



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química

THIAGO ROSA SAMPAIO

Dissertação de Mestrado

Orientador: Dr. Alexandre Fonseca

Novembro de 2013



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química

**Desenvolvimento de microssistemas de análise por
injeção em fluxo à base de uretana-acrilato para
determinações por quimiluminescência**

THIAGO ROSA SAMPAIO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Química

Orientador: Dr. Alexandre Fonseca

Área de Concentração: Química Analítica

Brasília, novembro de 2013.

Agradecimentos

Quero agradecer em especial ao meu professor Dr. Alexandre Fonseca, pelo apoio e compreensão demonstrados ao longo do curso. Eu tive o privilégio de ter sido orientado por ele, e posso dizer que é um dos poucos professores que realmente dão o suporte que o aluno precisa, sempre presente e disposto a ajudar, a qualquer momento, além de possuir o dom de transmitir o conhecimento.

À minha mãe que sempre me apoiou e me ajudou nas horas difíceis, sempre desejando o meu sucesso e felicidade.

À minha namorada Christiani, que ao longo do curso me deu apoio, suporte, companhia, amizade, sempre estando comigo em momentos de dificuldades. Posso dizer que sem ela o caminho trilhado até aqui teria sido muito sem graça.

À minha tia Fátima que é como uma segunda mãe pra mim, e sempre esteve disposta a me ajudar em tudo que eu precisasse.

Aos amigos de graduação e pós graduação, Humberto, Vinícius, Gustavo, Valadão, Alan, Raphael, Daniel, Ítalo, Pedro, Saulo, Elias, Leandro, Gabriel, Hélio, Matheus e tantos outros que fizeram o curso valer a pena.

Aos meus amigos Silvano, Tiago, Afonso, Wesley, Rodrigo e respectivas namoradas/esposas pela amizade ao longo desses anos.

Aos colegas do AQQUA pela agradável convivência no laboratório.

Aos que não me lembrei de citar, mas que contribuíram com algo na minha vida.

E a CAPES pelo fornecimento da bolsa.

Resumo

Este trabalho descreve o desenvolvimento e avaliação de microssistemas de análise por injeção em fluxo à base de Uretana-Acrilato com célula de detecção por quimiluminescência integrada. A fotolitografia profunda no ultravioleta foi empregada para gravar os canais (largura de 500 μm e profundidade de 440 μm , aproximadamente) em fotoresiste de Uretana-Acrilato (UA), sendo a célula de detecção, em formato de serpentina ou caracol, desenvolvida com diâmetro de 1,0 cm, tamanho adequado ao tamanho dos detectores utilizados. Para a realização de medidas de quimiluminescência, foram utilizados dois fotodiodos (Centronic OSD50-E) e alternativamente foi utilizada uma mini fotomultiplicadora (Hamamatsu -H7468-03). O dispositivo microfluídico proposto suportou vazões de até 3,0 mL/min sem vazamentos e foi avaliado na determinação de peróxido de hidrogênio em soluções padrões, na determinação de hipoclorito em amostras comerciais de água sanitária e na determinação de nitrito em patês comerciais. Os sinais analíticos obtidos para a determinação de peróxido de hidrogênio utilizando detecção com fotodiodos demonstraram uma relação linear ($R^2=0,99987$) para faixa de concentração entre 50 e 200 $\mu\text{mol/L}$ e apresentou frequência analítica 110 injeções/h, enquanto que a determinação utilizando a fotomultiplicadora apresentou uma resposta linear ($R^2= 0,99999$) na faixa de concentrações de 5 a 25 $\mu\text{mol/L}$ e frequência analítica de 150 injeções/h. Para determinação de hipoclorito em amostras comerciais de água sanitária a curva analítica construída a partir dos dados obtidos com o microssistema com detecção por fotodiodos apresentou uma boa resposta linear ($R^2= 0,99848$) na faixa de concentrações de 2 a 20 mg/L e frequência analítica de 80 injeções/h. Para a determinação de nitrito em patês comerciais foi utilizado um microssistema com detecção por fotomultiplicadora, em que os dados obtidos apresentaram uma resposta linear ($R^2= 0,99965$) na faixa de concentração de 10 a 80 $\mu\text{g/L}$ e frequência analítica de 60 injeções/h. Os resultados obtidos nas determinações de hipoclorito e nitrito foram comparados com os respectivos métodos de referência e não apresentaram diferenças significativas ao nível de 95% de confiança. Estes resultados demonstraram a viabilidade de se desenvolver microssistemas de análise por injeção em fluxo com célula de detecção por quimiluminescência integrada.

Abstract

This work describes the development and evaluation of micro flow injection analysis systems based on Urethane – Acrylate photoresist with integrated chemiluminescence detection cell. The deep ultraviolet photolithography was employed to engrave the channels (width of 500 μm and depth of 440 μm , approximately) on plates of Urethane acrylate photoresist - (UA), and the detection cell (with serpentine or snail shapes) was developed with 1.0 cm diameter, an appropriate size for adaptation of the used detectors. To perform chemiluminescence measurements, two photodiodes (Centronic OSD50 -E) or, alternatively, a mini photomultiplier (Hamamatsu-H7468-03) were employed. The proposed microfluidic devices can operate with flow rates up to 3.0 ml/min, without leaks, and was evaluated in determining hydrogen peroxide in standard solutions, hypochlorite ions in commercial bleach samples and for the determination of nitrite in commercial pates. The signals obtained for the analytical determination of hydrogen peroxide using photodiodes as transducers demonstrated a linear relationship ($R^2= 0.99987$) in the concentration range between 50 and 200 $\mu\text{mol/L}$ and the analytical throughput of 110 injections/h. The results for the same determination using the photomultiplier showed a linear response ($R^2=0.99999$) in the concentration range from 5 to 25 $\mu\text{mol/L}$ and the injection rate of about 150/h. For determination of hypochlorite in commercial bleach samples to the analytical curves obtained with the detection by photodiodes showed a good linear response ($R^2=0.99848$) in the concentration range of 2 - 20 mg/L with analytical frequency of 80 injections/h. The results were compared with the reference method and showed relative deviations of less than 5%. For the determination of nitrite in pates, using a photomultiplier to detect quenching of chemiluminescence, where the data obtained showed a linear response ($R^2 =0.99965$) in the concentration range of 10-80 $\mu\text{g/L}$ and analytical frequency of 60 injections/h. The results were compared with the reference method and no significant difference was observed in 95% confidence level. These results demonstrated the feasibility of developing microsystems in UA with integrated chemiluminescence detection cells.

Índice

Folha de Rosto.....	II
Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Lista de Abreviaturas e Acrônimos	IX
Lista de Figuras	X
Lista de Tabelas	XV
1. Introdução.....	1
1.1 - Miniaturização de Sistemas de Análise.....	1
1.1.1 - Principais vantagens na utilização de μ TAS.....	2
1.1.2 - Principais desvantagens na utilização de μ TAS.....	3
1.1.3 - Técnicas de microfabricação.....	4
1.1.3.1 - Técnicas convencionais de Fabricação.....	5
1.1.3.2 - Técnicas Alternativas de Microfabricação.....	7
1.1.3.3 - Microfabricação por fotolitografia profunda em UV	10
1.1.3.4 - Selagem de Microssistemas	11
1.2 - Integração de Sistemas de detecção em microssistemas	13
1.2.1 - Métodos Eletroquímicos.....	14
1.2.2 - Métodos Ópticos.....	16
1.2.2.1 - Espectrofotometria (UV/VIS).....	18
1.2.2.2 - Fluorescência Molecular.....	19
1.3 - Quimiluminescência.....	21
1.3.1 - Breve histórico de fenômenos luminescentes.....	21
1.3.2 - O Fenômeno de Quimiluminescência.....	23
1.3.3 - Quimiluminescência aplicada a Química Analítica	27
1.3.3.1 Quimiluminescência aplicada à análise por injeção de fluxo (FIA)	30
2. Objetivos.....	33
3. Parte experimental.....	34
3.1. - Microfabricação por Fotolitografia profunda no UV.....	34

3.2. - Construção dos circuitos eletrônicos e desenvolvimento dos programas para controle e automação dos procedimentos.....	38
3.3. - Adaptação dos transdutores aos microssistemas fluídicos.....	44
3.4 - Avaliação dos microssistemas com reação entre peróxido de hidrogênio e luminol catalisada por ferricianeto de potássio.....	46
3.4.1 - Instrumentação.....	46
3.4.2 - Reagentes, Soluções e Procedimentos.....	46
3.5 - Avaliação de um microssistema na determinação de íons Hipoclorito (OCl ⁻) em amostras comerciais.....	48
3.5.1 - Instrumentação.....	48
3.5.2 - Reagentes, soluções e procedimento.....	48
3.5.3 - Método de Referência.....	50
3.6 - Avaliação de um microssistema na determinação de Nitrito em Patês Comerciais.....	51
3.6.1- Instrumentação.....	51
3.6.2 - Reagentes, soluções e procedimento.....	51
3.6.3 - Método de Referência.....	53
4. Resultados e Discussão.....	55
4.1. - Caracterização dos Dispositivos Propostos.....	55
4.2. - Avaliação de microssistemas para a reação entre peróxido de hidrogênio e luminol catalisada por ferricianeto de potássio.....	58
4.3. - Avaliação de um microssistema na determinação de íons Hipoclorito (OCl ⁻) em amostras comerciais.....	65
4.4. - Avaliação de um microssistema na determinação de Nitrito em Patês Comerciais.....	72
5. Conclusões e Perspectivas.....	77
6. Referências Bibliográficas.....	78

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

UV/ UVA - Ultravioleta

UA - Uretana Acrilato

FIA – *Flow Injection Analysis* (Análise por injeção em fluxo)

μFIA - Microsistema de análise por injeção em fluxo

μTAS - *Microsystem Total Analysis* (Microsistema de Análise Total)

LED - Diodo emissor de luz

Am - Amostragem

FO - Fibra óptica

CFF - Célula de Fluxo Fotométrica

PDMS - Polidimetilsiloxisano

PTFE - Politetrafluoretileno

BP - Bomba peristáltica

AM - Água Mineral

QL – Quimiluminescência

CQ – Célula de Detecção por Quimiluminescência

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema do primeiro microssistema de análise [4]	2
Figura 2. Etapas envolvidas no processo de fotolitografia. [5].....	6
Figura 3. Fonte de UV pulsa rapidamente quebrando as ligações químicas causando miniexplosões e a ejeção de CO e CO ₂ gasosos, formando os microcanais	8
Figura 4. a) Molde de fio metálico. b) Molde em silício ou quartzo	9
Figura 5. Estrutura típica de um oligômero Uretana-Acrilato.....	10
Figura 6. Três tipos de detecção eletroquímica utilizadas em dispositivos microfluídicos. (a) Potenciométrico; (b) Amperométrico; (c) Condutométrico.....	15
Figura 7. Esquema de detecção utilizando LIF.....	20
Figura 8. Sistema de detecção fluorimétrica	20
Figura 9. “O Alquimista em busca da pedra filosofal descobre o fósforo” – A descoberta do fósforo, pintura de Joseph Wright.....	22
Figura 10. a) Quimiluminescência a) (Luminol); b) Bioluminescência (Vagalume)	23
Figura 11. Compostos luminescentes: 1 Iofina, 2 luminol, 3 lucigenina, 4 isoluminol, 5 etanodiato de bis (2,4,6-triclorofenila), 6 pirogalol e 7 luciferina.....	24
Figura 12. Diagramas de níveis de energia potencial para reações exotérmicas (a) e reações quimiluminescentes.....	25
Figura 13. Anéis 1,2-dioxietânicos, representação genérica.....	25
Figura 14. Mecanismos de reação (a) vagalume, (b) cipridina e (c) luminol ..	26
Figura 15. Representação genérica de quimiluminescência direta (a) e indireta (b).....	27
Figura 16. Número de publicações por ano, palavras chave: “ <i>chemiluminescence</i> ” e “ <i>Flow injection analysis</i> ”.....	29
Figura 17. Máscaras fotolitográficas.....	35
Figura 18. Construção do molde utilizado na microfabricação.....	35
Figura 19. Fotografia da fotoexpositora utilizada na microfabricação.....	36
Figura 20. Processo de gravação dos canais.....	37

Figura 21. Circuito baseado no microcontrolador PIC16F819 para acionamento das válvulas solenóides e aquisição do sinal analítico.....	39
Figura 22. Fotografia do circuito eletrônico microcontrolado.....	40
Figura 23. Fotografia da parte frontal da caixa plástica para acondicionamento do circuito microcontrolador.....	40
Figura 24. Fotografia da parte traseira da caixa plástica utilizada para acondicionamento do circuito microcontrolador.....	41
Figura 25. Esquema do Circuito Eletrônico desenvolvido para a detecção por quimiluminescência baseado em dois fotodiodos. (Circuito Baseado no proposto por Borges et. al).....	42
Figura 26. Fotografia dos circuitos da fonte simétrica e do sistema de detecção por Quimiluminescência propostos.....	42
Figura 27. Esquema do Circuito Eletrônico para a fonte simétrica de alimentação dos circuitos.....	43
Figura 28. Interface ao usuário do programa desenvolvido para automação das operações com os micro sistemas, detecção com mini fotomultiplicadora.....	44
Figura 29. Seqüência de fotografias mostrando o acoplamento dos fotodiodos à célula de detecção por quimiluminescência. Adaptação do fotodiodo em uma lâmina de acrílico (A), Colocação de um suporte vazado de EVA (B), alinhamento do detector com a célula de detecção quimiluminométrica (C) e configuração em “sanduíche” com os dois fotodiodos (D).....	45
Figura 30. Mini fotomultiplicadora acoplada com o micro sistema.....	45
Figura 31. Configuração de fluxo utilizada para a realização da detecção de peróxido de hidrogênio em soluções padrão. BP : bomba peristáltica, V1-V5 : Válvula solenóides de três vias (na posição desligada), D : Descarte, Am : Plug de solução injetada, C : ponto de confluência, CQ : Célula para detecção.....	47
Figura 32. Fotografia geral do sistema desenvolvido para a realização dos estudos (Detecção utilizando fotodiodos).....	48
Figura 33. Configuração de fluxo utilizada para a realização da detecção de hipoclorito em soluções padrão e amostras. BP : bomba peristáltica, V1-	

