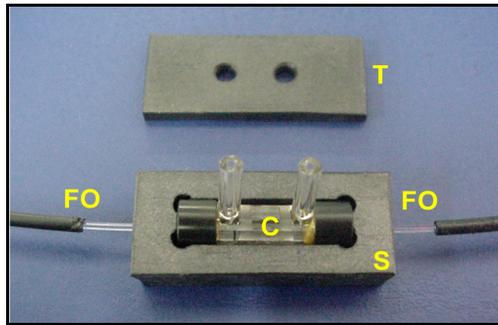
### **2.1.1.3 Avaliação do sistema para a determinação fotométrica de íons $\text{Fe}^{2+}$ em medicamentos**

O sistema foi avaliado para a determinação fotométrica de íons  $\text{Fe}^{2+}$  em 5 formulações de sulfato ferroso empregando-se o método da o-fenantrolina [37]. Nesta seção, serão descritas as estratégias utilizadas para realizar a detecção fotométrica e a injeção da amostra no sistema e os materiais e métodos empregados na determinação.

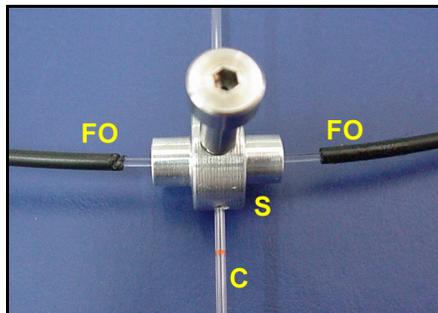
#### **2.1.1.3.1 Sistema de Detecção: Adaptação de células de fluxo**

Para a realização de medidas fotométricas com o sistema miniaturizado em PMMA, propôs-se a adaptação externa de uma célula de fluxo capilar e o uso de fibras ópticas para guiar a radiação da fonte até a célula e desta para o detector.

Foram avaliadas duas células de fluxo para este propósito, uma célula capilar em “U” com diâmetro interno de 1,0 mm e caminho óptico de 1,0 cm e uma célula mais simples, na qual o diâmetro interno de um tubo capilar de vidro com 0,7 mm foi empregado como caminho óptico. A Figura 2.2 e a Figura 2.3 mostram fotografias destas células e dos seus respectivos suportes, os quais foram utilizados para a fixação de fibras ópticas plásticas com 1,0 mm de diâmetro. É importante relatar que a conexão do sistema de fluxo miniaturizado com as células fotométricas foram feitas com o auxílio de tubos de Teflon<sup>®</sup> e de Tygon<sup>®</sup> de modo semelhante ao realizado em sistemas FIA convencionais.



**Figura 2.2:** Célula de fluxo em “U” com caminho óptico de 10 mm. **FO:** Fibras ópticas plásticas com 1,0 mm de diâmetro, **S:** Suporte em teflon **C:** Célula e **T:** Tampa do suporte. Célula gentilmente fornecida pelo Prof. C. J. Patton (USGS, Denver, USA)



**Figura 2.3:** Célula de fluxo em tubo capilar de vidro com caminho óptico de 0,7 mm. **FO:** fibras ópticas plásticas com 1,0 mm de diâmetro, **S:** suporte metálico e **C:** capilar. Célula gentilmente fornecida pelo Prof. C. J. Patton (USGS, Denver, USA)

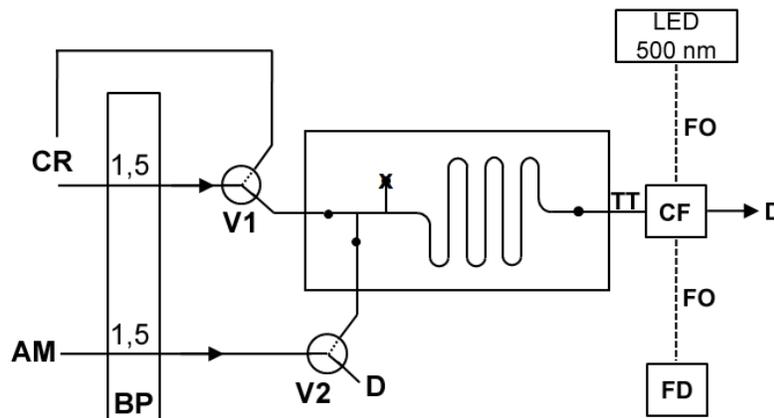
Para tornar o sistema de detecção mais compacto, um diodo emissor de luz (LED) emitindo em 500 nm foi utilizado como fonte de radiação e um fotodiodo (RS 308-067) foi empregado como transdutor. Estes elementos compunham um fotômetro “*home-made*” [38] utilizado para as medidas, o qual foi controlado por um microcomputador através de um programa desenvolvido em VisualBasic 5.0.

### 2.1.1.3.2 Configurações de fluxo em linha única: Injeção direta e hidrodinâmica da amostra

Foi também proposta para a avaliação do sistema em PMMA, a utilização de duas configurações de fluxo em linha única [39] que permitiram a inserção da amostra por injeção direta ou por amostragem hidrodinâmica [40].

A Figura 2.4 ilustra a configuração utilizada para injeção direta das soluções, na qual uma bomba peristáltica (Ismatec MP-13 R) e duas válvulas solenóides de três vias (Cole-Parmer Instrument Co. P/N. 01367-72) foram empregadas para a propulsão e direcionamento dos fluidos, respectivamente. Nesta configuração, quando ambas as válvulas estavam desligadas, o carregador era impulsionado até o detector e a solução da amostra descartada. Quando ambas as válvulas eram acionadas, o carregador era bombeado de volta ao seu reservatório e a amostra injetada no sistema. Deste modo, foi possível inserir diferentes volumes de amostra, controlando-se a vazão de bombeamento da solução e o tempo com que as válvulas permaneciam acionadas.

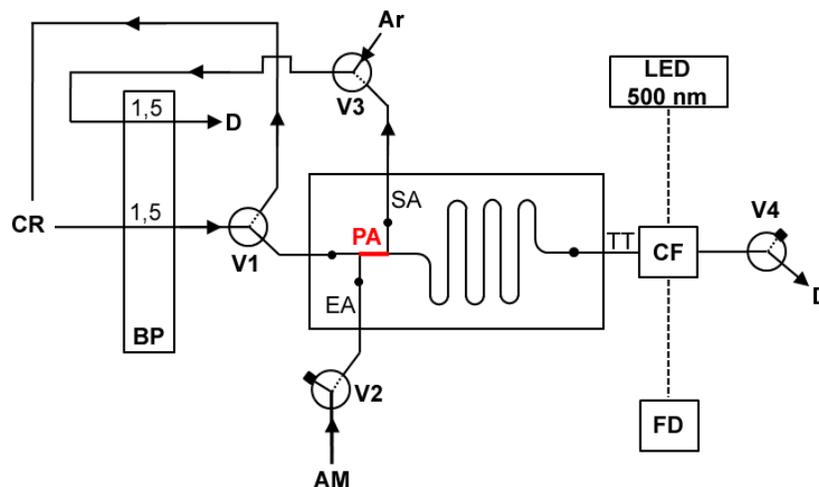
Para os estudos realizados neste trabalho, empregou-se a vazão de  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$  tanto para a solução carregadora quanto para as soluções das amostras com as válvulas permanecendo acionadas por 1,5 s durante o procedimento de amostragem. Nestas condições, volumes de aproximadamente  $38 \mu\text{L}$  foram injetados no sistema para obtenção dos sinais analíticos. Após a injeção, as válvulas foram desligadas e a amostra foi impulsionada até o detector, enquanto reagia com a solução carregadora. Vale dizer que a primeira injeção de um novo padrão ou de amostra foi efetuada mantendo-se as válvulas acionadas por aproximadamente 10 s, o que permitiu que a linha ligando o reservatório de amostra e o sistema fosse lavado com a própria solução de trabalho. Após a primeira injeção, utilizou-se o procedimento convencional com as válvulas permanecendo acionadas por 1,5 s.



**Figura 2.4:** Configuração em linha única proposta para injeção direta da amostra no. **CR:** solução carregadora ( $1-10$  fenantrolina  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão acetato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5), **AM:** soluções das amostras, **BP:** Bomba peristáltica (*indicação das vazões em  $\text{mL min}^{-1}$* ), **V1 e V2:** válvulas solenóides de três vias desligadas (*linhas pontilhadas indicam a via fechada*), **D:** descarte **TT:** tubos de Tygon® para conexão do sistema à cela de fluxo, **CF:** célula de fluxo, **FD:** fotodiodo e **FO:** fibras ópticas.

A configuração de fluxo empregada para a injeção hidrodinâmica das amostras no sistema está ilustrada na Figura 2.5. Nesta proposta, uma bomba peristáltica foi empregada para impulsionar a solução carregadora e para aspirar as soluções das amostras, enquanto quatro válvulas solenóides de três vias foram utilizadas para direcionar os fluidos. Quando todas as válvulas estavam desligadas (situação ilustrada na Figura 2.5), a solução carregadora era bombeada até o detector, uma vez que as válvulas V1 e V4 permitiam o fluxo livre neste sentido e as válvulas V2 e V3 evitavam a saída de fluido pelos canais laterais do sistema. Ao mesmo tempo, a válvula V3 permitia a aspiração de ar por uma de suas vias.

Com o acionamento concomitante de todas as válvulas, a solução carregadora era bombeada ao seu reservatório de origem e a amostra era aspirada através das válvulas V2 e V3 preenchendo o “plug” de amostragem (PA). Este “plug” foi definido pela distância entre os canais de entrada (EA) e de saída (SA) de amostra e apresentava um volume de aproximadamente 10  $\mu\text{L}$ . Quando todas as válvulas foram desligadas, esta zona de amostra foi impulsionada até o detector, reagindo com a solução carregadora ao longo da bobina de reação. Para o presente trabalho, a mesma vazão de 1,5  $\text{mL min}^{-1}$  foi utilizada para aspirar a amostra e para bombear a solução carregadora. O tempo de amostragem, tempo em que as válvulas permaneceram ligadas, foi de 5 s.



**Figura 2.5:** Configuração em linha única proposta para injeção hidrodinâmica da amostra. **CR:** solução carregadora (1-10 fenantrolina 1  $\text{mmol L}^{-1}$  em tampão acetato 0,2  $\text{mol L}^{-1}$  pH 4,5), **AM:** soluções das amostras, **BP:** Bomba peristáltica (indicação das vazões em  $\text{mL min}^{-1}$ ), **V1-V4:** válvulas solenóides de três vias desligadas (linhas pontilhadas indicam a via fechada), **D:** descarte, **EA:** canal de entrada da amostra, **SA:** Canal de saída da amostra, **PA:** “plug” amostragem (10  $\mu\text{L}$ ), **TT:** tubos de Tygon® para conexão do sistema à cela de fluxo, **CF:** célula de fluxo, **FD:** fotodiodo e **FO:** fibras ópticas.

Para ambas as configurações de fluxo, o controle das válvulas e do sistema de detecção foi realizado por um microcomputador equipado com uma interface eletrônica PCI9111DG/HR (Adlink Tech. Inc.) a partir de um programa escrito em VisualBasic 5.0.

### 2.1.1.3.3 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados no experimento eram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água desionizada. Os padrões com 0,0 a 10 mg L<sup>-1</sup> em Fe(II) foram preparados a partir da diluição de alíquotas de uma solução estoque acidificada de sulfato ferroso amoniacal contendo 500 mg L<sup>-1</sup> em Fe(II), a qual foi preparada pela dissolução da massa apropriada do sal (Reagen). As alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL aos quais foram adicionados 5 mL de uma solução de cloreto de hidroxilamina (Merck) 5% m/v, completando-se o volume com solução de ácido sulfúrico (Mallinckrodt) 0,05 mol L<sup>-1</sup>. A solução carregadora, 1-10 fenantrolina 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, foi preparada pela dissolução da massa apropriada do complexante em 100 mL de uma solução tampão acetato de sódio/ácido acético 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5.

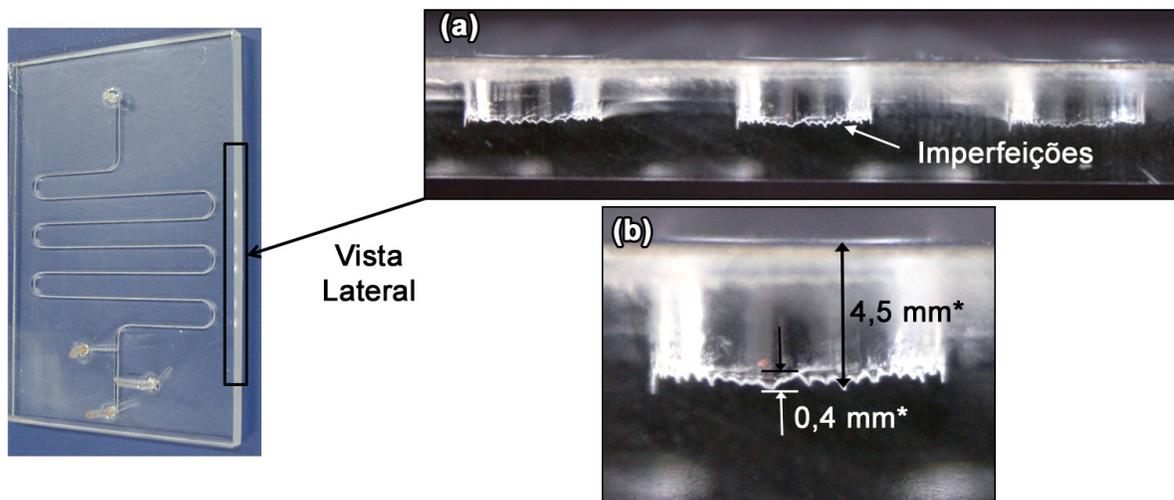
Três soluções estoque foram preparadas para cada um dos cinco medicamentos estudados (PerFer<sup>®</sup> comprimidos, NovoFer<sup>®</sup> comprimidos, VitaFer<sup>®</sup> comprimidos, Sulfer<sup>®</sup> solução e Combiron<sup>®</sup> solução). As soluções das amostras comercializadas em forma de comprimidos foram preparadas transferindo-se a massa adequada (de 0,1 a 0,2 g) de um comprimido, devidamente pulverizado em almofariz, para um béquer contendo cerca de 50 mL de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup>. Após a sonicação por 20 min, a suspensão resultante foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com as soluções de lavagem do sólido filtrado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup>. As soluções estoque das amostras comercializadas na forma de soluções foram preparadas pela diluição adequada de alíquotas dos medicamentos em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup>.

As soluções diluídas dos medicamentos foram preparadas adicionando-se alíquotas adequadas das soluções estoque à balões volumétricos de 100 mL contendo 5 mL de solução de cloreto de hidroxilamina e completando-se os volumes com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup>.

## 2.1.2 Resultados e Discussão

Conforme já mencionado, a ablação do substrato por ação do laser possibilitou a gravação de canais com seções transversais retangulares com cerca de 200  $\mu\text{m}$  largura, 4,5 mm de profundidade e 0,9  $\text{mm}^2$  de área. Como estas dimensões são maiores que aquelas observadas em sistemas FIA convencionais, onde tubos de teflon<sup>®</sup> com 0,8 mm de diâmetro interno e 0,5  $\text{mm}^2$  de área são usualmente empregados, o dispositivo proposto não pode ser considerado um microsistema FIA. Entretanto, as estratégias de selagem e de conexão dos canais com o mundo macroscópico sugeridas neste trabalho poderão ser empregadas para o desenvolvimento de novos sistemas em PMMA, cujas dimensões sejam significativamente menores que as apresentadas acima.

A Figura 2.6 mostra a visão lateral do sistema mostrando os canais gravados sobre o PMMA. Nestas imagens são observadas deformidades no substrato situado ao fundo do canal, as quais foram possivelmente geradas pelo uso de um laser com potência muito elevada e pela dissipação não uniforme do calor gerado durante a ablação. Tais imperfeições aumentam a área de contato entre as soluções de trabalho e o substrato podendo dificultar a limpeza do sistema. Vale notar também que a rugosidade observada no substrato representa cerca de 9 % da profundidade do canal (aproximadamente 0,4 mm), de modo que as condições utilizadas para a fabricação devem ser ajustadas para o desenvolvimento de sistemas com dimensões em escala micrométrica.



**Figura 2.6:** Vista lateral dos canais gravados em PMMA (a) e ampliação mostrando detalhes das imperfeições (b). \*valores aproximados.

### 2.1.2.1 Avaliação da selagem e das conexões com o mundo exterior

As estratégias utilizadas para a selagem dos canais e para as conexões com o mundo exterior se mostraram eficientes. Nenhum vazamento nas conexões e nenhuma deformidade no plástico adesivo de selagem foram observados ao se bombear água destilada ao longo do sistema em vazões menores que  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Para vazões maiores que esta, o adesivo plástico se despreendeu do substrato, às margens dos canais, tornando inviável o uso do dispositivo nesta condição.

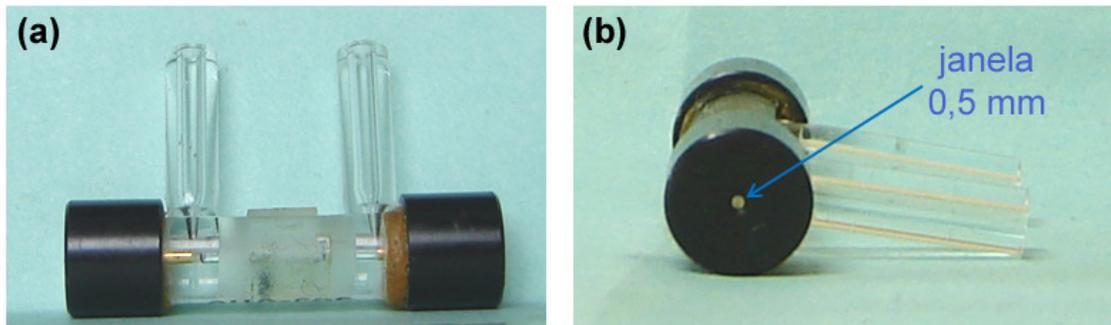
Considerando que a maioria dos microssistemas FIA descritos na literatura opera com vazões substancialmente menores que  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ , o uso do filme plástico adesivo para a selagem de dispositivos em PMMA pode ser uma alternativa simples e barata às estratégias já empregadas com sucesso para este propósito. Deve-se observar, porém, que outros estudos serão necessários para se avaliar a real aplicabilidade deste filme nos microssistemas, como a possibilidade de uso com soluções fortemente ácidas e básicas e a sua resistência frente a solventes orgânicos.

### 2.1.2.2 Avaliação do sistema para a determinação fotométrica de íons $\text{Fe}^{2+}$ em medicamentos

A resposta analítica obtida com o sistema em PMMA ao se empregar a estratégia de amostragem hidrodinâmica e a célula de fluxo capilar com 0,7 mm de caminho óptico (Figura 2.3) não foi satisfatória. Sinais com baixa razão sinal/ruído foram obtidos nestas condições, mesmo para injeções dos padrões mais concentrados ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{Fe}^{2+}$ ), inviabilizando a construção da curva analítica para a faixa de concentração proposta ( $2,0$  a  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). Devido ao pequeno caminho óptico e a dificuldade de alinhamento das fibras com o centro do capilar, parte da radiação proveniente do LED atingia o fotodiodo sem interagir com a amostra, dificultando a aquisição do sinal analítico. Para contornar este problema, uma pequena lente poderia ser adaptada à extremidade da fibra para evitar o espalhamento da radiação e focalizar o feixe no centro do capilar. Vale mencionar que esta dificuldade é também observada para a realização de medidas fotométricas em microssistemas onde os próprios canais definem a célula de medida. Nestes

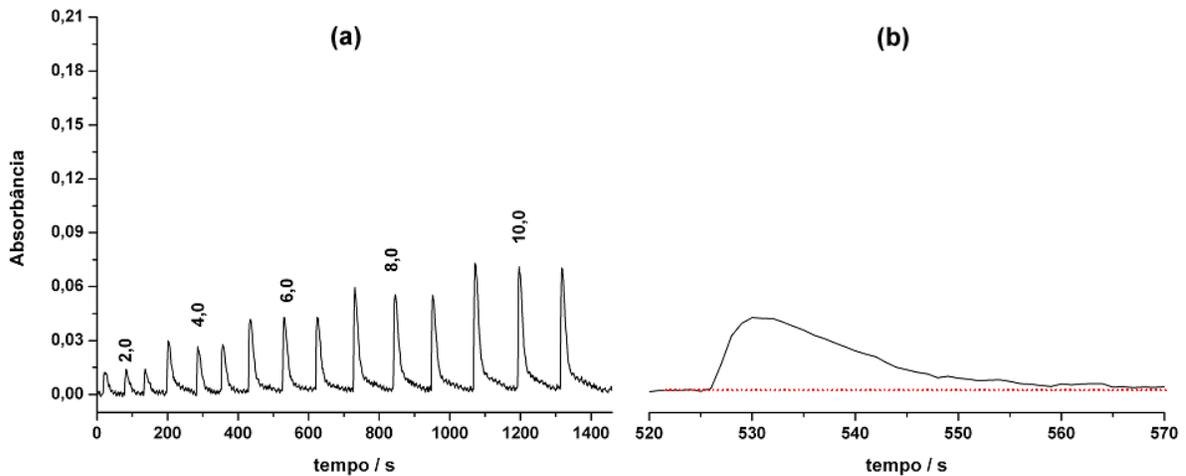
casos, o alinhamento das fibras é feito com o auxílio de partes mecânicas adaptadas ao dispositivo que permitem o ajuste da posição das mesmas [36]. Além disso, para aumentar a sensibilidade, células multi-reflexivas têm sido utilizadas em conjunto com lasers para a realização das medidas [41 e 42].

Para melhorar a razão sinal/ruído sem alterar drasticamente a instrumentação, propôs-se o uso de uma célula de fluxo capilar com maior caminho óptico (10 mm) na qual as janelas laterais são fabricadas para evitar problemas com a radiação espúria. Conforme mostra a Figura 2.7, esta célula é envolta lateralmente por um plástico escuro com um furo central de 0,5 mm de diâmetro, o qual bloqueia a radiação espalhada na extremidade da fibra e evita que a mesma atinja o detector sem interagir com a amostra.

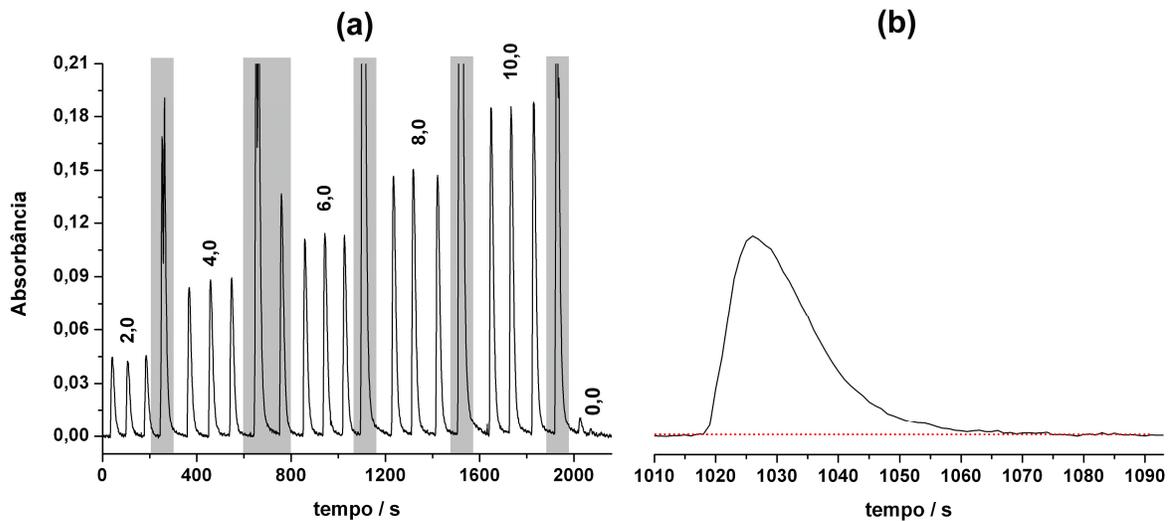


**Figura 2.7:** Célula de fluxo em vidro empregada para a realização da detecção fotométrica (a) e detalhe da janela com 0,5 mm de diâmetro (b).

Com o uso desta célula, houve uma melhora significativa na resposta analítica e boas razões sinal/ruído foram observadas para as injeções de todos os padrões estudados empregando-se a amostragem direta ou hidrodinâmica das soluções (seção 2.1.1.3.2). A Figura 2.8 e a Figura 2.9 mostram os diagramas obtidos com as duas formas de amostragem e os detalhes para os sinais adquiridos com o padrão contendo  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{Fe}^{2+}$ . Na Figura 2.9, os sinais realçados em cinza referem-se às injeções realizadas logo após a troca de uma solução de referência por outra com maior concentração. Estes sinais foram descartados para a construção da curva analítica e apresentaram-se muito mais intensos que os sinais das amostras devido ao maior tempo de amostragem (10s) empregado.



**Figura 2.8:** Diagrama obtido para a injeção hidrodinâmica dos padrões (a) e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  (b)



**Figura 2.9:** Diagrama obtido para a injeção direta dos padrões (a) e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  (b). Picos realçados em cinza referem-se às injeções de limpeza.

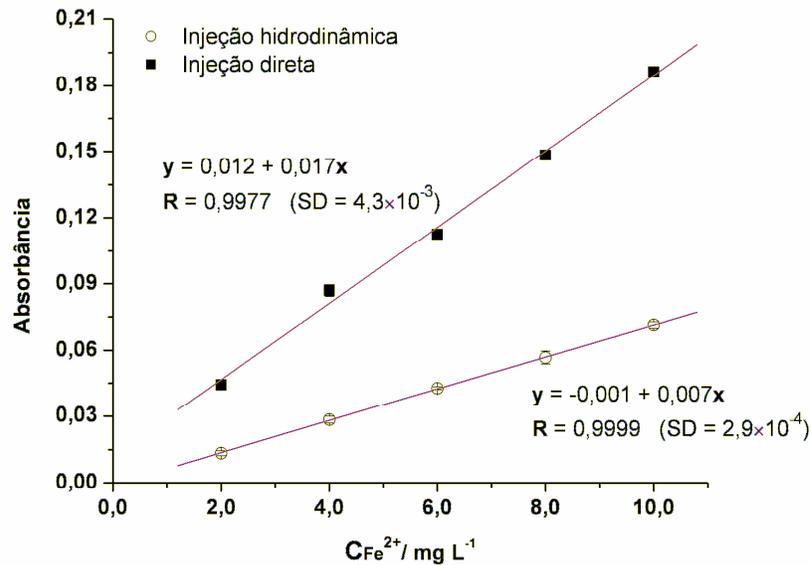
Conforme mostram as Figuras acima, os sinais transientes obtidos com o sistema em PMMA são semelhantes àqueles normalmente adquiridos em sistemas FIA convencionais, indicando que a dispersão da amostra ao longo dos canais deve ocorrer por convecção, causada pelo fluxo laminar, e por difusão radial [43 e 44]. É importante lembrar, porém, que a detecção foi realizada em uma célula de fluxo acoplada externamente ao sistema e que os tubos utilizados para a conexão do

sistema à célula, além dos próprios canais retangulares gravados no substrato, influenciam no regime de dispersão da amostra. Portanto, a detecção deveria ser realizada em uma célula integrada ao próprio sistema para permitir uma avaliação mais correta da dispersão ocorrida apenas nos canais retangulares, o que não foi realizado devido às dificuldades para se construir um novo dispositivo.

Ao se examinar os picos ampliados nas Figura 2.8 Figura 2.9 nota-se que, independente do modo como foi realizada a injeção, houve certa dificuldade de retorno do sinal à linha de base. Em ambos os modos de amostragem, aproximadamente 50 s foram necessários para a aquisição completa do pico, o que tornou o método relativamente lento. Parte deste problema está relacionada com a grande área superficial das paredes internas dos canais, a qual proporciona maior interação entre as soluções e o substrato, prejudicando a limpeza do sistema.

Os diagramas apresentados na Figura 2.8 e na Figura 2.9 foram plotados empregando-se a mesma escala de absorbância para melhor comparação das estratégias de amostragem adotadas. Conforme esperado, os sinais obtidos empregando-se a amostragem hidrodinâmica (Figura 2.8) foram menores que aqueles obtidos por amostragem direta (Figura 2.9) devido à grande diferença nos volumes injetados, 10  $\mu\text{L}$  e 38  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Esta diferença fez com que a curva analítica construída a partir da média das alturas dos picos obtidos por amostragem direta apresentasse a maior sensibilidade para a faixa de concentração estudada. Como mostra a Figura 2.10, a inclinação da reta obtida para esta condição foi cerca de 2 vezes maior que aquela obtida por amostragem hidrodinâmica e, por este motivo, a mesma foi utilizada para a determinação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  nas formulações farmacêuticas de sulfato ferroso.

Embora tenha proporcionado uma menor sensibilidade, a estratégia de amostragem hidrodinâmica se mostrou eficiente. Uma boa repetibilidade foi observada para injeções sucessivas de um mesmo padrão (cerca de 5% para 10 injeções da solução com  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{Fe}^{2+}$ ) e um ótimo ajuste linear ( $R^2 = 0,9998$ ) foi calculado para a faixa de concentração estudada, indicando que esta forma de amostragem pode ser aplicada com sucesso aos sistemas miniaturizados, desde que o desenho dos canais permita a injeção de um volume de amostra adequado ao comprimento da bobina de reação.



**Figura 2.10:** Curvas analíticas construídas a partir das médias das alturas dos picos obtidos por injeção direta ou hidrodinâmica dos padrões

As injeções das amostras foram efetuadas imediatamente após a inserção das soluções de referência. A curva analítica empregada para a determinação e apresentada na Figura 2.10 proporcionou um limite de detecção de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , calculado como a média do sinal para o branco adicionado de três vezes o seu desvio padrão, com um coeficiente de correlação ( $R$ ) de 0,9977. Devido à dificuldade de limpeza do sistema, já discutida acima, a frequência analítica do método foi de apenas  $35 \text{ injeções h}^{-1}$ , podendo ser aumentada com a diminuição do tamanho dos canais e com a integração da célula de fluxo ao próprio sistema. A repetibilidade dos sinais ao se empregar a amostragem direta também foi satisfatória, sendo calculada em 3 % para 10 injeções de um padrão com  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{Fe}^{2+}$ .

A Tabela 2.1 mostra os resultados obtidos para a determinação de  $\text{Fe(II)}$  em formulações farmacêuticas de sulfato ferroso a partir do método proposto e do método baseado na espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS). Três soluções diluídas de cada medicamento foram analisadas em ordem aleatória, sendo os resultados apresentados em termos das médias para as triplicatas, salvo para as amostras “Perfer” e “Combiron”, para as quais as medidas foram realizadas em duplicata. Um teste F [58] aplicado com o nível de significância de 0,05 não indicou diferenças significativas entre os desvios padrões encontrados por ambos os

métodos, indicando uma boa precisão para o método com sistema em PMMA. O teste T independente [58] aplicado aos resultados obtidos por ambos os métodos com um intervalo de confiança de 95 % mostrou que as médias obtidas por ambos os métodos não foram significativamente diferentes para 4 das seis amostras analisadas, diferenças significativas entre as médias foram observadas apenas para as amostras “PerFer” e “Combiron”. Em um intervalo de confiança maior, 99%, apenas as médias obtidas para a amostra “Combiron” mostraram-se significativamente diferentes, o que permite afirmar que o método proposto com o sistema FIA possibilita também boas exatidões para a determinação em questão.

**Tabela 2.1:** Concentrações médias de Fe(II) em  $\text{mg g}^{-1}$  encontradas para as determinações realizadas em triplicata com sistema FIA proposto e por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS).

Amostra	FIA	FAAS	Erro / %
NovoFer	110 ± 8	111 ± 4	-0,9
PerFer	180 ± 5	181,3 ± 0,9*	-0,7
VitaFer	137 ± 1	129 ± 3	+6,2
Combiron	113 ± 3*	102 ± 1	+11
Combiron solução**	24,6 ± 0,6	25,8 ± 0,5	-4,6
Sulfer **	12,4 ± 0,5	12,2 ± 0,4	+1,6

\*Médias e desvios para duplicatas

\*\*Resultados em  $\text{mg L}^{-1}$

Apesar destes bons resultados, o sistema estudado apresentou um consumo de reagentes similar ao de um sistema FIA convencional devido à elevada vazão necessária para a realização das medidas. Deste modo, não houve uma vantagem significativa para o uso do sistema proposto em relação aos sistemas convencionais. Entretanto, foi demonstrado que um dispositivo construído de forma relativamente simples pode ser utilizado com um bom desempenho em determinações fotométricas. Além disso, todo o procedimento empregado na construção deste sistema poderá ser utilizado para o desenvolvimento de novos protótipos que poderão proporcionar melhores resultados.

# Capítulo

## 3

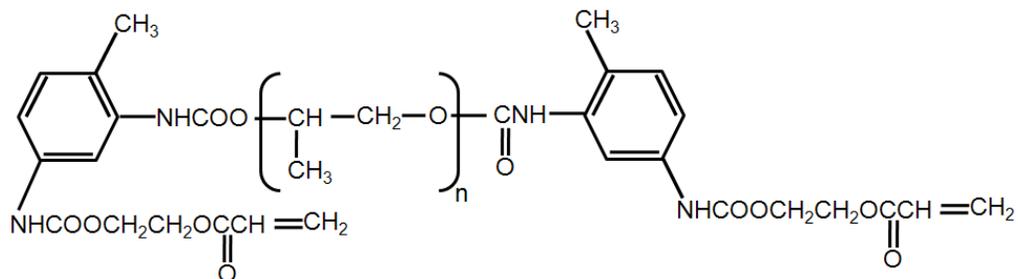
*Construção de microssistemas em  
Uretana-Acrilato (UA)*

### 3.1 Construção de Microssistemas em Uretana-Acrilato

Conforme demonstrado recentemente por Fernandes e Ferreira [45], uma resina fotopolimerizável (resiste), baseada nos oligômeros uretana e acrilato (UA) e usualmente empregada para a confecção de carimbos, pode ser utilizada para a construção de estruturas microfluídicas a partir de uma técnica simples e de baixo custo, a fotolitografia profunda no ultravioleta. Devido à simplicidade e à eficiência desta técnica, optou-se por empregá-la na construção da maioria dos protótipos descritos neste trabalho, sendo necessária a otimização de algumas etapas do procedimento original para aperfeiçoamento da selagem e da conexão dos canais com o mundo exterior.

#### 3.1.1 Resinas à base de Uretana – Acrilato

As resinas à base de uretana-acrilato são amplamente empregadas na indústria gráfica e apresentam propriedades muito semelhantes às do poli(dimetilsiloxano) (PDMS), frequentemente utilizado na fabricação de microssistemas de análise [34]. A sua principal vantagem em relação aos polímeros normalmente utilizados no desenvolvimento de estruturas microfluídicas está na possibilidade de uso da técnica de fotolitografia profunda no UV para a gravação dos canais, a qual permite a prototipagem rápida dos dispositivos sem necessidade de equipamentos especiais [45]. Um oligômero típico de Uretana-Acrilato apresenta a estrutura ilustrada na Figura 3.1, sendo produzido normalmente pela reação entre poli(isocianatos) com hidróxi-alkil-acrilatos em conjunto com outros compostos contendo grupos hidroxila, os quais possibilitam o ajuste de algumas propriedades do oligômero tais como, viscosidade, reatividade e flexibilidade [46].



**Figura 3.1:** Estrutura típica de um oligômero de Uretana-Acrilato

Devido às diferenças na composição, é possível se encontrar atualmente no mercado um bom número de resinas baseadas em UA. No presente trabalho, a resina utilizada foi adquirida junto à indústria de carimbos Medeiros Ltda.[47], a qual disponibiliza o produto sob o código M50-LBS. Fernandes e Ferreira [45] demonstraram que esta resina apresenta uma ótima resistência às soluções concentradas de ácidos e bases e que a mesma suporta também ataques de alguns solventes orgânicos normalmente empregados em métodos de extração. Considerando estes aspectos, este mesmo material foi selecionado para a fabricação dos microdispositivos propostos nesta seção.

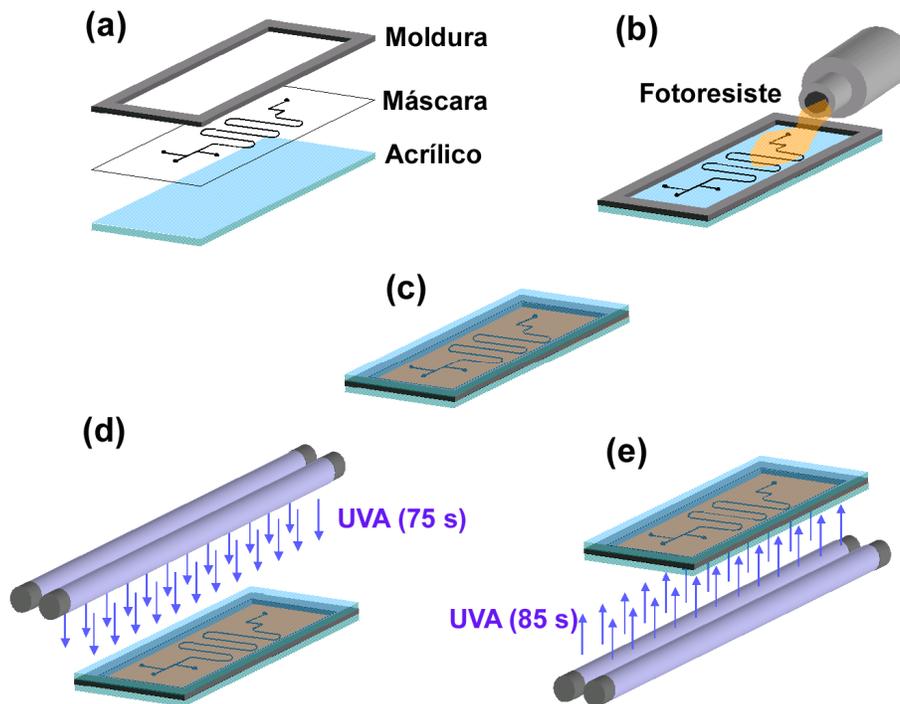
### **3.1.2 Parte experimental**

#### **3.1.2.1 Gravação dos Canais**

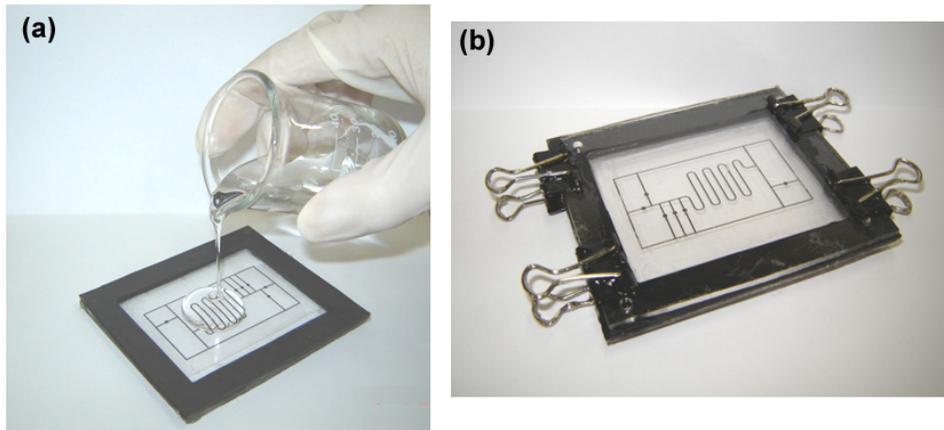
Na primeira etapa do procedimento de fotolitografia, uma máscara contendo o *layout* do sistema proposto foi desenvolvida empregando-se o *software* gráfico AutoCAD 2002 (AutoDesk®). Neste estágio, os componentes mais críticos dos microssistemas, como “plugs” de amostragem, bobina de reação e célula de detecção foram desenhados e impressos em uma transparência (CG3300-3M®) empregando-se uma impressora Laser (Laserjet 1300 - Hewlett Packard®) à resolução de 1200 pontos por polegada. Como ilustrado nas Figura 3.2(a) e na Figura 3.2(b), a máscara (transparência) foi devidamente recortada e unida a uma moldura de borracha e a uma placa de acrílico, ambas com 2,0 mm de espessura, de modo a constituir um conjunto para reter o resiste utilizado (Resina M50-LBS, Indústria de Carimbos Medeiros Ltda [47]). A moldura de borracha, a máscara e a placa de acrílico foram coladas com o auxílio de fita adesiva dupla face, tendo-se o cuidado de manter o lado impresso da máscara voltado para a placa de acrílico, o que evitou danos às linhas impressas após a aplicação do resiste, permitindo a reutilização do conjunto após a limpeza do mesmo. Com a máscara devidamente afixada, a região delimitada pela moldura de borracha foi preenchida com a resina, evitando-se ao máximo a formação de bolhas (Figura 3.2(b)). Outra placa de acrílico, com as mesmas dimensões da primeira, foi utilizada para fechar o conjunto de modo análogo ao ilustrado na Figura 3.2 (c), sendo o excesso de resina eliminado, após a

fixação das placas com grampos apropriados. As fotografias apresentadas na Figura 3.3 mostram a deposição da resina sobre o conjunto e o fechamento do mesmo com os grampos.

Os canais foram gravados expondo-se o resiste à radiação UVA (350 nm) em duas etapas. Na primeira (Figura 3.2 (d)), a exposição foi realizada por 75 s (dose de  $360 \text{ mJ cm}^{-2}$ ), a partir do lado do conjunto em que a máscara não protegia nenhuma região do resiste. Sem a proteção da máscara e com o controle do tempo, parte da resina foi fotopolimerizada, formando a base da estrutura fluídica. Na segunda etapa (Figura 3.2 (e)), o outro lado do conjunto foi irradiado por 85 s (dose de  $410 \text{ mJ cm}^{-2}$ ) e apenas as regiões protegidas pela máscara não foram fotopolimerizadas, formando os canais. Estes tempos de exposição foram otimizados para permitir a boa formação dos canais e para possibilitar a fácil retirada do dispositivo pronto do conjunto contendo a máscara



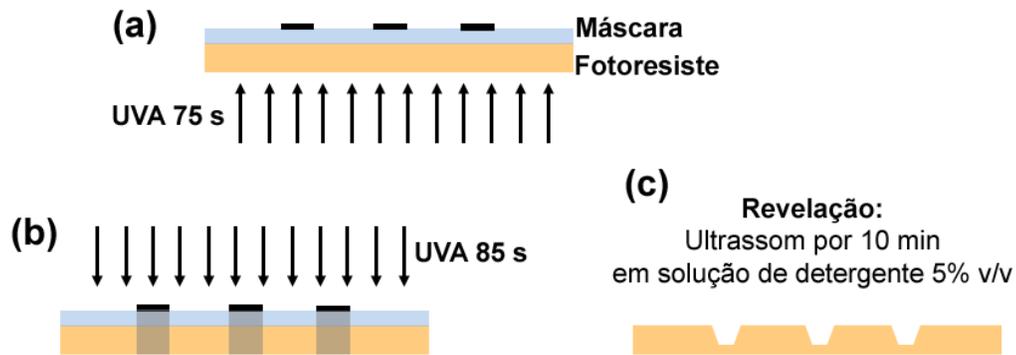
**Figura 3.2:** Procedimento empregado no desenvolvimento de microssistemas em uretana-acrilato por fotolitografia profunda no ultravioleta. União da moldura de borracha, placa de acrílico e máscara (a), deposição do resiste (b), fechamento com outra placa de acrílico e exposição à radiação ultravioleta (d) e (e).



**Figura 3.3:** Fotografias mostrando a deposição do resiste **(a)** e o conjunto fechado com o auxílio de grampos **(b)**.

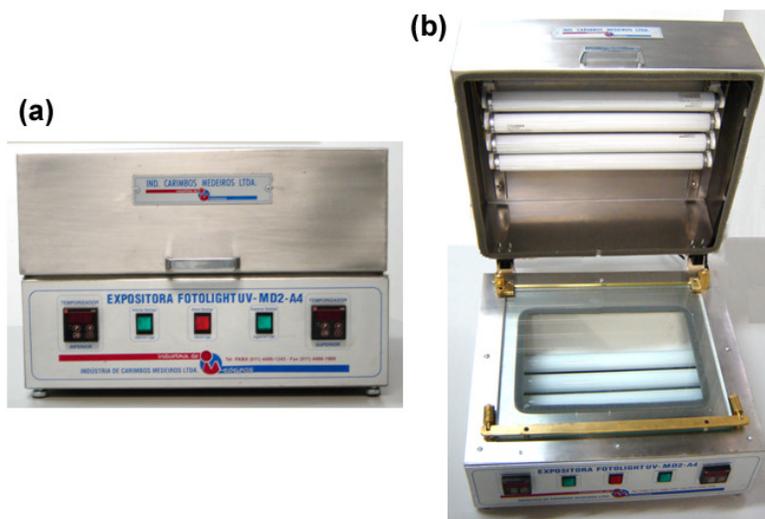
Após as etapas de exposição, a estrutura fluídica gravada sobre a resina foi revelada empregando-se um procedimento bastante simples. O polímero com os canais fotolitografados foi retirado cuidadosamente do conjunto empregado para encerrar o resiste e, em seguida, imerso em uma solução de detergente comercial 5% v/v, a qual foi utilizada como revelador. O recipiente contendo esta solução e o microdispositivo foi colocado em um banho ultrassônico por 10 minutos, sendo que, na metade do tempo, a revelação foi auxiliada escovando-se a estrutura com um pincel macio. Após este procedimento, realizou-se a lavagem cuidadosa do dispositivo em água corrente e a secagem do mesmo em fluxo  $N_2$ .

A Figura 3.4 mostra um esquema simplificado do procedimento de exposição e revelação do resiste, no qual uma estrutura em baixo relevo contendo os canais é obtida como resultado final. Conforme observado, apenas as regiões protegidas pela máscara não foram polimerizadas e puderam ser eliminadas durante o processo de revelação devido ao uso de um resiste do tipo negativo [4].



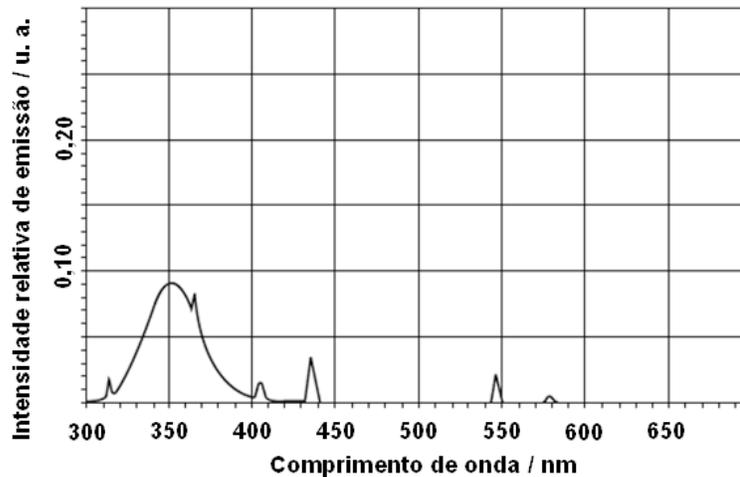
**Figura 3.4:** Esquema simplificado das etapas de exposição e revelação do resiste. Exposição para formação da base dos canais (a), exposição com regiões protegidas pela máscara (b) e estrutura obtida após a revelação (c).

É importante relatar que as doses de radiação empregadas durante a exposição da resina foram otimizadas para uma fotoexpositora comercial Fotolight MD2-A4 (Carimbos Medeiros Ltda). Conforme mostra a Figura 3.5, este equipamento possui dois conjuntos de lâmpadas, cada um com 4 elementos, os quais podem ser acionados simultânea ou separadamente de acordo com a seleção do operador. Neste trabalho, cada conjunto foi acionado separadamente durante as etapas de exposição.



**Figura 3.5:** Fotografias da expositora comercial (Fotolight MD2-A4, Carimbos Medeiros Ltda), empregada no procedimento de fotolitografia. Detalhe do painel frontal com temporizadores (a) e detalhe dos conjuntos de lâmpadas inferiores e superiores (b).

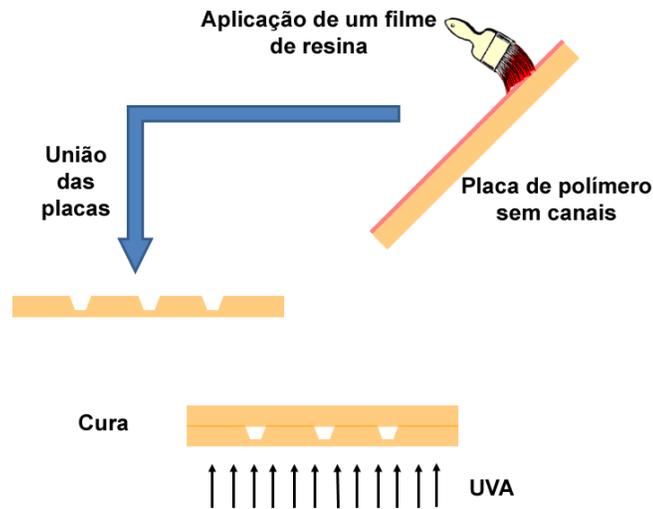
Vale salientar que as lâmpadas instaladas na expositora são do tipo luz negra (350 BL F15w -T12 -Sylvania®) e que, conforme ilustra o espectro fornecido pelo próprio fabricante (Figura 3.6), apresentam máximo de emissão em 350 nm. Para o equipamento em questão, estas lâmpadas são colocadas a uma distância de 10 cm da mesa utilizada para apoio do conjunto com o resiste.



**Figura 3.6:** Espectro da lâmpada luz negra (F15w -T12 -Sylvania®) utilizada na expositora comercial [48].

### 3.1.2.2 Estratégias desenvolvidas para selagem dos microssistemas

Para a selagem dos canais gravados sobre o resiste, Fernandes e Ferreira [45] propuseram um procedimento baseado no uso de uma camada adesiva intermediária [27]. Conforme ilustra a Figura 3.7, este procedimento consiste em desenvolver uma placa do polímero sem os canais e aplicar, sobre uma de suas superfícies, um filme de resina não polimerizada com o auxílio de um pincel. Após a aplicação da resina, esta superfície é colocada em contato com a placa que contém os canais e colada a esta sob exposição à radiação UVA. Embora este procedimento seja simples, a aplicação do filme de resina não é uniforme e o entupimento das estruturas microfluídicas pode ocorrer se as dimensões das mesmas forem menores que cerca de 500  $\mu\text{m}$ . Devido a estas dificuldades, outras estratégias de selagem foram propostas e avaliadas com o objetivo de tornar o procedimento mais simples e eficiente.



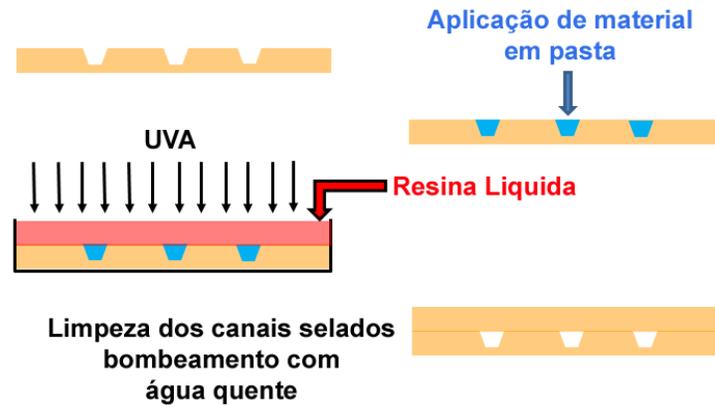
**Figura 3.7:** Esquema do procedimento de selagem dos canais proposto por Fernandes e Ferreira [45].

### 3.1.2.2.1 Selagem com filme plástico adesivo

A primeira proposta alternativa para a selagem dos canais foi idêntica àquela descrita na seção 2.1.1.1 para o sistema construído em PMMA. Um filme plástico adesivo foi aplicado à superfície que continha os canais, sendo o microssistema utilizado somente 72 horas após a aplicação.

### 3.1.2.2.2 Selagem com preenchimento prévio dos canais

Para realizar a selagem do sistema a partir desta estratégia, os canais abertos sobre o substrato foram preenchidos previamente com um material em pasta (creme dental), o qual foi aplicado de forma homogênea ao longo de toda a superfície do polímero com o auxílio de uma espátula. Após a aplicação, a superfície foi limpa com uma esponja umedecida em água, com a finalidade de eliminar o excesso de pasta. Realizados o preenchimento dos canais e a limpeza da superfície, aplicou-se sobre o dispositivo uma camada de resina, a qual foi polimerizada posteriormente sob ação da radiação ultravioleta, selando o sistema. Neste procedimento, o creme dental impediu o entupimento dos canais pelo resiste e o mesmo foi retirado em seguida pelo bombeamento com água a 50 °C empregando-se uma seringa. Uma ilustração do procedimento empregado é apresentada na Figura 3.8.



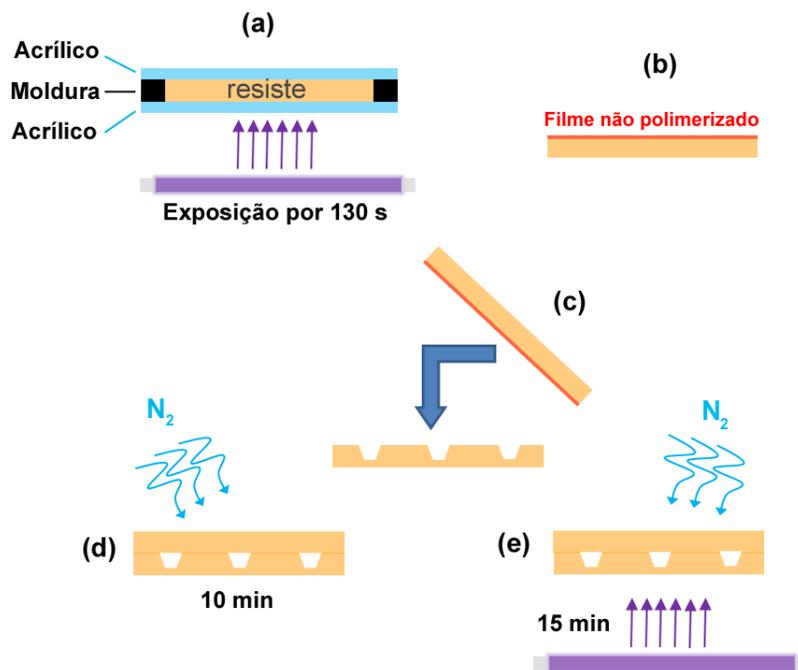
**Figura 3.8:** Esquema do procedimento proposto para a selagem com o preenchimento prévio dos canais

### 3.1.2.2.3 Selagem empregando camada de resiste com superfície não polimerizada

Nesta terceira e última proposta, semelhante àquela descrita por Fernandes e Ferreira [45], uma placa do próprio polímero foi empregada para a selagem dos canais. Diferentemente do proposto por estes autores, a placa foi confeccionada de maneira que um filme fino de resiste não polimerizado permanecesse sobre uma de suas superfícies, descartando a necessidade de aplicação da resina com um pincel.

O procedimento de confecção desta placa foi análogo ao descrito na seção 3.1.2.1. Uma camada de resiste com 2 mm de espessura foi encerrada entre duas lâminas de acrílico, as quais foram espaçadas com uma moldura de borracha (Figura 3.9 (a)). O conjunto foi exposto à radiação ultravioleta por 130 s (dose de  $650 \text{ mJ cm}^{-2}$ ), sendo a exposição realizada somente pelo acionamento das lâmpadas inferiores da expositora. Conforme ilustrado na Figura 3.9, este procedimento foi realizado sem a necessidade de máscaras e o modo como foi realizada a exposição evitou a cura da superfície do resiste não exposta diretamente à radiação UV, criando um filme não polimerizado. Esta placa de cobertura foi, então, lavada com detergente em água corrente, a fim de eliminar o excesso de resiste e, em seguida, a mesma foi seca em nitrogênio e colocada em contato com a placa que continha os canais através da sua superfície não polimerizada (Figura 3.9 (c)). Após a união de ambas as camadas, o conjunto foi colocado sob fluxo de nitrogênio gasoso durante 10

minutos (Figura 3.9 (d)) com o objetivo de proporcionar uma atmosfera livre de oxigênio ao redor do substrato, antes da exposição. Conforme será discutido adiante, o oxigênio da atmosfera pode inibir a polimerização, prejudicando a selagem do dispositivo. Realizadas estas etapas, o conjunto foi exposto à radiação ultravioleta, ainda sob fluxo de nitrogênio, durante 15 minutos, levando à selagem irreversível do sistema. Vale relatar que este procedimento foi utilizado para o desenvolvimento da maioria dos sistemas construídos em UA, propostos neste trabalho.

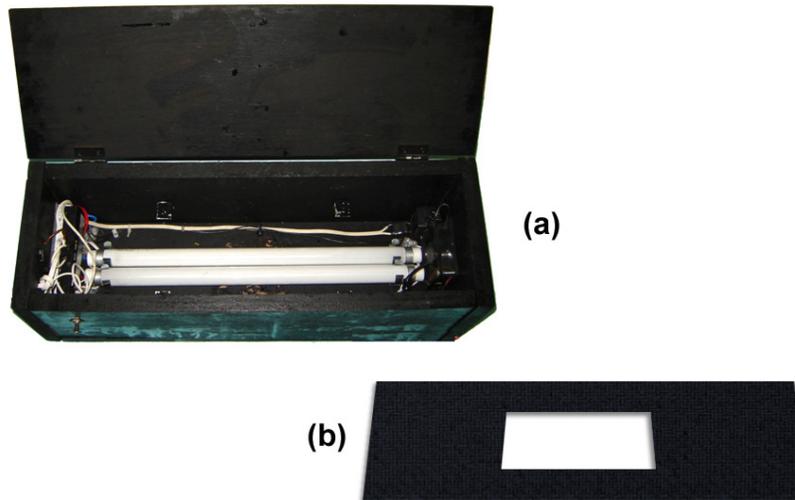


**Figura 3.9:** Esquema do procedimento proposto para a selagem empregando uma camada de resiste com superfície não polimerizada. Exposição controlada do resiste (a), placa de resiste com superfície não polimerizada (b), união da placa de cobertura com a placa contendo os canais (c), aplicação de fluxo de nitrogênio gasoso para geração de atmosfera livre de oxigênio (d) e exposição final para selagem irreversível do sistema (e).

### 3.1.2.3 Fabricação com uma expositora “Home-Made”

O procedimento de fabricação descrito na seção anterior foi também realizado empregando-se uma expositora “home-made”, Figura 3.10 (a). Duas lâmpadas do tipo luz negra (350 BL F15w –T8 Sylvania®) foram instaladas em uma caixa de madeira pintada em preto, a qual apresentava uma cavidade com 20 cm de largura, 50 cm de comprimento e 25 cm de altura. Um suporte vazado em duratex®, Figura 3.10 (b), foi fixado a 10 cm das lâmpadas e utilizado para apoio do substrato. Devido

ao menor número de lâmpadas, os tempos de exposição empregados durante o procedimento de fotolitografia foram diferentes daqueles descritos na seção 3.1.2.1 para a expositora comercial. A primeira etapa de exposição, ilustrada na Figura 3.2(d), foi realizada com o tempo de 60 s, enquanto a etapa ilustrada na Figura 3.2 (e) foi realizada com o tempo de exposição de 150 s.



**Figura 3.10:** Fotografia mostrando a expositora “home-made” desenvolvida para execução do procedimento de fotolitografia **(a)** e desenho do suporte vazado em Duratex<sup>®</sup> empregado para apoio do substrato sobre as lâmpadas **(b)**.

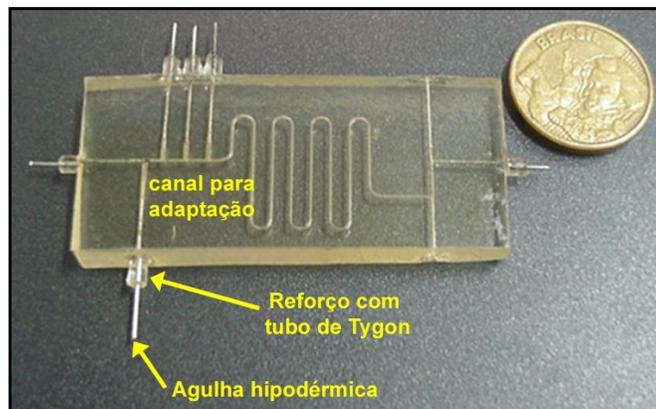
É necessário salientar que a expositora proposta dispunha somente de um par de lâmpadas situadas ao fundo da caixa e, por este motivo, as etapas descritas acima foram realizadas alternando-se a posição do substrato em relação às lâmpadas a fim de permitir a exposição correta do resiste.

A estratégia de selagem dos canais com uma camada do polímero com superfície não polimerizada, seção 3.1.2.2.3, foi também executada empregando-se esta expositora. A camada de recobrimento sem os canais foi fabricada com a exposição do resiste por 180 s e após a união desta camada com aquela que continha os canais, realizou-se a exposição do sistema sob fluxo de nitrogênio por 15 minutos.

### 3.1.2.4 Conexões com o mundo macroscópico

Para permitir o acesso das soluções de trabalho aos canais, agulhas hipodérmicas com 0,45 mm de diâmetro externo (305111-BD<sup>®</sup>) foram acopladas aos dispositivos por meio de canais laterais previamente confeccionados para este propósito. As agulhas de uso hospitalar foram retiradas de sua base plástica e lixadas para a retirada do bisel, sendo, em seguida, acopladas por pressão aos canais de entrada e saída dos sistemas. Estes canais foram confeccionados de forma que suas dimensões (largura e profundidade da seção transversal) fossem ligeiramente menores que o diâmetro externo das agulhas. Deste modo, ao se introduzir as agulhas, o substrato ao redor do canal era ligeiramente deformado, atuando como um septo que evitava os vazamentos. Vale ressaltar que esta estratégia de conexão somente foi implementada devido à característica elastomérica do substrato, o qual é deformado sem que haja rupturas na junção de selagem.

É importante relatar também que neste acoplamento não houve a necessidade de uso de qualquer tipo de adesivo, uma vez que as propriedades elastoméricas do polímero aliadas às dimensões adequadas dos canais foram suficientes para a boa adaptação das agulhas. Apesar disto, tubos de Tygon<sup>®</sup> foram colados na junção agulha / substrato para tornar estas conexões mais resistentes ao manuseio constante. A fotografia apresentada na Figura 3.11 mostra as agulhas adaptadas ao sistema através da estratégia proposta.



**Figura 3.11:** Fotografia de um microssistema fabricado em UA com agulhas hipodérmicas adaptadas para acesso das soluções de trabalho.

### **3.1.2.5 Caracterização**

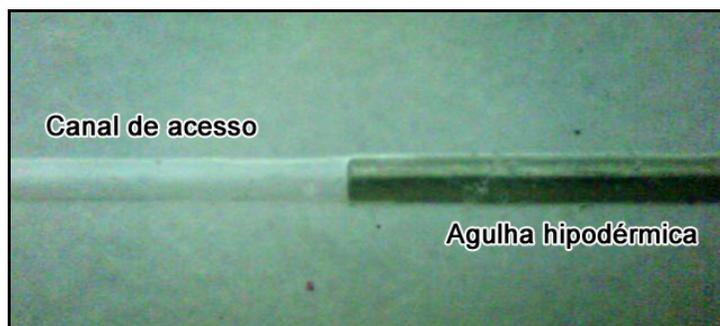
Para a caracterização dos sistemas construídos empregando-se a técnica proposta, foram obtidas imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos canais abertos sobre o substrato e de seções transversais dos mesmos devidamente selados. Para isto, empregou-se um eletromicroscópio JSM 6360-LV (JEOL-JAPAN) ajustando-se o aumento de forma adequada para cada imagem. Para permitir a obtenção das imagens das seções transversais, o substrato contendo o canal foi cortado em fatias finas com o auxílio de um bisturi, sendo a região de corte lubrificada com solução de detergente para facilitar a operação.

### 3.1.3 Resultados e Discussão

#### 3.1.3.1 Caracterização

A fotografia apresentada na Figura 3.11 mostra que os dispositivos construídos em uretana acrilato são incolores e transparentes. Fernandes e Ferreira [45] demonstraram que este substrato não absorve radiação visível com comprimentos de onda de 400 a 750 nm, o que pode facilitar a integração de sistemas ópticos de detecção baseados nesta região do espectro. Os autores demonstraram também que este substrato é inerte a diversos solventes orgânicos e à soluções concentradas de ácidos e bases, o que o torna atrativo para muitas aplicações em Química.

Conforme mencionado anteriormente, a polimerização do resiste leva a formação de um elastômero que, devido à sua baixa dureza e alta flexibilidade, torna mais fácil a adaptação de componentes como fibras ópticas e agulhas, as quais permitem a interligação do sistema com o mundo exterior. A imagem obtida com um microscópio digital USB (Proscope-HR) apresentada na Figura 3.12 mostra que o acoplamento das agulhas ocorreu de forma bastante eficiente, com o substrato envolvendo completamente dispositivo. Para os sistemas selados com uma camada de resiste com superfície não polimerizada, seção 3.1.2.2.3, nenhum vazamento foi observado nesta conexão em fluxos de até  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

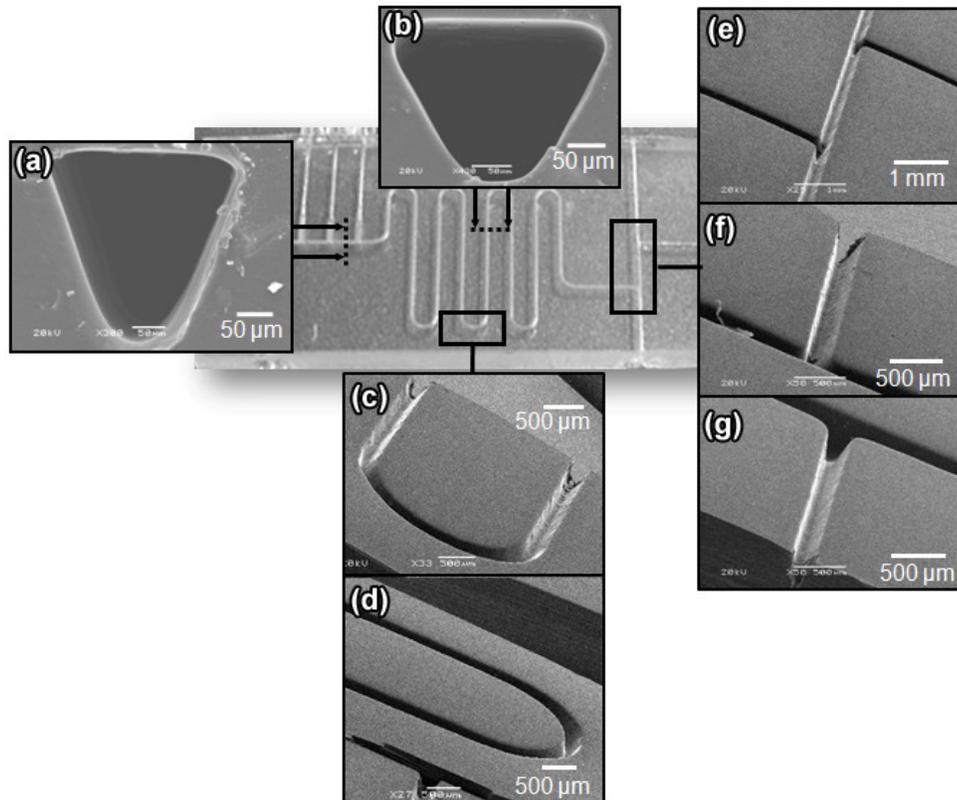


**Figura 3.12:** Imagem ampliada mostrando a conexão de uma agulha hipodérmica ao microscistema

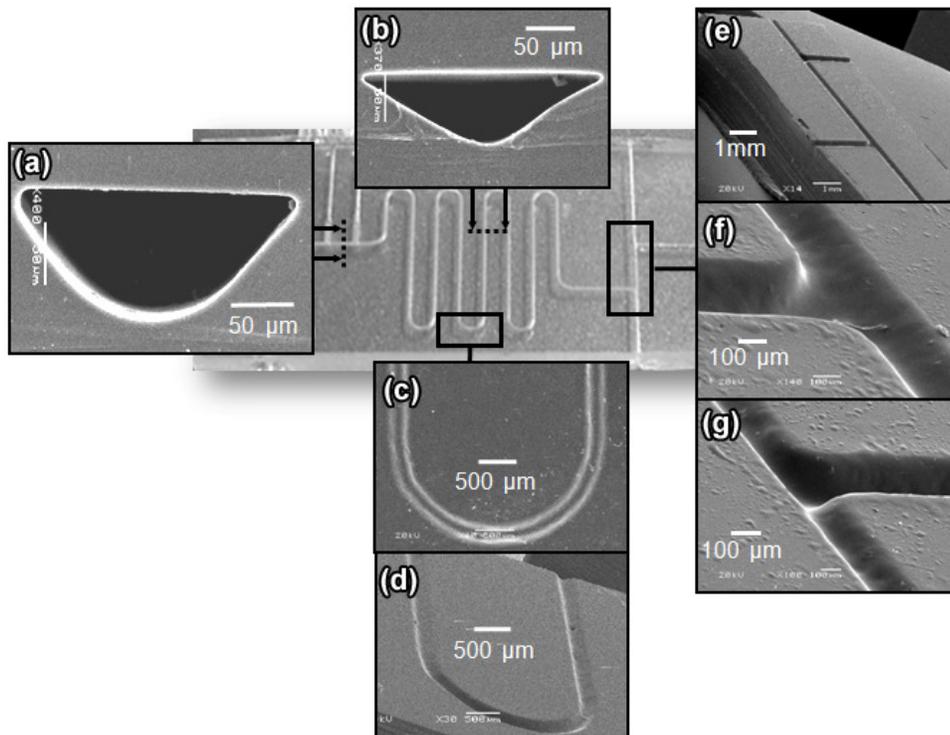
Em sua dissertação de mestrado, Killner [49] demonstrou que o acoplamento de eletrodos para a determinação eletroquímica de espécies em microssistemas à base de UA é também facilmente conseguida devido a esta característica.