V5: Válvulas solenóides de três vias (na posição desligada), D: Descarte, Am: Plug de solução injetada, C: ponto de confluência e CQ: Célula para detecção quimiluminométrica	50
Figura 34. Configuração de fluxo utilizada para a realização da detecção de nitrito em soluções padrão e amostras. BP: bomba peristáltica, V1-V5: Válvula solenóides de três vias (na posição desligada), D: Descarte, Am: Plug de solução injetada, C: ponto de confluência e CQ: Célula para detecção quimiluminométrica	52
Figura 35. Mecanismo de reação utilizada para determinação de nitrito pelo método de Griess.....	53
Figura 36. Microdispositivo com célula de detecção em formato caracol (A).....	55
Figura 37. Microdispositivo com célula de detecção em formato serpentina (B).....	55
Figura 38. Micrografia eletrônica de varredura de um microcanal construído por fotolitografia profunda no UV.....	56
Figura 39. Esquema simplificado da reação de luminol com peróxido de hidrogênio catalisada por Ferricianeto de potássio	58
Figura 40. Fiagrama obtido para injeções de soluções padrão de peróxido de hidrogênio (concentrações em $\mu\text{mol/L}$ indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-1. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.....	59
Figura 41. Curva analítica obtida com injeções de padrões de H_2O_2 , microssistema 1 (célula de detecção com formato em caracol).....	59
Figura 42. Fiagrama obtido para injeções de soluções padrão de peróxido de hidrogênio (concentrações em $\mu\text{mol/L}$ indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-2. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.....	60
Figura 43. Curva analítica obtida com injeções de padrões de H_2O_2 , microssistema 2 (Célula em formato serpentina).....	61
Figura 44. Fiagrama obtido para injeções de soluções padrão de peróxido de hidrogênio (concentrações em $\mu\text{mol/L}$ indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 19-2 e detecção com	

fotomultiplicadora. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.....	62
Figura 45. Curva analítica obtida com injeções de padrões de H ₂ O ₂ , microssistema 2, detecção com fotomultiplicadora.....	63
Figura 46. Esquema simplificado da reação quimiluminescente luminol/peróxido de hidrogênio.....	65
Figura 47. Fiagrama obtido para injeções de soluções padrão de hipoclorito (concentrações em mg/L indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-4 e detecção com fotodiodos. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.....	66
Figura 48. Curva analítica obtida com injeções de padrões de OCl ⁻ , detecção com fotodiodos.....	66
Figura 49. Fiagrama obtido para injeções de soluções padrão de hipoclorito (concentrações em µg/L indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-4 e detecção com fotomultiplicadora. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.....	67
Figura 50. Curva analítica obtida com injeções de padrões de OCl ⁻ , detecção com fotomultiplicadora.....	68
Figura 51. Fiagrama obtido para injeções de soluções padrão de hipoclorito (concentrações em µg/L indicadas sobre os picos), e amostras comerciais de água sanitária empregando-se a configuração mostrada na Figura 19-4 e detecção com fotodiodos. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.....	69
Figura 52. Fiagrama obtido para injeções de soluções padrão de nitrito (concentrações em µg/L indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-4 e detecção com fotomultiplicadora. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.....	72
Figura 53. Curva analítica obtida com injeções de padrões de NO ₂ ⁻ , detecção com fotomultiplicadora.....	73
Figura 54. a) Fiagrama obtido para injeções de soluções padrão de nitrito (concentrações em µg/L indicadas sobre os picos). b) Fiagrama das soluções amostra. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.....	73

Figura 55. A) Curva analítica obtida por μ FIA. B) Curva analítica obtida pelo método de referência (espectrofotometria)..... 74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tipos de Luminescência e respectivas fontes de excitação.....	23
Tabela 2. Volumes estimados para diferentes regiões (Microdispositivo A, célula de detecção em formato caracol).....	57
Tabela 3. Volumes estimados para diferentes regiões (Microdispositivo B, célula de detecção em formato serpentina).....	57
Tabela 4. Resultados comparativos (Análise de Hipoclorito em amostras comerciais).....	70
Tabela 5. Teste F entre os resultados obtidos por μ FIA e Titulação.....	71
Tabela 6. Resultados comparativos entre μ FIA e Espectrofotometria na determinação de nitrito em patês comerciais.....	74

1. Introdução

1.1 – Miniaturização de Sistemas de Análise

Nos últimos anos a miniaturização de sistemas de análise químicas se tornou um dos principais temas de estudo em Química Analítica. Parte desse interesse surgiu da necessidade de se adequar as técnicas analíticas aos conceitos da Química Verde [1] principalmente no que se refere ao consumo de reagentes e a geração de resíduos após os procedimentos, o que diminui os custos e também contribui para a minimização de eventuais danos ao meio ambiente.

Com base nos avanços observados pela microeletrônica e pela informática desde a década de 60, os quais possibilitaram a redução do tamanho dos circuitos eletrônicos e o aumento da velocidade de processamento de dados, a área de Química Analítica tem vislumbrado a possibilidade de automação de procedimentos analíticos, a partir de sistemas miniaturizados, com o objetivo de aumentar a eficiência das análises não só com relação ao consumo de reagentes e geração de resíduos, mas também no que se refere ao aumento da sensibilidade e portabilidade dos sistemas analíticos. [2]

Dentro desse escopo surge então o conceito de microssistemas de Análise Total (μ TAS – *Micro Total Analytical System*), que descreve um sistema automatizado e miniaturizado capaz de efetuar todas as etapas da análise química de uma amostra, como a amostragem, transporte da amostra, filtração, diluição, reações químicas, separação e detecção. [3] Embora este conceito tenha ganhado força apenas no início da década de 90 com o trabalho publicado por Manz et.al, há trabalhos mais antigos na literatura que já demonstravam a miniaturização e automação de métodos analíticos. Um exemplo é o trabalho publicado em 1979, no qual Stephen Terry e colaboradores [4] apresentaram um micro-cromatógrafo gasoso fabricado em pastilha de silício (Figura 1) com diâmetro de 5 cm, contendo minicanais e conexões externas, além do sistema de detecção por condutividade.

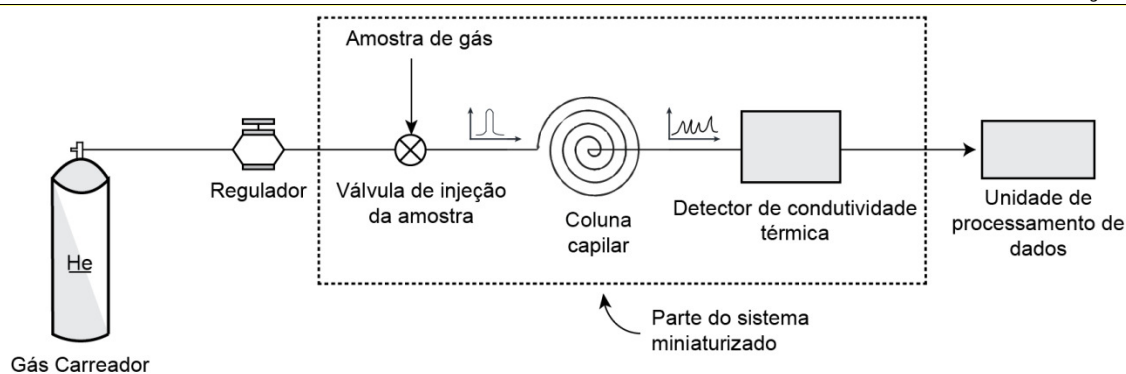


Figura 1. Esquema do primeiro microsistema de análise [adaptado da ref. 4]

De fato, um μ TAS é caracterizado por um dispositivo com dimensões diminutas (*chip*), não maiores que aquelas de um cartão de crédito, onde estruturas micrométricas (canais, câmaras, reatores, etc.) são desenvolvidas para permitir a realização de todas as etapas analíticas de maneira integrada. Devido à estas características, os μ TAS são também conhecidos pelo termo “*Lab-On-a-Chip*” (LOC), entretanto, este termo é mais geral e utilizado para designar todo tipo de microsistemas, quer seja para análise química ou para outro propósito, de modo que o termo μ TAS se torna mais conveniente para descrever sistemas analíticos miniaturizados com múltiplas funções.

1.1.1 – Principais vantagens na utilização de μ TAS

A utilização dos μ TAS pode proporcionar diversas vantagens, variando de acordo com a técnica aplicada. Dentre elas destacam-se:

- Portabilidade: tendo em vista que os dispositivos são construídos em escalas bem reduzidas, é possível transportá-los facilmente, permitindo a realização de análises em campo.

- Automação: a automação do processo analítico evita erros que podem ser gerados pela própria fadiga do analista, permitindo a execução de tarefas repetitivas de maneira reprodutível e exata. Com a miniaturização, atuadores como bombas e válvulas que consomem menos energia podem ser utilizados para o controle dos processos químicos, o que acarreta em um ganho substancial para as medidas analíticas.

- Redução nos volumes totais da análise: os volumes gerenciados no interior dos microsistemas podem variar entre alguns nanolitros até algumas

dezenas de microlitros. Isto leva à uma redução drástica no consumo de reagentes e na geração de resíduos, o que proporciona a redução dos custos das análises e o impacto gerado pelo procedimento ao ambiente.

- Velocidade Analítica: comparado aos procedimentos realizados em bancada (métodos em batelada), os tempos de análise para os procedimentos com os μ TAS costumam ser significativamente menores, de tal forma que a frequência analítica (número de injeções processadas por determinado período) é aumentada significativamente.

1.1.2 – Principais desvantagens na utilização de μ TAS

A utilização de μ TAS também possui algumas desvantagens, algumas contornáveis, enquanto para outras há a necessidade de uma evolução das técnicas de microfabricação e dos sistemas de detecção. Dentre elas, pode-se destacar:

- Integração do sistema de detecção: O tamanho reduzido das estruturas fluídicas normalmente impõe uma grande dificuldade na comunicação do mundo exterior com o interior dos microssistemas, onde estão as soluções que serão analisadas. De fato, a obtenção da informação analítica através de detectores, principalmente ópticos, integrados aos microssistemas é dificultada pelo próprio tamanho das estruturas, o que pode acarretar em uma diminuição da sensibilidade com relação àquela obtida através dos métodos em batelada.

- Processo de microfabricação: A própria construção de sistemas miniaturizados pode ser considerada uma barreira à sua aplicação. Embora muitas técnicas alternativas de microfabricação tenham sido propostas nos últimos anos com o objetivo de facilitar o desenvolvimento de microssistemas analíticos, o seu uso é ainda restrito à alguns laboratórios e à pesquisadores que dispõem de pessoal habilitado para lidar com estruturas de tamanho bastante reduzido.

- Efeitos químicos e físicos em pequenas escalas: Em sistemas microfluídicos utilizam-se microcanais (com dimensões da ordem de dezenas de micrometros) para o transporte das soluções. Nessa escala, o comportamento dos fluidos é bastante diferente daquele observado em sistemas convencionais (em escalas maiores), de modo que forças capilares existentes entre o fluido e

os pequenos dutos além do fluxo altamente laminar, presente sob estas condições, afetarão demasiadamente a mistura das soluções reagentes nestes sistemas. Além disso, a rugosidade dos microcanais podem afetar as formas de interação dos fluídos com o próprio material de construção do microsistema, tornando o processo de análise mais complexo em μ TAS do que em instrumentos comumente utilizados em laboratórios.

- Entupimento e formação de bolhas nos microcanais: Em algumas situações, o entupimento dos microcanais pode ocorrer por conta da cristalização de soluções salinas ou pela passagem de soluções de amostras que não foram previamente filtradas. Nestes casos, o problema pode ser solucionado, realizando uma limpeza adequada do sistema, o que nem sempre é possível e pode levar a inutilização do dispositivo. Outro problema que pode acontecer, é a formação de bolhas ao longo das microestruturas em decorrência de algum processo químico ou mesmo pela grande variação de pressão nas estruturas. Em sistemas que operam com soluções líquidas, as bolhas podem alterar drasticamente o resultado analítico final, pois modificam os processos de mistura no interior dos sistemas e alteram a resposta da maioria dos detectores.

1.1.3 – Técnicas de microfabricação

De uma forma bastante geral, pode-se dizer que existem duas etapas no processo de microfabricação de sistemas analíticos, uma que envolve a gravação dos microcanais em um substrato e a outra que envolve a selagem da estrutura microfluídica construída, na qual o próprio substrato ou outro material pode ser utilizado como cobertura. Na literatura é mostrado [5] que a escolha da técnica a ser utilizada dependerá substancialmente do material em que serão desenvolvidas as estruturas e também do tamanho destas estruturas. Usualmente, quanto menor as dimensões desejadas, mais caro e cuidadoso deverá ser o procedimento.