A Figura 3.13 e a Figura 3.14 apresentam as micrografias eletrônicas de varredura obtidas para os sistemas construídos empregando-se as expositoras comercial e “home-made”, respectivamente. Conforme mostram as imagens, canais com seções transversais triangulares, cujas paredes apresentam baixa rugosidade, foram obtidos ao se empregar as duas expositoras. Como a radiação proveniente das lâmpadas não é colimada antes de atingir o resiste, feixes em diagonal penetraram no substrato ocasionando a sua polimerização em “v”. A literatura mostra que feixes altamente paralelos de radiação proporcionam a gravação de estruturas retangulares com alta razão de aspecto [4], o que não ocorreu para o método proposto devido ao uso apenas das lâmpadas, sem nenhum elemento para minimizar o espalhamento da radiação.

Devido às diferentes condições de fabricação, os canais desenvolvidos a partir da expositora comercial apresentaram dimensões maiores que aquelas obtidas quando a expositora “home-made” foi empregada. Considerando que as linhas da máscara utilizada para gravar os canais apresentados na Figura 3.13 foram impressas com largura de 350  $\mu\text{m}$  e que a máscara utilizada para gravar os canais apresentados na Figura 3.14 possuíam linhas com 0,5 mm de largura, pode-se dizer que houve uma maior penetração da radiação no resiste ao se empregar a fotolitografia com a expositora home-made, uma vez que linhas mais estreitas deveriam produzir canais menores. Entretanto, é também importante observar que a gravação dos canais empregando-se a expositora home-made (seção 3.1.2.3) foi realizada com maior tempo de exposição, potencializando a polimerização do resiste, com conseqüente diminuição dos canais. Estes resultados mostram que variáveis como o tempo de exposição, larguras das linhas da máscara e número de lâmpadas empregadas, irão influenciar diretamente nas dimensões dos canais, devendo ser levadas em consideração no início do desenvolvimento do projeto.

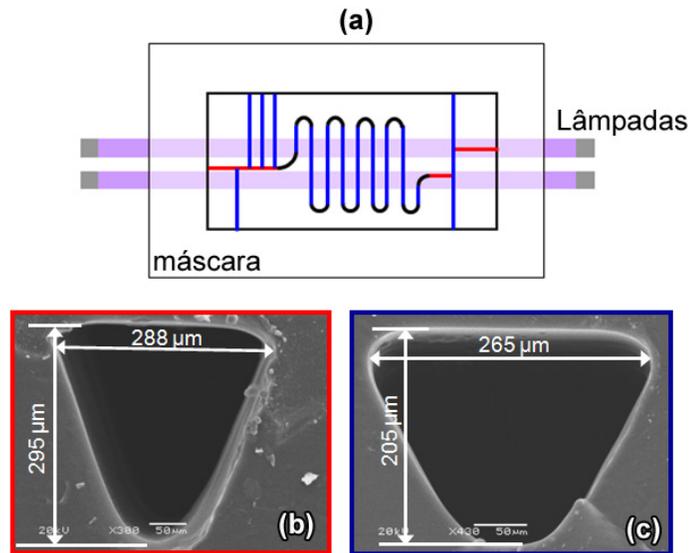


**Figura 3.13:** Micrografias de varredura eletrônica obtidas para os canais gravados por fotolitografia com uma expositora comercial (seção 3.1.2.1) empregando-se uma máscara contendo linhas com 350  $\mu\text{m}$  de largura. Seções transversais dos canais selados (a) e (b), detalhes de um canal aberto em curva (c) e (d) e detalhes dos canais abertos para a integração de uma célula de fluxo fotométrica (e) a (g).



**Figura 3.14:** Micrografias de varredura eletrônica obtidas para os canais gravados por fotolitografia com uma expositora “home-made” (seção 3.1.2.3) empregando-se uma máscara contendo linhas com 500 µm de largura. Seções transversais dos canais selados (a) e (b), detalhes de um canal aberto em curva (c) e (d) e detalhes dos canais abertos para a integração de uma célula de fluxo fotométrica (e) a (g).

Outra importante constatação realizada neste estudo foi o fato de as seções transversais de canais ortogonais entre si apresentarem características diferentes, embora tenham sido fabricados sob as mesmas condições e com linhas de máscara de mesma largura. As micrografias (a) e (b) apresentadas na Figura 3.13 e na Figura 3.14 mostram que, independente da expositora empregada, a forma e as dimensões dos canais de um mesmo dispositivo são significativamente distintas, dependendo da sua posição no substrato. Conforme ilustra a Figura 3.15, os canais gravados por exposição perpendicular das linhas da máscara (linhas azuis) em relação às lâmpadas são menores que aqueles obtidos por exposição paralela das linhas da máscara (linhas vermelhas) em relação às lâmpadas. Este comportamento foi observado ao se utilizar máscaras com linhas de diferentes larguras e indica que, de uma forma que ainda necessita ser investigada, há um bloqueio mais efetivo da radiação pela linha impressa posicionada paralelamente às lâmpadas.



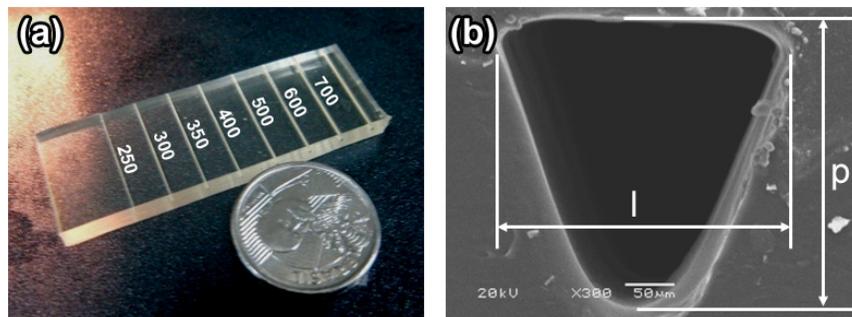
**Figura 3.15:** Posição relativa entre as lâmpadas e as linhas da máscara empregada para a gravação dos canais (a) e micrografias de varredura eletrônica dos canais gravados por exposição perpendicular (b) e paralela (c) das linhas em relação às lâmpadas. Os canais foram gravados com uma expositora comercial (seção 3.1.2.1) empregando-se uma máscara com linhas de 350 µm.

Devido a este fenômeno, as áreas das seções transversais dos canais de um mesmo dispositivo foram significativamente diferentes. Para o dispositivo construído com a expositora comercial, áreas de 0,027 mm<sup>2</sup> e de 0,043 mm<sup>2</sup> foram calculadas empregando-se a expressão,

$$A = \frac{(base \times altura)}{2}$$

como aproximação ao perfil triangular dos canais. Do mesmo modo, áreas de 0,008 mm<sup>2</sup> e de 0,015 mm<sup>2</sup> foram calculadas para os canais desenvolvidos com a expositora “home-made”. Este comportamento pode melhorar a mistura das soluções nos microcanais devido às variações de pressão que podem ocorrer como conseqüência do alargamento e estreitamento dos dutos pelos quais as soluções são bombeadas.

A relação entre a largura das linhas da máscara e as dimensões dos canais foi avaliada apenas para o procedimento com a expositora comercial (seção 3.1.2.1). Uma máscara contendo 7 linhas com larguras diferentes (250 a 700  $\mu\text{m}$ ) foi empregada para a gravação dos canais, os quais foram selados posteriormente com uma camada de UA com superfície não polimerizada (seção 3.1.2.2.3). A mesma máscara foi utilizada para criar um dispositivo em que as linhas foram expostas a 90° das lâmpadas e outro onde a exposição foi feita com as linhas paralelas às lâmpadas. Imagens das seções transversais destes canais foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura, sendo as mesmas utilizadas para as medições da largura ( $l$ ) e profundidade ( $p$ ) das estruturas. A Figura 3.16 mostra a fotografia de um dos dispositivos desenvolvidos e a micrografia de um dos canais indicando as dimensões descritas acima.



**Figura 3.16:** Fotografia de um dos dispositivos empregados para o estudo (relação entre a largura das linhas e dimensões dos canais) com indicação das larguras das linhas utilizadas em  $\mu\text{m}$  (a) e micrografia eletrônica de varredura indicando a largura ( $l$ ) e profundidade ( $p$ ) dos canais (b).

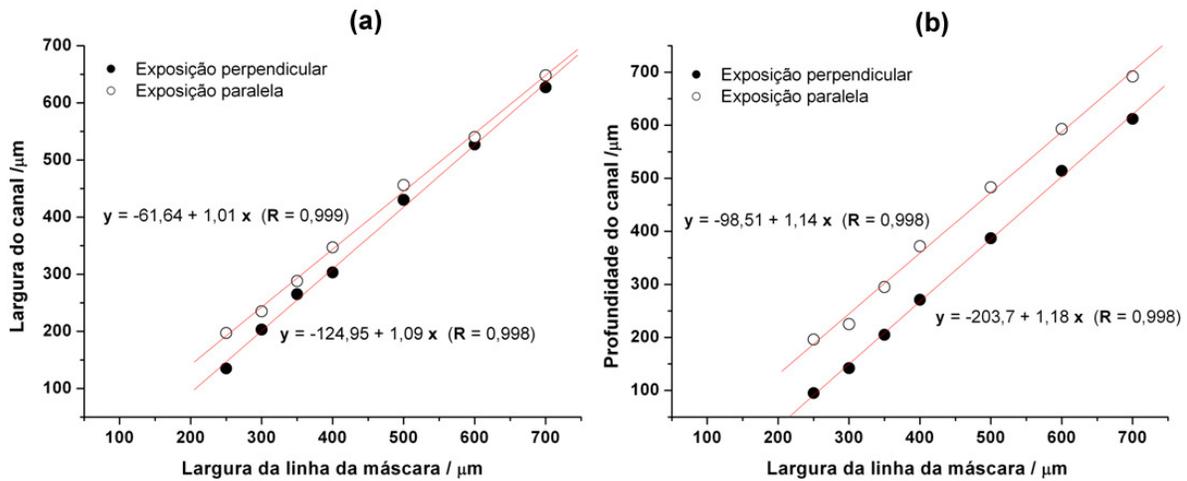
Conforme mostra a Tabela 3.1, a largura e a profundidade dos canais foram sempre menores que as larguras das linhas da máscara empregada para a gravação. Além da radiação não colimada, imperfeições nas extremidades das linhas da máscara (Figura 3.18), causadas pela deposição não uniforme do toner sobre a transparência, facilitaram a penetração lateral da radiação ocasionando a redução das dimensões dos canais em relação à largura das linhas. É importante destacar, porém, que este resultado foi obtido para as condições descritas na seção 3.1.2.1 e que alterações nos tempos de exposição ou outras variáveis proporcionarão resultados diferentes, principalmente para a profundidade dos canais.

**Tabela 3.1:** Relação entre as larguras das linhas da máscara e as dimensões dos canais

Largura da linha da máscara / $\mu\text{m}$	Exposição paralela		Exposição perpendicular	
	largura (l) / $\mu\text{m}$	profundidade (p) / $\mu\text{m}$	largura (l) / $\mu\text{m}$	profundidade (p) / $\mu\text{m}$
250	197	196	135	95
300	235	225	203	142
350	288	295	265	205
400	347	372	303	271
500	456	483	430	387
600	540	593	527	514
700	648	692	627	612

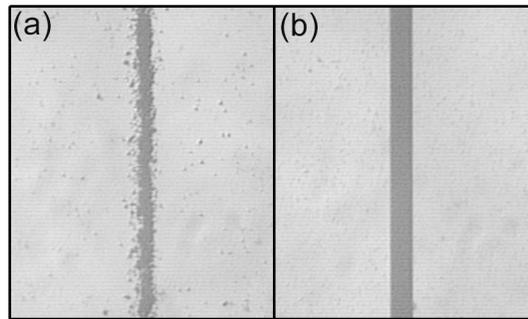
De acordo com o que foi discutido anteriormente, as dimensões dos canais gravados por exposição perpendicular foram sempre menores que aquelas onde a exposição paralela foi empregada. Entretanto, nota-se neste estudo que a diferença foi mais pronunciada para as medidas de profundidade.

Os gráficos apresentados na Figura 3.17 mostram que a largura e a profundidade dos canais relacionam-se linearmente com a largura da linha da máscara empregada. Para ambos os modos de exposição (paralela ou perpendicular) e para ambas as dimensões (largura ou profundidade), foram observados coeficientes de correlação para o ajuste linear da ordem de 0,999. Com isto, desde que as condições descritas na seção 3.1.2.1 sejam obedecidas, as equações que descrevem as retas podem ser utilizadas para estimar as dimensões dos canais que serão desenvolvidos em um novo microssistema. Apesar disto, esta estimativa deve ser utilizada com cautela uma vez que qualquer alteração nas condições de fabricação pode alterar também as dimensões dos canais. A gravação com lâmpadas já usadas exaustivamente, por exemplo, pode tornar o resultado bastante diferente daquele que seria obtido com lâmpadas nunca antes utilizadas.

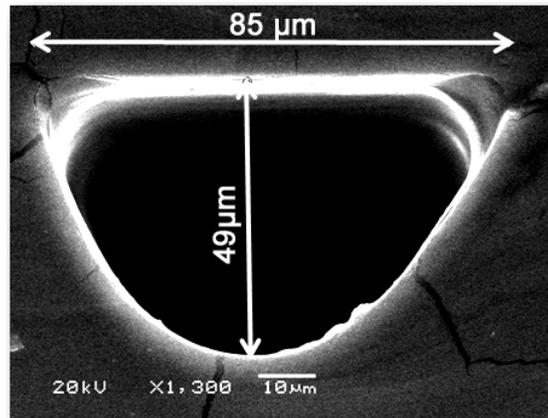


**Figura 3.17:** Relações entre a largura (a) e profundidade (b) dos canais com a largura da linha da máscara empregada.

Vale relatar também que os canais que foram construídos com linhas menores que 250  $\mu\text{m}$  entupiram facilmente durante a fabricação do dispositivo. Segundo a micrografia óptica apresentada na Figura 3.18, a deposição não uniforme do toner durante a impressão da transparência (máscara) é bastante crítica para uma linha com 100  $\mu\text{m}$  de largura, fazendo com que haja uma superexposição do resiste situado sob a máscara com conseqüente estreitamento e entupimento de algumas regiões do canal. Para que canais com dimensões menores que as apresentadas na Tabela 3.1 possam ser construídos, os tempos de exposição utilizados para a gravação devem ser aumentados para permitir que linhas mais largas, para as quais as irregularidades do toner é menos crítica, possam ser utilizadas ao invés das linhas mais estreitas. Outra opção é empregar um fotolito gráfico como máscara. Conforme mostra a Figura 3.18(b), uma linha com 100  $\mu\text{m}$  de largura, impressa através desta tecnologia, apresenta resolução muito maior que aquela impressa em uma impressora a laser e, por isto, pode proporcionar melhores resultados. A Figura 3.19 mostra a micrografia eletrônica de varredura obtida para a seção transversal de um canal construído com uma máscara tipo fotolito com linha de 100  $\mu\text{m}$  e com condições experimentais diferentes das apresentadas na seção 3.1.2.1. Conforme observado, o canal apresenta dimensões significativamente menores que aquelas que foram obtidas com a transparência impressa a laser com linhas de 250  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.18:** Micrografias ópticas obtidas para linhas com 100  $\mu\text{m}$  de largura impressas com impressora laser em transparência (a) e através da tecnologia de fotolito (b).



**Figura 3.19:** Micrografia eletrônica de varredura obtida para a seção transversal de um canal construído a partir de uma máscara tipo fotolito com linha de 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3.2 Estratégias para selagem dos microssistemas

#### 3.1.3.2.1 Selagem com filme plástico adesivo

A estratégia de selagem dos canais empregando um filme plástico adesivo (seção 3.1.2.2.1) não foi eficiente. Para vazões maiores que  $80 \mu\text{L min}^{-1}$ , o filme perdeu a adesão com o substrato, ocasionando vazamentos. Possíveis irregularidades na superfície do elastômero assim como uma fraca interação entre os materiais devem ter potencializado o desprendimento do filme, tornando inviável o uso do sistema.

### **3.1.3.2.2 Selagem com preenchimento prévio dos canais**

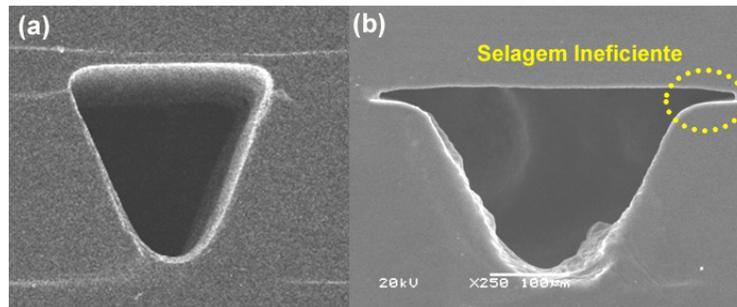
A selagem realizada com o preenchimento prévio dos canais com um material em pasta (seção 3.1.3.2.2) foi plenamente satisfatória em termos de resistência. Com a aplicação de vazões de até  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ , não foi constatado nenhum vazamento no dispositivo o que possibilitou a sua utilização. Apesar disto, o processo de preenchimento dos canais, realizado manualmente, foi bastante tedioso e irregularidades foram observadas, mesmo a olho nu, nos canais selados através deste procedimento. Deste modo, não houve uma vantagem significativa no uso desta estratégia em relação àquela proposta por Fernandes e Ferreira [45].

### **3.1.3.2.3 Selagem empregando camada de resiste com superfície não polimerizada**

A estratégia de selagem dos canais com uma placa do próprio elastômero com superfície não polimerizada (seção 3.1.3.2.3) foi a que proporcionou os melhores resultados. Conforme mostra a Figura 3.20 (a), houve uma boa adesão entre a placa de cobertura e a placa que continha os canais, não sendo observadas irregularidades na região de junção das mesmas. É importante dizer que as linhas esbranquiçadas que aparecem na imagem referem-se às irregularidades causadas pelo corte do polímero com um estilete e não a falhas na selagem. Como observado, estas linhas estão espalhadas aleatoriamente ao longo da superfície de corte e não são notadas na região de junção. Esta boa adesão permitiu que soluções aquosas fossem bombeadas ao longo do sistema com vazões superiores a  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ , sem nenhum vazamento.

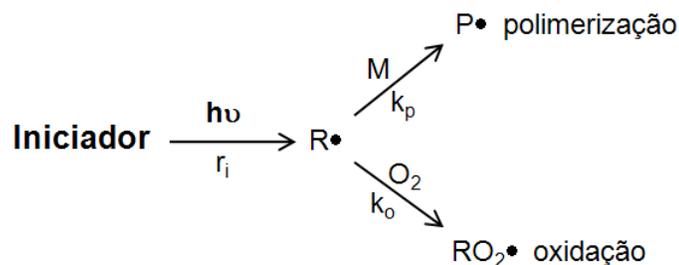
Embora não tenham sido efetuadas medidas da espessura do filme de resiste que permanece sobre a superfície da placa de cobertura sem polimerizar, a selagem de um canal com  $49 \mu\text{m}$  de profundidade, apresentado na Figura 3.19, mostra que este filme é suficientemente fino para não causar o entupimento de estruturas desta ordem de grandeza. Apesar disto, novos estudos devem ser realizados para avaliação dos limites de aplicação desta estratégia na selagem de dispositivos microfluídicos.

A Figura 3.20 (b) mostra a micrografia eletrônica de varredura para a seção transversal de um canal que foi selado a partir do procedimento descrito na seção 3.1.2.2.3, na ausência do fluxo de nitrogênio. As fendas observadas na parte superior da estrutura, exatamente na região de junção das placas, mostram que a selagem não foi eficiente, o que foi comprovado pela separação das partes com a introdução de uma pequena agulha no canal. Conforme será discutido a seguir, moléculas de oxigênio dissolvidas no resiste inibem a sua polimerização e impedem a selagem eficiente do sistema. Quando o fluxo de nitrogênio é utilizado, a difusão do oxigênio atmosférico para a superfície do resiste é suprimida e a polimerização ocorre de forma mais rápida e eficiente.



**Figura 3.20:** Micrografias de varredura eletrônica mostrando as diferenças entre os canais selados sob fluxo de nitrogênio (a) e na ausência deste fluxo (b).

Segundo Decker e Jenkis [50], o efeito do oxigênio na polimerização induzida por radiação ultravioleta pode ser representada pelo seguinte esquema,



onde  $r_i$  indica a velocidade de formação dos radicais de iniciação,  $\text{R}\bullet$ , através da fotólise do iniciador,  $k_p$  é a constante de velocidade de propagação do monômero  $\text{M}$  (cerca de  $10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para o monômero acrilato) e  $k_o$  é a constante de velocidade para a reação entre o radical e o oxigênio (aproximadamente  $5 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Em um ambiente bem arejado, a concentração de oxigênio dissolvido no resiste é alta

(da ordem de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) e a polimerização não ocorre imediatamente, pois  $k_o[O_2]$  é muito maior que  $k_p[M]$ , de modo que quase todos os radicais formados reagem apenas com o O<sub>2</sub>. À medida que esta reação se desenvolve, a concentração do oxigênio dissolvido diminui até um valor mínimo, no qual o seu consumo é compensado pela difusão do O<sub>2</sub> atmosférico através da superfície da resina. No momento em que a concentração de O<sub>2</sub> se torna baixa o suficiente para que as moléculas do monômero possam competir com sucesso pela captura dos radicais de iniciação, ou seja, quando  $k_o[O_2] \approx k_p[M]$ , a reação de polimerização se inicia. Assim, em um sistema aberto a polimerização será lenta, uma vez que deve ocorrer primeiramente o consumo do oxigênio dissolvido antes da polimerização.

Vale observar também que a concentração de O<sub>2</sub> dissolvido na superfície do resiste é maior que aquela no interior do substrato devido à exposição direta ao ar atmosférico. Deste modo, a polimerização desta região será ainda mais lenta ou poderá não ocorrer completamente. De fato, todos os microssistemas construídos a partir desta técnica apresentaram certa aderência em suas superfícies, a qual foi detectada ao simples toque e está associada a este fenômeno.

Conforme descrito na seção 3.1.3.2.3, a placa de cobertura não foi confeccionada em atmosfera livre de oxigênio e a exposição do resiste foi realizada irradiando-se, de forma direta, apenas uma de suas superfícies (Figura 3.9 (a)). Assim, a superfície que não foi irradiada diretamente permaneceu com um filme fino de monômero que agiu como uma camada adesiva intermediária [27] durante a selagem. Após a união das placas, o fluxo de nitrogênio aplicado sobre o dispositivo proporcionou uma atmosfera livre de oxigênio e as moléculas dissolvidas na superfície não polimerizada do resiste foram arrastadas, possibilitando a selagem eficiente do sistema após a exposição à radiação UV por um longo período (15 min).

É importante destacar que esta estratégia de selagem dos dispositivos é bastante simples e eficiente. Uma estrutura monolítica de alta resistência é formada entre a placa que contém os canais e a placa de cobertura sem que haja a necessidade de uso de equipamentos especiais, tais como “*spin-coaters*” para a deposição do filme de resiste ou de tratamentos de superfície, como aqueles necessários para a selagem irreversível de dispositivos em PDMS [7].

# Capítulo

## 4

*Microsistemas em Uretana-Acrilato com célula integrada para detecção fotométrica*

## **4.1 Microssistemas em Uretana Acrilato com célula integrada para detecção fotométrica**

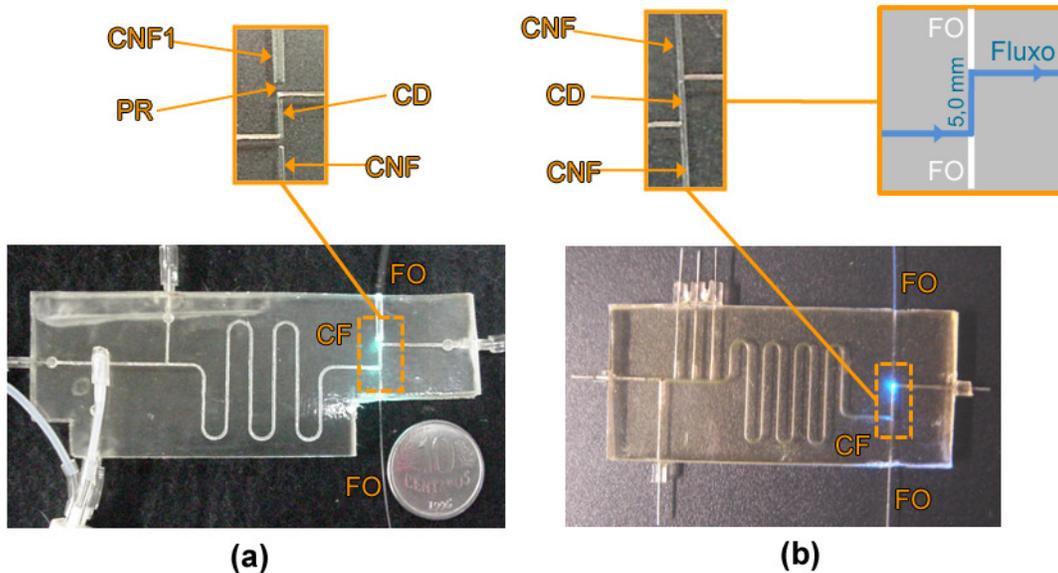
Devido ao uso de uma instrumentação simples, com tamanho reduzido e de baixo custo, a fotometria na região do espectro visível foi a primeira estratégia de detecção a ser estudada para integração aos microssistemas construídos em resina à base de UA. Como será discutido a seguir, duas formas para a integração das células de fluxo foram propostas e avaliadas. A estratégia que proporcionou os melhores resultados foi utilizada para desenvolver dois microssistemas que foram aplicados separadamente à determinação fotométrica de íons Cr(VI) e íons cloreto.

### **4.1.1 Parte experimental**

#### **4.1.1.1 Integração da célula de fluxo para detecção fotométrica**

As duas estratégias propostas para a integração da célula fotométrica de fluxo aos microssistemas em UA são apresentadas na Figura 4.1. Em ambas as configurações, um canal com 5,0 mm de comprimento foi utilizado como caminho óptico e outros dois canais foram utilizados para acoplamento de fibras ópticas, as quais foram empregadas para guiar a radiação da fonte até o sistema e deste até o detector. Na primeira configuração, Figura 4.1(a), os canais para acoplamento das fibras e o canal de detecção (caminho óptico) foram separados por paredes com aproximadamente 0,5 mm de espessura, o que evitou o contato das fibras com a solução de trabalho. Também nesta configuração, um canal mais largo foi projetado para permitir o acoplamento de uma fibra com 1,0 mm de diâmetro, utilizada para guiar a radiação da fonte até o sistema, enquanto um canal mais estreito foi utilizado para adaptação de uma fibra óptica com 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro, a qual foi utilizada para guiar a radiação do sistema até o detector. Na segunda configuração, Figura 4.1 (b), não houve separação entre os canais para acoplamento das fibras e o canal de detecção. Fibras ópticas plásticas com 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro foram adaptadas nas extremidades do canal de detecção de modo que as mesmas ficassem em contato direto com as soluções de trabalho. Também nesta configuração, as fibras foram

acopladas aos dispositivos de forma idêntica a descrita na 3.1.2.4 para adaptação das agulhas de acesso. Canais com dimensões ligeiramente menores que o diâmetro da fibra foram fabricados para proporcionar a adaptação por pressão das fibras, evitando vazamentos. Esta estratégia de integração da célula de fluxo proporcionou os melhores resultados e por isto foi utilizada para a construção dos sistemas aplicados à determinação fotométrica de íons cloreto e Cr(VI).



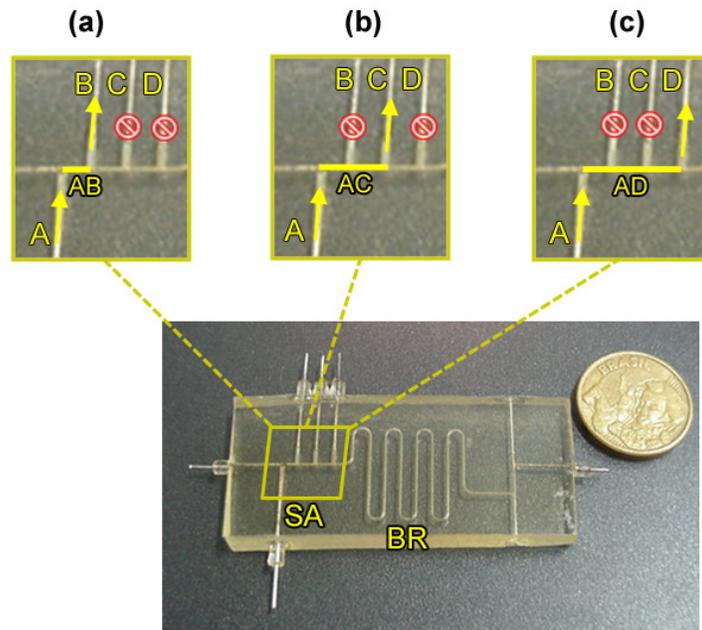
**Figura 4.1:** Integração de células de fluxo fotométricas aos sistemas miniaturizados. Canal para adaptação para fibra e canal de detecção separados por paredes de 0,5 mm **(a)** e fibras acopladas diretamente ao canal de detecção **(b)**. **CF:** Células de Fluxo **CNF1:** canal para adaptação da fibra óptica com 1,0 mm de diâmetro, **CNF:** Canais para adaptação das fibras ópticas com 250  $\mu$ m de diâmetro, **PR:** parede com 0,5 mm de espessura, **CD:** Canal de detecção com 5,0 mm de caminho óptico, **FO:** Fibras ópticas.

#### 4.1.1.2 Integração do sistema de amostragem e da bobina de reação

Os microssistemas propostos para a detecção fotométrica de espécies foram também projetados para permitir a injeção hidrodinâmica das amostras [40] de forma semelhante à descrita na seção 2.1.1.3.2 para o sistema em PMMA. Conforme ilustrado na Figura 4.2, o sistema de amostragem sugerido foi desenhado para permitir a escolha do volume injetado entre três opções disponíveis. Na primeira delas, o menor volume de amostra inserido no sistema era selecionado ao se obstruir os canais C e D, permitindo a aspiração da amostra somente através dos canais A e

B. Para este caso, o volume amostrado era definido pelas dimensões do canal representado pelo segmento AB na Figura 4.2 (a). Da mesma forma, ao se obstruir os canais B e D, permitiu-se que a amostra fosse aspirada somente através dos canais A e C e um volume representado pelo segmento AC na Figura 4.2(b) era inserido no sistema. Por último, o maior dos três volumes disponíveis era amostrado ao se obstruir os canais B e C, permitindo que a amostra preenchesse o segmento AD ilustrado na Figura 4.2 (c).

Este sistema de amostragem foi integrado aos dois microsistemas estudados neste trabalho, mantendo-se a mesma disposição e distância relativa entre os canais A, B, C e D. Entretanto, como foram utilizadas diferentes condições de fabricação para cada dispositivo, os volumes de amostragem representados pelos segmentos AB AC e AD foram também diferentes para cada microsistema e serão apresentados nas próximas seções. É importante relatar que a obstrução dos canais para a seleção dos “plugs” de amostragem foi realizada por meio da adaptação de pequenos tubos de Tygon<sup>®</sup>, devidamente estrangulados, às extremidades das agulhas de acesso destes mesmos canais. Os canais não obstruídos foram conectados normalmente aos dispositivos externos, como bomba e válvulas.

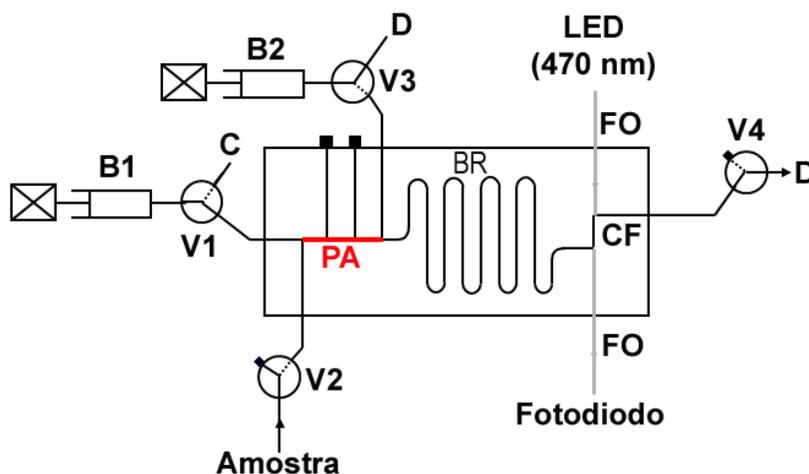


**Figura 4.2:** Fotografia de um microsistema em UA com sistema de amostragem (SA) e bobina de reação (BR) integrados e detalhes mostrando o caminho percorrido pela amostra durante as Injeções do menor volume (a), volume intermediário (b) e maior volume (c).