A seguir, será realizada uma breve descrição das técnicas de microfabricação convencionais e também daquelas que são consideradas alternativas para o desenvolvimento de microsistemas analíticos.

1.1.3.1 – Técnicas convencionais de Fabricação

Dentre as técnicas de microfabricação de sistemas analíticos, as chamadas técnicas convencionais, que utilizam substratos como o vidro, quartzo e silício, foram inicialmente utilizadas nas décadas de 70 e 80, empregando-se os mesmos processos fotolitográficos utilizados no desenvolvimento de circuitos integrados.

Embora diferentes formas de energia possam ser utilizadas para auxiliar na gravação dos canais, tais como a radiação ultravioleta (UV), raios-X e feixes de elétrons, o processo quase sempre envolve seis etapas [5], as quais são ilustradas na Figura 2 e descritas resumidamente a seguir:

- Etapa 1: Deposição de filmes metálicos e de fotorresiste (polímero foto-sensível) sobre o substrato. O filme metálico é utilizado para melhorar a adesão do fotorresiste ao substrato.

- Etapa 2: É colocada uma máscara fotolitográfica, onde a radiação UV ou de raios-X irão atingir seletivamente a superfície do fotorresiste.

- Etapa 3: A imagem contida na máscara fotolitográfica é revelada ao se utilizar solventes orgânicos adequados que eliminam o fotorresiste das regiões que não interagiram com a radiação (obs. As vezes se elimina a região que interagiu com o fotorresiste, o que dependerá do material utilizado para tal).

- Etapa 4: Após transferido o padrão dos microcanais (máscara) para o fotorresiste, é realizada a corrosão do filme metálico.

- Etapa 5: Após a corrosão do filme metálico a superfície do substrato passa por um processo de corrosão úmida (utilizando soluções contendo HF) ou corrosão por via seca (plasma reativo), onde é transferida a imagem dos microcanais para o substrato (vidro ou quartzo).

- Etapa 6: Retirada do fotorresiste com solvente adequado e retirada do filme metálico por corrosão. Após eliminar estes materiais, é feita a selagem dos microcanais, utilizando uma cobertura que pode ser do mesmo material ou de material diferente do que foi utilizado como substrato. Geralmente se utiliza a selagem térmica com o próprio substrato. Neste caso, a placa de cobertura que não contém microcanais, é colocada sobre o substrato contendo os microcanais e então submetida a uma temperatura elevada (500 °C), onde se origina a ligação entre ambas as placas.

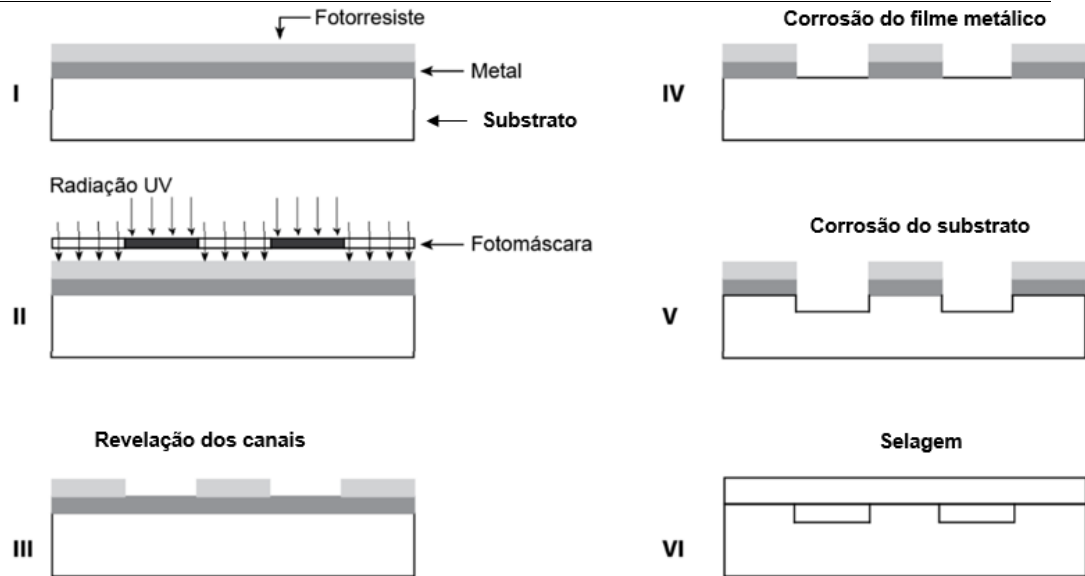


Figura 2. Etapas envolvidas no processo de fotolitografia. [5]

O silício é um dos substratos que podem ser empregados na fabricação de microsistemas de análise. Apesar de apresentar alta estabilidade térmica e mecânica, o custo para fabricar dispositivos neste material é extremamente elevado, de tal forma que se buscam alternativas para substituí-lo. [6]

O silício em determinados tipos de microsistemas de análise não se mostra o substrato mais adequado, pois possui problemas com condutividade quando a ele é aplicado uma alta tensão para fluxo eletro-osmótico (eletroforese).

O vidro é o material mais utilizado para substituir o silício na fabricação de microdispositivos, pois apresenta diversas vantagens, tais como: quimicamente inerte, exceto por reagir com ácido fluorídrico e derivados; transparência óptica; baixa autofluorescência; adaptação para prototipagem e produção em massa; baixa contaminação; durabilidade. Embora apresente muitas vantagens, a utilização de vidro como substrato apresenta algumas limitações, como por exemplo, o elevado preço de fabricação e o longo do tempo do processo, além da necessidade de um laboratório muito bem limpo, pois no processo de selagem a existências de partículas pode impedir a selagem adequada dos microdispositivos. Para contornar essas limitações, em 2007, Chen e colaboradores [7] descreveram um método rápido e de baixo custo para fabricação de dispositivos microfluídicos utilizando vidro como substrato. Neste

procedimento os autores utilizaram a litografia por UV, corrosão por via úmida e selagem com resina foto-curável, obtendo resultados satisfatórios.

Na literatura é possível encontrar alguns trabalhos onde a selagem de dispositivos microfluídicos de vidro são realizados em temperatura ambiente e sem a necessidade de salas limpas, o que torna o processo menos complexo e mais barato. [8][9]

1.1.3.2 – Técnicas Alternativas de Microfabricação

Embora as técnicas convencionais permitam a fabricação de microdispositivos com excelentes resoluções, no que refere a forma e as dimensões dos canais, o custo para se implementar um laboratório com estrutura e materiais adequados para a produção de microssistemas a partir destas técnicas pode chegar à valores superiores a 1 milhão de reais. [5] Dessa forma, a busca por técnicas alternativas para produção de microssistemas a partir de procedimentos de baixo custo é de grande interesse para a comunidade científica.

Embora existam muitas técnicas alternativas de microfabricação, como por exemplo a microfabricação em toner-poliéster [10], a moldagem por injeção [11], moldagem por compressão [12], a litografia macia [13], entre outras, somente algumas serão brevemente discutidas neste trabalho.

A utilização de polímeros como substratos para a fabricação de microssistemas vem sendo largamente difundida [5], os principais polímeros utilizados para a fabricação de microdispositivos são polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), poliestireno (PE), polícloreto de vinila (PVC), poliuretano (PU), polidimetilsiloxisano (PDMS) e uretana-acrilato (UA) [14]. Além dos polímeros, outros materiais têm sido utilizados na fabricação de microssistemas, tais como, papel e toner/poliéster, com excelente desempenho para algumas aplicações analíticas.

Algumas das principais técnicas alternativas para fabricação de microssistemas em polímeros são a ablação a laser e a moldagem a quente. Na técnica de ablação a laser, utilizada por Matthew A. Roberts e colaboradores [15], determinadas regiões do substrato (polímero como o PMMA) são expostas a uma fonte pulsada de UV. A absorção desta radiação gera um aquecimento

localizado onde a quebra de ligações no polímero é induzida, ocorrendo a formação de gases como CO e CO₂ que se desprendem do substrato. Basicamente, o mecanismo para a gravação dos canais é a junção de dois efeitos gerados pela exposição à luz UV, fotodegradação e a decomposição térmica. [15]

Existem dois métodos de fabricação por ablação a laser, o primeiro consiste em utilizar uma máscara fotolitográfica, onde o laser incide no substrato através dessa máscara produzindo os microcanais (Figura 3). [15] O segundo método é a gravação direta, onde o substrato é colocado em uma plataforma móvel que se movimenta nas direções x-y sob o feixe do laser. Como o feixe do laser é focalizado em único ponto a movimentação da plataforma gera os microcanais no formato desejado. A profundidade do microcanal é definida pela intensidade do laser, tempo de exposição, absorvância do substrato e pela quantidade de pulsos. [15]

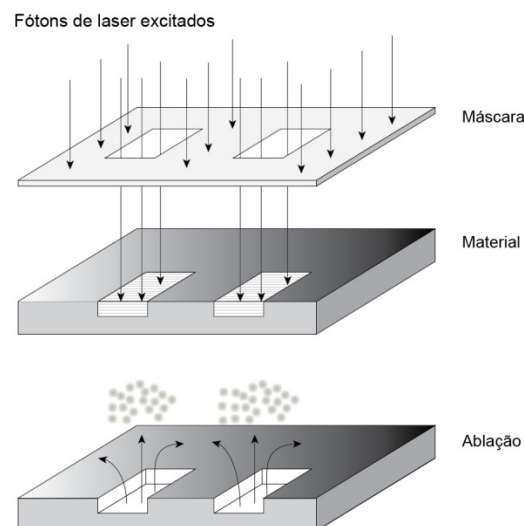


Figura 3. Fonte de UV pulsa rapidamente quebrando as ligações químicas causando miniexplosões e a ejeção de CO e CO₂ gasosos, formando os microcanais. [15]

Outra técnica bastante utilizada é a moldagem por pressão a quente. [16][17] Nesta técnica é construído um molde rígido, geralmente feito de vidro, silício ou metal, que tem o formato dos microcanais a serem produzidos no substrato. O molde pode ser constituído de um fio metálico que possui a geometria adequada para formação dos canais ou por um molde feito em silício ou quartzo, o qual possui o lado negativo que será gravado no substrato (Figura 4). Os substratos geralmente utilizados são materiais poliméricos sólidos

(termoplásticos) como o PMMA e o policarbonato. O molde é pressionado contra o substrato e o conjunto é aquecido a temperatura próxima a de transição vítrea do polímero tornando-o flexível e permitindo que a estrutura do molde seja replicada como um baixo-relevo em sua superfície. Feito isto, a temperatura é diminuída e o molde é retirado.

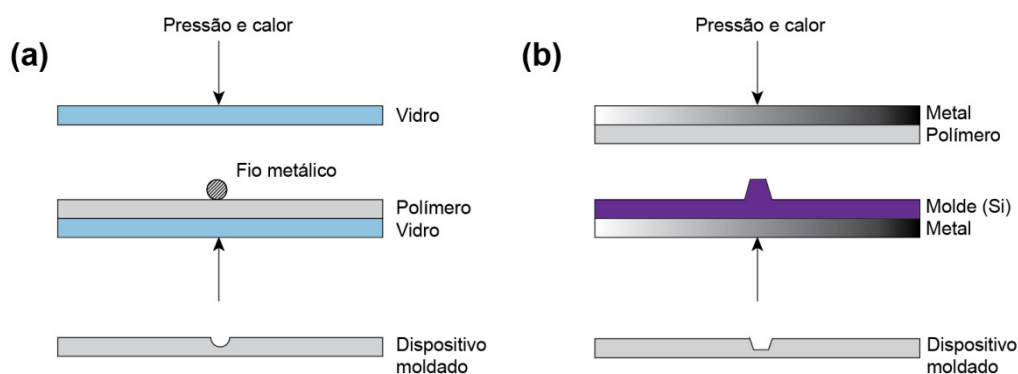


Figura 4. Moldagem por pressão a quente: a) Molde de fio metálico. b) Molde em silício ou quartzo [17]

Outra alternativa que pode ser utilizada na microfabricação de dispositivos fluídicos é a fotolitografia profunda no ultravioleta com fotorresiste de Uretana-Acrilato (UA), a qual foi proposta por Fernandes e Ferreira [6] e aperfeiçoada por Fonseca et al [17]. Nesta técnica, baseada em procedimentos normalmente utilizados para a confecção de carimbos, uma transparência com o desenho dos canais é impressa à laser (toner) e utilizada como máscara para definir as regiões a serem polimerizadas do fotorresiste. Lâmpadas UV (380 nm) são utilizadas para a etapa de replicação fotolitográfica e um banho ultrassônico é empregado para a eliminação do resiste não polimerizado (revelação). Por empregar materiais com custos bastante reduzidos e ainda assim apresentar um ótimo desempenho, esta técnica foi utilizada no desenvolvimento de todos os sistemas produzidos na presente dissertação. Por isso, maiores detalhes sobre a sua execução serão relatadas na parte experimental do trabalho (Seção 3.1).