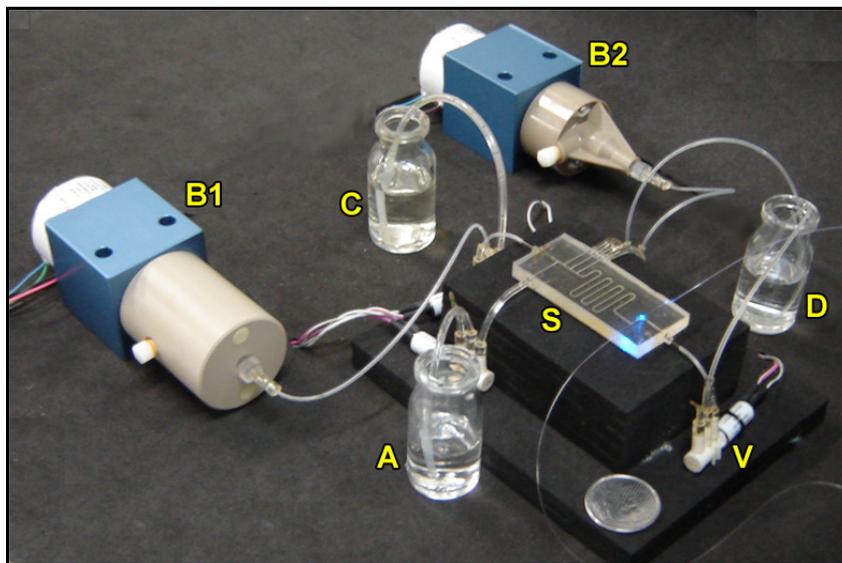
Para proporcionar a mistura das soluções, uma bobina de reação com 13 mm de comprimento foi integrada aos dispositivos próxima ao sistema de amostragem. A configuração com curvas foi utilizada com o objetivo de melhorar a mistura dos fluidos ao longo do sistema.

#### 4.1.1.3 Determinação de íons cloreto em águas minerais

Para esta aplicação, empregou-se o microsistema miniaturizado apresentado na Figura 4.2, o qual foi construído empregando-se uma foto-expositora comercial durante o procedimento de fotolitografia, seção 3.1.2.1, e o qual apresentava canais com 288  $\mu\text{m}$  de largura por 295  $\mu\text{m}$  de profundidade (exposição paralela) ou com 265  $\mu\text{m}$  x 205  $\mu\text{m}$  (exposição perpendicular). As medidas foram realizadas a partir da configuração em linha única ilustrada na Figura 4.3, na qual duas mini-bombas de pistão (B1 e B2) foram utilizadas para propulsão das soluções e quatro mini-válvulas solenóides de três vias (V1-V4) foram utilizadas para direcionamento do fluxo. Uma fotografia de todo o sistema é apresentada na Figura 4.4.



**Figura 4.3:** Configuração em linha única empregada para a determinação de cloreto em águas minerais: **B1 e B2:** Mini-bombas de pistão; **V1-V4:** mini-válvulas solenóides de três vias desligadas (*linhas pontilhadas indicam a via fechada*); **C:** Solução Carregadora; **BR:** bobina de reação com 13 cm, **D:** descarte; **PA:** “plug” de amostragem de 0,30  $\mu\text{L}$ , **FO:** Fibras ópticas e **CF:** Célula de fluxo (caminho óptico de 5 mm).



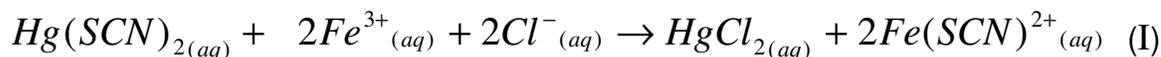
**Figura 4.4:** Fotografia do sistema utilizado para a determinação fotométrica de íons cloreto em águas minerais comerciais. **B1 e B2:** mini-bombas de pistão, **C:** reservatório da solução carregadora, **A:** reservatório da solução de amostra, **D:** reservatório para descarte, **S:** microsistema e **V:** mini-válvula solenóide.

As mini-bombas B1 (LPVX-0502150 B, Lee<sup>®</sup>) e B2 (LPVX 0504950 B, Lee<sup>®</sup>) utilizadas para a aplicação apresentam volumes totais de 250  $\mu\text{L}$  e 750  $\mu\text{L}$ , respectivamente, e podem operar em modo de passo completo ou em modo de meio passo. Em modo de passo completo, as bombas B1 e B2 proporcionam o deslocamento de 0,5  $\mu\text{L}$  e 1,5  $\mu\text{L}$ , respectivamente, a cada movimento do pistão. Em modo de meio passo, metade dos volumes acima são deslocados a cada movimento do pistão e, como consequência disto, vazões menores e com menor pulsação dos fluidos ao longo do sistema podem ser obtidas. As mini-válvulas solenóides (LHDA 0531415H, Lee<sup>®</sup>) apresentam um volume total de 70  $\mu\text{L}$  com volume morto de 5  $\mu\text{L}$ , cada uma. Maiores detalhes sobre estes dispositivos e sobre os circuitos desenvolvidos para permitir o controle dos mesmos estão descritos no apêndice B (seção B.1.2).

A injeção hidrodinâmica dos padrões e das amostras foi realizada empregando-se o maior “plug” disponível para o microsistema, o qual apresentava um volume de aproximadamente 0,30  $\mu\text{L}$ . O preenchimento deste “plug” com as soluções foi realizado mantendo-se todas as válvulas ligadas e ambas as bombas aspirando as soluções em modo de passo completo por 25 s. Nesta condição, as

válvulas V2 e V3 permitiram que a solução da amostra fosse aspirada pela bomba B2 a uma vazão de  $300 \mu\text{L min}^{-1}$ , preenchendo o plug de amostragem (PA), enquanto a bomba B1 era reabastecida com a solução carregadora a vazão de  $100 \mu\text{L min}^{-1}$ . Durante este procedimento, a válvula V4 atuava impedindo a aspiração da solução presente na bobina reação enquanto a válvula V1 impedia a aspiração da solução carregadora pela bomba B2. Após a inserção do “plug”, todas as válvulas eram desligadas e ambas as bombas passavam a dispensar as soluções em modo de meio passo por 50 s. Nesta condição, a bomba B1 impulsionava o “plug” de amostragem ao longo da bobina de reação até o detector à vazão de  $50 \mu\text{L min}^{-1}$ , enquanto a bomba B2 impulsionava a solução recém amostrada até o descarte à vazão de  $150 \mu\text{L min}^{-1}$ . Ao fim do período de 50 s, as bombas eram desligadas e permaneciam neste estado até um novo comando do analista.

Para esta determinação, uma solução aquosa contendo  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Hg}(\text{SCN})_2$  e  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{Fe}(\text{III})$  foi utilizada como carregador e soluções acidificadas com concentrações em  $\text{Cl}^-$  na faixa de  $0,0$  a  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  foram utilizadas como padrões para a construção da curva analítica. Com a mistura da solução carregadora e da solução padrão, os íons cloreto reagem estequiometricamente com o tiocianato de mercúrio(II) ligando-se aos íons  $\text{Hg}^{2+}$ , permitindo a formação do complexo colorido de tiocianato de ferro, conforme descrito na equação (I). Devido à esta relação estequiométrica, medidas de absorbância do complexo de tiocianato de ferro permitiram determinar indiretamente a concentração de íons cloreto nas amostras.



As medidas fotométricas foram efetuadas utilizando-se um LED com máximo de emissão em  $470 \text{ nm}$  como fonte de radiação e um fotodiodo (RS 308-067) como transdutor, sendo ambos conectados à célula de fluxo integrada ao sistema por meio de fibras ópticas plásticas com  $250 \mu\text{m}$  de diâmetro, seção 4.1.1.1. A leitura do sinal analítico foi realizada após o procedimento de amostragem em intervalos de  $0,5 \text{ s}$  durante  $30 \text{ s}$ , totalizando o registro de  $60$  leituras para cada injeção. O controle das

bombas, válvulas e do sistema de detecção foi realizado através de um microcomputador equipado com uma interface eletrônica PCI 9111 DG/HR (Adlink Tech. Inc.), com conversor A/D de 12 bits e de um programa escrito em VisualBasic 5.0.

#### **4.1.1.3.1 Reagentes e Soluções**

Reagentes de grau analítico e água destilada/desionizada foram utilizados no preparo de todas as soluções. Uma solução estoque com  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  em íons cloreto foi preparada pela dissolução da massa apropriada do sal NaCl (Synth) em água. Cinco soluções de referência contendo íons cloreto na faixa de concentração de  $2,0 - 10,0 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparadas através da diluição apropriada de alíquotas desta solução estoque em  $\text{HNO}_3$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução do branco foi preparada com a mesma concentração de  $\text{HNO}_3$  na ausência do analito.

Uma solução estoque de  $\text{Hg}(\text{SCN})_2$   $1,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução da massa apropriada do sal (Merck) em 50 mL de metanol (Synth) com posterior diluição à 100 mL em água. Uma solução estoque contendo  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em Fe(III) foi preparada pela dissolução do sal  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (Vetec) em solução de  $\text{HNO}_3$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução carregadora contendo  $\text{Hg}(\text{SCN})_2$   $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , íons  $\text{Fe}^{3+}$   $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{HNO}_3$   $0,03 \text{ mol L}^{-1}$  e metanol 1,5 % v/v foi preparada pela diluição apropriada de alíquotas das soluções acima em água.

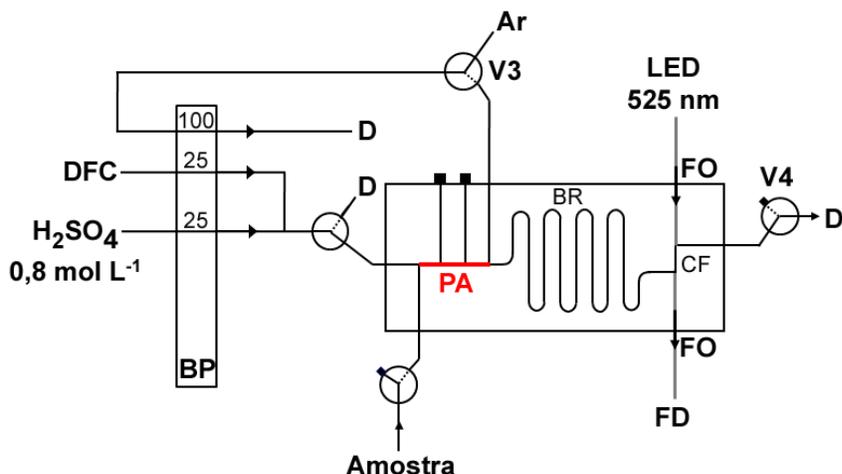
Amostras de águas minerais comerciais foram adquiridas no mercado local e apropriadamente diluídas em  $\text{HNO}_3$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### **4.1.1.3.2 Método de Referência**

A concentração de íons cloreto nas águas estudadas foi também determinada pelo método espectrofotométrico em batelada empregando-se os mesmos reagentes. A curva analítica foi construída com padrões contendo íons cloreto na faixa de  $0,0$  a  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo as amostras diluídas para permitir a determinação nesta faixa de trabalho. As medidas foram realizadas com um espectrofotômetro Jenway® modelo 6405, empregando-se o comprimento de onda de 480 nm e uma cubeta com 1,0 cm de caminho óptico.

#### 4.1.1.4 Determinação de íons Cr(VI) em águas contaminadas e em ligas de Ni-Cr.

Para esta aplicação, um microsistema semelhante ao apresentado na Figura 4.2 foi construído empregando-se uma fotoexpositora “home-made” durante o procedimento de fotolitografia, seção 3.1.2.3. Este microsistema apresentava canais com 230  $\mu\text{m}$  de largura por 70  $\mu\text{m}$  de profundidade (exposição perpendicular) ou com 220  $\mu\text{m}$  de largura por 100  $\mu\text{m}$  de profundidade (exposição paralela). Conforme ilustrado na Figura 4.5, este dispositivo foi devidamente conectado a quatro válvulas solenóides (Cole-Parmer Instrument Co. P/N. 01367-72) e a uma bomba peristáltica (Ismatec MP-13R), a fim de permitir a injeção hidrodinâmica das amostras e a confluência externa ao sistema de uma solução de ácido sulfúrico 0,8 mol L<sup>-1</sup> com a solução do reagente cromogênico (difenilcarbazida 0,05 % m/v). Estas soluções foram impulsionadas à mesma vazão de 25  $\mu\text{L min}^{-1}$  ao longo dos canais, proporcionando a vazão total de 50  $\mu\text{L min}^{-1}$  na saída da célula de fluxo.



**Figura 4.5:** Configuração de fluxo proposta para a determinação fotométrica de íons Cr(VI). **DFC:** solução de difenilcarbazida 0,05 % m/m em acetona 0,4% v/v, **BP:** Bomba peristáltica (*indicação das vazões em  $\mu\text{L min}^{-1}$* ), **V1-V4:** válvulas solenóides de três vias desligadas (*linhas pontilhadas indicam a via fechada*), **BR:** bobina de reação com 15 cm, **D:** descarte, **CF:** célula de fluxo, **FD:** fotodiodo e **FO:** fibras ópticas.

O procedimento empregado para a injeção das amostras foi semelhante ao descrito na seção 2.1.1.3.2 para a determinação fotométrica de Fe(II) com o sistema em PMMA. Com o acionamento simultâneo de todas as válvulas, a amostra era aspirada de seu reservatório através das válvulas V2 e V3, preenchendo o “plug” de

amostra (PA), o qual foi selecionado conforme a descrição na seção 4.1.1.2, permitindo a injeção do maior volume de amostra disponível para este sistema (0,12  $\mu\text{L}$ ). Ao se desligar todas as válvulas, o “plug” de amostra era impulsionado em direção à célula de fluxo, reagindo com a difenilcarbazida ao longo de uma bobina de reação com 13 cm de comprimento. Neste procedimento, as válvulas foram acionadas por exatamente 20 s a cada injeção e desligadas imediatamente após este período. Ao se substituir os padrões ou as amostras, a primeira injeção da nova solução foi realizada aumentando-se a rotação dos roletes da bomba peristáltica, para permitir a rápida limpeza da linha entre o sistema e a válvula V2.

A detecção foi realizada utilizando-se um LED com máximo de emissão em 525 nm como fonte de radiação e um fotodiodo (RS 308-067) como transdutor, sendo ambos conectados à célula de fluxo integrada ao sistema por meio de fibras ópticas plásticas com 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro, seção 4.1.1.1. A leitura do sinal analítico foi realizada imediatamente após o procedimento de amostragem por um período total de 25 s em intervalos de 0,5 s, totalizando o registro de 50 leituras para cada injeção. O controle das válvulas e do sistema de detecção foi realizado através de um microcomputador equipado com uma interface eletrônica PCI 9111 DG/HR (Adlink Tech. Inc.) com conversor A/D de 12 bits e de um programa escrito em VisualBasic 5.0.

#### **4.1.1.4.1 Reagentes e soluções**

Todas as soluções empregadas foram preparadas em água desionizada com reagentes de grau analítico. Uma solução estoque de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  com concentração de 1000  $\text{mg L}^{-1}$  em Cr(VI) foi preparada pela dissolução da massa apropriada do sal (VETEC) em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1  $\text{mol L}^{-1}$ . Para a construção da curva analítica com o sistema proposto, seis soluções padrão de Cr(VI) na faixa de 0,0 a 1,5  $\text{mg L}^{-1}$  foram preparadas pela diluição, à 25 mL, de alíquotas da solução estoque em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5  $\text{mol L}^{-1}$ . Uma solução de difenilcarbazida 0,05% m/m foi preparada pela dissolução da massa apropriada desta substância (VETEC) em solução aquosa de acetona 0,4 % v/v. A solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,8  $\text{mol L}^{-1}$  foi preparada pela diluição apropriada do reagente (Synth) em água.

Aproximadamente 200 mg de três diferentes ligas de Ni-Cr foram digeridas em 25 mL de água régia, sendo as soluções resultantes tratadas posteriormente com 1,5 g de persulfato de sódio a 80 °C por 20 minutos. Após o resfriamento, o volume final de cada solução foi ajustado para 100 mL em um balão volumétrico com solução de HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Para permitir as leituras, alíquotas destas soluções foram ainda diluídas até 25,00 mL em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. As amostras de água subterrânea contaminadas com Cr(VI) foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química da UNICAMP (LQA) e preparadas de acordo com o recomendado pelo método padrão [51].

#### **4.1.1.4.2 Método de Referência**

Para avaliação dos resultados obtidos com o microsistema, realizou-se a determinação de Cr(VI) nas mesmas amostras através do método espectrofotométrico em batelada empregando-se um espectrofotômetro Jenway® modelo 6405, com uma cubeta com 1,0 cm de caminho óptico. As medidas foram realizadas com o mesmo comprimento de onda (525 nm) e na mesma faixa de concentração (0,0-1,5 mg L<sup>-1</sup> em Cr(VI)).

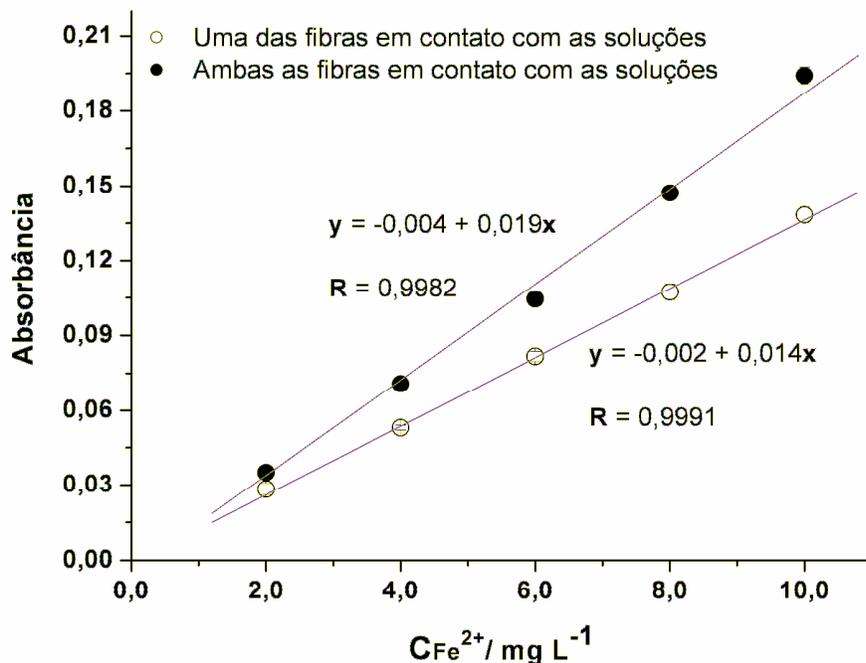
## **4.1.2 Resultados e discussão**

### **4.1.2.1 Integração da célula de fluxo**

O primeiro microssistema desenvolvido a partir do resiste de UA para a determinação fotométrica de espécies foi construído com uma expositora “home-made” (seção 3.1.2.3), empregando-se a selagem com preenchimento prévio dos canais com material em pasta (seção 3.1.3.2.2). Uma fotografia deste protótipo é apresentada na Figura 4.1 (a), onde se observa que a célula de fluxo fotométrica foi integrada ao dispositivo separando-se as fibras ópticas do canal de detecção com uma fina camada de polímero (seção 4.1.1.1). Embora o elastômero resultante da cura da resina não absorva radiação visível [45], nenhuma resposta do detector para injeções de soluções absorvedoras foi notada ao se empregar esta célula. Parte da radiação proveniente do LED, guiada até o sistema pela fibra de maior diâmetro, era espalhada ao atingir a janela de polímero, dificultando a obtenção do sinal analítico. Do mesmo modo, os feixes de radiação que atravessavam o caminho óptico eram espalhados pela parede de polímero situada entre o canal de detecção e a fibra empregada para a captação da radiação. Para minimizar este efeito, um pequeno orifício foi aberto, com o auxílio de uma agulha, na janela de polímero próxima ao canal de adaptação para a fibra de 250  $\mu\text{m}$ , utilizada para guiar a radiação do sistema ao detector. Através deste orifício, a pequena fibra foi introduzida de modo a ficar em contato direto com o canal de detecção enquanto a fibra maior continuava separada deste último pela parede de polímero. Com esta configuração, foi possível obter respostas do detector para injeções de padrões com 2,0 a 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  de Fe(II) empregando-se o mesmo método fotométrico da o-fenantrolina descrito na seção 2.1.1.3 para o sistema em PMMA.

Devido aos bons resultados obtidos com a configuração acima, onde apenas uma das fibras entrava em contato direto com as soluções, construiu-se um novo dispositivo (Figura 4.1 (b)) onde duas fibras com diâmetro de 250  $\mu\text{m}$  foram acopladas diretamente ao canal de detecção. Conforme mostram as curvas analíticas na Figura 4.6, esta última estratégia proporcionou maior sensibilidade ao método devido à eliminação completa das paredes de polímero que causavam o

espalhamento da radiação. Vale observar, entretanto, que os sistemas utilizados para a obtenção destas curvas foram construídos com “layouts” diferentes e com canais de dimensões diferentes, de modo que não apenas a disposição das fibras poderia influenciar nos resultados obtidos. Apesar disto, ambos os sistemas apresentavam o mesmo comprimento para a bobina de reação (aproximadamente 13 cm), sendo que um “plug” de amostra com maior comprimento (15 mm) foi utilizado para o sistema que apresentou menor sensibilidade e um “plug” de amostra com apenas 2 mm de comprimento foi empregado para o sistema que apresentou maior sensibilidade. Considerando este aspecto, a principal fonte de diferença para os resultados pode ser atribuída ao posicionamento das fibras uma vez que o menor “plug” de amostra sofre maior dispersão ao longo do sistema e, portanto, atinge a célula de detecção de forma mais diluída.



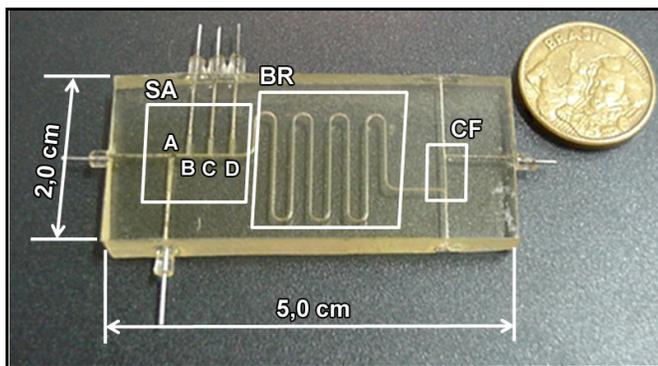
**Figura 4.6:** Curvas analíticas obtidas para a determinação de  $Fe^{2+}$  através do método fotométrico com o-fenantrolina empregando-se microsistemas com diferentes posicionamentos das fibras.

Devido a estes resultados, os dois microsistemas construídos para aplicação em determinações fotométricas possuíam células onde as fibras foram acopladas diretamente aos canais de detecção.

### 4.1.2.2 Caracterização dos dispositivos

Conforme relatado anteriormente, dois microsistemas semelhantes foram aplicados separadamente à determinação fotométrica de íons Cr(VI) e de íons cloreto em diferentes amostras. O microsistema aplicado à determinação de íons Cr(VI) foi construído com uma expositora “home-made” (seção 3.1.2.3) empregando-se uma máscara fotolitográfica cujas linhas apresentavam 500  $\mu\text{m}$  de largura. O dispositivo aplicado à determinação de íons cloreto foi desenvolvido com uma máscara análoga à anterior onde a largura das linhas foi alterada para 350  $\mu\text{m}$  e a exposição foi efetuada com uma expositora comercial (seção 3.1.2.1). Devido a estas diferenças no procedimento de fabricação, os dispositivos apresentaram diferentes dimensões internas para os seus respectivos canais. Entretanto, a disposição dos mesmos ao longo do substrato para os dois microsistemas foi exatamente igual.

A Figura 4.7 mostra que o sistema de amostragem, a bobina de reação e a célula de fluxo foram integradas a uma estrutura monolítica com 5,0 cm de comprimento; 2,0 cm de largura e 0,4 cm de altura, tornando os dispositivos tão pequenos quanto uma caixa de fósforos. Com base nas áreas das seções transversais dos canais calculadas a partir das imagens de microscopia eletrônica de varredura, os volumes totais dos microsistemas e de regiões específicas dos mesmos foram determinados. A Tabela 4.1 lista os valores encontrados e mostra que o dispositivo construído com a expositora “home-made”, aplicado à determinação de Cr(VI), apresentou os menores volumes devido às menores áreas de seções transversais apresentadas para seus canais.



**Figura 4.7:** Fotografia geral do microsistema proposto com indicação do sistema de amostragem (SA), bobina de reação (BR) e célula de fluxo (CF).

**Tabela 4.1:** Dimensões e volumes de algumas regiões dos microsistemas propostos

	comprimento / mm	Sistema Cr(VI)	Sistema Cl <sup>-</sup>
		Volumes / $\mu\text{L}$	Volumes / $\mu\text{L}$
<b>Segmento AB</b>	2,0	0,03	0,09
<b>Segmento AC</b>	5,0	0,08	0,22
<b>Segmento AD</b>	8,0	0,12	0,30
<b>Bobina de Reação</b>	130,0	1,23	3,81
<b>Célula de fluxo</b>	5,0	0,04	0,14
<b>Sistema todo*</b>		2,2	7,00

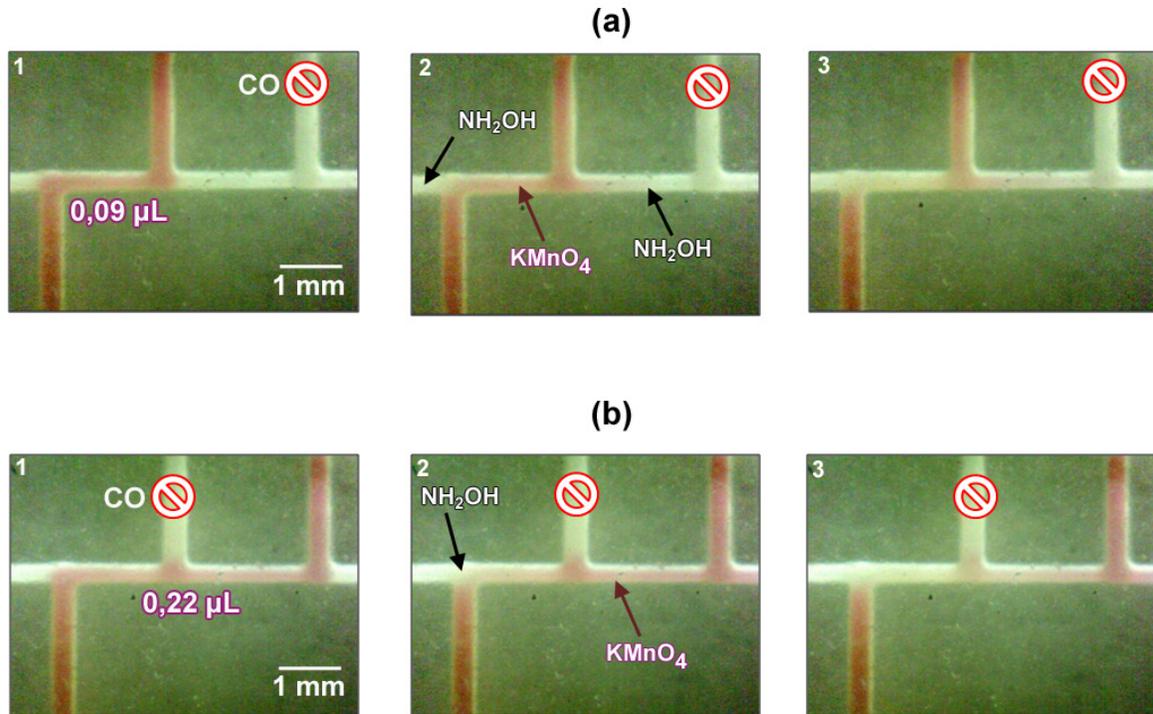
\*canais de acesso inclusos

Conforme descrito na seção 4.1.1.2, os microsistemas desenvolvidos foram projetados para permitir a injeção hidrodinâmica de até três volumes diferentes de amostra. A Tabela 4.1 também lista os valores calculados para estes volumes com base no comprimento dos segmentos formados entre o ponto A e os pontos B, C ou D, na Figura 4.7. Com o objetivo de verificar se apenas as regiões situadas entre estes pontos eram preenchidas pela amostra, um microscópio digital portátil (Avantscope<sup>®</sup>) foi posicionado sobre o sistema de amostragem e utilizado para a aquisição de imagens em tempo real de todo o procedimento de injeção. Para tornar as imagens mais nítidas, uma solução saturada de  $\text{KMnO}_4$  foi utilizada como solução de amostra e uma solução de cloreto de hidroxilamina (5 % m/v) foi empregada como carregador em um sistema de linha única idêntico ao ilustrado na Figura 4.3 para a determinação de cloreto. Apenas o microsistema fabricado com a expositora comercial foi avaliado neste estudo.

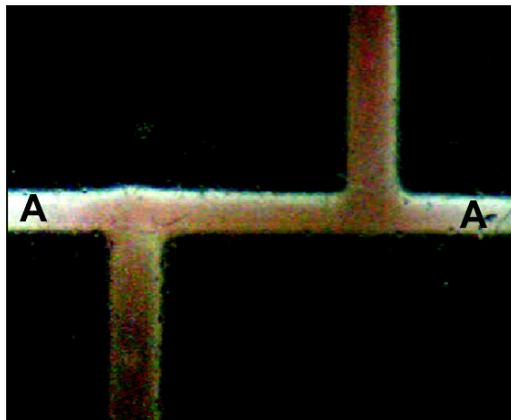
A Figura 4.8 mostra a seqüência de imagens obtidas ao se realizar as injeções com o “plug” de 0,09  $\mu\text{L}$  (a) e com o “plug” de 0,22  $\mu\text{L}$  (b). Conforme observado nas primeiras imagens, a amostra preenche apenas o “plug” de amostragem, não havendo alargamento da zona em relação aos canais de entrada e saída, coloridos pela amostra. Além disso, para o “plug” maior, nota-se que não ocorre um avanço significativo da amostra em direção ao canal que foi previamente obstruído para a seleção do volume de amostragem. Deste modo pode-se afirmar que os volumes apresentados na Tabela 4.1 representam uma boa estimativa dos volumes realmente

amostrados durante o procedimento de injeção hidrodinâmica. É importante observar, no entanto, que estes estudos foram realizados empregando-se a aspiração das amostras à vazão de  $300 \mu\text{L min}^{-1}$  e que, nesta condição, o procedimento foi visualmente reprodutível. Quando o mesmo procedimento foi realizado à vazão de aproximadamente  $500 \mu\text{L min}^{-1}$ , o alargamento da zona de amostragem foi significativo (Figura 4.9) e o volume amostrado deixou de ser reprodutível como consequência de um regime de pressão desfavorável para a operação.

As imagens 2 e 3 na Figura 4.8 mostram o “plug” de amostra sendo carregado logo após a injeção. Como a reação entre o  $\text{KMnO}_4$  e a hidroxilamina é praticamente instantânea com formação de um produto incolor, parte da amostra reage imediatamente após o início do bombeamento, o que é notado pelo clareamento das extremidades do “plug” que interagem de forma mais rápida com a solução do reagente. Para o maior volume injetado (Figura 4.8 (b)), nota-se que a pequena porção de amostra que preencheu parte do canal obstruído (CO) é arrastada de forma mais lenta pelo fluxo carregador. Entretanto, a limpeza completa do canal de amostragem foi realizada em cerca de 2 s, de modo que esta constatação não deve representar um grande inconveniente.



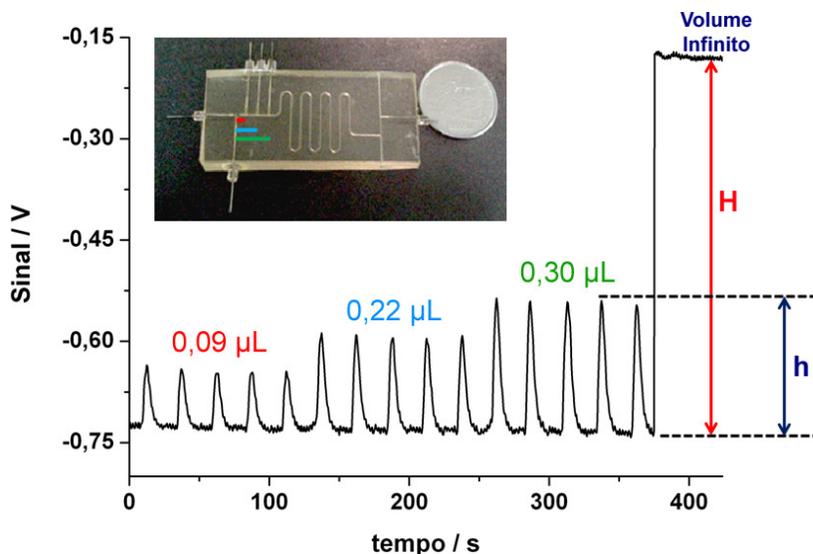
**Figura 4.8:** Imagens em seqüência (1, 2 e 3) para o procedimento de amostragem hidrodinâmica realizado com “plugs” de amostra de 0,09  $\mu\text{L}$  **(a)** e 0,22  $\mu\text{L}$  **(b)** à vazão de 300  $\mu\text{L min}^{-1}$ . **CO:** canal obstruído durante a seleção do volume de amostragem (preenchido previamente com água).



**Figura 4.9:** Imagem mostrando o alargamento do “plug” de amostragem ao se utilizar a aspiração da amostra com vazões elevadas (aproximadamente 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ). A: Regiões onde a amostra avança sobre o reagente

Os coeficientes de dispersão (D) [39] para os três volumes de amostragem em relação à bobina com 13 cm de comprimento foram avaliados a partir da configuração de fluxo apresentada na Figura 4.3, empregando-se um LED com máximo de emissão em 500 nm como fonte de radiação. A solução carregadora (tampão acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,5) foi propelida à vazão de 50 µL min<sup>-1</sup> ao longo do sistema enquanto a solução absorvedora (6,0 mg L<sup>-1</sup> em Fe<sup>2+</sup> previamente complexado com o-fenantrolina) foi aspirada através de cada um dos plugs para obtenção das respectivas respostas. A mesma solução do complexo de Fe(II) com o-fenantrolina foi empregada para a obtenção do sinal sem dispersão (volume infinito).

A Figura 4.10 mostra que as alturas dos picos obtidos relacionam-se com o volume do “plug” de amostra utilizado, de modo que picos mais altos foram obtidos para os maiores volumes de amostra, como consequência da menor dispersão ao longo do sistema. Este resultado indica um bom desempenho para a estratégia de amostragem empregada e demonstra que a seleção do volume injetado pode ser realizada de maneira simples e eficiente.



**Figura 4.10:** Diagrama obtido para a injeção de “plugs” de amostras com diferentes volumes e fotografia indicando os referidos “plugs”.