1.1.3.3 – Microfabricação por fotolitografia profunda em UV

A utilização da técnica de foto-polimerização representa um grande avanço no desenvolvimento de materiais de revestimento, adesivos e na indústria de

tintas, pois esta técnica apresenta diversas vantagens como a secagem instantânea ampla faixa de formulação, redução no consumo de energia e materiais de baixo custo. Um dos principais polímeros utilizados em técnicas de foto-polimerização é formado por oligômeros a base de Uretana-Acrilato (Figura 5), cuja síntese envolve uma reação entre poli(isocianatos) com hidroxi-alkil-acrilatos em conjunto com outros compostos contendo grupos hidroxila. [18]

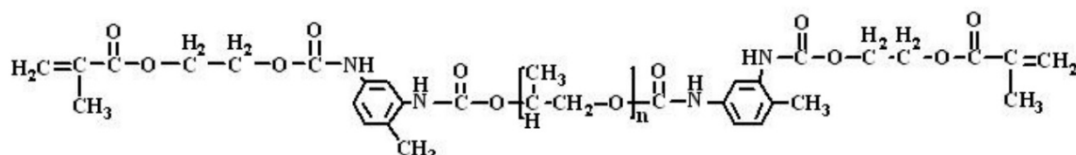


Figura 5. Estrutura típica de um oligômero Uretana-Acrilato

Muitos sistemas microfluídicos tem sido construídos utilizando o polímero PDMS [19] devido a suas propriedades, tais como: transparência a ondas eletromagnéticas na faixa do visível e UV próximo, inércia química, flexibilidade mecânica, durabilidade e baixo custo. [6] Entretanto, a utilização de PDMS na fabricação de dispositivos microfluídicos pode apresentar alguns problemas, como a permeabilidade a vapores de água, o que pode ser difícil de controlar considerando os pequenos volumes que são gerenciados no interior do dispositivo. Além disso, moléculas hidrofóbicas podem adsorver em dispositivos de PDMS, sendo liberadas posteriormente nos líquidos que percorrem os canais, causando problemas em estudos biológicos. O PDMS apresenta baixa resistência química em presença de algumas soluções ácidas e básicas, tais como: hidróxido de potássio, ácido nítrico, ácido sulfúrico e etc.

A técnica de microfabricação por fotolitografia profunda em UV é uma técnica simples e de baixo custo, que permite a obtenção de resultados satisfatórios, utilizando como substrato uma resina de Uretana-acrilato, que possui propriedades similares ao polímero PDMS e é fotolitografada com radiação UV na faixa de comprimento de onda entre 350 e 450 nm. [6][20]

De acordo com Ferreira e Fernandes [6], as fotoresinas à base de UA apresentam boa resistência química a solventes orgânicos normalmente utilizados em processos de extração, tais como, hexano, tolueno, clorofórmio, tetracloreto de carbono, entre outros, além de apresentar boa resistência química à soluções concentradas de ácidos e bases. Adicionalmente, o produto

da polimerização das fotoresinas de UA apresentam transparência à luz visível, o que possibilita a sua utilização em métodos ópticos de análise.

Com estas características a utilização de polímeros a base de UA se mostra uma boa alternativa para a construção de estruturas microfluídicas, e associada à técnica de fotolitografia profunda no UV, permite a prototipagem rápida dos dispositivos sem necessidade de equipamentos especiais e outros reagentes, o que reduz drasticamente os custos para a sua produção. [17]

Considerando as facilidades para a construção de sistemas microfluídicos a partir desta técnica de microfabricação, a mesma foi utilizada para o desenvolvimento de todos os dispositivos propostos neste trabalho. Na seção 3.1 (parte experimental) será realizada uma descrição mais abrangente sobre os procedimentos necessários à obtenção do dispositivo.

1.1.3.4 – Selagem de Microssistemas

A selagem é a etapa mais importante e crítica da fabricação dos microdispositivos fluídicos, pois consiste em vedar os microcanais gravados adequadamente permitindo a movimentação dos fluidos através do microcanais. A selagem é feita utilizando uma cobertura, que pode ter a composição química idêntica ou diferente do substrato, por via direta ou indireta. [5][17]

Basicamente na selagem direta, as lâminas do substrato e da cobertura são unidas diretamente ao se aplicar uma determinada pressão em um ambiente de alta temperatura. Enquanto que na selagem indireta é utilizada uma camada de material ligante, aplicando pressão e temperaturas mais baixas do que na selagem direta. [17]

Em dispositivos microfluídicos construídos por métodos fotolitográficos, em que os substratos geralmente são silício, quartzo ou vidro, a selagem pode ser realizada por processos térmicos. [17][21]

Na selagem por via térmica, o substrato é colocado em contato com outra lâmina (cobertura) de vidro, silício ou quartzo e aquecido a temperaturas superiores a 500 °C sob pressão, unindo-se as lâminas por meio de fortes ligações covalentes. A elevada temperatura empregada neste processo pode ser considerada uma limitação do processo, uma vez que pode causar deformações nos perfis dos microcanais, além da necessidade de as superfícies das lâminas

estarem perfeitamente limpas e planas para garantir aderência perfeita das superfícies, sem causar deformidades ao dispositivo. Um grande problema nesse tipo de selagem é a necessidade de uma sala completamente limpa, e que esteja livre de materiais particulados que podem causar deformidades ou impedir a selagem adequada. [21]

Para contornar o problema da alta temperatura no processo de selagem, alguns métodos utilizando temperaturas mais baixas têm sido desenvolvidos, dos quais se destaca a selagem anódica. Nesta técnica, as placas são submetidas à temperaturas entre 150 a 500 °C, e simultaneamente a uma grande diferença de potencial (200 a 1500 V). Esta técnica apresenta resultados melhores no que diz respeito a deformação dos canais, mas só é aplicável a substratos de vidro, quartzo e silício. [16]

A selagem dos canais de dispositivos microfluídicos fabricados em substratos poliméricos é mais simples do que em microdispositivos fabricados sobre substratos de silício, quartzo e vidro. No caso de substratos poliméricos a selagem pode ser feita diretamente utilizando o mesmo material do substrato, bastando apenas aplicar uma pequena pressão sob leve aquecimento até que seja atingida a temperatura de transição vítrea do material, assegurando a não deformidade dos microcanais durante o processo. [22]

Polímeros elastômeros, como o PDMS tem excelente adesão a diversos tipos de substrato, e pode ser utilizado em selagens reversíveis. Entretanto, o PDMS pode ser utilizado para realizar selagens irreversíveis entre si ou com outros substratos, tais como vidro, silício, quartzo, polietileno, poliestireno e etc, utilizando a técnica de oxidação por plasma. [22]

A selagem geralmente utilizada para a técnica de ablação a laser, por exemplo, é por via térmica, onde o substrato contendo os canais é pressionado contra uma placa de cobertura (usualmente sem canais e do mesmo material), sendo o conjunto submetido à uma temperatura próxima a de fusão do material. Neste caso, o aquecimento pode ser realizado empregando ultrassom, laser, micro-ondas ou mesmo uma fonte de radiofrequência, permitindo a selagem irreversível das estruturas. Alternativamente, a selagem pode ser realizada com uma cobertura de PDMS, onde este polímero é devidamente tratado para aderir ao substrato (com canais) através de forças de Van der Waals. [5]

Outra alternativa para efetuar a selagem de dispositivos microfluídicos fabricados em polímeros é o tratamento com camada intermediária, onde uma camada fina de um adesivo é aplicada na superfície de uma das lâminas, que em seguida é alinhada com a outra placa, onde se é aplicada uma pequena pressão para unir as duas lâminas. Uma das grandes vantagens deste processo é a sua aplicabilidade a maioria dos polímeros utilizados na fabricação de dispositivos microfluídicos, além de poder ser realizado em temperatura ambiente. Entretanto uma desvantagem é a possibilidade de obstrução dos microcanais, impossibilitando a passagem de fluidos.

1.2 – Integração de Sistemas de detecção em microssistemas

Um dos maiores desafios na miniaturização de sistemas analíticos reside na integração do sistema de detecção aos dispositivos. A miniaturização de sistemas analíticos permite a utilização de menores volumes para se realizar a análise, conseqüentemente a quantidade de solução contendo o analito a ser detectado é bastante reduzida, o que dificulta a execução dos procedimentos usuais de detecção instrumental. Dessa forma, alguns dos fatores que devem ser considerados para a escolha da técnica de detecção que será utilizada no dispositivo microfluídico, são a sensibilidade e a escalabilidade para dimensões menores, ou seja a possibilidade de redução do tamanho do sistema de detecção. [23][24][25][26]

Os métodos de detecção de dispositivos microfluídicos podem ser classificados em três tipos principais: ópticos, eletroquímicos e de espectrometria de massa. Dentre esses métodos, os métodos ópticos e eletroquímicos são os mais utilizados e serão discutidos brevemente neste trabalho.

1.2.1 – Métodos Eletroquímicos

A detecção eletroquímica é bastante utilizada em microssistemas fluídicos devido à geometria e natureza dos eletrodos que podem ser integrados aos dispositivos microfluídicos e à instrumentação mínima que é requerida para obter o sinal analítico. [27] Técnicas eletroquímicas de análise como a potenciometria,

voltametria e coulometria são confiáveis, e seletivas, além de apresentarem sensibilidades suficientemente adequadas para a detecção de analitos em amostras complexas, tais como alimentos, matrizes biológicas e ambientais. Essas e outras características contribuem para o seu uso de forma integrada em microssistemas.

As medidas eletroquímicas são baseadas em propriedades elétricas das espécies químicas que sofrem reações redox, sendo portanto, utilizadas para a detecção de espécies eletroativas. As medidas eletroquímicas podem ser feitas por medidas amperométricas, potenciométricas e condutométricas.

A detecção amperométrica é realizada ao se aplicar um potencial voltamétrico entre um eletrodo de referência e um eletrodo de trabalho, que irá causar a redução ou oxidação de uma espécie eletroativa, gerando uma corrente elétrica, a qual é relacionada a concentração da espécie. Neste caso, a detecção do analito pode ser realizada utilizando um voltamograma cíclico e as curvas de corrente versus tempo.

Na detecção potenciométrica, a quantificação do analito é realizada pelo monitoramento do potencial de um eletrodo íon-seletivo, comparando-o com o potencial de um eletrodo de referência. Usualmente, membranas são utilizadas para a construção dos eletrodos íon-seletivos e a diferença de potencial gerada entre as duas superfícies desta membrana é relacionada à concentração do íon de interesse.

A detecção condutométrica é baseada na mobilidade de espécies carregadas sob efeito de um campo elétrico de corrente alternada. Diferentes espécies apresentam diferentes respostas de condutividade, variando também de acordo com a concentração. A detecção condutométrica é a técnica eletroquímica de análise mais comumente utilizada, pois em princípio pode-se trabalhar com todas as espécies carregadas de interesse, porém, justamente por este motivo, apresenta uma seletividade bastante limitada.

A Figura 6 traz um esquema simplificado para ilustrar o funcionamento destas três técnicas eletroquímicas de detecção.

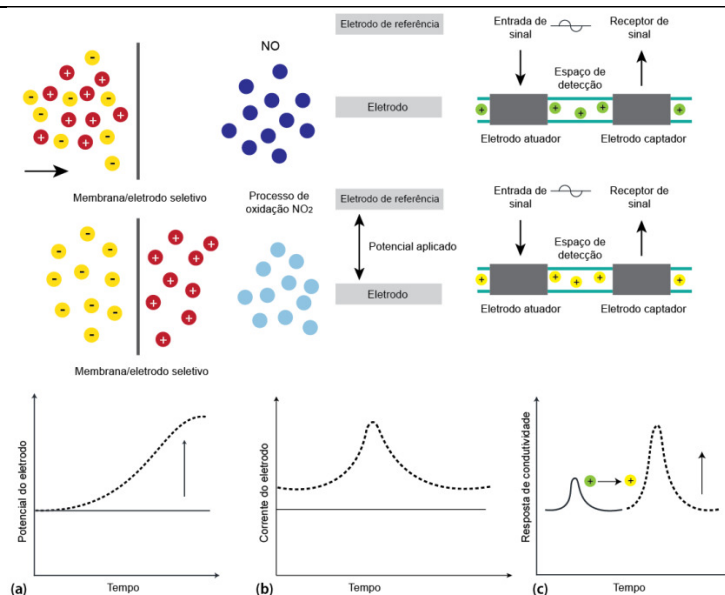


Figura 6. Três tipos de detecção eletroquímica utilizadas em dispositivos microfluídicos. (a) Potenciométrico; (b) Amperométrico; (c) Condutométrico.

A literatura descreve diversos métodos de análise utilizando detecção eletroquímica em dispositivos microfluídicos. Em 2005, Collier e Hart [28] apresentaram um método de incorporação de eletrodos em um canal de um dispositivo microfluídico. Utilizando a oxidação eletroquímica de peróxido de hidrogênio, eles conseguiram determinar a quantidade de glucose adicionado a leite ultrafiltrado. Em 2009, Zhihong Nie et. al [29] descreveram um método de fabricação de um microdispositivo em papel com integração de um detector eletroquímico, conhecido como μ PED (*microfluidic paper-based electrochemical devices*). Estes microdispositivos compreendem canais microfluídicos em papel estampados por fotolitografia, e são capazes de quantificar as concentrações de metais pesados e glucose em soluções aquosas. Em 2012, Jianjun Shi et al [30] descreveram um método para a determinação de Pb e Cd em soluções aquosas utilizando um μ PED. Eles utilizaram tiras de papel combinadas com eletrodos de carbono impresso, para montar o dispositivo microfluídico. O dispositivo era portátil e permitiu a análise de Pb e Cd em amostras contaminadas sem pré-tratamento, permitindo a análise na faixa de concentração de 0 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ambos analitos.