A Tabela 4.2 lista os coeficientes de dispersão (D) calculados para o uso dos diferentes volumes de amostragem. De acordo com o sugerido por Ruzicka e Hansen [39], o “plug” com maior volume proporcionou uma dispersão limitada da

amostra ao longo do sistema, enquanto que os “plugs” com volumes de 0,09 e 0,22  $\mu\text{L}$  proporcionaram a dispersão média da mesma. Embora nenhum dos volumes utilizados tenha proporcionado a dispersão elevada da amostra, uma redução ainda maior no volume de amostragem poderia tornar inviável a obtenção do sinal analítico para a determinação fotométrica e um aumento na bobina de reação poderia tornar a análise demasiadamente lenta. Considerando que a dispersão média é normalmente requerida para sistemas em fluxo que utilizam detectores espectrofotométricos [44], o sistema proposto apresentou uma boa relação entre os volumes injetados e o comprimento da bobina de reação (13 cm).

**Tabela 4.2:** Estudo de dispersão para os diferentes volumes de amostra injetados.

Volume dos “Plugs” ( $\mu\text{L}$ )	Coefficiente de Dispersão (D) $D = H/h^*$	Tipo de dispersão**
0,09	$6,3 \pm 0,3$	Média (3-10)
0,22	$4,0 \pm 0,1$	Média (3-10)
0,30	$2,9 \pm 0,1$	Limitada (1-3)

\*as alturas  $h$  e  $H$  estão representadas na Figura 4.10.

\*\* De acordo com o descrito por Ruzicka e Hansen [39].

O número de Reynolds [52] foi também estimado para o sistema construído com a expositora comercial a fim de avaliar o regime de fluxo ao longo dos micro-canais. Para o cálculo, empregou-se a expressão,

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu}$$

onde  $\rho$ ,  $\mu$  e  $v$  são a densidade, viscosidade dinâmica e velocidade do fluido, respectivamente, e  $D$  o diâmetro do canal. O fluido empregado como base para a estimativa foi a água pura a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo a sua velocidade ( $v$ ) calculada como a razão entre a vazão de  $50\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$  e a área da seção transversal dos canais ( $0,027\text{ mm}^2$ ).

O diâmetro do canal (D) foi estimado considerando a área da seção transversal do referido canal (A) a partir da expressão,

$$D = 2\sqrt{\frac{A}{\pi}}$$

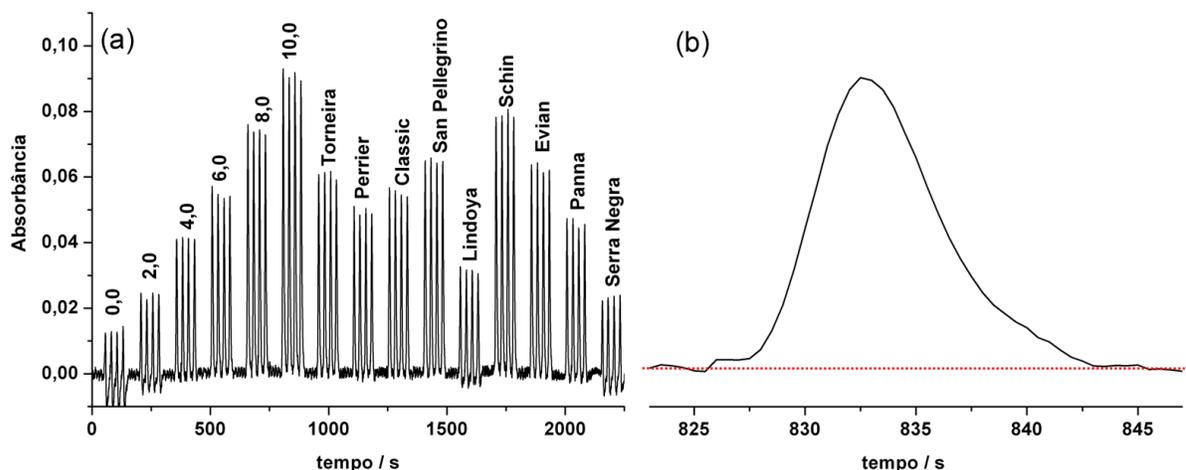
a qual foi baseada na equação para a determinação da área de um círculo.

Para a vazão de  $50 \mu\text{L min}^{-1}$ , empregada para a propulsão dos fluidos na maioria das aplicações com os microssistemas, o número de Reynolds encontrado foi de aproximadamente 6,5, considerando-se um segmento linear do canal. Em um sistema FIA convencional com dutos de 0,8 mm de diâmetro, operando à vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , o número de Reynolds estimado é igual a 30. Estes resultados indicam que o regime de fluxo laminar deve ser esperado para ambos os casos, já que o limite mínimo para o regime de fluxo turbulento se dá em um número de Reynolds da ordem de 2100. Entretanto, devido ao valor encontrado para o microssistema ser cerca de 5 vezes menor que aqueles normalmente obtidos para sistemas FIA convencionais, o fluxo será ainda mais laminar como consequência do pequeno tamanho dos canais e da baixa vazão empregada.

#### **4.1.2.3 Determinação de íons cloreto em águas minerais**

A Figura 4.11 (a) mostra o diagrama obtido para a determinação fotométrica de íons cloreto em águas minerais empregando o microssistema proposto. Nota-se que a linha de base apresentou boa estabilidade e que razões sinal/ruído elevadas foram obtidas para injeções de todos os padrões. Entretanto, observa-se que a injeção do branco ( $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi detectada por um sinal característico do efeito de Schlieren [53], o qual surgiu devido a diferença entre os índices de refração da solução carregadora e da solução do branco. Embora este efeito pudesse ser minimizado ajustando-se a força iônica de ambas as soluções, optou-se por realizar a determinação sem este ajuste, uma vez que os sinais obtidos para o padrão de menor concentração ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) eram suficientemente maiores que aqueles obtidos para o branco.

O sinal ampliado para uma injeção do padrão com 10,0 mg L<sup>-1</sup> em cloreto, apresentado na Figura 4.11(b), indicou um perfil mais simétrico que aqueles usualmente obtidos em sistemas FIA. Devido à baixa vazão (50 µL min<sup>-1</sup>) e à pequena seção transversal do canal, a dispersão por difusão radial foi favorecida em relação à convecção e à difusão axial, levando a esta resposta [44]. Vale observar que os picos obtidos com o uso deste mesmo microsistema para os ensaios de dispersão (Figura 4.10, seção 4.1.2.2) não demonstraram o mesmo comportamento, de modo que não só a geometria triangular dos canais teve influência sobre o perfil do sinal analítico, mas sim o conjunto de todas as condições empregadas.

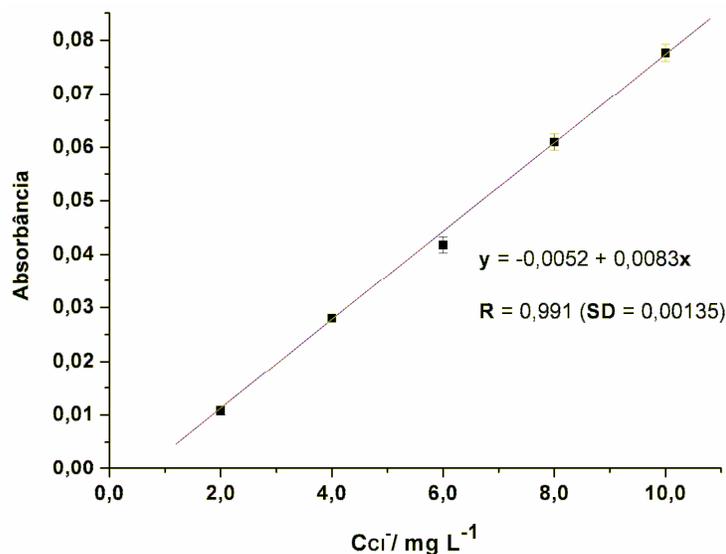


**Figura 4.11:** Determinação fotométrica de íons cloreto em águas. Diagrama para injeções dos padrões (0,0-10,0 mg L<sup>-1</sup> em Cl<sup>-</sup>) e das amostras **(a)** e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com 10,0 mg L<sup>-1</sup> do analito **(b)**.

O desvio padrão relativo para a média das alturas dos quatro picos obtidos para a solução de referência com 6,0 mg L<sup>-1</sup> foi de 3,7 %, indicando uma boa repetibilidade para o método. Com o uso das condições descritas na seção 4.1.1.3, o tempo necessário para a injeção da amostra e aquisição do sinal analítico foi de 75 s, o que proporcionou a frequência analítica de 48 injeções por hora. Este valor, embora ainda baixo, pode ser aumentado, desvinculando o procedimento de amostragem do procedimento de detecção, empregado para a utilização das mini bombas de pistão. Desta forma, a frequência de até 180 determinações h<sup>-1</sup> pode ser alcançada, considerando que o tempo total para a aquisição completa do sinal analítico, com retorno à linha de base, é de aproximadamente 20 s (Figura 4.11 (b)).

É importante destacar que apesar da baixa frequência analítica, o volume de solução carregadora ( $\text{Hg}(\text{SCN})_2$   $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) descartado após 100 injeções de amostras é de aproximadamente 4,0 mL, contendo cerca de 0,4 mg de Hg residual. Em uma jornada de trabalho de 8 horas, o volume de solução carregadora descartada ao final do dia será menor que 20 mL. Para o mesmo número de amostras injetadas, os sistemas FIA convencionais [39 e 54] geram massas residuais de mercúrio 40 a 400 vezes maiores que a descartada com o método proposto. Este fato representa a característica mais importante dos microsistemas desenvolvidos, já que a redução na geração de resíduos preenche um dos requisitos de grande relevância para a Química Verde.

A curva analítica construída com as médias das alturas dos picos em relação ao sinal do branco é apresentada na Figura 4.12. O coeficiente de regressão linear encontrado com o ajuste por mínimos quadrados ( $R=0,9991$ ) demonstrou o cumprimento da lei de Beer para a faixa de concentração estudada, entretanto, o coeficiente linear da reta de ajuste foi deslocado negativamente em relação à “ $y = 0$ ”, o que pode estar associado ao efeito de Schilieren sobre o sinal do branco, o qual foi utilizado como referência para a determinação das alturas dos picos. O limite de detecção, estimado em  $0,96 \text{ mg L}^{-1}$ , foi calculado empregando-se a média do sinal do branco adicionado de três vezes o seu desvio padrão. Este valor, ainda alto, pode ser reduzido também pela minimização do efeito de Schilieren.



**Figura 4.12:** Curva analítica construída com o uso do microsistema para a determinação de cloreto na faixa de concentração de 2,0 a 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  do analito.

A Tabela 4.3 lista os resultados obtidos para a determinação de íons cloreto em águas minerais comerciais e em água de torneira empregando-se o microsistema proposto e o método em batelada (seção 4.1.1.4.2). O teste F [58] realizado com o nível de significância de 0,05 não indicou diferenças significativas entre os desvios padrões das médias para 8 das 9 amostras analisadas. Apenas para a amostra “Serra Negra” foi observada uma diferença significativa entre os desvios obtidos por ambos os métodos, indicando uma boa precisão para as medidas realizadas com o microsistema. O teste T independente [58] aplicado aos resultados obtidos por ambos os métodos com um intervalo de confiança de 95 %, excluindo-se a amostra “Serra Negra”, mostrou que as médias obtidas por ambos os métodos não foram significativamente diferentes para a maioria das amostras, sendo observadas diferenças significativas apenas para as amostras “Torneira” e “S. Pellegrino”. Em um intervalo de confiança maior, 98%, apenas as médias obtidas para a amostra “S. Pellegrino” mostraram-se significativamente diferentes, permitindo afirmar que o método proposto com o microsistema possibilita também uma boa exatidão.

**Tabela 4.3:** Determinação de íons cloreto em águas minerais e de torneira

Amostra	$\mu\text{FIA}^*$	batelada**	Erro / %
	[Cl <sup>-</sup> ] / mgL <sup>-1</sup>	[Cl <sup>-</sup> ] / mgL <sup>-1</sup>	
Torneira	12,7 ± 0,3	13,4 ± 0,2	-4,4
Perrier	25,2 ± 1,0	26,8 ± 0,4	-5,6
Classic	5,8 ± 0,2	5,5 ± 0,1	+4,0
S. Pellegrino	68,9 ± 1,0	61,7 ± 0,3	+12
Lindoya	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,1	-3,7
Schin	17,2 ± 0,4	16,7 ± 0,6	+2,6
Evian	6,7 ± 0,2	6,8 ± 0,2	-1,9
Panna	9,3 ± 0,4	8,8 ± 0,1	+5,8
Serra Negra	1,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1	+10

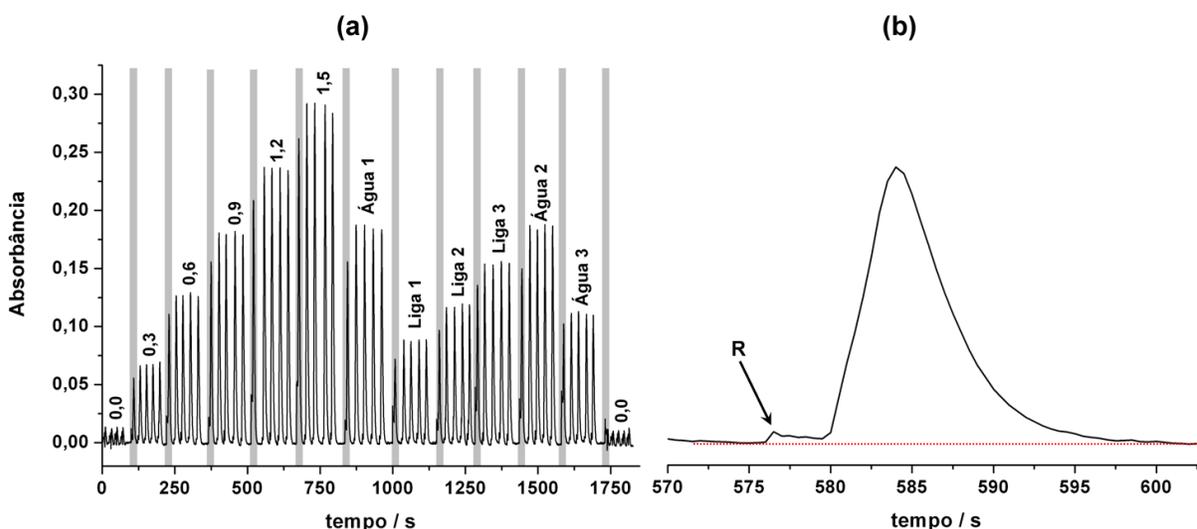
\*médias para quatro medidas

\*\*médias para três medidas (método espectrofotométrico em batelada)

O bom desempenho analítico obtido com o uso do microsistema FIA proposto para esta aplicação demonstra que as estratégias utilizadas para a construção do dispositivo e para a integração da célula fotométrica foram muito bem sucedidas. A partir deste estudo inicial, outros métodos de análise em fluxo que empregam a detecção fotométrica poderão ser adaptados para a escala em miniatura de forma simples e barata.

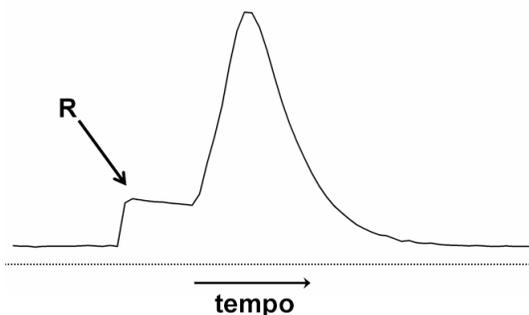
#### 4.1.2.4 Determinação de íons Cr(VI) em águas contaminadas e em ligas de Ni-Cr.

O diagrama obtido para a determinação de Cr(VI) em ligas metálicas e em águas contaminadas empregando-se as condições descritas na seção 4.1.1.4 é apresentado na Figura 4.13(a), onde os picos destacados em cinza referem-se às injeções de limpeza realizadas durante a troca dos padrões. Novamente, uma boa estabilidade para a linha de base foi observada durante todo o período de realização das medidas, com ótimas razões sinal/ruído para as injeções de todos os padrões e amostras estudados. Assim como observado para a determinação de cloreto, sinais característicos do efeito de Schlieren foram detectados para as injeções da solução do branco, embora nesta aplicação o efeito tenha sido menos pronunciado devido às diferentes características das soluções utilizadas.



**Figura 4.13:** Determinação fotométrica de íons Cr(VI) em ligas de Ni-Cr e em águas contaminadas. Diagrama para injeções dos padrões (0,0-1,5,0 mg L<sup>-1</sup>) e das amostras (a) e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com 1,2 mg L<sup>-1</sup> do analito (b). **R:** Resposta indesejável obtida antes do sinal analítico. Picos em cinza referem-se às injeções para limpeza do sistema.

O sinal ampliado para uma das injeções realizadas com o padrão de  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$  em Cr(VI) na Figura 4.13 (b) mostra que o uso de uma bomba peristáltica para a propulsão dos fluidos não altera a resposta analítica obtida com o microssistema em relação àquela adquirida com as mini-bombas de pistão (seção 4.1.1.3), demonstrando que um dispositivo padrão de bombeamento, amplamente utilizado em análise por injeção em fluxo, pode ser empregado em conjunto com os microssistemas para a realização das análises. É importante relatar, entretanto, que a pequena resposta (R) que surgiu imediatamente antes do pico não está relacionada com uso da bomba peristáltica, uma vez que o mesmo comportamento foi observado para outras aplicações dos microssistemas em que as mini-bombas de pistão foram utilizadas, Figura 5.10 na seção 5.1.2.3. Conforme mostra a Figura 4.14, a qual é uma ampliação para o pico de limpeza situado entre as injeções dos padrões de  $0,9$  e  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ , houve um aumento desta resposta quando a vazão de amostragem foi aumentada durante a troca dos padrões (seção 4.1.1.4), indicando uma relação entre este sinal e a pressão negativa que se forma no sistema, durante a aspiração das amostras. De acordo com o discutido na seção 4.1.2.2, a vazão de amostragem elevada ocasiona também o alargamento da zona de amostragem, o que pode proporcionar resultados indesejáveis como este.



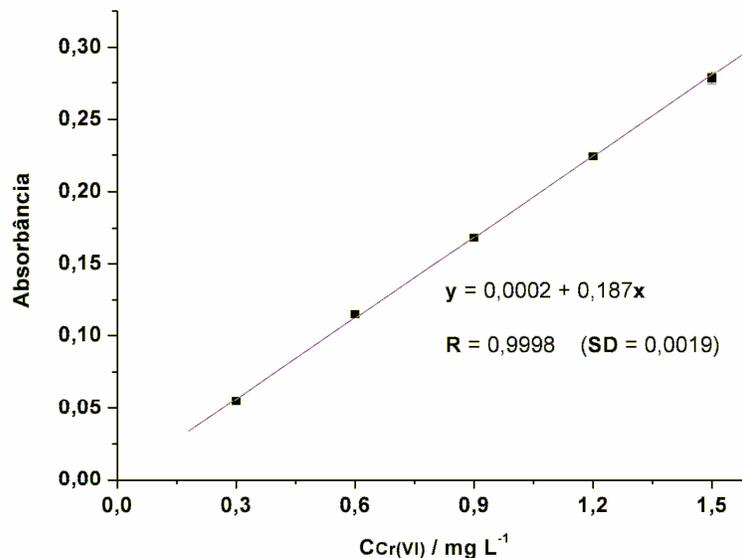
**Figura 4.14:** Ampliação para o pico de limpeza obtido durante a substituição do padrão de  $0,9 \text{ mg L}^{-1}$  pelo padrão de  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$  mostrando o aumento da resposta indesejável (R) ocasionada pelo aumento da vazão de amostragem.

O sinal ampliado na Figura 4.13(b) permite verificar também que a diminuição no tamanho dos canais não alterou significativamente o perfil da resposta analítica. Vale lembrar que o microssistema desenvolvido para esta aplicação apresentou canais que são cerca de três vezes menores que aqueles do microssistema aplicado para a determinação de cloreto. Deste modo, um consumo ainda menor de

reagentes e amostras e um volume menor de resíduos gerados poderão ser alcançados ao se empregar este sistema em relação ao sistema maior.

Como os tempos utilizados para a amostragem (20 s) e para a aquisição dos sinais (25 s) foram menores que aqueles utilizados para a determinação de cloreto, a frequência analítica foi maior que no método anterior, chegando a 80 injeções por hora e igualando-se a obtida em sistemas FIA convencionais para a mesma determinação [55]. Considerando que o método proposto permite que as soluções dos reagentes sejam bombeadas à vazão total de  $50 \mu\text{L min}^{-1}$ , um volume de resíduo de apenas 24 mL é gerado ao final de uma jornada de trabalho de 8 horas empregando-se o microssistema. Com um sistema FIA convencional, operando a vazão total de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , o volume de resíduo gerado é 20 vezes maior (480 mL) para a mesma jornada de trabalho e para o mesmo número de amostras analisadas.

A repetibilidade, estimada como o desvio padrão relativo para 10 injeções sucessivas do padrão contendo  $0,9 \text{ mg L}^{-1}$  em Cr(VI), foi de apenas 1,5 %, sendo comparável as obtidas com sistemas em maior escala [55]. A curva analítica construída com a média das alturas dos picos obtidos para os padrões em relação ao sinal do branco, Figura 4.15, mostrou uma resposta linear para a faixa de concentração estudada ( $R = 0,9998$ ), sendo calculado um limite de detecção de  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  com base no sinal médio para o branco mais três vezes o seu desvio padrão.



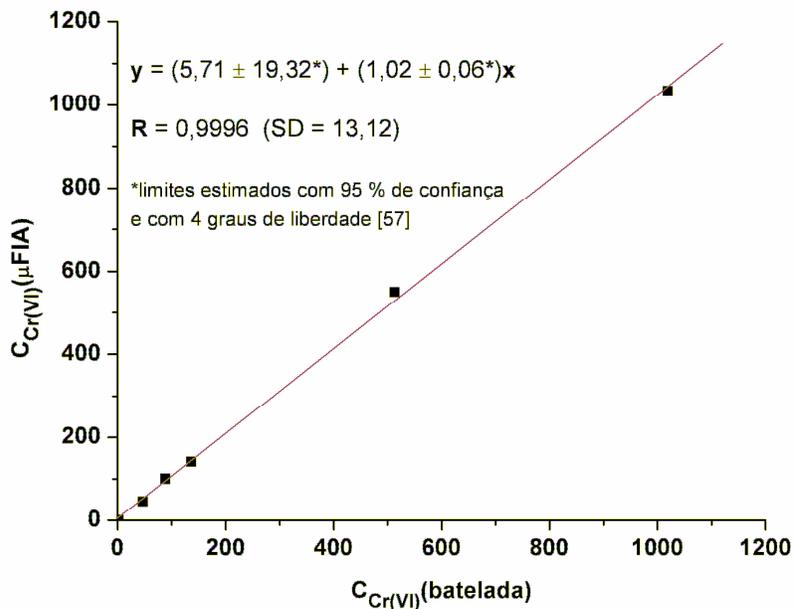
**Figura 4.15:** Curva analítica construída com o uso do microssistema para a determinação de Cr(VI) na faixa de concentração de  $0,3$  a  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  do analito.

As concentrações de cromo total encontradas para as amostras de água e de ligas de Ni-Cr a partir do método proposto e do método espectrofotométrico em batelada são listadas na Tabela 4.4. Como as medidas para o método em batelada não foram realizadas em replicata, não foi possível aplicar os testes F e T independente [58] para avaliação da precisão e exatidão dos resultados, sendo aplicado apenas o teste da regressão linear [58] para verificar a existência ou não de erros sistemáticos nas medidas. Conforme mostra a Figura 4.16, os resultados obtidos com o método proposto relacionam-se linearmente com aqueles obtidos com o método em batelada não sendo observados desvios significativos ao nível de 95 % de confiança para o intercepto ( $5,71 \pm 19,32$ ) e para a inclinação da curva ( $1,02 \pm 0,06$ ), o que indica a inexistência de erros sistemáticos e uma boa exatidão para as medidas realizadas com o microssistema.

**Tabela 4.4:** Determinação de Cr(VI) em águas subterrâneas contaminadas e em ligas de Ni-Cr.

Amostra	Unidade	$\mu\text{FIA}$	Batelada*	Erro / %
Água 1	mg L <sup>-1</sup>	1034 ± 11	1019	1,5
Água 2	mg L <sup>-1</sup>	550,0 ± 5,3	512,9	7,2
Água 3	mg L <sup>-1</sup>	1,33 ± 0,02	1,49	-10,1
Liga 1	mg g <sup>-1</sup>	100,4 ± 2,2	88,1	14,0
Liga 2	mg g <sup>-1</sup>	141,8 ± 2,0	136	4,3
Liga 3	mg g <sup>-1</sup>	46,1 ± 0,4	46,8	-1,5

\*Medidas realizadas em 525 nm com uma cubeta com 10 mm de caminho óptico.



**Figura 4.16:** Relação entre as concentrações determinadas através do método proposto e do método espectrofotométrico em batelada.

Os bons resultados obtidos para esta aplicação demonstram que uma bomba peristáltica e válvulas solenóides convencionais podem ser empregadas com sucesso na manipulação dos fluidos ao longo dos microcanais. O principal inconveniente no uso destes dispositivos é, ainda, o tamanho elevado, o que limita a miniaturização do sistema de análise como um todo. Estes resultados demonstraram também que uma expositora “home-made” de custo extremamente baixo pode ser utilizada com sucesso para a fabricação dos dispositivos microfluídicos, o que torna mais fácil e menos custoso o desenvolvimento de protótipos em laboratórios com poucos recursos.

# Capítulo

## 5

*Microsistemas em Uretana-Acrilato com  
célula integrada para detecção fluorimétrica*

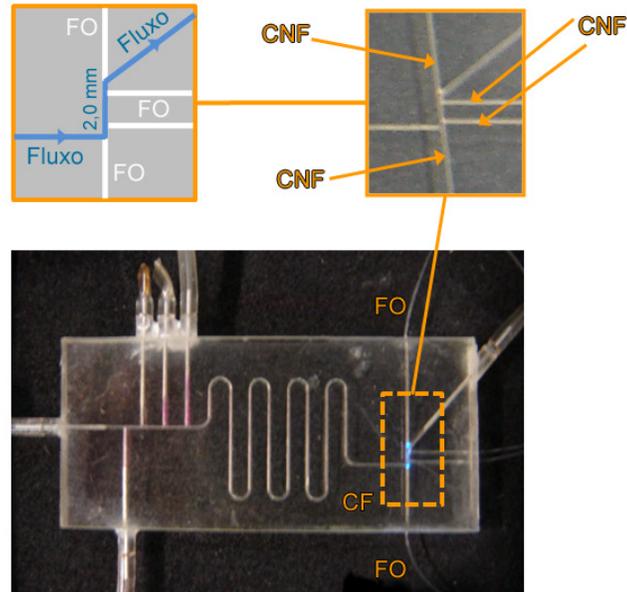
## **5.1 Microssistemas em Uretana-Acrilato com célula integrada para detecção fluorimétrica**

O uso da fluorescência molecular como técnica para a determinação de espécies empregando os microssistemas construídos em resina a base de UA foi também avaliada no presente trabalho. Uma estratégia simples para integração da célula de fluxo aos microssistemas foi proposta, sendo a mesma avaliada através da aplicação dos dispositivos à determinação de fluoresceína em soluções aquosas e à determinação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em águas minerais empregando o método de complexação do analito com fluorexon (calceína).

### **5.1.1 Parte Experimental**

#### **5.1.1.1 Integração da célula de fluxo para detecção fluorimétrica**

A integração da célula para realização da detecção fluorimétrica nos microssistemas foi realizada de forma semelhante à descrita na seção 4.1.2.1 para os microssistemas com detecção fotométrica. Conforme apresentado na Figura 5.1, um canal com 2,0 mm de comprimento foi construído e empregado como célula de fluxo. Duas fibras ópticas plásticas com 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro foram adaptadas nas extremidades deste canal de forma que as mesmas ficassem em contato direto com as soluções. Do mesmo modo, outro par de fibras foi acoplado em ângulo reto com o canal de detecção. Estas fibras foram adaptadas por pressão a canais com dimensões ligeiramente menores que o diâmetro da fibra, de maneira semelhante à descrita na seção 3.1.2.4, para a adaptação das agulhas de acesso. De acordo com o que será discutido nas próximas seções, um dos pares de fibras foi utilizado para guiar a radiação de excitação proveniente de um LED até o microssistema e o outro par foi empregado para guiar a radiação de emissão até uma fotomultiplicadora.



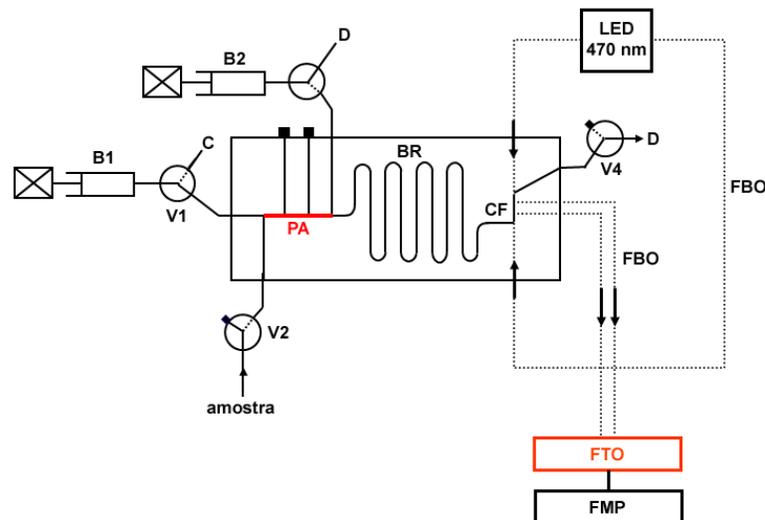
**Figura 5.1:** Integração de uma célula de fluxo fluorimétrica ao sistema miniaturizado à base de uretana-acrilato. **CF:** Célula de Fluxo, **CNF:** Canais para fibras ópticas com 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro, **FO:** Fibras ópticas plásticas com 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

### 5.1.1.2 Determinação de Fluoresceína em soluções aquosas

Com o objetivo de avaliar a estratégia proposta para a integração da célula fluorimétrica aos microssistemas, realizou-se inicialmente um ensaio simples onde soluções aquosas com diferentes concentrações de fluoresceína (0,2-1,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) foram inseridas no sistema para a construção de uma curva analítica.

O microssistema apresentado na Figura 5.1 foi utilizado neste estudo, sendo o mesmo construído com uma configuração semelhante à utilizada para os sistemas empregados na determinação fotométrica de espécies, alterando-se apenas o desenho da célula de fluxo para realização da detecção fluorimétrica. Os canais foram gravados sobre o substrato empregando-se uma máscara fotolitográfica cujas linhas foram impressas com largura de 400  $\mu\text{m}$ , de modo que suas dimensões ficaram ligeiramente maiores que as dos sistemas apresentados anteriormente (303  $\mu\text{m}$  de largura por 205  $\mu\text{m}$  de profundidade (exposição perpendicular) ou 347  $\mu\text{m}$  de largura por 372  $\mu\text{m}$  de profundidade (exposição paralela)).

Para a realização das medidas, empregou-se a configuração de fluxo ilustrada na Figura 5.2, a qual foi também bastante semelhante à utilizada para a determinação fotométrica de íons cloreto (seção 4.1.1.3). As mesmas mini-válvulas solenóides (V1-V4) e mini-bombas de pistão (B1 e B2) foram utilizadas para o controle do fluxo no microsistema, sendo a bomba B1 empregada para propulsão da solução carregadora ( $\text{NaHCO}_3$  0,4 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,0) a vazão de 60  $\mu\text{L min}^{-1}$  e a bomba B2 utilizada para aspiração das amostras (fluoresceína 0,2-1,0 mg L<sup>-1</sup> em  $\text{NaHCO}_3$  0,4 mmol L<sup>-1</sup>) a vazão de 300  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Durante o procedimento de amostragem, todas as válvulas permaneceram ligadas por um período de 20 s, permitindo a injeção hidrodinâmica de um plug de amostra com 0,52  $\mu\text{L}$  (maior volume disponível). Após este procedimento, as válvulas foram desligadas (situação ilustrada na Figura 5.2) e o plug de amostra foi carregado até o detector, impulsionado pela bomba B1.



**Figura 5.2:** Configuração em linha única com microsistema empregado para a determinação de fluoresceína em soluções aquosas. **B1-B2:** Mini-bombas de pistão; **V1-V4:** Mini-válvulas solenóides (desligadas); **C:** Solução Carregadora ( $\text{NaHCO}_3$  0,4 mmol L<sup>-1</sup>); **D:** descarte; **PA:** “plug” de amostragem de 0,52  $\mu\text{L}$ ; **BR:** Bobina de reação com 13 cm; **CF:** Célula de fluxo, **FBO:** fibras ópticas, **FTO:** Filtro passa faixa (espectro de transmitância apresentado na Figura 5.8), **FMP:** Fotomultiplicadora.

A detecção foi realizada empregando-se um LED com máximo de emissão em 470 nm como fonte de excitação e uma mini-fotomultiplicadora (Hamamatsu H7468-03) como transdutor. Como mostra a Figura 5.2, duas fibras ópticas acopladas às extremidades da célula de fluxo foram empregadas para guiar a radiação do LED até o microsistema e duas fibras ópticas conectadas à 90° do canal de detecção foram utilizadas para guiar a radiação de emissão até o detector. Vale observar, que um filtro

óptico passa faixa com máximo de transmitância em 750 nm (espectro de transmitância na Figura 5.8) foi colocado à frente da janela da fotomultiplicadora e utilizado para filtrar a radiação de fundo proveniente do LED, que eventualmente pudesse atingir o detector. O monitoramento do sinal analítico foi realizado imediatamente após a inserção do “plug” de amostra em intervalos de 0,5 s durante 40 s, totalizando o registro de 80 leituras para cada injeção. Todo o procedimento de análise foi realizado empregando-se um módulo eletrônico baseado em um microcontrolador PIC 16F819 para o controle das operações. A descrição detalhada da construção e funcionamento deste instrumento é apresentada no apêndice B (seções B.1.3 e B.1.4).

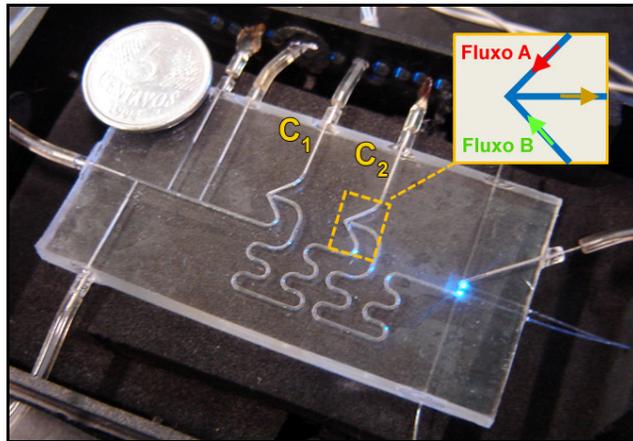
### **5.1.1.2.1 Reagentes e soluções**

Reagentes de grau analítico e água desionizada foram empregadas para a preparação de todas as soluções. Uma solução de  $\text{NaHCO}_3$  com concentração de  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução da massa apropriada do sal (VETEC) em água. Uma solução estoque de fluoresceína com concentração de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução da massa apropriada do reagente (Merck) em solução de  $\text{NaHCO}_3$   $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ . Soluções de referência contendo fluoresceína na faixa de concentração de  $0,2$  a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparadas pela diluição de alíquotas da solução estoque na mesma solução de  $\text{NaHCO}_3$ .

### **5.1.1.3 Determinação de íons cálcio e magnésio em águas minerais**

Nesta segunda aplicação, realizou-se a determinação da concentração total de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em amostras de água mineral empregando-se o método fluorimétrico baseado na complexação destes íons com fluorexon (calceína) em meio fortemente básico [56]. Para isto, propôs-se o emprego do microssistema ilustrado na Figura 5.3, o qual permite a confluência das soluções de trabalho e a detecção por fluorescência molecular. Nesta proposta, dois canais de acesso para confluência,  $C_1$  e  $C_2$ , foram projetados em uma configuração alternativa, ilustrada no detalhe da Figura 5.3, com o intuito de melhorar a mistura das soluções. Como observado, esta estratégia consistiu em proporcionar o encontro dos fluxos de duas soluções distintas

A e B em um ângulo de  $90^\circ$ , com posterior junção dos mesmos em um canal situado a  $45^\circ$  dos canais originais. Para a construção deste microssistema, empregou-se uma máscara fotolitográfica cujas linhas foram impressas com largura de  $600\ \mu\text{m}$ , o que proporcionou a construção de canais com dimensões maiores que aqueles que foram utilizados nos outros microssistemas descritos até o momento ( $527\ \mu\text{m}$  de largura por  $514\ \mu\text{m}$  de profundidade (exposição perpendicular) ou  $540\ \mu\text{m}$  de largura por  $593\ \mu\text{m}$  de profundidade (exposição paralela)).

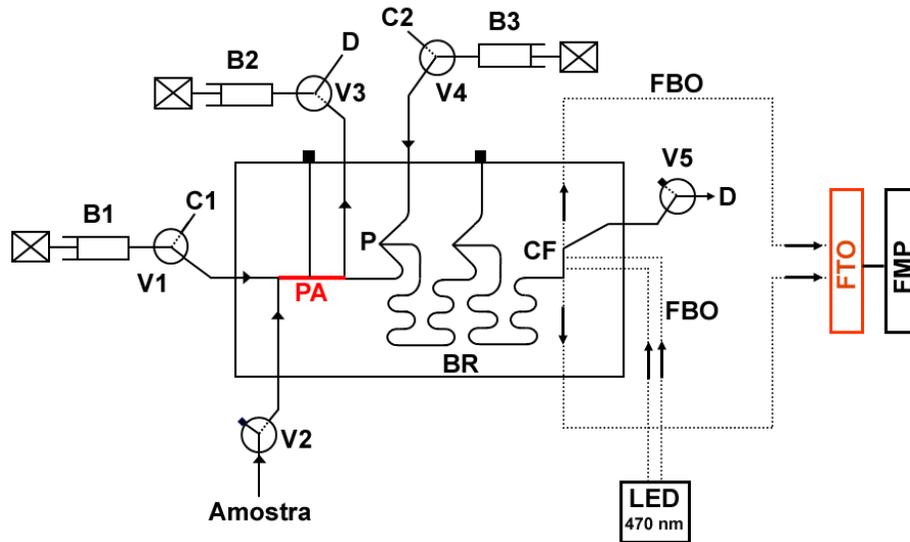


**Figura 5.3:** Microssistema FIA empregado para a determinação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em amostras de águas minerais. **C1 e C2:** Canais de acesso para confluência.

A Figura 5.4 ilustra a configuração de fluxo utilizada para esta determinação, onde três mini-bombas de pistão foram utilizadas para a propulsão das soluções e 5 mini-válvulas solenóides foram empregadas para o direcionamento do fluxo. As mini-bombas e mini-válvulas utilizadas foram idênticas àquelas descritas na seção 4.1.1.3 para a determinação fotométrica de íons cloreto. As bombas B1 e B3, com capacidade máxima de  $250\ \mu\text{L}$  e resolução de  $0,5\ \mu\text{L}/\text{passo}$  cada, foram utilizadas para a propulsão das soluções de hidróxido de potássio ( $0,02\ \text{mol L}^{-1}$ ) e de calceína ( $10,0\ \text{mg L}^{-1}$  em  $\text{KOH } 0,02\ \text{mol L}^{-1}$ ), respectivamente. A bomba B2, com capacidade máxima de  $750\ \mu\text{L}$  e resolução de  $1,5\ \mu\text{L}/\text{passo}$ , foi utilizada para aspiração das amostras.

Para a realização das medidas fluorimétricas, a mesma instrumentação empregada para a determinação de fluoresceína, descrita na seção 5.1.1.2, foi utilizada. Como pode ser observado na Figura 5.4, as fibras ópticas utilizadas para coletar as radiações de excitação e emissão foram acopladas ao microssistema de

maneira inversa à proposta na seção 5.1.1.2 para a determinação de fluoresceína. As fibras situadas nas extremidades do canal de detecção foram empregadas para guiar a radiação de emissão até a fotomultiplicadora, enquanto as fibras acopladas à 90° do canal de detecção foram utilizadas para guiar a radiação do LED até o microsistema.



**Figura 5.4:** Configuração com confluência empregada para a determinação fluorimétrica de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em amostras de águas minerais. **B1-B3:** mini-bombas de pistão; **V1-V5:** Mini-válvulas solenóides (desligadas); **C1:** solução carregadora ( $\text{KOH}$   $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ); **C2:** solução do reagente (fluorexon  $10 \text{ mgL}^{-1}$  em  $\text{KOH}$   $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ); **D:** descarte; **PA:** “plug” de amostragem de  $2,40 \mu\text{L}$ ; **P:** ponto de confluência; **BR:** Bobina de reação com  $15 \text{ cm}$  **CF:** célula de fluxo, **FBO:** fibras ópticas, **FTO:** filtro passa faixa (espectro de transmitância apresentado na Figura 5.8), **FMP:** fotomultiplicadora.

As operações necessárias à obtenção da resposta analítica foram realizadas empregando-se um algoritmo semelhante ao utilizado para a determinação de íons cloreto. As amostras foram inseridas no sistema por meio de amostragem hidrodinâmica a partir do acionamento simultâneo de todas as mini-válvulas solenóides por um período de  $30 \text{ s}$ . Durante este intervalo, a bomba B2 atuou aspirando a solução da amostra através das válvulas V2 e V3, preenchendo o “plug” de amostragem (PA) com  $2,40 \mu\text{L}$  de volume, enquanto as bombas B1 e B2 aspiravam as soluções de  $\text{KOH}$  e calceína, respectivamente. Vale ressaltar que, durante este procedimento, todas as bombas atuaram em modo de passo completo, à vazão de  $120 \mu\text{L min}^{-1}$  para as bombas B1 e B3 e à vazão de  $300 \mu\text{L min}^{-1}$  para a bomba B2.

Após o procedimento de amostragem, todas as válvulas foram desligadas e as três bombas passaram a dispensar as soluções em modo de meio passo por um período de 60 s à vazão de  $60 \mu\text{L min}^{-1}$  para as bombas B1 e B3 e à vazão de  $150 \mu\text{L min}^{-1}$  para a bomba B2. Nesta condição, ilustrada na Figura 5.4, o “plug” de amostra foi carregado pela solução de KOH, por ação da bomba B1, até a confluência com a solução de calceína no ponto P e misturado à esta solução ao longo da bobina de reação BR com 14 cm de comprimento.

O monitoramento do sinal analítico foi realizado imediatamente após a inserção do “plug” de amostra em intervalos de 0,3 s durante 60 s, totalizando o registro de 200 leituras para cada injeção. Todo o procedimento de análise foi realizado empregando-se um módulo eletrônico baseado em um microcontrolador PIC 16F819 para o controle das operações (Apêndice B, seções B.1.3 e B.1.4).

Seis amostras comerciais de água mineral de diferentes marcas foram analisadas empregando-se o método proposto. Para isto, realizou-se a injeção de soluções de referência contendo íons  $\text{Ca}^{2+}$  na faixa de concentração de 25,0 a  $125 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a construção da curva analítica com posterior injeção das soluções diluídas das amostras. Vale ressaltar que embora tenha sido realizada a determinação da concentração total de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  nas amostras, os padrões foram preparados apenas com íons  $\text{Ca}^{2+}$ , uma vez que a reação entre a calceína e os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  segue a mesma estequiometria com mesmo efeito na emissão do fluoróforo [56].

### **5.1.1.3.1 Reagentes e soluções**

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico em água desionizada. Uma solução estoque de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução da massa apropriada de  $\text{CaCO}_3$  (VETEC), previamente seca em estufa, em 20 mL de solução de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e posterior diluição a 100 mL com água. Soluções de referência contendo  $\text{Ca}^{2+}$  na faixa de concentração de 1,0 a  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  ( $25$  a  $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ , aproximadamente) foram preparadas pela diluição de alíquotas da solução estoque em HCl  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Uma solução estoque de fluorexon (calceína) contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  do fluoróforo foi preparada pela dissolução da massa apropriada do reagente (Acros) em solução de

KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , sendo armazenada, após a preparação, em refrigerador. Uma solução de calceína contendo  $10 \text{ mg L}^{-1}$  do fluoróforo foi preparada pela diluição da alíquota adequada da solução estoque descrita acima em solução de KOH  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ . Uma solução estoque KOH  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução da massa apropriada da base (CRQ) em água e utilizada para a preparação das soluções mais diluídas descritas acima. Alíquotas das amostras de água analisadas foram diluídas em solução de HCl mantendo a concentração final do ácido em  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  da mesma forma que as soluções de referência.

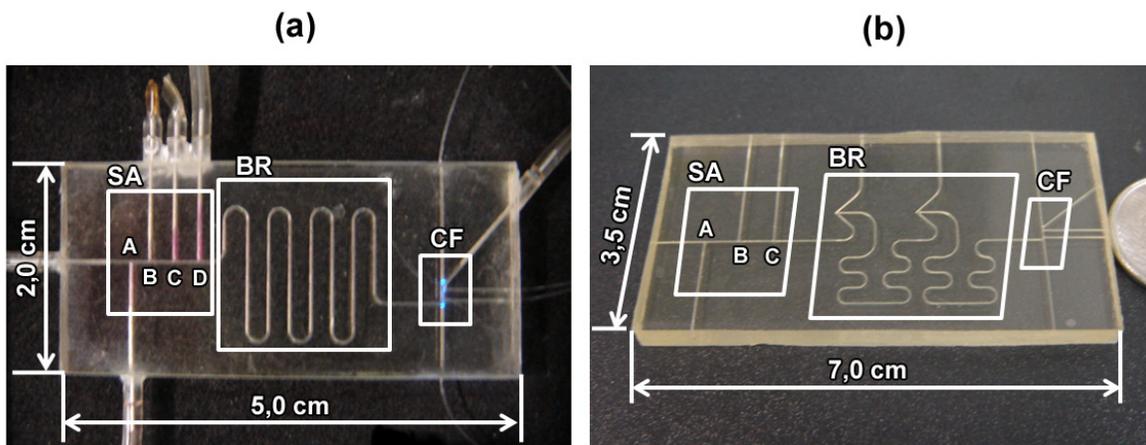
#### **5.1.1.3.2 Método de Referência**

Para avaliação dos resultados obtidos com o microssistema proposto, realizou-se a determinação da concentração total de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  empregando-se a volumetria de complexação com EDTA [57]. Aliquotas apropriadas das amostras foram transferidas para erlenmeyers de 125 mL e tamponadas com 2,0 mL de solução de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 10. As titulações foram realizadas com adição controlada de uma solução de EDTA  $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  sobre a solução da amostra empregando-se uma bureta de 25,0 mL. O indicador negro de eriocromo T foi empregado para visualização do ponto final.

## 5.1.2 Resultados e discussão

### 5.1.2.1 Microsistemas

De acordo com o relatado nas seções 5.1.1.2 e 5.1.1.3, dois microsistemas foram construídos e avaliados para as determinações fluorimétricas. O primeiro, aplicado à determinação de fluoresceína (Figura 5.5 (a)), foi desenvolvido com um “*layout*” semelhante ao utilizado para os sistemas com detecção fotométrica, com alterações apenas na célula de fluxo e no tamanho dos canais. O segundo, aplicado à determinação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Figura 5.5 (b)), foi desenvolvido com canais relativamente maiores e com alterações no “*layout*” que possibilitaram a confluência das soluções de trabalho. Com base nas equações descritas na Figura 3.17 e nas larguras das linhas das máscaras empregadas para a construção dos dispositivos, as dimensões internas dos canais foram estimadas e os volumes das regiões específicas de ambos os microsistemas foram calculadas, sendo apresentadas na Tabela 5.1.



**Figura 5.5:** Microsistemas com células para detecção fluorimétrica desenvolvidos a partir de máscaras fotolitográficas com linhas de 400 µm de largura (a) e 600 µm de largura (b). **SA:** sistema de amostragem, **BR:** bobina de reação e **CF:** célula de fluxo.

**Tabela 5.1:** Dimensões e volumes de algumas regiões dos sistemas propostos

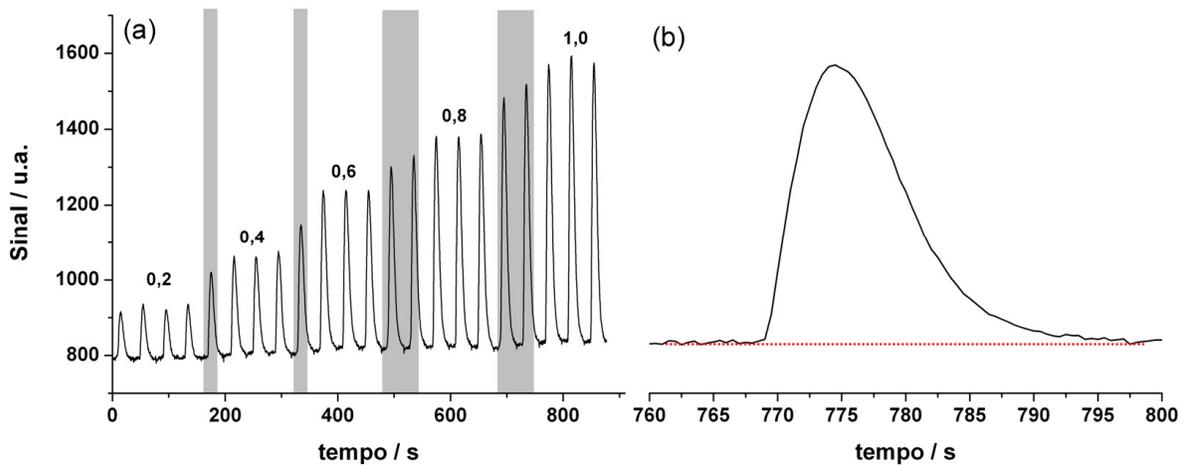
	Sistema (a)*		Sistema (b)*	
	comprimento / mm	Volumes / $\mu\text{L}$	comprimento / mm	Volumes / $\mu\text{L}$
<b>segmento AB</b>	2,0	0,13	10,0	1,60
<b>segmento AC</b>	5,0	0,32	15,0	2,40
<b>segmento AD</b>	8,0	0,52		
<b>Bobina de Reação</b>	130	5,82	140	19,60
<b>Célula de fluxo</b>	2,0	0,08	2,0	0,26
<b>Sistema todo**</b>		10,4		37,90

\*referentes aos sistemas da Figura 5.5 (a e b)

\*\*canais de acesso inclusos

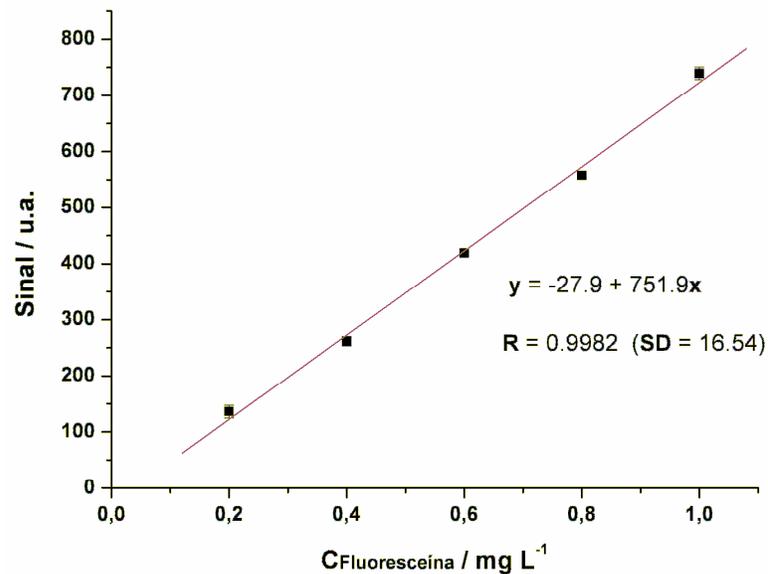
### 5.1.2.2 Determinação de fluoresceína em soluções aquosas

O diagrama apresentado na Figura 5.6 (a) mostra os resultados obtidos ao se empregar o sistema de menor volume (Figura 5.5 (a)) à determinação de fluoresceína em soluções aquosas contendo 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> do fluoróforo. Os picos destacados em cinza referem-se às injeções de limpeza do sistema e o detalhe na Figura 5.6(b) é a ampliação do sinal obtido para uma injeção do padrão com 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Conforme observado, a linha de base apresentou uma inclinação positiva durante o procedimento, havendo um aumento de aproximadamente 50 unidades arbitrárias em um período de aproximadamente 15 minutos. Parte deste problema pode estar relacionada à adsorção do fluoróforo nas paredes dos canais, principalmente naquelas da célula de fluxo, sendo necessária uma investigação mais aprofundada do problema para melhor esclarecimento. Apesar disto, os sinais com boas razões sinal/ruído mostraram que a estratégia utilizada para a integração da célula de fluxo foi bem sucedida e que o sistema pode ser aplicado à determinações simples, onde a detecção fluorimétrica é utilizada. A semelhança do sinal obtido com àqueles observados em sistemas FIA convencionais, sugere também um mecanismo de mistura semelhante para o microsistema empregado.



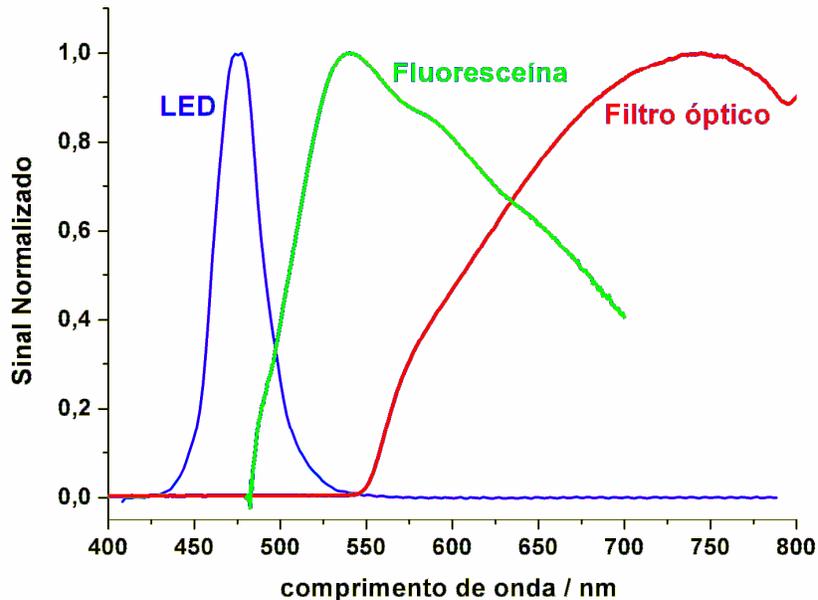
**Figura 5.6:** Determinação fluorimétrica de fluoresceína em soluções aquosas. Diagrama para injeções dos padrões (2,0-1,0 mg L<sup>-1</sup>) (a) e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com 1,0 mg L<sup>-1</sup> do analito (b). Picos em cinza referem-se às injeções para limpeza do sistema.

O desvio padrão relativo médio de 1,9 % foi obtido para as injeções em triplicata de cada um dos padrões, mostrando uma boa precisão das medidas. A curva analítica construída a partir das médias das alturas dos picos em relação à linha de base (Figura 5.7) apresentou boa linearidade ( $R = 0,9982$ ), sendo estimado um limite de detecção de 0,14 mg L<sup>-1</sup> a partir do módulo do coeficiente linear da curva (27,9) adicionado de três vezes o desvio padrão para o ajuste por mínimos quadrados da reta ( $SD = 16,54$ ) [58].



**Figura 5.7:** Curva analítica construída com o uso do microsistema para a determinação de fluoresceína na faixa de concentração de 0,2 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

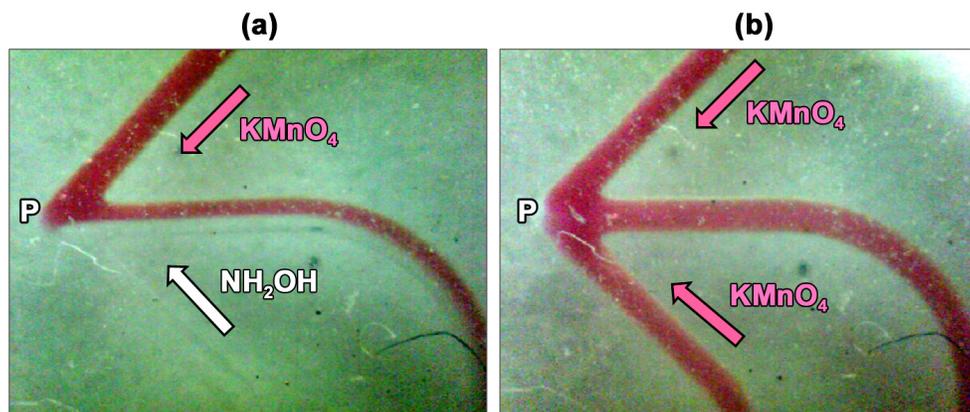
É importante relatar que, embora o limite de detecção encontrado seja ainda modesto em relação aos obtidos com outros sistemas miniaturizados [59] ( $0,30 \mu\text{g L}^{-1}$ ), as condições utilizadas para a determinação precisam ser otimizadas para a obtenção de melhores resultados. Conforme mostram os espectros na Figura 5.8, o filtro óptico empregado não é transparente para a região de máxima emissão do fluoróforo, diminuindo a sensibilidade do método. Entretanto, ao se empregar um filtro óptico com aproximadamente 70 % de transmitância em 525 nm, não houve resposta analítica para os padrões estudados devido à elevada radiação de fundo gerada pelo LED. Embora as fibras ópticas utilizadas para guiar as radiações de emissão e excitação tenham sido acopladas em ângulo de  $90^\circ$ , parte da radiação não colimada do LED é refletida nas paredes do canal da célula de fluxo atingindo o detector. Como a radiação do LED não é totalmente monocromática [38], algumas componentes da mesma não são filtradas, gerando o elevado sinal de fundo. Para minimização deste problema, outra fonte de excitação poderia ser empregada em substituição ao LED. Um laser, por exemplo, seria uma excelente opção por proporcionar feixes colimados de alta potência e com radiação de ótima monocromaticidade.



**Figura 5.8:** Espectros de: Emissão do LED utilizado como fonte de excitação, emissão do fluoróforo (excitado em 470 nm), e espectro de transmitância do filtro óptico utilizado.

### 5.1.2.3 Determinação de íons cálcio e magnésio em águas minerais

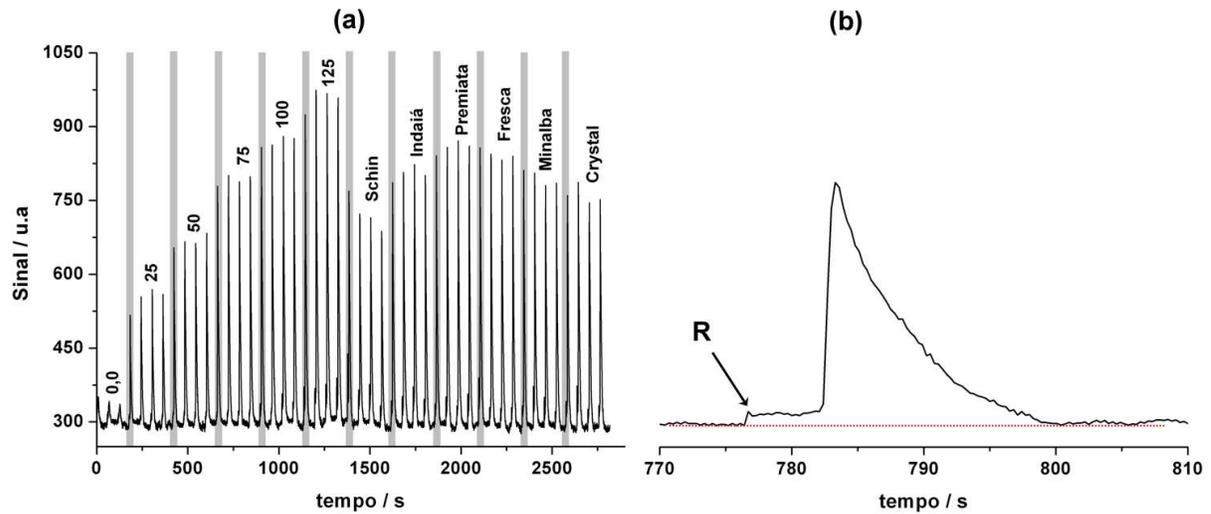
De acordo com o descrito na seção 5.1.1.3, o microsistema construído para esta aplicação foi desenvolvido para permitir a confluência das soluções. A literatura mostra que esta estratégia melhora a mistura dos reagentes com o “plug” de amostra em relação aos sistemas de linha única, permitindo que volumes maiores sejam amostrados com conseqüente aumento na sensibilidade do método [39]. Neste primeiro estudo com os microsistemas, a confluência foi realizada empregando-se uma configuração de fluxo alternativa, Figura 5.4, na qual a zona de amostra e a solução do reagente se encontram em um ponto P, onde a possível turbulência ocasionada pelo encontro abrupto poderia melhorar a mistura dos fluidos. A Figura 5.9 mostra, entretanto, que ao se confluir uma solução acidificada de  $\text{KMnO}_4$   $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  com uma solução de cloreto de hidroxilamina (5 % m/v) empregando-se a configuração de fluxo proposta, não houve uma mistura efetiva no referido ponto. As diferentes soluções foram impulsionadas paralelamente ao longo do pequeno canal que liga o ponto P à bobina de reação, sendo observada a mistura entre elas somente a alguns centímetros após a confluência. Este resultado comprova a existência de um regime de fluxo altamente laminar nos microcanais, que limita a eficiência da mistura no procedimento de confluência.



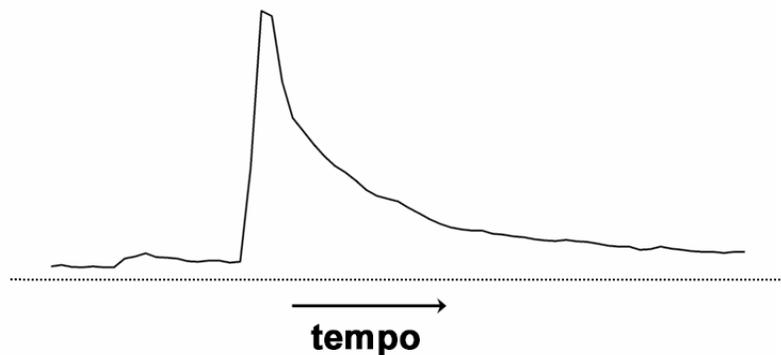
**Figura 5.9:** Imagem obtida com microscópio digital mostrando a confluência de uma solução saturada de  $\text{KMnO}_4$  com uma solução de hidroxilamina (5% m/v) (a) e imagem comparativa mostrando o bombeamento da mesma solução de permanganato em ambos os canais de confluência (b). P: ponto de confluência.

A Figura 5.4 mostra que a posição das fibras empregadas para guiar as radiações de excitação e emissão foi invertida em relação àquela utilizada para a determinação de fluoresceína, Figura 5.2. Esta alteração foi realizada com o objetivo de minimizar o aumento gradual da linha de base, observado nos estudos iniciais com fluoresceína (5.1.2.2), os quais podem ter sido causados por adsorção do fluoróforo nas paredes dos canais. Como as fibras empregadas para a captação da radiação de emissão foram acopladas paralelamente ao canal de detecção, os efeitos indesejáveis da emissão do fluoróforo nas paredes deste canal podem ser minimizados ou eliminados, com esta nova configuração. De fato, o diagrama apresentado na Figura 5.10 (a) mostra que a linha de base se manteve praticamente constante ao longo de todo o período de realização das medidas, de forma que a posição das fibras podem ter realmente influenciado para a melhora deste resultado. Apesar disto, por se tratar de uma aplicação diferente com um novo sistema, serão necessários outros estudos para verificar se a posição das fibras realmente implica na melhora do sinal analítico.

O sinal ampliado na Figura 5.10 (b) mostra que os picos obtidos para a injeção dos padrões apresentaram um perfil muito diferente daqueles observados para a determinação de fluoresceína na seção 5.1.1.2. Devido ao grande número de variáveis alteradas em relação à aplicação anterior, tais como adição do reagente por confluência, tamanho dos canais, reações envolvidas e posicionamento das fibras, é difícil propor causas para esta modificação. Entretanto, estudos preliminares mostraram que um perfil semelhante para o sinal foi obtido ao se realizar esta determinação empregando-se a configuração em linha única com o mesmo microssistema utilizado nos ensaios com fluoresceína (Figura 5.11). Deste modo, quase todas as modificações realizadas para o “novo” microssistema devem ter influenciado muito pouco no perfil de resposta obtido para esta aplicação. Vale relatar também que, durante os ensaios realizados com os dois dispositivos, os canais apresentaram-se mais brancos e opacos em relação ao que vinha sendo observado nas outras aplicações. A solução extremamente básica ( $\text{KOH } 0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ) utilizada na determinação parece modificar momentaneamente as propriedades de superfície do polímero com conseqüente alteração no sinal analítico.



**Figura 5.10:** Determinação fluorimétrica de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em águas minerais. Diagrama para injeções dos padrões ( $0,0$ - $125 \mu\text{mol L}^{-1}$  em cálcio) e das amostras **(a)** e detalhe do sinal para a injeção de um padrão com  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  do analito **(b)**. **R:** pequeno ruído observado antes do sinal analítico. Picos em cinza referem-se às injeções para limpeza do sistema.

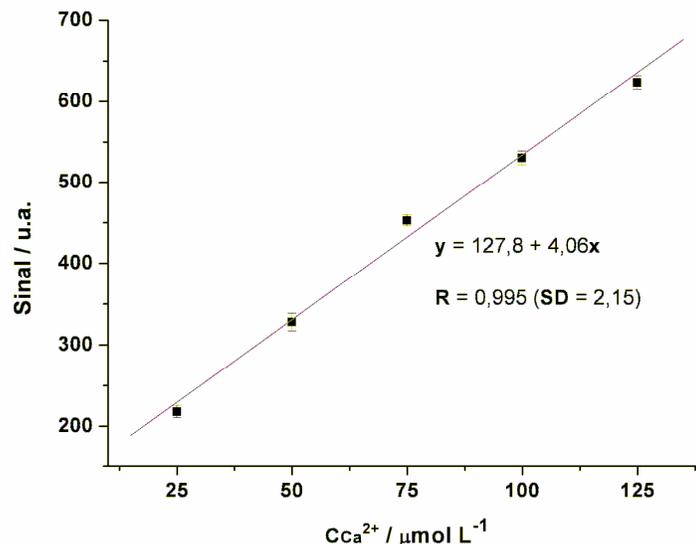


**Figura 5.11:** Detalhe do sinal obtido para a injeção de um padrão com  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do microsistema empregado para a determinação de fluoresceína (Figura 5.5 (a)).

É preciso relatar também que o ruído observado antes do sinal analítico na Figura 5.10 (b) é bastante semelhante àquele observado na seção 4.1.2.4 para a determinação fotométrica de íons  $\text{Cr(VI)}$ . Conforme já discutido naquela seção, este ruído está relacionado com o procedimento de aspiração da amostra, durante a injeção hidrodinâmica.

O método utilizado para a determinação fluorimétrica de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em amostras de águas minerais foi adaptado do método proposto no início da década de 90 por Chimpalee et al. [60]. A escolha deste método foi baseada na sua simplicidade e facilidade para adaptação em escala miniaturizada e por empregar um fluoróforo cuja excitação pode ser efetuada com radiação visível azul (470 nm). Desta forma, um LED com máximo de emissão exatamente neste comprimento de onda foi utilizado para a realização das medidas, tornando o sistema, como um todo, mais compacto. É importante destacar, entretanto, que os autores do método original não empregaram a excitação com radiação deste comprimento de onda, mas com radiação ultravioleta (365 nm), sendo que ambas podem ser utilizadas para o mesmo propósito [61].

A Figura 5.12 mostra que a curva analítica construída com as médias das alturas dos picos em relação ao sinal para o branco apresentou uma boa linearidade ( $R = 0,995$ ) para a faixa de 1,0 a 5,0  $\text{mg L}^{-1}$  em  $\text{Ca}^{2+}$  (aproximadamente 25 a 125  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Este resultado pode ser considerado plenamente satisfatório se comparado ao método em fluxo convencional [60 e 62], onde a relação linear entre a concentração e o sinal analítico é observada apenas para concentrações maiores que 3,0  $\text{mg L}^{-1}$ . O limite de detecção de 1,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (cerca de 0,07  $\text{mg L}^{-1}$ ) foi estimado para o método com o microssistema, empregando-se o sinal calculado como o coeficiente linear da curva (127,8) adicionado de três vezes o desvio padrão para o ajuste por mínimos quadrados ( $3 \times \text{SD} = 6,45$ ).



**Figura 5.12:** Curva analítica construída com o uso do microssistema para a determinação de  $\text{Ca}^{2+}$  na faixa de concentração de 25 a 125  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (0,2 a 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) do analito.

Com as condições descritas na seção 5.1.1.3, a repetibilidade obtida para 5 injeções do padrão com  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{Ca}^{2+}$  foi de 3,5 % e a frequência analítica estimada com base nos tempos de amostragem, reação e detecção foi de 40 injeções por hora. Esta frequência, embora possa ser aumentada, é comparável às 50 injeções por hora obtidas com o método em fluxo convencional desenvolvido por Chimpalee et al. [60], mostrando um bom desempenho do microssistema com relação a esta figura de mérito.