Detecção eletroquímica em microdispositivos tornou-se uma alternativa muito utilizada para o desenvolvimento de dispositivos portáteis para aplicações

em campo e estas estratégias eletroquímicas de análise tem se tornado especialmente atraentes para os microdispositivos devido à alta sensibilidade.

[31]

Um dos grandes desafios na aplicação de técnicas eletroquímicas em microdispositivos fluídicos está na integração dos eletrodos aos microcanais. Neste sentido, uma alternativa que vem sendo largamente estudada, principalmente por pesquisadores brasileiros, é a condutometria sem contato aplicada. [32][33][34][35] Em 2011, Pinotti [33] descreveu detalhadamente os avanços nos processos de fabricação de dispositivos microfluídicos com eletrodos acoplados para detecção condutométrica sem contato.

Basicamente, neste tipo de detecção, é realizada a medida de admitância entre um eletrodo de excitação e um eletrodo receptor, ambos em conjunto com a região do canal microfluídico que formam a cela de detecção. A indução das cargas, geradas pela aplicação de um sinal alternado de alta frequência ao eletrodo de excitação, é influenciada pela condutividade da solução no interior do microcanal, sendo assim possível relacionar o sinal registrado com a condutividade das espécies em solução. [33]

1.2.2 – Métodos Ópticos

Os métodos ópticos de análise compreendem a detecção da radiação que é absorvida, espalhada, refletida ou emitida pelas substâncias de interesse. Dentre estes métodos, os mais utilizados em microssistemas de análise são a fluorescência molecular, a espectrofotometria (UV/Vis), além da quimiluminescência e a bioluminescência. Estes métodos são muito utilizados devido a sua alta sensibilidade, característica que é compatível para detecção em pequenos volumes, porém a sua miniaturização pode ser bastante complexa e, em alguns casos, instrumentalmente não aplicável.

Considerando estes aspectos, existem muitos trabalhos na literatura que descrevem estratégias para a realização de detecção ópticas em microssistemas fluídicos. De uma maneira geral, observa-se o uso de duas possibilidades, aquelas em que os sensores são acoplados diretamente nos canais por onde

fluem as soluções (Detecção *on-chip*) e aquelas onde a radiação a ser medida é manipulada externamente ao microssistema, chamada de detecção *off-chip*. A seguir, serão apresentados alguns trabalhos que utilizam esta estratégia com uma pequena discussão sobre as suas vantagens e desvantagens.

A detecção óptica em macro-escala é muito comum devido à grande gama de aplicações e as propriedades da luz que podem ser utilizadas como ferramenta analítica. A vantagem dessa abordagem remete a níveis muito baixos de sinal de fundo, permitindo a combinação com técnicas de detecção muito sensíveis, como por exemplo, a utilização de fotomultiplicadoras, o que permite alcançar limites de detecção muito baixos. No entanto, para acoplar um sistema de detecção óptico a áreas pequenas como a de um canal microfluídico (com diâmetros menores que 0,5 mm) há a necessidade de se focar a radiação externa ao longo do caminho óptico (*off-chip*) ou mesmo acoplar fibras ópticas aos canais para que seja possível realizar as medidas (*on-chip*). Deve-se ressaltar, entretanto, que a redução do caminho óptico, normalmente observada em sistemas miniaturizados, pode diminuir a sensibilidade do método, em particular para medidas de absorbância. [36]

Embora na maioria das técnicas ópticas utilizam-se fotomultiplicadoras como transdutor para a detecção de radiação emitida, os fotodiodos, [37][38] embora menos sensíveis que as fotomultiplicadoras, podem ser utilizados para a detecção da radiação emitida, apresentando vantagens como maior robustez e menores custo e tamanho. O emprego destes dispositivos é particularmente interessante no caso de sistemas miniaturizados ou destinados a medidas em campo.

1.2.2.1 – Espectrofotometria (UV/VIS)

A detecção baseada em medidas de absorbância na região UV/VIS é a medida óptica mais utilizada em macro-escala. Entretanto, apesar da sua vasta gama de aplicações, existem poucos exemplos de sua utilização em microssistemas de análise. Isso se deve ao fato de que as pequenas dimensões dos canais do microchip representam um grande obstáculo para a realização prática das medidas, o que pode afetar a sensibilidade e a confiabilidade das determinações analíticas. A incorporação de fibras ópticas ao microssistema,

para guiar a radiação da fonte ao dispositivo e deste ao detector, é vista como uma abordagem simples, diminuindo a quantidade de componentes ópticos requeridos para a análise. [36] A seguir são descritos alguns trabalhos onde foram utilizados microssistemas de análise com detecção ópticas.

Em muitos sistemas cromatográficos, se utiliza a detecção por absorbância no UV/VIS para identificação e quantificação de compostos orgânicos. Em 2004, Jindal e Cramer [39], descreveram a construção de um microchip contendo uma coluna cromatográfica (imobilização de fase estacionária) no qual utilizavam uma fibra óptica para efetuar a detecção de absorbância proveniente da separação de peptídeos.

Em 2006, Nishihama e Yoshizuka [40], descreveram a utilização de um microssistema FIA para a determinação de glicose em urina, utilizando detecção UV/VIS. O microssistema foi construído em uma base de PMMA, e fibras ópticas foram utilizadas para auxiliar nas medidas de absorbância.

Na literatura são descritos alguns exemplos de sistemas de detecção por absorbância UV/VIS incorporados aos microssistemas. Em 2002, Petersen e colaboradores [41] descreveram a construção e a avaliação de um dispositivo microfluídico de separação eletroforética com célula de detecção por polarizador integrado a um sistema de detecção por UV/VIS. Em 2006, Steigert e colaboradores [42] descreveram um dispositivo microfluídico com detecção UV/VIS integrada pra determinação de álcool no sangue por método colorimétrico. Estes exemplos mostram as possibilidades de integração deste tipo detecção em microssistemas de análise.

1.2.2.2 – Fluorescência Molecular

A detecção por fluorescência molecular é a técnica óptica mais utilizada em microssistemas de análise, por causa de sua alta seletividade e sensibilidade. Na literatura, a maioria dos trabalhos descritos sobre dispositivos microfluídicos utilizam a detecção fluorimétrica, usualmente empregando a Fluorescência Induzida por Laser (LIF – Laser-induced Fluorescence). Embora existam diversas fontes de excitação, a LIF é mais facilmente adaptada para micro-escala. A coerência e a baixa divergência do feixe do laser tornam fácil a focalização da radiação em volumes extremamente pequenos de solução,

permitindo uma alta irradiação e, por conseguinte, limites muito baixos de detecção. [43]

Em 2004, Bishop e colaboradores [44] descreveram um método para determinação de benzodiazepinas nitradas por fluorescência induzida por laser em dispositivo microfluídico.

Em 2005 e 2006, Hellmich e colaboradores, [45] [46] descreveram um método e o aperfeiçoamento de técnicas de separação de proteínas, no qual utilizavam detecção por UV-LIF em dispositivos microfluídicos.

Em 2007, Shi e colaboradores [47] descreveram método para determinação de neurotransmissores em células de feocrocitoma utilizando um microchip eletroforético com detecção por fluorescência, e uma lâmpada de Mercúrio como fonte de excitação.

Dispositivos microfluídicos se tornaram muito comuns em diagnósticos médicos e também em outras aplicações biológicas, pois permitem detecção automática, com alta velocidade e com baixo custo, de marcadores biológicos, e propiciando um consumo muito reduzido de amostras e reagentes. Em 2011, Schrott e colaboradores descreveram um sistema automatizado de fluorescência induzida por laser utilizando chips microfluídicos construídos em polidimetilsiloxano (PDMS) para detecção e quantificação de imunoglobulinas em ratos. Na figura 7 é apresentado o esquema utilizado por Shcrott. [48]

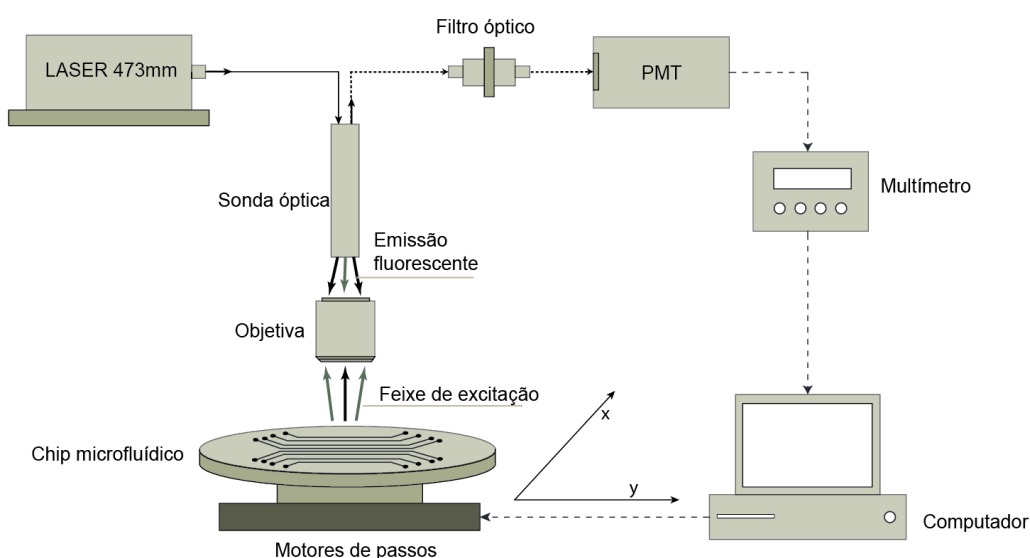


Figura 7. Esquema de detecção utilizando LIF [adaptado da ref. 48]

A utilização de diodos emissores de luz (LED) convencionais ou laser, além da recente introdução dos LED orgânicos (OLED), torna possível a integração direta da fonte de radiação aos microcanais com ampla faixa de opções de comprimentos de onda, além da utilização de fibras ópticas acopladas ao sistema de detecção óptico com os microcanais. [5] Em 2007, Pais e colaboradores, [49] descreveram um microssistema descartável utilizando OLED como fonte de excitação e um detector de fotodiodo orgânico (OPD) para medidas fluorimétricas.

Em 2013, Zhao e colaboradores [50], descreveram um microssistema com detecção fluorimétrica induzida por LED com lentes integradas. O diagrama do sistema de detecção é apresentado na Figura 8.

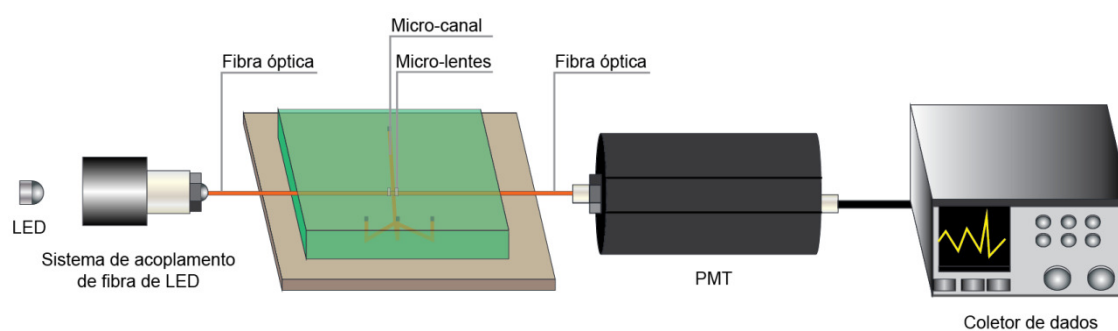


Figura 8. Sistema de detecção fluorimétrica [50]

Assim como a utilização da técnica de detecção por espectrofotometria, a detecção utilizando fluorescência molecular necessita de fontes externas de excitação, o que, em se tratando de sistemas miniaturizados, torna a implementação destes sistemas de detecção mais complexa. Dentro desta dificuldade é que surge a quimiluminescência como alternativa.