Comparado ao método em fluxo convencional, a principal vantagem no uso do microssistema proposto está no consumo de reagentes e no volume de resíduos gerados. A Tabela 5.2 mostra, por exemplo, que para o mesmo número de injeções (50), a massa de KOH descartada ao se utilizar o microssistema é cerca de 400 vezes menor que aquela descartada ao se empregar o método proposto por Chimpalee et al [60]. Da mesma forma, a Tabela 5.3 mostra que há a redução de aproximadamente 58 vezes na massa de calceína descartada com o microssistema em relação ao sistema FIA convencional, embora este último permita a injeção mais rápida das amostras (60 minutos para 50 amostras contra 75 minutos para o mesmo número de amostras com o microssistema).

**Tabela 5.2:** Condições utilizadas com o sistema FIA miniaturizado proposto ( $\mu\text{FIA}$ ) e com um sistema FIA convencional [60] em termos do consumo de hidróxido de potássio para a injeção de 50 amostras.

	tempo de Análise (min.)	vazão ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ )	massa descartada (mg)
<b><math>\mu\text{FIA}</math></b>	75	60	0,02	5,0
<b>FIA</b>	60	1000	0,6	2000

**Tabela 5.3:** Condições utilizadas com o sistema FIA miniaturizado proposto ( $\mu\text{FIA}$ ) e com um sistema FIA convencional [60] em termos do consumo de calceína para a injeção de 50 amostras.

	tempo de Análise (min.)	vazão ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )	massa descartada (mg)
<b><math>\mu\text{FIA}</math></b>	75	60	10	0,05
<b>FIA</b>	60	800	60	2,88

Conforme listado na Tabela 5.4, os valores de concentração determinados com o método proposto diferiram em menos de 6% para a maioria das amostras analisadas em relação àqueles determinados através do método em batelada (volumetria de complexação). Os erros relativos observados ocorreram de forma aleatória, indicando a inexistência de erros sistemáticos nas medidas, o que foi confirmado aplicando-se teste estatístico de regressão linear [58] para o qual a curva que relaciona as concentrações obtidas pode ser descrita por:

$$y = (-44,6 \pm 162,7) + (1,11 \pm 0,22)x$$

**Tabela 5.4:** Concentrações totais de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  determinadas através do método fluorimétrico com o microssistema FIA e por volumetria de complexação com EDTA.

Amostra	$\mu\text{FIA}^*$		Complexometria**		Erro Relativo %
	$[\text{Ca}^{2+}] + [\text{Mg}^{2+}]$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	SD	$[\text{Ca}^{2+}] + [\text{Mg}^{2+}]$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	SD	
Schin	1170	91	1020	8	+14,0
Indaiá	837	28	825	5	+1,5
Crystal	143	11	154	2	-7,0
Premiata	483	9	460	7	+5,1
Fresca	453	8	451	1	+0,6
Minalba	788	34	822	3	-4,1

\*médias para 3 injeções

\*\*médias para 3 determinações

Embora ainda sejam necessários outros estudos para uma melhor avaliação dos microssistemas propostos, foi demonstrado, neste capítulo, que a determinação fluorimétrica em um dispositivo microfluídico à base de UA pode realizada de forma simples e eficiente, com resultados comparáveis aos obtidos com sistemas em fluxo convencionais.

# Capítulo

## 6

### *Conclusões e Perspectivas*

## 6.1 Conclusões e Perspectivas

O presente trabalho demonstrou que microssistemas para análise em fluxo podem ser desenvolvidos de forma rápida e eficiente, empregando-se técnicas simples e de baixo custo.

Embora o sistema em PMMA tenha sido fabricado por ablação a laser, a qual é uma técnica relativamente cara e complexa, a selagem dos canais com um filme plástico adesivo mostrou-se plenamente adequada para o desenvolvimento de dispositivos neste material. Esta estratégia poderá facilitar ainda mais a construção de microssistemas em PMMA onde os canais são gravados a partir de técnicas simples como a moldagem por pressão à quente.

A otimização da técnica de fotolitografia profunda no UV para a fabricação de microssistemas de análise em fluxo foi, sem dúvida, a maior contribuição do presente trabalho. A partir dos procedimentos propostos, dispositivos microfluídicos foram confeccionados de forma simples e eficiente em menos de duas horas, caracterizando um processo de prototipagem rápida, adequado para o desenvolvimento de pesquisas na área de miniaturização. Foi observado também que esta técnica de microfabricação pode ser implementada em qualquer laboratório com custos extremamente baixos. Uma estação de microfabricação, incluindo expositora “home-made”, filmes de transparência, impressora à laser, placas de acrílico e fotorresiste à base de UA pode ser adquirida por menos de US\$ 700,00, tornando a técnica extremamente atraente para grupos de pesquisas com poucos recursos.

A selagem dos microssistemas em UA com uma camada do próprio substrato com superfície não polimerizada representou um grande avanço para a fabricação destes dispositivos. Foi demonstrado que o procedimento proposto é significativamente mais simples e mais fácil de ser aplicado em relação aos procedimentos já descritos na literatura, permitindo que canais com dimensões menores que 100  $\mu\text{m}$  sejam selados de forma eficaz em uma estrutura monolítica.

As estratégias propostas para a integração das células de fluxo fotométricas e fluorimétricas aos microssistemas foram também muito bem sucedidas, possibilitando a aquisição de sinais analíticos com ótimas razões sinal/ruído que

permitiram a aplicação dos dispositivos a diferentes determinações. Em relação à muitas das propostas descritas na literatura para o mesmo objetivo, estas alternativas de integração dos sistemas ópticos de detecção se mostraram mais simples e eficazes, dispensando o uso de instrumentos complexos e facilitando a implementação em escala miniaturizada.

A redução no consumo dos reagentes e na geração de resíduos constatada para as diferentes aplicações dos microssistemas FIA propostos em relação aos sistemas FIA convencionais demonstrou que o uso de dispositivos miniaturizados podem reduzir ainda mais os custos das análises e o volume de resíduos tóxicos que necessitam de tratamento. Outros métodos em fluxo poderão ser adaptados para a versão em microescala, utilizando-se as técnicas propostas neste trabalho, proporcionando resultados melhores que os já obtidos com os sistemas convencionais.

Para os microssistemas desenvolvidos em UA, deverão ser realizados, nos próximos anos, estudos sobre a possibilidade de bombeamento eletrosmótico dos fluidos nos microcanais, o que poderá permitir não só a fabricação de dispositivos para análise em fluxo mas também de “chips” aplicados para a separação de espécies por eletroforese. Outra alternativa para o bombeamento e direcionamento dos fluidos deverá ser implementada, em breve, aos microssistemas, com a integração de microválvulas e microbombas de membrana fabricados com o mesmo fotoretista à base de UA. Para isto, novas estratégias vêm sendo estudadas pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Luiz Otávio S. Ferreira (FEM-UNICAMP), de modo a possibilitar a construção de dispositivos microfluídicos mais compactos e mais completos.

Pretende-se também desenvolver microssistemas à base de UA, nos quais o próprio substrato possa ser utilizado para a imobilização de reagentes que permitam a detecção seletiva de espécies químicas através de um sensor óptico integrado ao próprio dispositivo. Ensaios já estão sendo realizados pelo grupo de instrumentação e automação em Química Analítica (GIA-UNICAMP) para avaliação desta estratégia, a qual poderá ampliar as aplicações dos microssistemas propostos.

## *Referências Bibliográficas*

1. Simonet, B. M. e Valcárcel, M., "Analytical chemistry in modern society: what can we expect", *Microchim. Acta*, 153, 1, 2006.
2. Manz A., Graber, N. e Widmer, H. M., "Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing", *Sens. Actuators B*, 1990, 1, 244.
3. *Lab-on-a-chip: "The Revolution in portable instrumentation"*, 3<sup>rd</sup> ed., Frost & Sullivan Ed.: New York. 1999, p17.
4. Madou, M. J., "*Fundamentals of Microfabrication*", Boca Raton, 1st. Ed., CRC Press, 1997.
5. Boone, T. R., Ricco, A. J., Fan, Z. H., Tan, H., Hooper, H. H. e Williams, S. J., "Plastic Advances Microfluidic Devices", *Anal. Chem.*, 2002, 74, 78A.
6. Becker, H. e Locascio, L. E., "Polymer microfluidic devices", *Talanta*. 2002, 56, 267.
7. Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A. e Whitesides, G. M., "Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)", *Anal. Chem.* 1998, 70, 4974.
8. Rios, A., Escarpa, A., Gonzales, N. C. e Crevillen, A. C., "Challenges of analytical microsystems", *Trends in Anal. Chem.*, 2006, 25(5), 467.
9. Coltro, W. K. T., Piccin, E., Carrilho, E., de Jesus, D. P., Fracassi da Silva, J. A., Silva H. D. T. Da e Lago, C. L. do, "Microssistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações", *Quím. Nova*, 2007, 30(8), 1986.
10. Dittrich, P. S., Tachikawa, K. e Manz, A., "Micro Total Analysis Systems. Latest Advancements and Trends", *Anal. Chem.*, 2006; 78(12); 3887.
11. Huikko, K., Kostianen, R. e Kotiaho, T., "Introduction to micro-analytical systems: bioanalytical and pharmaceutical applications", *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2003, 20, 149.
12. <http://www.samcointl.com> (acessado em 04/06/2008).
13. Roberts, M. A., Rossier, J. S., Bercier, P. e Girault. H.; "UV Laser Machined Polymer Substrates for the Development of Microdiagnostic Systems", *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2035.
14. Kupka, R. K., Bouamrane, F., Cremers, C. e Megtert. S., "Microfabrication: LIGA-X and applications", *Applied Surface Science*, 2000, 164, 97.

15. Soper, S. A.; Ford, S. M.; Qi, S.; McCarley, R. L.; Kelly, K. e MURPHY, M. C., "Polymeric microelectromechanical systems", *Anal. Chem*, 2000, 72, 643A.
16. Martynova, L., Locascio, L. E.; Gaitan, M.; Kramer, G. W, Christensen, R. G. e Maccreeham, W. A., "Fabrication of Plastic Microfluid Channels by Imprinting Methods", *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4783.
17. Lee, G., Chen, S., Huang, G., Sung, W. e Lin, Y., "Microfabricated plastic chips by hot embossing methods and their applications for DNA separation and detection", *Sens. Act. B.*, 2001, 75, 142.
18. <http://www.lnls.br> (acessado em 04/06/2008).
19. Lago, C. L. do, SILVA, H. D. T. da, Neves, C. A., Brito Neto, J. G. A. e Fracassi da Silva, J. A., "A Dry Process for Production of Microfluidic Devices Based on the Lamination of Laser-Printed Polyester Films", *Anal. Chem.* 2003, 75, 3853.
20. Belloy, E., Pawlowisky, A., Sayah, A. e Gijs, M. A. M., J., "Microfabrication of high-aspect ratio and complex monolithic structures in glass", *J. Microelectromech. S.*, 2002, 11(5), 521.
21. Wu, H., Odom, T. W. e Whitesides, J. M., "Reduction Photolithography Using Microlens Arrays: Applications in Gray Scale Photolithography", *Anal. Chem.*, 2002, 74, 3267.
22. Watanabe, M., "Refreshable microfluidic channels constructed using an inkjet printer", *Sensor Actuat. B*, 2007, 122, 141.
23. Nie, F. Q., Macka, M. e Paull B., "Micro-flow injection analysis system: on-chip sample preconcentration, injection and delivery using coupled monolithic electroosmotic pumps", *Lab Chip*, 2007, 7, 1597.
24. Nie, F. Q., Macka, M., Barron L., Connolly, D., Kent, N. e Paull, N., "Robust monolithic silica-based on-chip electro-osmotic micro-pump", *Analyst*, 2007, 132, 417.
25. Brown, L., Koerner, T., Horton, J. H. e Oleschuk, R. D., "Fabrication and characterization of poly(methylmethacrylate) microfluidic devices bonded using surface modifications and solvents", *Lab Chip*, 2006, 6, 66.
26. Schalautmann, S., Besselink, G. A. J., Radhakrishna, P. G. e Schasfoort, R. B. M., "Fabrication of a microfluidic chip by UV bonding at room temperature for integration of temperature-sensitive layers" , *J. Micromech. Microeng.*, 2003, 13, S81.

27. Satyanarayana, S., Karnick, R. N. e Majumdar, A., "Stamp-and-stick room-temperature bonding technique for microdevices", *J. Microelectromech. S.*, 2005, 14(2), 392.
28. Ruzicka, H. e Hansen E. H., "Integrated microconduits for flow injection analysis", *Anal. Chim. Acta*, 1984, 161, 1.
29. Wang, J. e Pumera, M., "Microchip flow-injection analysis of trace 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) using mercury-amalgam electrochemical detector", *Talanta*, 2006, 69, 984.
30. Leelasattarakul, T., Liawruagrath, S., Rayanakorn, M., Liawruagrath, B., Oungpipat, W. e Youngvises, N., "Greener analytical method for the determination of copper(II) in wastewater by micro flow system with optical sensor", *Talanta*, 2007, 72, 126.
31. Baeza, M. del Mar, Ibanez-Garcia, N., Baucells, J., Bartroli, J. e Alonso, J., "Microflow injection system based on a multicommutation technique for nitrite determination in wastewaters", *Analyst*, 2006, 131, 1109.
32. Kruanetr, S., Liawruagrath, S. e Youngvises, N., "A simple and green analytical method for determination of iron based on micro flow analysis", *Talanta*, 2007, 73, 46.
33. Liu, W., Zhang, Z. e Zhang, Y., "Chemiluminescence micro-flow system for rapid determination of chemical oxygen demand in water", *Microchim. Acta*, 2008, 160, 141.
34. Destandau, E., Lefevre, J. P., Eddine, A. C. F., Desports, S., Jullien M. C., Hierle, R., Leray, I., Valeur, B. e Delaire, J. A., "A novel microfluidic flow-injection analysis device with fluorescence detection for cation sensing. Application to potassium", *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387, 2627.
35. Nishihama, S., Imabayashi, H., Matoba, T., Toya, C., Watanabe, K., e Yoshizuka, K., "Micro-flow injection system for the urinary protein assay", *talanta*, 74, 2008, 1350.
36. Rainelli, A., Stratz, R., Schweizer, K. e Hauser, P.C., "Miniature flow-injection analysis manifold created by micromilling", *Talanta*, 2003, 61, 659.
37. Harris, D. C., *Análise Química Quantitativa*. Trad. Carlos Alberto da Silva Riehl e Alcides Wagner Serpa Guarino, Rio de Janeiro, 5ª Ed., LTC, p. 740-741, 2001. Título original: "Quantitative Chemical Analysis"
38. Fonseca, A. e Raimundo JR, I. M., "A multichannel photometer based on an array of light emitting diodes for use in multivariate calibration", *Anal. Chim. Acta*, 2004, 522, 223.

39. Ruzicka, J. e Hansen, E. H., in Flow injection Analysis (Chemical Analysis), Wiley-Interscience, New York, 1st ed., 1981, vol. 62.
40. Ruzicka J. e Hansen, E. H., "Recent Developments in Flow Injection Analysis: Gradient Techniques and Hydrodynamic Injection"., *Anal. Chim. Acta*, 1983, 145, 1.
41. Verpoorte, E., Manz, A., Ludi, H., Bruno, A. E., Maystre, F., Krattiger, B., Widmer, H. M., van der Schoot, B. M. e Rooji, N. F., "A silicon flow cell for optical detection in miniaturized total chemical analysis systems", *Sens. Actuators B*, 1992, 6, 66.
42. Salimi-Moosavi, H., Jiang, Y., Lester, L., McKinnom, G. e Harrison, D. J., "A multireflection cell for enhanced absorbance detection in microchip-based capillary electrophoresis devices", *Electrophoresis*, 2000, 21, 1291.
43. Betteridge, D., "Flow injection analysis", *Anal. Chem.*, 1978, 50, 836A.
44. Skoog, D. A., Holler, F. J. e Nieman, T. A., *Princípios de Análise Instrumental*, Trad. Ignez Caracelli... [et al.], Porto Alegre, 5ª. Ed., Bookman, 2002. p. 735.
45. Fernandes, J. C. B. e Ferreira, L. O. S., "Manufacturing of miniature fluidic modules for Lab-on-a-Chip using UA photoresin from flexographic platemaking process", *J. Braz. Chem. Soc.*, 2006, 17, 643.
46. Leach, D. e Hockessin, D. E., US Pat. 6,214,522 B1 2001.
47. [www.medeiros.com.br](http://www.medeiros.com.br) (acessado em 05/06/2008)
48. <http://www.gilbertinc.com/lamps.htm> (acessado em 05/06/2008)
49. Killner, M. H. M., *Desenvolvimento de um Sistema Voltamétrico Microfluídico*, Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
50. Decker, C. e Jenkis, A. D., "Kinetic approach of oxygen inhibition in ultraviolet- and laser-induced polymerizations", *Macromolecules*, 1985, 18, 1241.
51. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. APHA, AWWA, and WPCF, Washington, 18th Ed., 1975, sections 4-52, 3-59.
52. Purcell, E. M., "Life at Low Reynolds Number", *Am J Phys*, 1977, 45, 3.
53. Dias, A. C. B.; Borges, E. P.; Zagatto, E. A. G. e Worsfold, P. J., "A critical examination of the components of the schlieren effect in flow analysis", *Talanta*, 2006, 68, 1076.

- 
54. M. Cheregy e A. F. Danet, "Flow injection determination of chloride ions with spectrophotometric detection", *Analytical Letters*, 1997, 30, 2847.
55. Pasquini, C. e Raimundo Jr., I. M., "Um fotômetro simples para análise por injeção em fluxo", *Quim Nova*, 1984, 7(1), 24.
56. SNELL, F. D., *Photometric and Fluorimetric Methods of Analysis, Metals Part 2*, Wiley, New York, 1978.
57. Baccan, N., Andrade, J. C., Godinho, O. E. S. e Barone, J. S., *Química Analítica Quantitativa Elementar*, São Paulo, 2a. Ed., Edgard Blücher, 1985, p.203.
58. Miller, J. C. e E Miller, J. N., *Statistics for analytical chemistry*, 3<sup>rd</sup> ed., Ellis Horwood, 1993.
59. Hart, S.J. e Jiji, R. D., "A simple, low-cost, remote fiber-optic micro volume fluorescence flowcell for capillary flow-injection analysis", *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 374, 385.
60. Chimpalee, N.; Chimpalee, D.; Jarungapattananon, R.; Lawratchavee, S. E Thorburn Burns D., "Spectrofluorimetric flow-injection determination of calcium using calcein", *Anal. Chim. Acta*, 1993, 271, 247.
61. Vogel, A. I., Mendhan, R. C., Denney, R. C., Barnes, J. D. e Thomas, M., "Análise Química Quantitativa", Trad. Julio Carlos Afonso... [et al.], Rio de Janeiro, 6a. Ed., LTC, 2002, p.368.
62. Thuy, D. T., Denop-Weever, D., Kok, W. T., Luan, P. e Nghi, T. V., "Determination of traces of calcium and magnesium in rare earth oxides by flow-injection analysis", *Anal. Chim. Acta*, 1994, 295, 151.
63. [http://www2.dupont.com/Packaging\\_Graphics/en\\_US/](http://www2.dupont.com/Packaging_Graphics/en_US/)(acessado em 14/06/08)

# Apêndice **A**

*Microsistemas em resina de poliéster e em elastômero para flexografia*

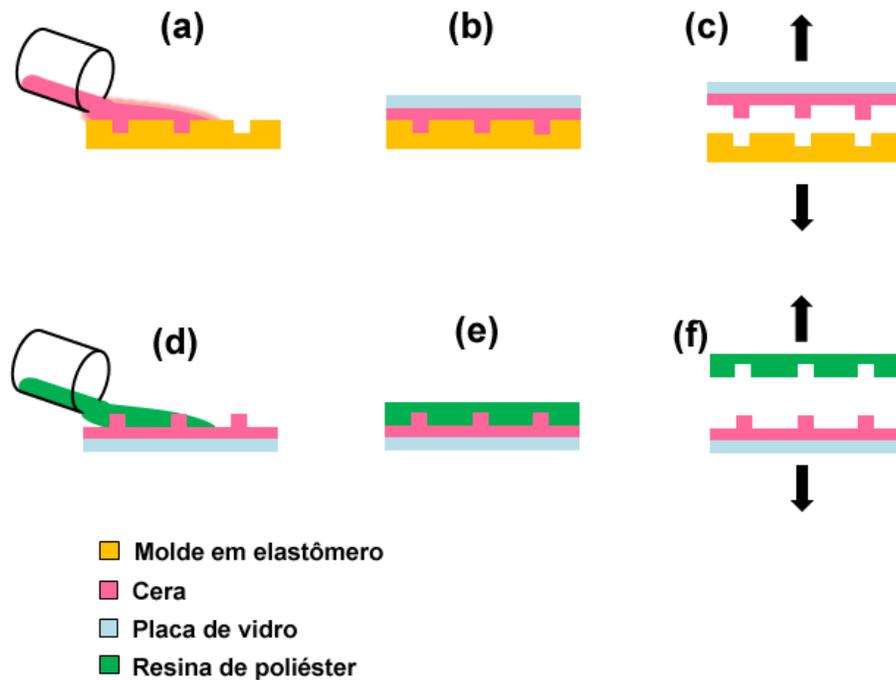
## **A.1 Microssistemas em resina de poliéster e em elastômero para flexografia**

Além do poli(metilmetacrilato) e da resina fotossensível à base de UA, outros materiais, como uma resina a base de poliéster (Resina Cristal 440-C- Glasspercil) e um fotopolímero sólido (Dupont - Cyrel<sup>®</sup>), foram empregados para a fabricação de microssistemas através das técnicas de moldagem em cera e fotolitografia, respectivamente. Devido às dificuldades encontradas, os dispositivos desenvolvidos através destes materiais não puderam ser aplicados analiticamente, o que impossibilitou a avaliação mais aprofundada dos mesmos, tornando a sua descrição, no corpo principal do texto, pouco coerente. Apesar disto, as técnicas descritas neste apêndice poderão ser otimizadas e utilizadas com sucesso na fabricação de novos microssistemas, justificando a sua descrição neste apêndice.

### **A.1.1 Microssistema em resina de poliéster**

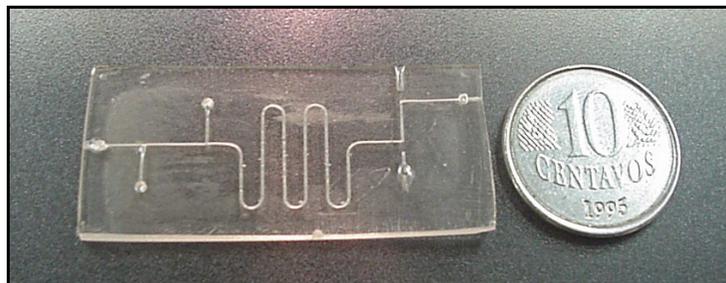
Uma resina à base de poliéster facilmente encontrada no comércio e utilizada para a manufatura de artesanatos (Resina Cristal 440-C- Glasspercil) foi empregada para o desenvolvimento de um protótipo a partir de um molde em cera. A Figura A 1 ilustra as etapas do procedimento proposto para a microfabricação. Inicialmente, um molde em baixo relevo foi desenvolvido sobre um elastômero à base de uretana-acrilato a partir da técnica de fotolitografia, seção 3.1.2.1. Sobre este molde, depositou-se cuidadosamente a cera (Cera Rosa No. 7 Wilson<sup>®</sup>), previamente fundida em cadinho, de forma preencher os canais e deixar certo excesso sobre o mesmo (Figura A 1 (a)). A seguir, uma placa de vidro foi utilizada para formar uma configuração em sanduíche com a cera e com a estrutura em baixo relevo utilizada para dar forma ao molde (Figura A 1 (b)). Depois da solidificação da cera, o que levou cerca de 10 minutos, separou-se, as partes obtendo-se a uma estrutura em alto relevo aderida à placa de vidro, Figura A 1(c). Esta separação foi possível graças à baixa aderência da cera ao elastômero e à flexibilidade deste polímero que permitiu realizar esta operação facilmente. A estrutura de cera foi então utilizada como molde para a confecção do sistema em resina de poliéster. Como ilustrado na Figura A 1(d), a resina de poliéster foi depositada sobre o molde de cera e, em seguida, o conjunto

(Figura A 1(e)) permaneceu em repouso por 24 horas, permitindo a polimerização da resina, a qual ocorre por ação de um catalisador adicionado à mesma. Após este período, as partes foram separadas com o auxílio de aquecimento, com um secador de cabelo, revelando os canais no substrato (Figura A 1(f)). É importante salientar que os resíduos de cera que permaneceram aderidos ao sistema foram eliminados por meio do aquecimento até a temperatura de fusão da cera, cerca de 70 °C e posterior lavagem com detergente e água.



**Figura A 1:** Esquema do processo utilizado para a construção de sistemas rígidos em resina de poliéster. Espalhamento da cera fundida sobre um molde feito em elastômero à base de uretana-acrilato (a), “sanduíche” com uma placa de vidro (b), separação do molde de cera aderido ao vidro (c), deposição da resina líquida de poliéster (d), repouso por 24 h para polimerização (e) e separação do dispositivo do molde de cera (f).

Os canais construídos por meio desta técnica foram selados com um filme plástico adesivo (Con-tact<sup>®</sup>, Vulcan) de forma idêntica à descrita na seção 2.1.1 para o sistema em PMMA. Uma fotografia do sistema construído a partir da técnica proposta é apresentada na Figura A 2.



**Figura A 2:** Sistema FIA miniaturizado em resina de poliéster.

Conforme mostra a Figura A 2, o polímero resultante do processo de cura da resina é transparente e rígido o que pode facilitar a adaptação de detectores ópticos para a região visível do espectro. Apesar disto, o material se apresentou extremamente quebradiço, o que dificultou a confecção de furos para realização da conexão dos microcanais com o mundo exterior. Embora tenham sido utilizadas brocas com diâmetro de 0,7 mm, aplicando-se pequena pressão sobre o substrato, durante a sua perfuração, foram observadas trincas no material que impossibilitaram a utilização do dispositivo.

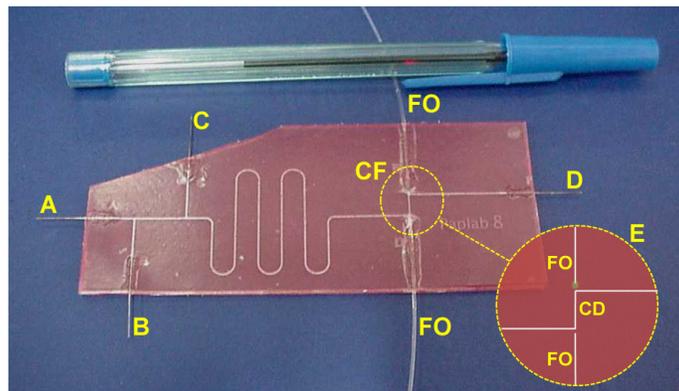
### **A.1.2 Microsistema FIA em fotopolímero para flexografia**

Um fotopolímero freqüentemente empregado na indústria gráfica para desenvolvimento de tipos para impressões por flexografia foi também estudado para o desenvolvimento de um microsistema para análise em fluxo. A técnica de fotolitografia no ultravioleta foi utilizada por técnicos da Faculdade de Tecnologia Gráfica da Escola SENAI Theobaldo de Nigris em São Paulo/SP para desenvolver um protótipo em Cyrel<sup>®</sup> [63], o qual é um fotopolímero sólido e flexível, fabricado pela DuPont, que pode ser fotolitografado por exposição seletiva de algumas regiões à radiação ultravioleta.

Os canais foram gravados sobre o fotopolímero empregando-se equipamentos comerciais, disponíveis na escola SENAI, que realizaram as operações de fotolitografia e revelação do resiste, de forma automatizada. Uma máscara confeccionada em fotolito foi utilizada em conjunto com estes equipamentos para criar canais com perfis semicirculares com dimensões da ordem de 200 µm de

largura e 300 µm de profundidade, seguindo a disposição apresentada na Figura A 3. Os canais foram arranjados ao longo de uma placa de fotopolímero com dimensões de 100 mm x 40 mm x 2 mm e selados com um filme plástico adesivo (Con-tact<sup>®</sup>, Vulcan) de forma idêntica à descrita na seção 2.1.1.1 para o sistema em PMMA. Para acesso das soluções ao sistema, agulhas hipodérmicas com diâmetro externo de 0,45 mm foram inseridas cuidadosamente através das laterais do dispositivo por perfuração do polímero com as próprias agulhas.

Foi também proposto para este sistema a integração de uma célula de fluxo com caminho óptico de 5,0 mm. Para isto, duas fibras ópticas plásticas com 250 µm de diâmetro foram adaptadas conforme o detalhe apresentado na Figura A 3, utilizando-se dois canais que foram fabricados para guiar e alinhar as fibras ao canal de detecção. Nesta proposta, o canal de detecção e os canais das fibras foram confeccionados de forma a ficarem separados por uma parede de polímero com aproximadamente 300 µm de espessura.



**Figura A 3:** Sistema FIA miniaturizado em fotopolímero para flexografia (Cyrel<sup>®</sup>-DuPont). **A-D:** agulhas hipodérmicas, **E:** detalhe da célula de fluxo, **FO:** fibras ópticas, **CF:** cela de fluxo, **CD:** canal de detecção.

Os equipamentos e tecnologias empregadas para a fabricação destes microssistemas permitem desenvolver estruturas com ótima resolução em dimensões de até 10 µm. Testes preliminares demonstraram que a selagem do dispositivo com um filme plástico adesivo foi eficiente, de modo que nenhum vazamento ou deformidades na interface filme/substrato foram observados ao se bombear água destilada ao longo dos canais em vazões de até 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

Apesar destes bons resultados preliminares, a integração da célula para detecção fotométrica empregando-se a estratégia descrita anteriormente não foi bem sucedida. A introdução das fibras nos pequenos canais previamente confeccionados para a adaptação das mesmas provocou o rompimento da selagem nas regiões próximas ao canal de detecção, impossibilitando o uso do sistema. Ao se empregar canais maiores para a adaptação das fibras, este problema não ocorreu. Entretanto, houveram enormes dificuldades para alinhar ambas as fibras com o canal de detecção, o que não permitiu a aquisição do sinal analítico.

Embora não tenham sido avaliadas neste estudo, outras estratégias de detecção poderão ser implementadas a estes dispositivos proporcionando melhores resultados.

# Apêndice **B**

*Instrumentação*

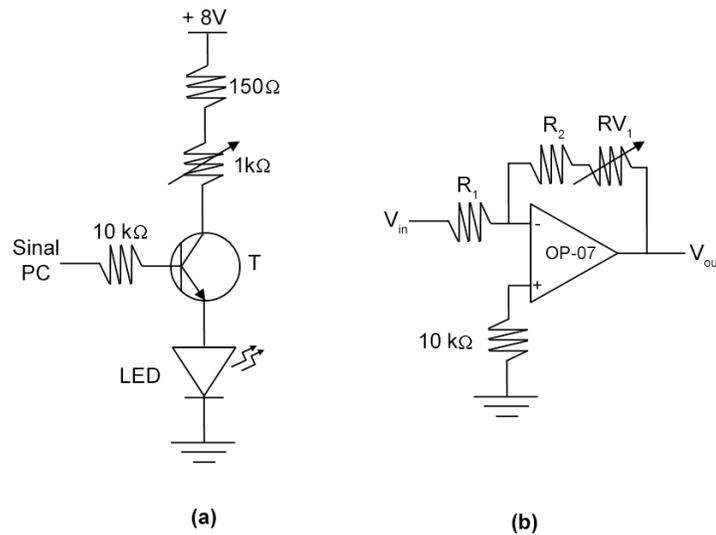
## B.1 Instrumentação

Como visto anteriormente, alguns dispositivos como mini-bombas de pistão, mini-válvulas solenóides, LEDs, fotodiodo e fotomultiplicadora foram utilizados em conjunto com os microssistemas para as determinações fotométricas e fluorimétricas. Neste apêndice, serão apresentados os circuitos eletrônicos desenvolvidos para o controle destes dispositivos com uma breve discussão do seu funcionamento.

### B.1.1 LED e fotodiodo

Para as determinações fotométricas descritas anteriormente, diodos emissores de luz (LED) foram utilizados como fonte de radiação e um fotodiodo (RS-308-067) foi empregado como transdutor. Estes componentes foram instalados em um fotômetro multicanal “home-made” recentemente desenvolvido [38], empregando-se os circuitos eletrônicos apresentados na Figura B 1.

Com a aplicação de um sinal lógico proveniente de um computador equipado com uma interface eletrônica (PCI 9111 DG/HR) na base do transistor (ULN 2001 A), o LED era acionado e a intensidade da sua radiação era ajustada, variando-se a corrente aplicada ao mesmo, através do resistor variável de 1 k $\Omega$  localizado no terminal do coletor do transistor, Figura B 1(a). O fotodiodo utilizado possuía quatro terminais, dos quais dois foram conectados ao terra do circuito, um foi conectado a fonte de alimentação (+8 V cc) e o último, terminal de tensão de saída, conectado ao circuito de amplificação, ilustrado na Figura B 1(b). Neste circuito, a tensão proveniente do fotodiodo ( $V_{in}$ ) era amplificada ao valor da tensão de saída ( $V_{out}$ ) de acordo com a função descrita na equação // . O terminal da tensão de saída do circuito amplificador era, então, conectado à entrada analógica da interface eletrônica, acoplada ao microcomputador, para a conversão analógica/digital (12 bits) do sinal analítico.

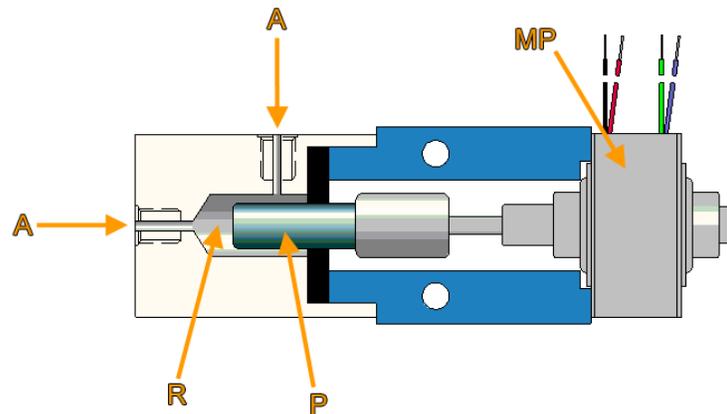


**Figura B 1:** Circuitos eletrônicos do fotômetro: Acionamento dos LEDs **(a)** e amplificação do sinal **(b)**, **T:** Transistor,  $R_1 = R_2 = 10 \text{ k}\Omega$ ,  $RV_1 = 100 \text{ k}\Omega$ .

$$V_{out} = V_{in} \times \left( \frac{RV_1 + R_2}{R_1} \right) \quad (II)$$

### B.1.2 Mini-bombas de pistão e mini-válvulas solenóides

Conforme citado anteriormente, duas mini-bombas de pistão (LPVX-0502150 B e LPVX 0504950 B, Lee<sup>®</sup>) foram utilizadas para a propulsão dos fluidos em determinadas aplicações dos microssistemas. Como ilustrado na Figura B 2, estes dispositivos consistem basicamente de um motor de passo, de um reservatório para as soluções de trabalho e de um pistão que, ao se movimentar, dispensa parte da solução presente no reservatório ou aspira as soluções externas à este, dependendo do sentido do seu movimento.