1.3 – Quimiluminescência

1.3.1 – Breve histórico de fenômenos luminescentes

Ao longo da história o fenômeno de luminescência vem sendo descrito pelo homem. Na literatura chinesa há referências datadas entre 1500-1000 a.C. sobre fenômenos de luminescência em vaga-lumes. Um dos primeiros exemplos do fenômeno de luminescência descrito na literatura, remete a descoberta acidental das chamadas *moonstones* pelo alquimista italiano Casciarolus por volta de

1600. Ele calcinou tijolos na esperança de encontrar metais preciosos, mas percebeu que após esse procedimento e exposição do material obtido à luz do sol, esse emitia um brilho avermelhado no escuro. Posteriormente, descobriu-se que a luminescência desse produto era derivado da produção de sulfeto de bário, no processo feito por Casciarolus. O sulfeto de bário em contato com a luz solar absorve energia, e quando no escuro emite a energia absorvida gradualmente, esse fenômeno é conhecido hoje como fosforescência. [51]

Henning Brand buscava encontrar a pedra filosofal e em 1669 realizou um experimento em que destilava 50 litros de urina misturada com areia (Figura 9). Deste procedimento foi gerado um produto que brilhava no escuro, o qual ele chamou de “fósforo de Brand”. Mais tarde descobriu-se que a luz vista por Brand era produzida pela reação do fósforo branco com oxigênio em meio úmido. Em 1831, David Brewster observou uma luminescência vermelha no extrato alcoólico de folhas verdes. A partir dessas primeiras observações diversos cientistas passaram a estudar os efeitos e propriedades da emissão de luz pelas substâncias, de tal forma que no final do século XIX, 600 compostos luminescentes já haviam sido identificados. [51]

Embora o fenômeno de quimiluminescência produzida sinteticamente tenha sido observada pela primeira vez por Radziszewski em 1877, quando realizou uma reação entre lofina e oxigênio e observou a emissão de luz verde, o termo “quimiluminescência” só foi introduzido em 1888 por Weidemann. [51][52]

Wiedemann introduziu o termo “luminescência”, a fim de distinguir a emissão de luz a partir de substâncias termicamente excitadas, fenômeno conhecido como incandescência, um processo físico, não químico, decorrente da emissão de radiação pelo corpo negro, e a emissão de luz a partir de moléculas excitadas por outros mecanismos, sem aumentar a energia cinética média. Ele classificou os fenômenos de luminescência em seis diferentes tipos, de acordo com o modo de excitação: fotoluminescência produzida pela absorção da luz, eletroluminescência produzida por descargas elétricas em gases, termoluminescência produzida por leve aquecimento, triboluminescência produzida por fricção, cristaloluminescência produzida por cristalização e quimiluminescência causada por uma reação química. [53]



Figura 9. “O Alquimista em busca da pedra filosofal descobre o fósforo” – A descoberta do fósforo, pintura de Joseph Wright

A luminescência é então definida como sendo a emissão de radiação eletromagnética por um material que passa por um processo de excitação. Existem diversos tipos de luminescência, o que as difere entre si é a fonte de excitação. A classificação dos fenômenos luminescentes por Weidemann não é muito diferente da utilizada atualmente. Na tabela 1 são apresentados os principais tipos utilizados atualmente, embora existam alguns outros não tão difundidos.

Tabela 1. Tipos de Luminescência e respectivas fontes de excitação

Tipos de Luminescência	Fontes de Excitação
Fotoluminescência (Fluorescência e Fosforencência)	Radiação UV ou Visível
Quimiluminescência	Reação Química
Bioluminescência	Reação Bioquímica
Radioluminescência	Partículas Gama
Triboluminescência	Energia Mecânica
Termoluminescência	Aquecimento a Baixas Temperaturas
Eletroluminescência	Corrente Elétrica
Magnetoluminescência	Campo Magnético
Sonoluminescência	Ondas Ultrassônicas

1.3.2 – O Fenômeno de Quimiluminescência

A quimiluminescência é a produção de radiação eletromagnética por uma reação química. A bioluminescência é um tipo de quimiluminescência, porém a reação química ocorre em um sistema vivo, o exemplo clássico é aquele que ocorre com o vaga-lume, no qual o agente quimiluminescente é a luciferina. [54]

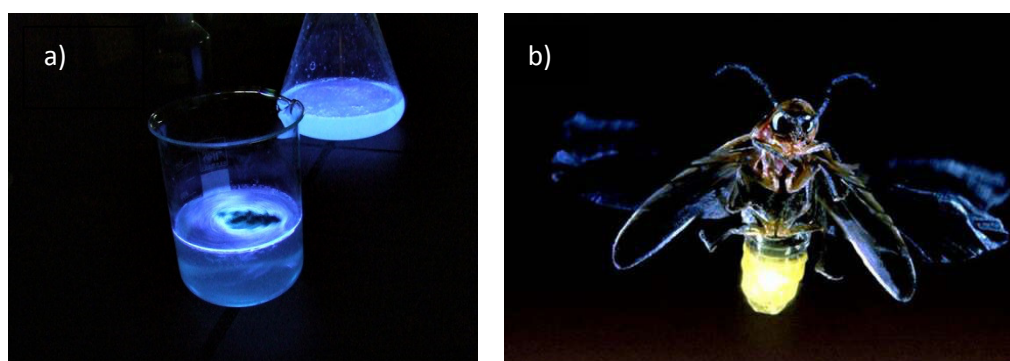


Figura 10. Tipos de Quimiluminescência: a) Quimiluminescência (Luminol) [55]; b) Bioluminescência (Vaga-lume) [57]

Em 1928, H. O. Albrecht descreveu mecanisticamente a primeira reação quimiluminescente, que ocorria entre o luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalaziodiona) e o peróxido de hidrogênio em meio básico catalisada por metais de transição. No ano de 1937, o luminol já era utilizado em investigações criminais para detecção de resíduos sanguíneos. A reação entre luminol e o peróxido de hidrogênio ocorre lentamente, mas o ferro existente no sangue catalisa a reação gerando uma emissão de luz azul muito intensa, permitindo a identificação de resíduos sanguíneos. [51]

A partir da descrição do luminol, vários foram os compostos sintetizados capazes de realizar reações luminescentes, tais como a lucigenina, isoluminol, etanodiato de bis(2,4,6-triclorofenila), pirogalol e luciferina (Figura 11).

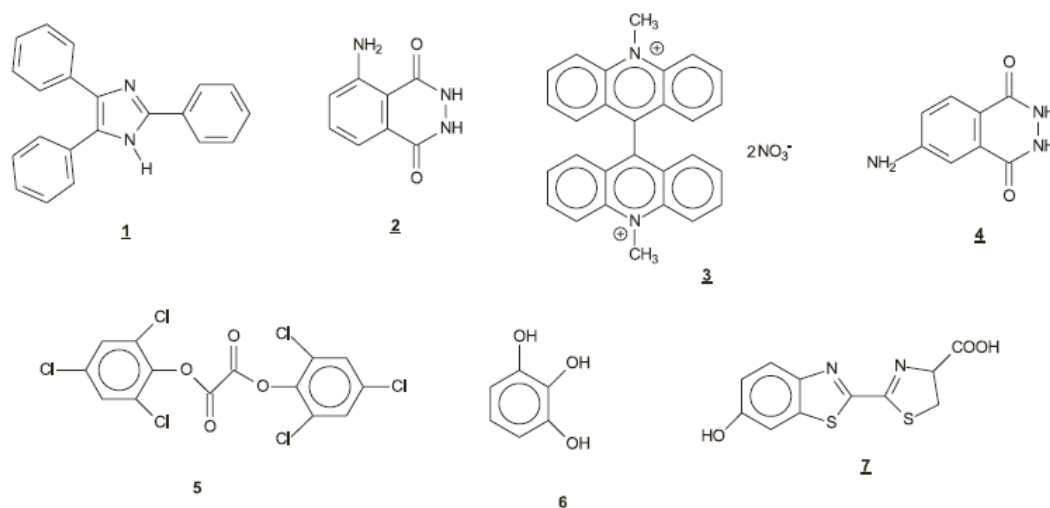


Figura 11. Compostos luminescentes: 1 Iofina, 2 luminol, 3 lucigenina, 4 isoluminol, 5 etanodiato de bis (2,4,6-triclorofenila), 6 pirogalol e 7 luciferina [54]

A quimiluminescência ocorre quando há absorção de energia por parte dos reagentes durante a reação química, formando um complexo ativado, que se converte em um produto eletronicamente excitado. As reações quimiluminescentes são sempre altamente exotérmicas, entretanto nem toda reação exotérmica é quimiluminescente. Nas reações exotérmicas a energia é absorvida por um reagente R, que altera as ligações químicas, formando um estado de transição que possui energia menor do que o produto eletronicamente excitado P^* , dessa forma a energia do estado de transição é liberada na forma de calor, gerando o produto P sem que haja a formação do produto eletronicamente excitado (Figura 12a). Nas reações quimiluminescentes, quando o reagente R possui energia térmica suficiente para formar o estado de transição e este, por sua vez, tem energia superior ao estado eletrônico do produto (P^*), o produto será formado no estado excitado, e irá emitir uma radiação eletromagnética quando atingir o estado fundamental P. (Figura 12b). [57]

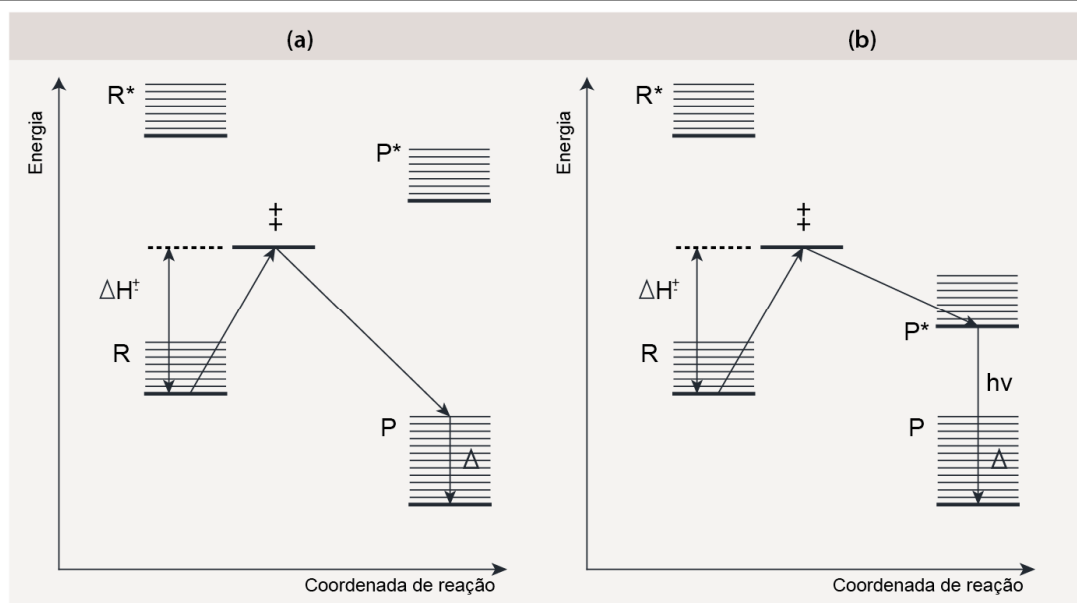


Figura 12. Diagramas de níveis de energia potencial para reações exotérmicas (a) e reações quimiluminescentes. [57]

A maioria das reações quimiluminescente e bioluminescentes são, direta ou indiretamente, oxidações envolvendo oxigênio ou alguns de seus derivados, como peróxidos de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), radical hidroxila (OH^\cdot), entre outros. Oxidações são reações exotérmicas, o que converge com uma das características da quimiluminescência, que como dito antes, são reações sempre exotérmicas. As reações quimi- e bioluminescentes envolvem a formação de intermediários dioxietânicos (Figura 13), que são conhecidos por sua alta capacidade energética, o que permite a formação de estados excitados após clivagem térmica. [58][59][60]

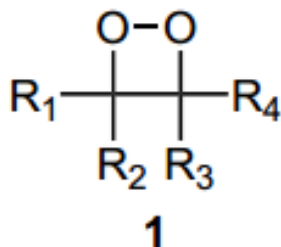


Figura 13. Anéis 1,2-dioxietânicos, representação genérica.

Nas Figuras 14a, 14b e 14c são apresentados resumidamente os mecanismos de algumas reações quimi- e bioluminescentes que apresentam intermediários dioexitânicos.

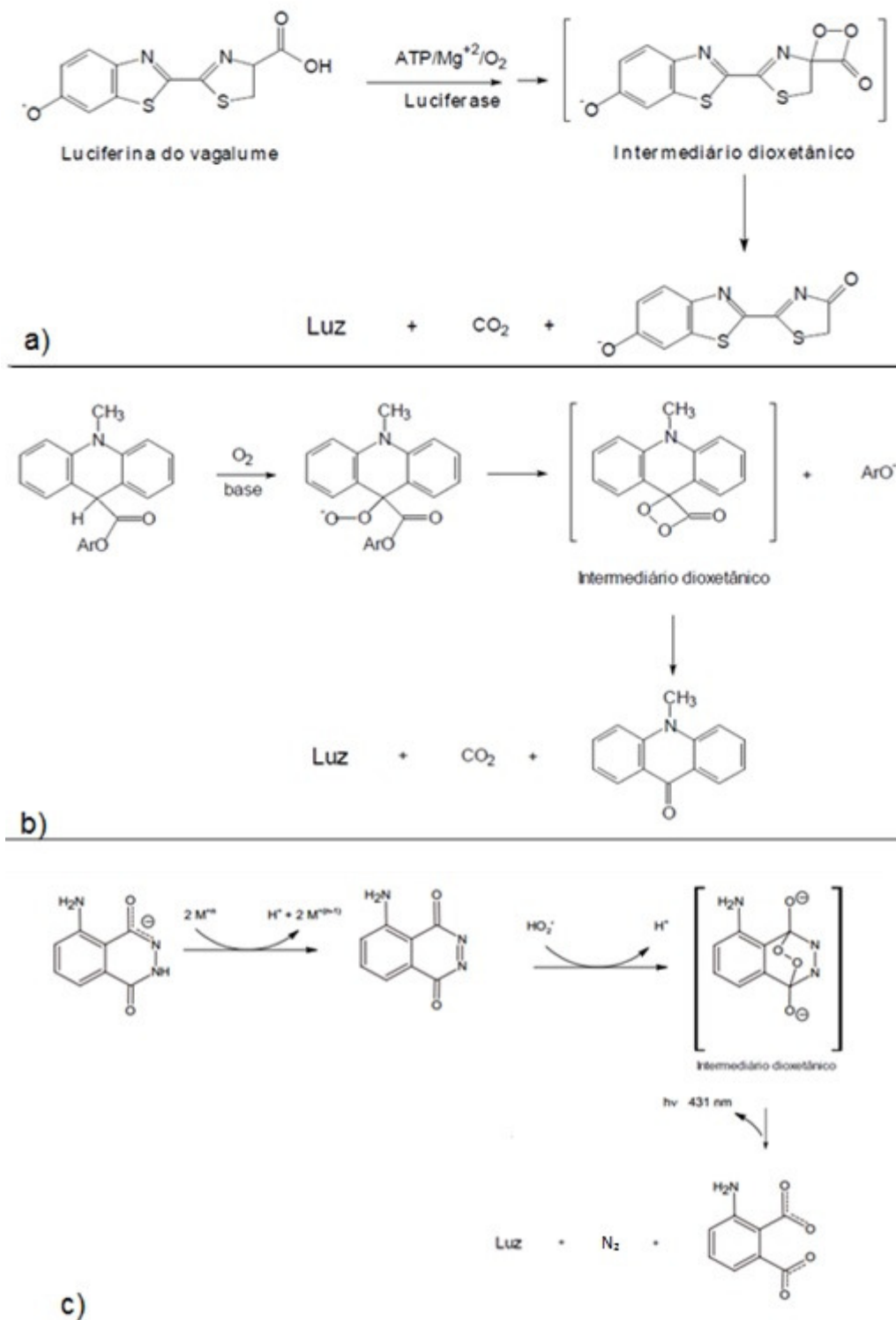


Figura 14. Mecanismos de reação (a) vagalume, (b) cipridina e (c) luminol [61]

Pode-se classificar basicamente a quimiluminescência em dois tipos: direta e indireta. Direta quando a reação gera uma molécula excitada que posteriormente é responsável pela emissão luminosa. Indireta quando o produto excitado da reação não é o responsável pela emissão, mas transfere essa energia para outra molécula, conhecida como fluoróforo, esse em seguida emite luz (Figura 15).

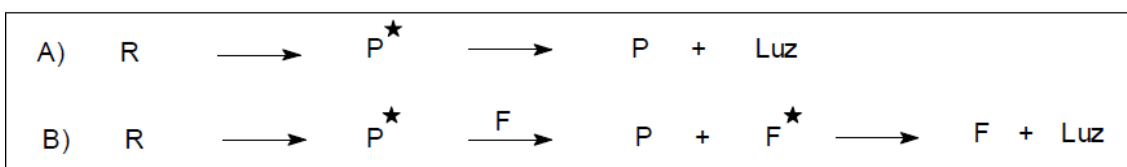


Figura 15. Representação genérica de quimiluminescência: (a) direta e (b) indireta [61]

1.3.3 – Quimiluminescência aplicada a Química Analítica

Em química analítica a utilização de sistemas com detecção de reações quimiluminescentes é bem ampla, sendo utilizadas nas determinações de compostos inorgânicos e orgânicos. As principais estratégias analíticas que utilizam a quimiluminescência como alternativa para realização de análises são: Análise por Injeção de Fluxo (FIA), eletroforese capilar (EC), cromatografia líquida (CL) e de gás (CG). Na literatura são descritas diversas aplicações nas análises clínicas, farmacêuticas, ambientais e de alimentos. Uma característica das determinações com detecção quimiluminescente é a dificuldade de realizá-las com procedimentos em batelada (em bancada e com vidraria usual de laboratório), pois as medições quantitativas precisam ser realizadas com um bom controle de tempo, o que é mais facilmente obtido a partir de procedimentos em fluxo.

As principais vantagens nas análises de reações quimiluminescentes reside no fato de a instrumentação requerida para análise ser relativamente simples, não precisando de uma fonte externa de radiação (imprescindível para medidas de absorção ou fluorescência), por apresentar limites de detecção baixos, além de ter uma larga gama de aplicações. A quimiluminescência é descrita como sendo uma técnica de campo escuro, sendo assim permite melhoras nos limites de detecção, pois possui um sinal de fundo muito pequeno,

ou seja, uma pequena alteração em um pequeno sinal é melhor observada do que uma pequena alteração em um grande sinal. [62]

Algumas desvantagens também devem ser consideradas para as medidas por quimiluminescência. Os reagentes quimiluminescentes nem sempre apresentam sinal para apenas um analito, dessa forma em alguns casos pode ocorrer uma falta de seletividade. Além disso, a emissão quimiluminescente depende de diversos fatores tais como: temperatura, solvente, força iônica, pH, e outras espécies presentes no sistema. Assim, as condições de separação (HPLC, CE, e etc) podem não ser as condições ideais para a máxima emissão quimiluminescente. Outra desvantagem/característica das reações quimiluminescentes é a variação da intensidade da emissão de acordo com o tempo, ou seja, é necessário um cuidado especial para realizar as medições em períodos definidos para que não se perca o ponto máximo do sinal analítico. [62]

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica analítica muito utilizada para separação e análise de misturas, a qual certamente minimiza a falta de seletividade da detecção quimiluminescente. A simplicidade operacional, alta eficiência, estabilidade da coluna e a capacidade de analisar simultaneamente diferentes compostos são as principais vantagens dessa técnica. Para se efetuar análise pela emissão quimiluminescente é necessário acoplar um sistema de detecção ao HPLC. Após a separação na coluna, ocorre a reação entre o analito e o reagente quimiluminescente contido no eluente. Vale ressaltar que sistemas HPLC-QL sempre utilizam derivatização pós-coluna. Os reagentes quimiluminescentes comumente utilizados na análise por HPLC-QL são luminol, lucigenina e oxalatos (TCPO – bis-triclorofenil oxalato). Na literatura são descritos diversos métodos que utilizam separação por HPLC acoplada com detecção por quimiluminescência em análises de amostras diversas. [63][64][65]

A eletroforese capilar é outra técnica de separação muito sensível, que foi desenvolvida com base nos conhecimentos adquiridos com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A eletroforese capilar permite a separação de biomoléculas de proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos com uma eficiência muito superior à que é possível em HPLC e pela eletroforese convencional, permitindo também a quantificação de pequenas moléculas que não podem ser

analisadas por estas técnicas. [66] Na literatura são descritos diversos métodos que utilizam eletroforese capilar acoplada com sistema de detecção por quimiluminescência. [67]

1.3.3.1 Quimiluminescência aplicada à análise por injeção de fluxo (FIA)

Antes do surgimento da análise por injeção em fluxo, diversas eram as reações quimiluminescentes conhecidas, mas o aumento das pesquisas sobre essas reações e suas aplicações em química analítica só tiveram um impulso após o desenvolvimento dos sistemas FIA. [54] Um sistema FIA pode ser entendido como uma versão da análise em fluxo não-segmentado, onde é possível injetar volumes de amostras de forma reprodutível em um fluxo contendo soluções reagentes, que após sofrerem processos químicos ou separações são carregadas através de uma célula de fluxo onde um detector é usado para monitorar a propriedade relacionada com a concentração do analito em função do tempo. O sinal característico da análise por injeção de fluxo é transiente (em forma de pico), cuja altura está relacionada à concentração do analito.

Medidas analíticas utilizando quimiluminescência são sensíveis à vários fatores experimentais e pequenas alterações nesses fatores afetam drasticamente a radiação emitida. Dessa forma, medidas analíticas por quimiluminescência requerem alta reprodutibilidade de todas as etapas que ocorrem na análise, principalmente em relação à mistura dos reagentes. A combinação de FIA com a detecção por quimiluminescência é uma poderosa ferramenta, pois é possível explorar as vantagens das duas técnicas.

Com todas as vantagens que podem ser proporcionadas pela combinação das duas técnicas, o número de publicações que envolvem a análise por injeção de fluxo e a detecção por quimiluminescência (FIA-QL) tem sido bastante considerável. Uma busca com as palavras-chaves “*chemiluminescence*” e “*Flow injection analysis*” na base de dados do “*sciencedirect*” encontrou 1522 publicações no período entre 1979 e 2013. Observa-se na figura 16 que a partir da introdução dos μ TAS no início da década de 90, o número de publicações aumentou significativamente.

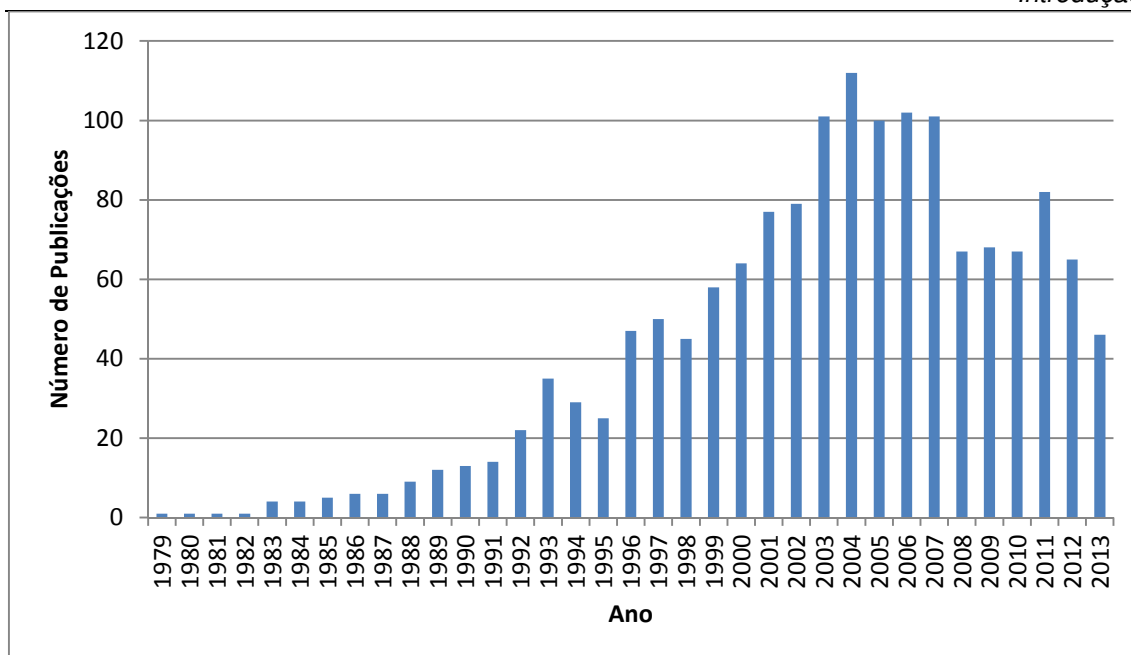


Figura 16. Número de publicações por ano, palavras chave: “chemiluminescence” e “Flow injection analysis”

Mohammad Yaqoob e colaboradores [68] [69] publicaram dois trabalhos, um em 2010 e outro em 2011 relatando dois métodos de determinação de nitrito e nitrato utilizando a análise por FIA-QL em água doce, ambos utilizando luminol como reagente quimiluminescente. No primeiro trabalho é descrito o método de determinação de nitrito e nitrato utilizando a reação quimiluminescente luminol-hipoclorito. Em meio básico, essa reação gera uma forte emissão na região do visível. O nitrito reage com o hipoclorito reduzindo o sinal quimiluminescente, ou seja, quanto maior a quantidade de nitrito menor o sinal obtido (*quenching*), pois a quantidade de hipoclorito disponível para reagir com luminol é menor, assim a reação entre nitrito e hipoclorito é a base para determinação de nitrato e nitrito em água doce neste método. Vale destacar que para permitir a determinação de íons nitrato, ao sistema foi incorporado uma coluna de cádmio para converter este íon em íon nitrito, previamente à reação com hipoclorito.

O método proposto é bastante simples em toda sua essência, utiliza de instrumentação relativamente simples e de reações bem descritas na literatura, e não possui interferentes que comprometam a análise, mostrando-se relevante como método alternativo para determinação de nitrato e nitrito em água doce ao

se considerar os resultados obtidos, tais como: limite de detecção (LD) de 4.0×10^{-8} M para nitrato e nitrito e frequência analítica de 120 amostras/h.

No segundo trabalho dos mesmos autores, publicado em 2011, também é mostrado um método para determinação de nitrato e nitrito em água doce. Este método envolve a formação de peroxinitrito, que se refere à soma do ânion peroxinitrito (ONOO^-) e ácido peroxinitroso (ONOOH). O peroxinitrito é uma versão instável do nitrato e seu ácido é gerado pela reação de nitrito com peróxido de hidrogênio em meio ácido, sendo convertido no ânion peroxinitrito em meio básico. O ânion peroxinitrito reage então com o luminol em meio básico gerando uma forte quimiluminescência com máximo de emissão em 425nm. A intensidade da emissão depende diretamente da concentração de nitrito, tornando possível a determinação de nitrato e nitrito em água doce.

Estes dois métodos propostos por Yaqoob e et. al. mostram a possibilidade de determinar espécies tanto pela medida direta da quimiluminescência, quanto pela medida indireta indicada pela atenuação do sinal. Existem diversos métodos descritos na literatura que utilizam essas estratégias de determinação, sendo que a escolha do método é baseada na natureza do analito e na reação quimiluminescente.

Na literatura são descritos diversas aplicações na determinação de compostos orgânicos por medidas quimiluminescentes acoplados com sistema FIA. Em 2012 Saikh Mohammad Wabaidur e colaboradores, publicaram um trabalho no qual descrevem um método para determinação de dopamina (DA), 4-(2-aminoetil)benzeno-1,2-diol por quimiluminescência. [70]

A dopamina aumenta a intensidade da emissão quimiluminescente do sistema $\text{KMnO}_4\text{-HCHO}$ (permanganato de potássio e formaldeído) em meio ácido e o aumento na intensidade da emissão quimiluminescente é relacionado à concentração de dopamina.