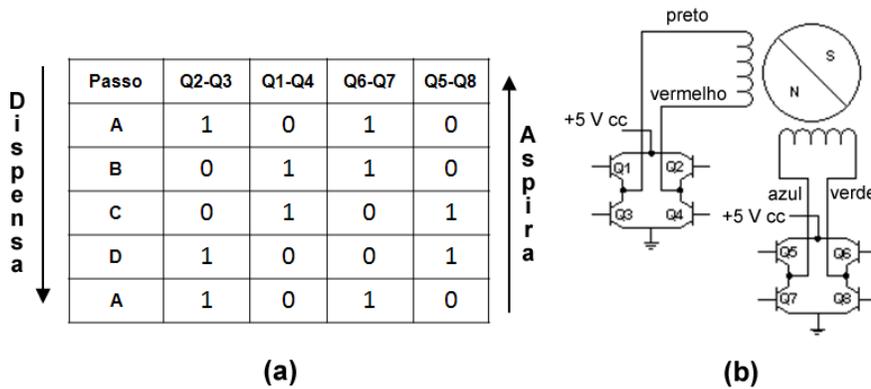
**Figura B 2:** Ilustração do interior de uma de uma mini-bomba pistão (LPVX-0502150 B, Lee®). **MP:** motor de passo bipolar, **P:** pistão, **R:** reservatório e **A:** canais de acesso ao reservatório.

Uma das bombas utilizadas (LPVX-0502150 B) possui um reservatório com capacidade para 250  $\mu\text{L}$  e permite dispensar volumes de 0,5  $\mu\text{L}$ , a cada passo completo do motor, ou volumes de 0,25  $\mu\text{L}$  com o motor trabalhando em modo de meio passo. A outra bomba empregada (LPVX 0504950 B) possui um reservatório com capacidade para 750  $\mu\text{L}$  e permite dispensar volumes de 1,5  $\mu\text{L}$  ou 0,75  $\mu\text{L}$  com o motor operando em modo de passo completo ou meio passo, respectivamente. As duas mini-bombas possuem pistões em cerâmica de zircônia (YTZP) e reservatórios em polietereetercetona (PEEK). As dimensões, semelhantes para as duas, é da ordem de 4 x 4 x 11 cm.

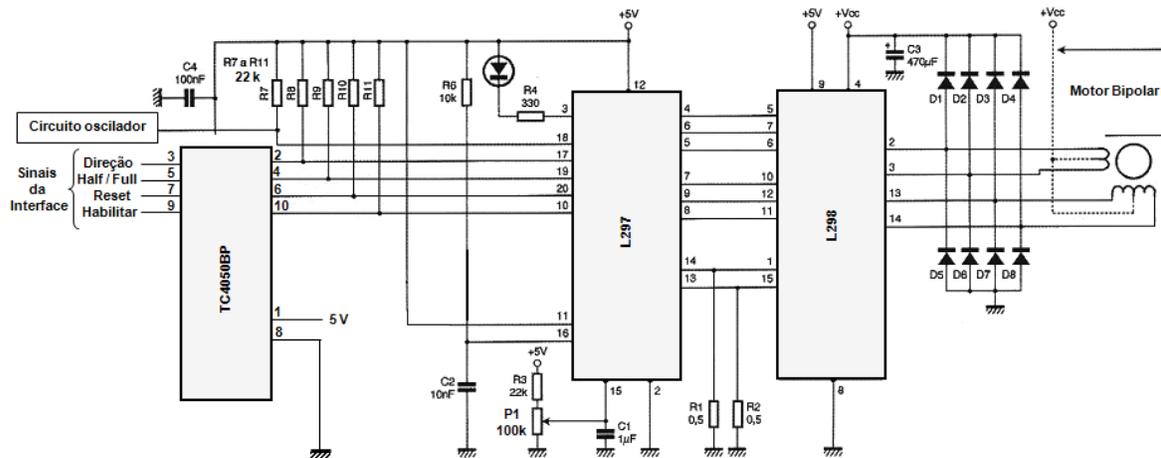
Conforme mostra a Figura B 3(b), os terminais de cada motor de passo foram conectados a duas pontes de transistores (CI-L298) e à tensão de +5 V cc. Para permitir o bombeamento, a seqüência sinais lógicos apresentada na Figura B 3(b) foi aplicada a base de transistores específicos da ponte (Q2-Q3, Q1-Q4, Q6-Q7 e Q5-Q8) fazendo com que o sentido da corrente ao longo das bobinas do motor fosse alterado a cada passo (A, B, C e D na Figura B 3(a)). Deste modo, dependendo da ordem de aplicação dos sinais lógicos (passos A $\rightarrow$ D ou D $\rightarrow$ A), o motor girava em sentido horário ou anti-horário, proporcionando a dispensa ou aspiração dos fluidos.

Embora a seqüência de sinais lógicos apresentada acima pudesse ser gerada por um microcomputador, optou-se pelo emprego de um circuito integrado (CI), L297, para realização desta operação. Conforme indicado no esquema da Figura B 4, este componente foi conectado ao CI L298 (ponte de transistores), à um circuito gerador

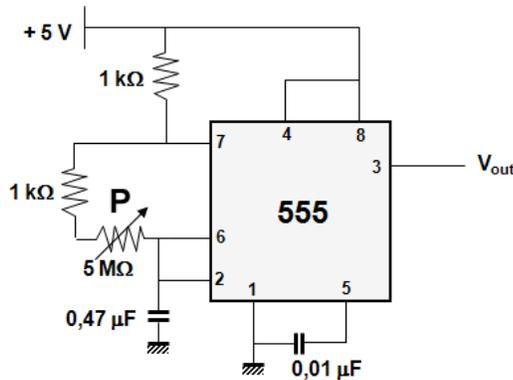
de onda quadrada e à interface do microcomputador através de um “buffer” (CI-TC4050B). Com esta configuração, foi possível alterar as propriedades de funcionamento da mini-bomba, tais como modo de atuação (passo completo/meio passo) e sentido do deslocamento do pistão (aspira/dispensa fluido), enviando sinais digitais provenientes da interface eletrônica aos pinos 10, 17, 19 e 20 do CI L297. O controle da vazão foi realizado ajustando-se a freqüência da onda quadrada gerada pelo circuito oscilador baseado no CI 555, Figura B 5, através do potenciômetro (P) de 5 MΩ. Como este circuito oscilador atua como “clock” do CI L297, a alteração da freqüência da onda faz com que a seqüência de bits necessária ao funcionamento da bomba ocorra de forma mais rápida ou mais lenta, alterando a vazão de bombeamento.



**Figura B 3:** Seqüência de bits necessária ao acionamento das mini-bombas de pistão (a) e conexão dos terminais das bombas com as pontes de transistores (b). Q1-Q4 e Q5-Q8: pontes de transistores integradas ao CI-L298.



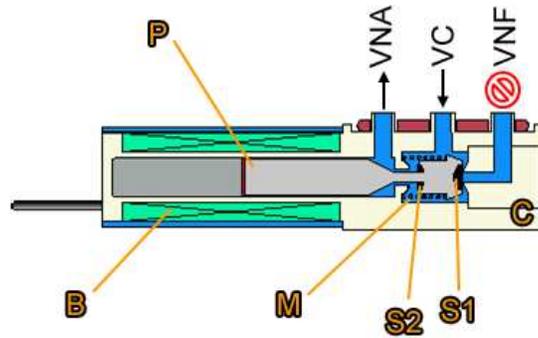
**Figura B 4:** Esquema do circuito “Driver” construído para controle das mini-bombas. D1-D9: diodos BYV96E de 2A. Valores das resistências indicadas em ohms. Todos os resistores são de ¼ w com exceção dos resistores R1 e R2 (5W). O esquema do circuito oscilador é apresentado na Figura B 5.



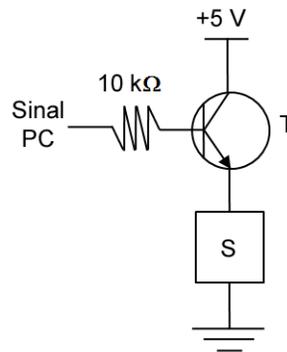
**Figura B 5:** Circuito oscilador (gerador de onda quadrada) utilizado como “clock” do CI L297 na Figura B 4. **P:** potenciômetro utilizado para ajuste da frequência da onda gerada.

As mini-válvulas solenóides (LHDA 0531415H, Lee<sup>®</sup>) utilizadas para o direcionamento do fluxo em algumas aplicações dos microssistemas apresentam a estrutura interna ilustrada na Figura B 6, com um volume interno de 70  $\mu\text{L}$ , volume morto de 5  $\mu\text{L}$  e dimensões da ordem de 3 x 7 x 13 mm. Como pode ser observado, estas válvulas dispõem de três vias, sendo uma via comum (VC), uma via normalmente fechada (VNF) e outra normalmente aberta (VNA). Com a válvula desligada, a mola (M) pressiona a cabeça do pistão (P) contra o canal VNF, impedindo a passagem de fluido nesta via devido à vedação realizada por um selo de silicone (S1) localizado na parte dianteira da cabeça do pistão. Nesta condição, o fluxo ocorre apenas entre VC e VNA, de acordo com o indicado pelas setas. Com o acionamento da válvula através da aplicação da tensão de +5 V entre seus dois terminais, o campo magnético gerado pela bobina (B) provoca o deslocamento do pistão para a esquerda, obstruindo o canal VNA por ação do selo de silicone (S2) localizado na parte traseira da cabeça do pistão. Nesta condição, o fluido segue apenas entre as vias VC e VNF.

O acionamento das válvulas foi realizado através de um microcomputador empregando-se o circuito apresentado na Figura B 7. Com a aplicação de um sinal lógico alto na base do transistor (ULN2001A) um dos terminais da válvula era aterrado, fornecendo corrente à bobina e provocando o deslocamento do pistão. Com a aplicação de um nível lógico baixo na base do transistor, a válvula era desligada.



**Figura B 6:** Ilustração do interior de uma mini válvula solenóide LHDA 0531415H. **P:** pistão, **B:** bobina, **M:** mola em aço inoxidável 430F, **S1** e **S2:** selos em silicone, **C:** corpo em politereftalato de butileno (PBT).



**Figura B 7:** Circuito eletrônico para acionamento das mini-válvulas solenóides. **T:** transistor (ULN2001A) e **S:** válvula solenóide

### B.1.3 Automação com um microcontrolador programável

O uso de um microcontrolador programável para a automação das operações de análise realizadas com os microssistemas FIA foi também proposta neste trabalho com o objetivo de permitir a utilização dos microdispositivos em campo. Um módulo eletrônico baseado nos circuitos integrados (CI) PIC16F819, L297, L298 e OPT101 foi desenvolvido para o controle das mini-bombas de pistão, mini-válvulas solenóides e fonte de radiação (LED), além da conversão analógico/digital (A/D) do sinal analítico e a transmissão do mesmo para um “lap-top” ou “desktop” via RS232/USB. O esquema do circuito eletrônico do módulo desenvolvido é apresentado na Figura B 8 e uma fotografia geral do instrumento é apresentada na Figura B 9.

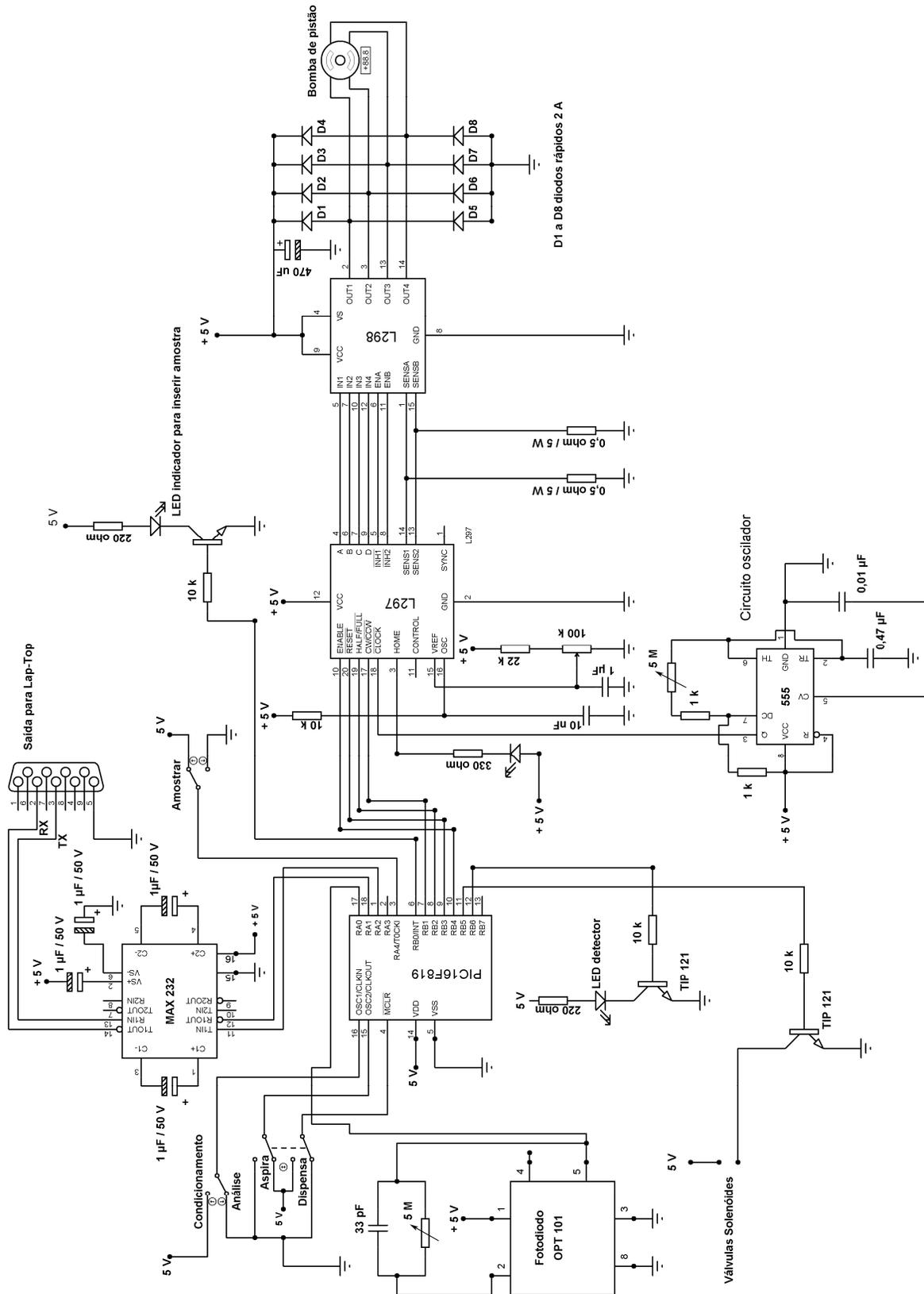
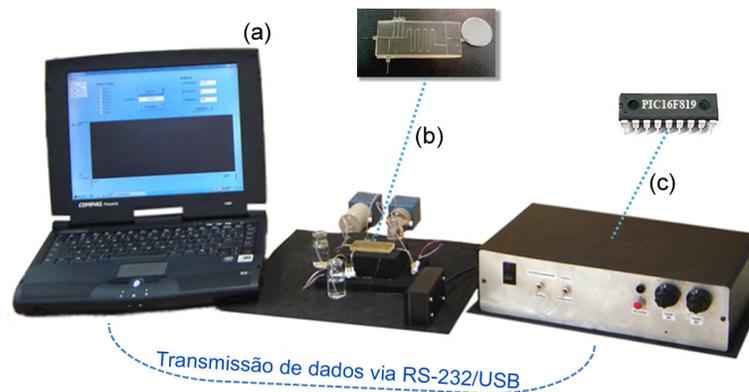


Figura B 8: Esquema do circuito eletrônico desenvolvido para controle do sistema miniaturizado com um microcontrolador PIC16F819.



**Figura B 9:** Fotografia com vista geral do sistema microcontrolado. “lap-top” para visualização gráfica e armazenamento dos dados (a), microssistema FIA (b) e módulo controlador construído com base no CI PIC 16F819.

Como pode ser observado na Figura B 8 o circuito utilizado para acionamento das bombas é semelhante ao apresentado na Figura B 4. Entretanto, nesta configuração, o controle do CI L297 através dos pinos 10, 17, 19 e 20 é realizado a partir de sinais lógicos provenientes do microcontrolador (PIC16F819) e não de um PC com interface eletrônica, como era realizado anteriormente. Da mesma maneira, o acionamento das mini-válvulas solenóides e do LED utilizado no sistema de detecção foi executado a partir de sinais lógicos provenientes dos pinos 11 e 12 do PIC, respectivamente. Vale observar que os circuitos para acionamento das válvulas e LED são ligeiramente diferentes daqueles apresentados nas seções B.1.1 e B.1.2. Transistores TIP 121 foram utilizados no lugar dos transistores ULN2001A e a alimentação do LED foi feita com a tensão de +5 V ao invés de +8 V.

Para a realização da detecção fotométrica, um CI OPT 101 com fotodiodo e sistema de amplificação integrado foi utilizado como transdutor. Este dispositivo foi conectado a um capacitor de 33 pF e a um resistor variável de 5 M $\Omega$ , o qual foi utilizado para ajuste da amplificação do sinal. Como mostra o circuito apresentado no canto inferior esquerdo da Figura B 8, o terminal de saída do OPT-101 (pino 5) foi conectado ao pino 17 do PIC, onde o sinal amplificado foi convertido em um sinal digital de 10 bits por um conversor A/D do próprio microcontrolador. Este sinal foi, então, enviado a um microcomputador (“lap-top” ou “desktop”) via RS-232 através dos pinos 1 e 18 do PIC, sendo o CI MAX 232 utilizado apenas para ajustar o sinal

proveniente do PIC ao nível de tensão normalmente empregado nos microcomputadores. Como a maioria dos microcomputadores atuais não dispõe de entradas RS-232, um cabo conversor (UTS2009-LRI) foi utilizado para conectar o módulo de controle à entrada USB de um PC. É importante destacar que o microcomputador foi utilizado somente para a visualização gráfica e armazenamento dos dados gerados pelo PIC e não para o controle do circuito. Um programa escrito em VisualBasic<sup>®</sup> 5.0 foi desenvolvido para este propósito

O circuito apresentado na Figura B 8 foi também equipado com três chaves “liga/desliga” que foram conectadas aos pinos 3, 4, 15 e 16 do microcontrolador. A Figura B 10 mostra a disposição das referidas chaves no painel frontal do módulo controlador proposto. Com o acionamento destas chaves, o usuário pode definir o tipo de procedimento a ser realizado (análise ou preparação do sistema), controlar o modo de funcionamento das bombas (aspirar ou dispensar as soluções) ou iniciar as operações necessárias a uma determinação analítica, como amostragem e detecção. Estas funções e a sua relação com a posição de cada uma das chaves foram definidas em um programa escrito em linguagem C, o qual foi compilado e gravado na memória do microcontrolador e será brevemente discutido a seguir.

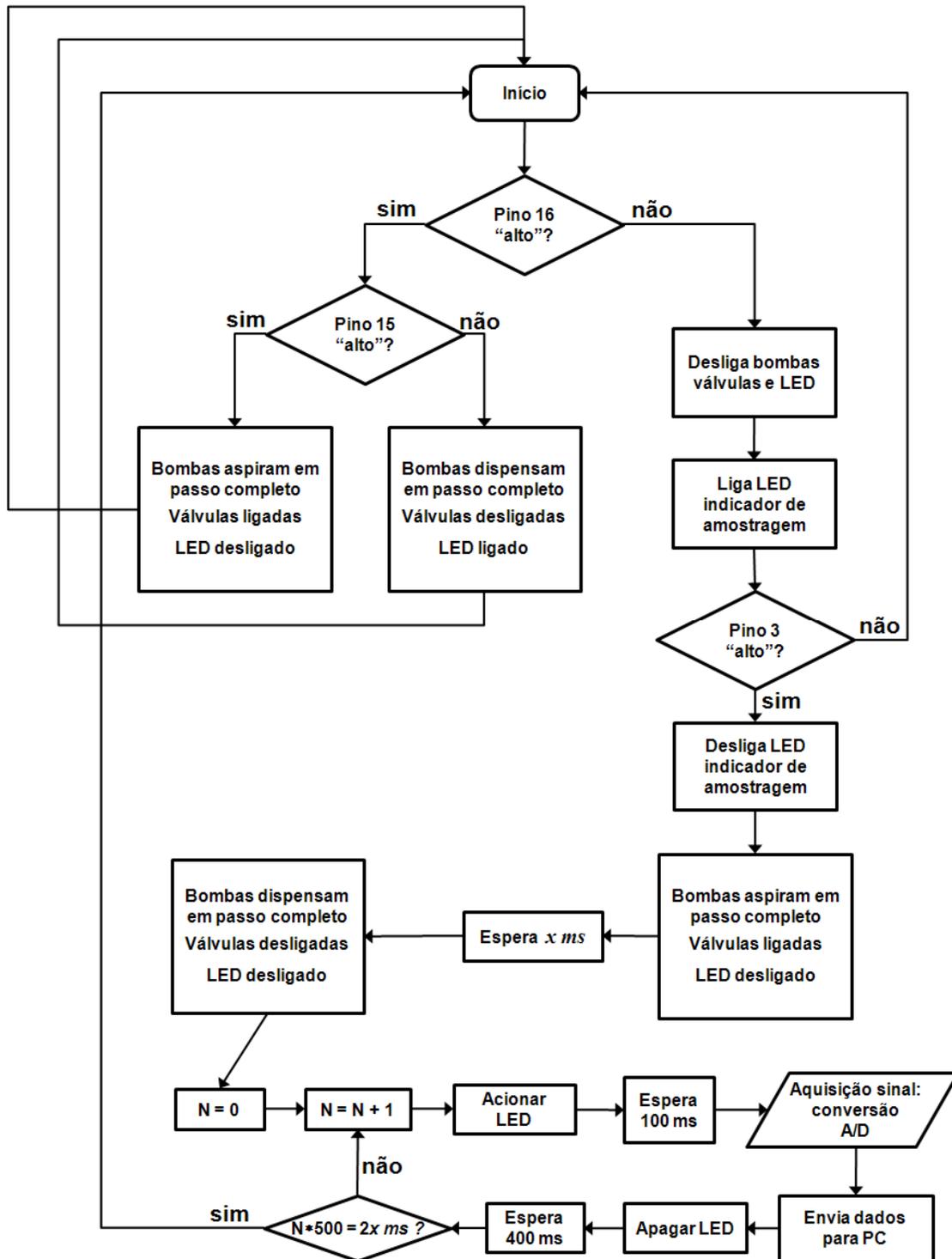


**Figura B 10:** Painel frontal do módulo controlador proposto. Chave de energia (a), chave “condicionamento/análise” (b), chave “aspira/dispensa” (c), chave “amostrar” (d) e potenciômetros para ajuste das vazões das mini-bombas (e).

A Figura B 11 mostra o fluxograma do algoritmo desenvolvido para uma determinação fotométrica simples controlada pelo módulo proposto a partir do acionamento das chaves “liga/desliga”. Como pode ser observado, após ligar o instrumento, o algoritmo verifica o “status” do pino 16 do microcontrolador, o qual é definido pela posição da chave “condicionamento/análise” no circuito da Figura B 8.

Quando este pino é alimentado com a tensão de +5 V (nível “alto”), o algoritmo passa a verificar o “status” do pino 15 do PIC, de modo que, alterando-se a posição da chave “aspira/dispensa” no circuito da Figura B 8, seja possível realizar a preparação do sistema para uma análise através da aspiração ou propulsão das novas soluções de trabalho. Quando o pino 16 do PIC é aterrado (0 V, nível “baixo”), todas as bombas e válvulas são desligadas e o LED indicador de amostragem é ligado. Para dar início ao procedimento automático de análise, o “status” do pino 3 do microcontrolador é alterado de “baixo” para “alto”, acionando-se a chave “amostrar” no circuito da Figura B 8. Após o acionamento desta chave, a amostra é aspirada pelo tempo previamente definido no programa do PIC ( $x$  ms na Figura B 11) e, em seguida, a mesma é impulsionada até o detector pelo dobro do tempo utilizado na amostragem ( $2x$  ms). Este procedimento é realizado para permitir que os pistões das mini-bombas empregadas sejam deslocados sem atingir o final do curso durante a análise. Como as bombas aspiram em modo de passo completo pela metade do tempo com que dispensam em meio passo, o deslocamento dos pistões é sempre o mesmo e nunca atingem o final do curso.

Durante a propulsão das soluções, a leitura do sinal analítico é efetuada em intervalos de 0,5 s pelo acionamento intermitente do LED. Ao final da leitura, o algoritmo retorna ao seu início e, desde que o “status” do pino 16 não seja alterado para “alto”, um novo ciclo de amostragem e leitura do sinal analítico é efetuado depois do acionamento da chave “amostrar”. Vale lembrar que a chave “amostrar” é, na realidade, um botão de mola que ao ser pressionado alimenta o pino 3 do PIC com +5 V e, ao retornar a sua posição inicial, fornece a tensão de 0,0 V a este mesmo pino. Deste modo, o usuário deve sempre pressionar este botão a cada nova injeção de amostra fornecendo um nível lógico “alto” ao pino 3 do PIC.



**Figura B 11:** Fluxograma do algoritmo proposto para uma determinação fotométrica simples a partir de um módulo controlador baseado no PIC 16F819.

### **B.1.4 Implementação de uma mini-fotomultiplicadora**

Este módulo foi também utilizado para controlar o sistema empregado para a determinação fluorimétrica de fluoresceína descrito na seção 5.1.1.2 e para a determinação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em amostras de água descrito na seção 5.1.1.3. Para este propósito, o transdutor (fotodiodo) foi substituído por uma mini-fotomultiplicadora (Hamamatsu H7468-03), a qual dispõe de uma fonte de alta tensão ajustável até 1000 V, de um conversor analógico/digital de 12 bits e de uma saída para comunicação via RS-232.

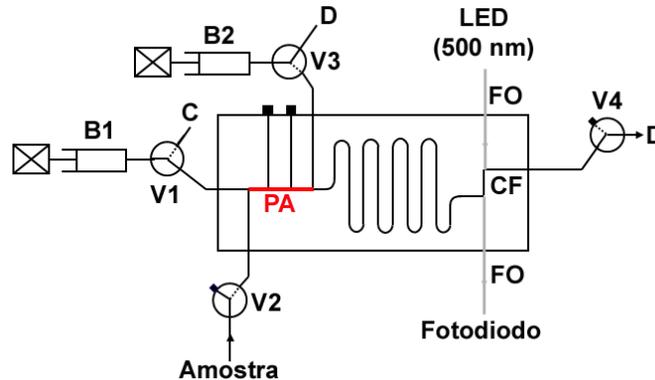
Diferentemente do proposto para a automação do método fotométrico, um microcomputador foi utilizado não só para o armazenamento e visualização gráfica dos dados, mas também para realizar o ajuste de tensão e do tempo de integração da fotomultiplicadora. Tanto estes ajustes quanto a transmissão dos dados foram realizadas conectando-se o microcomputador com a fotomultiplicadora por meio de um cabo conversor RS-232/USB (UTS2009-LRI).

O algoritmo utilizado para a determinação fluorimétrica a partir do módulo proposto foi semelhante àquele descrito na seção B.1.3. Entretanto, após o acionamento do LED do detector por 100 ms, um sinal digital proveniente do pino 13 do PIC era enviado a um dos terminais da fotomultiplicadora e utilizado como um “trigger”, dando início as operações de leitura e conversão do sinal analítico pela fotomultiplicadora.

### **B.1.5 Avaliação do módulo de controle na automação de uma determinação fotométrica com um microssistema.**

Para avaliação de seu desempenho, o módulo construído foi aplicado em conjunto com um microssistema para a determinação de Fe(II) em soluções padrão com 0,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> do analito, empregando-se o método fotométrico com o-fenantrolina. As medidas foram realizadas em um sistema de linha única, tal como o ilustrado na Figura B 12, para o qual as operações de amostragem, mistura dos reagentes e detecção foram controladas através do módulo desenvolvido com um

procedimento idêntico ao utilizado para a determinação de íons cloreto descrito na seção 4.1.1.3. O microsistema foi também o mesmo utilizado para aquela aplicação.



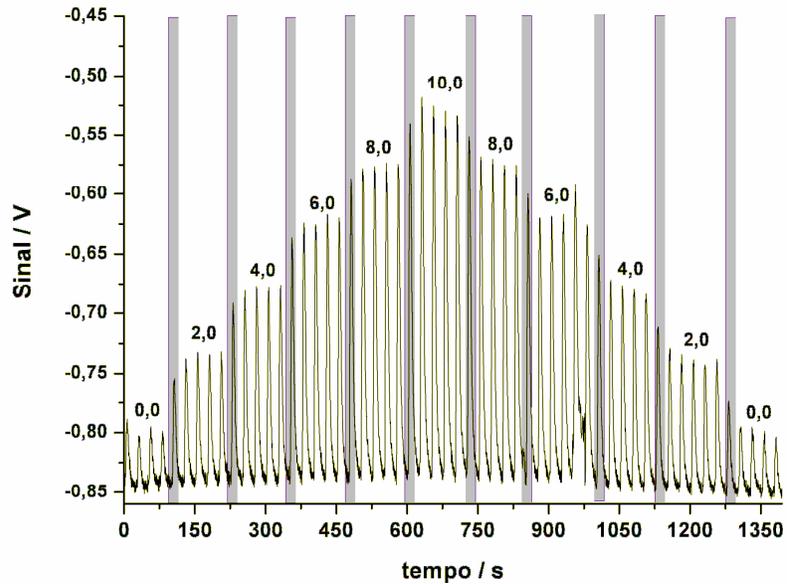
**Figura B 12:** Esquema do sistema de análise por injeção em fluxo miniaturizado empregado para a determinação de Fe(II): **B1 e B2:** mini-bombas de pistão; **V1-V4:** mini-válvulas solenóides (desligadas); **C:** solução carregadora (o-fenantrolina  $1\text{mmol L}^{-1}$  em tampão acetato pH 4,5); **D:** descarte; **PA:** “plug” de amostragem de  $0,30\ \mu\text{L}$ , **FO:** fibras ópticas e **CF:** célula de fluxo com caminho óptico de 5 mm.

## B.1.6 Resultados e discussão

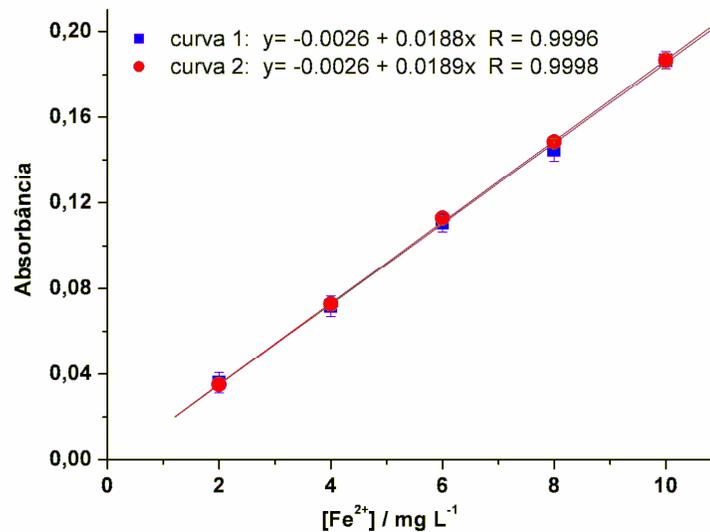
### B.1.6.1 Avaliação do módulo de controle na automação de uma determinação fotométrica com um microsistema.

Os resultados obtidos para a determinação fotométrica de Fe(II) empregando-se o módulo controlador proposto sugere que o mesmo pode ser utilizado para automação dos sistemas miniaturizados com bom desempenho. A estabilidade observada para a linha de base durante as injeções dos padrões indicou um “drift” praticamente desprezível do sinal analítico, enquanto o desvio relativo de 1,5%, obtido para 10 injeções sucessivas de um padrão contendo  $8,0\ \text{mg L}^{-1}$  em Fe(II), mostrou um ótimo controle dos tempos de amostragem e reação do analito. A Figura B 13 mostra o diagrama obtido para injeções sucessivas de padrões que foram injetados em ordem crescente e decrescente de concentração. Nesta figura, os picos demarcados em cinza referem-se aos picos de limpeza, ou seja, aos picos que foram obtidos imediatamente após a troca dos padrões com diferentes concentrações. Como pode ser observado na Figura B 14, as curvas analíticas construídas a partir das médias das alturas dos picos injetados em ordem crescente ou decrescente de concentração apresentaram praticamente a mesma sensibilidade com coeficientes

de correlação da ordem de 0,999, indicando a inexistência de efeitos de memória. Com o algoritmo desenvolvido, obteve-se a frequência de amostragem de 60 injeções h<sup>-1</sup> enquanto o limite de detecção de 0,46 mg L<sup>-1</sup> foi calculado como o sinal do branco mais três vezes o seu desvio padrão.



**Figura B 13:** Diagrama obtido para injeções de soluções padrão de Fe(II) com 0,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> do analito.



**Figura B 14:** Curvas analíticas obtidas a partir da média das alturas dos picos obtidos para injeções sucessivas de padrões em ordem crescente (**curva 1**) e decrescente de concentração (**curva 2**).

Estes resultados assemelham-se aos obtidos para determinações fotométricas realizadas com o mesmo microssistema empregando-se um microcomputador e uma interface eletrônica para o controle das operações e para a aquisição dos sinais, indicando que o módulo desenvolvido pode ser utilizado de maneira satisfatória para as aplicações dos microssistemas em campo. É importante observar, entretanto, que todos os circuitos descritos anteriormente foram alimentados com uma fonte de corrente contínua, a qual necessita ser ligada a rede elétrica. Deste modo, para tornar conveniente o uso do módulo proposto em campo, será ainda necessária a substituição desta fonte por baterias.