Dentre as novas tendências nos métodos analíticos que utilizam a detecção por quimiluminescência está a miniaturização dos sistemas FIA, gerando os métodos chamados de μFIA (micro-FIA). Neste tipo de método, há uma redução no consumo de reagentes e resíduos, além do aumento na frequência analítica. Em 2006, AL-Gailani e colaboradores publicaram um trabalho no qual descrevem um método para determinação de amônio em águas

de rio, utilizando um sistema μ FIA com detecção quimiluminescente baseada na reação do luminol com hipoclorito. [71] Em 2010 Xiuzhong Wang e colaboradores, publicaram um trabalho no qual descrevem um método para determinação de cisplatina (cis-diaminodicloroplatina II) em soro humano. A análise de cisplatina é baseada na reação luminol- H_2O_2 catalisada pela platina em meio básico. [72]

No entanto, estes trabalhos apresentados em μ FIA utilizam métodos complexos de microfabricação, e sistemas de detecção utilizando fotomultiplicadoras como transdutor do sinal analítico, encarecendo todo o processo.

Dessa forma, a miniaturização de sistemas analíticos baseada na facilidade de associação entre μ FIA com detecção por quimiluminescência, permite obter uma sensibilidade na determinação de diversos compostos em amostras de complexidade diversas. Tal técnica, aliada a fabricação de baixo custo de microssistemas de resinas a base de Uretana-Acrilato, pode permitir a construção de sistemas analíticos eficientes com custo bastante reduzido.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de microssistemas de análise por injeção em fluxo (μ FIA) à base de Uretana-Acrilato com células integradas para detecção por quimiluminescência. Foi também objetivo do trabalho avaliar o desempenho analítico dos dispositivos propostos na determinação de espécies químicas (H_2O_2 , OCl^- e NO_2^-) em amostras de produtos comerciais a partir de procedimentos automatizados e miniaturizados.

3. Parte experimental

3.1. Microfabricação por Fotolitografia profunda no UV

Os dispositivos microfluídicos propostos neste trabalho foram construídos empregando-se a técnica de fotolitografia profunda no UV de acordo com procedimento proposto por Fonseca et. al. [17] Como substrato base foi utilizada uma foto-resina comercial à base de Uretana-Acrilato (M-50 LBS), a qual é fornecida pela empresa de Carimbos Medeiros LTDA. [73]

De uma maneira geral, a construção dos microssistemas seguiram basicamente três etapas:

- 1^a) Confeccção das máscaras fotolitográficas.
- 2^a) Gravação e Revelação dos canais.
- 3^a) Selagem das estruturas e conexões de acesso.

1^a Etapa: Confeccção das máscaras fotolitográficas.

A confeccção das máscaras fotolitográficas envolveu o desenvolvimento de um *layout* bidimensional das estruturas microfluídicas desejadas, as quais foram projetadas a partir do software gráfico AutoCAD 2002 (AutoDesk®). Estes desenhos definiram o tamanho dos canais (largura, profundidade e comprimento) e o arranjo de todos os componentes efetivamente empregados no microssistema como o “plug” de amostragem, bobina de reação, confluências para reagentes e sistema de detecção. Para este trabalho foram desenvolvidos quatro dispositivos diferentes empregando-se as máscaras apresentadas na Figura 17, para as quais as linhas que definem os canais apresentavam a largura de 0,35 mm.

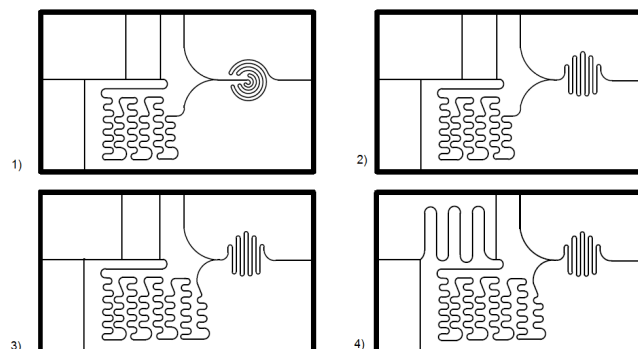


Figura 17. Máscaras fotolitográficas

Após o desenvolvimento no software, a máscara fotolitográfica foi impressa em uma transparência (PLTA4 -Abezeta), utilizando uma impressora à laser (P2055dn - HP LaserJet), com resolução de 1200 pontos por polegadas. Posteriormente, a máscara (transparência) foi devidamente unida com auxílio de fita adesiva dupla face à uma placa de acrílico e à uma moldura de borracha, ambas com 2,0 mm de espessura, permitindo o depósito do fotorresiste (líquido) previamente a polimerização. Na montagem do molde, a face impressa da máscara fica voltada para a placa de acrílico, de modo a garantir a integridade do layout e a reutilização do molde após a sua limpeza.

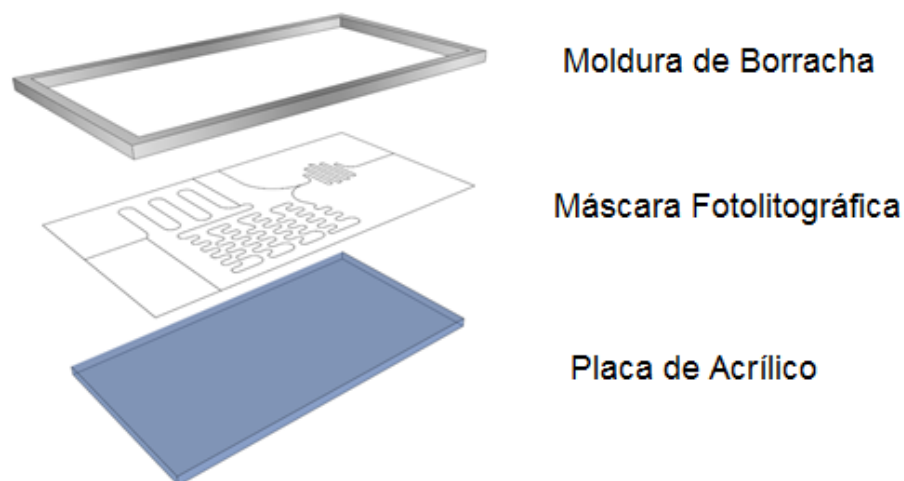


Figura 18. Construção do molde utilizado na microfabricação.

2ª. Etapa: Gravação e Revelação dos Canais

Nesta etapa, o foto-resiste líquido é depositado de maneira contínua e uniforme sobre o molde fotolitográfico até o preenchimento do volume definido pela moldura de borracha, de modo que não haja a formação de bolhas que possam interferir na formação dos canais e na polimerização uniforme do substrato. Para o fechamento dessa estrutura, uma segunda placa de acrílico, com as mesmas dimensões da primeira, é colocada lentamente sobre o resiste para o fechamento do conjunto. Em seguida, as extremidades da estrutura foram

fixadas com grampos apropriados, sendo descartados eventuais excessos de resiste das extremidades com auxílio de papel absorvente.

O processo de gravação dos canais (fotolitografia) foi realizado a partir da exposição do molde fotolitográfico à radiação UVA. Para isso, foi utilizada uma expositora *lab-made*, a qual foi previamente desenvolvida empregando-se duas lâmpadas da marca Philips modelo TL-D 15 W Actinic BL ($\lambda_{\text{Max}} = 380 \text{ nm}$) e um suporte vazado de madeira, para fixar o molde fotolitográfico à 10 cm das lâmpadas. Na Figura 19 é apresentada uma fotografia geral desta expositora ultravioleta, já utilizada em outros trabalhos do grupo. [16][17]

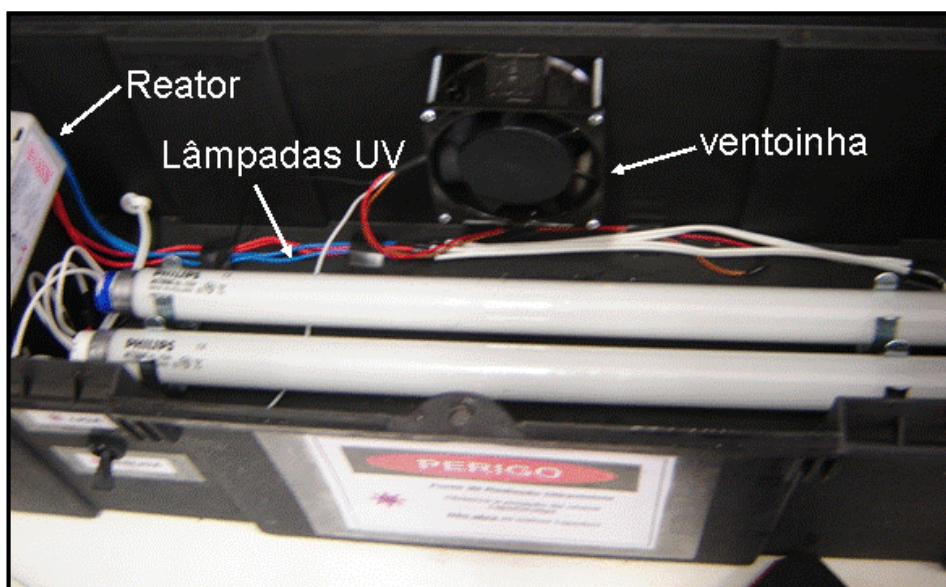


Figura 19. Fotografia da fotoexpositora utilizada na microfabricação. [16]

A gravação dos microcanais e de outras estruturas sobre o resiste foi realizada em duas etapas de exposição à radiação UVA. Para a primeira, necessária à polimerização do fundo dos canais, utilizou-se 120 segundos de exposição. Para a segunda etapa, na qual a exposição é efetuada através da superfície oposta à utilizada na primeira etapa, a placa fica sob exposição de radiação UVA por 20 segundos (Figura 20). Nesta segunda etapa ocorre a gravação dos canais sobre o substrato, pois as linhas da máscara bloqueiam a passagem de radiação em regiões específicas da superfície da resina impedindo a sua polimerização.

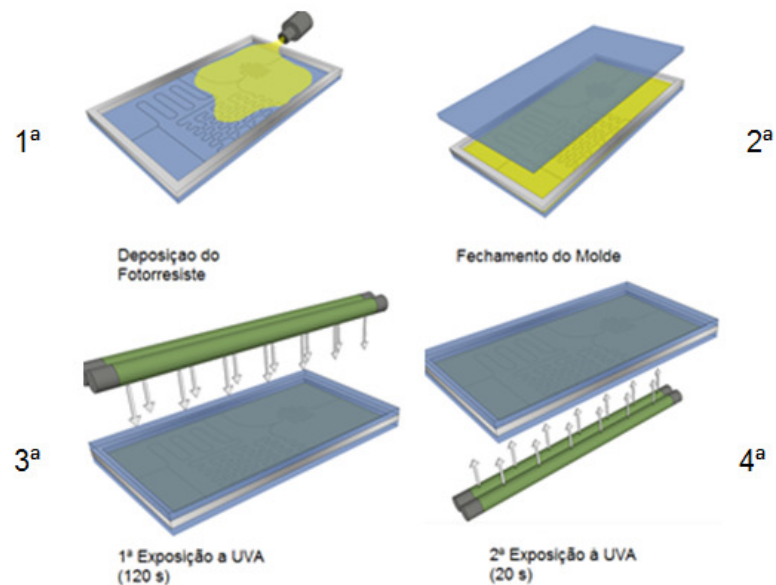


Figura 20. Processo de gravação dos canais.

Completadas as duas etapas de exposição, foi realizada a revelação dos canais gravados, o que consistiu em eliminar o resiste não polimerizado das regiões que foram protegidas pela máscara. A placa polimérica recém fotolitografada foi retirada cuidadosamente do molde e lavada por 10 minutos em um banho ultrassônico (USC 1400, Unique) com solução aquosa de detergente comercial 25% (v/v). Ao término desta etapa, o resiste residual ainda presente sobre a placa polimerizada foi removido com o auxílio de um pincel de cerdas macias e lavado com água corrente. Em seguida, esta placa, já com os canais em baixo relevo, foi lavada com etanol comercial em abundância e secada com o auxílio de um secador de cabelos, para depois ser acondicionada em um reservatório de plástico fechado a fim de evitar que partículas de poeira fossem agregadas à sua superfície. [16]

3ª Etapa: Selagem das estruturas

A selagem da estrutura gravada em baixo relevo foi realizada com uma nova placa de substrato desenvolvida sem canais em sua superfície (lisa). Para o desenvolvimento desta placa, utilizou-se um molde semelhante aquele apresentado na Figura 18, porém sem a máscara fotolitográfica, expondo o resiste por 3 minutos à radiação UV, somente através de uma de suas faces.

Segundo Fonseca e colaboradores [17], este procedimento permite que um filme fino de resiste não polimerizado permaneça na superfície do substrato ao final da exposição. Este filme atua então como uma camada adesiva que permite a união com a placa contendo os canais.

Após a retirada da placa polimérica do molde, efetuou-se a sua limpeza com solução aquosa de detergente comercial 25%. O excesso de detergente foi eliminado com água e a placa lavada novamente com etanol comercial para depois proceder-se a secagem com um secador de cabelos.

Após a secagem, a placa de selagem foi cuidadosamente unida com a placa que continha os canais gravados através da superfície que apresentava o filme de resiste não polimerizado. Este conjunto foi exposto por mais 10 minutos à radiação ultravioleta, selando irreversivelmente o dispositivo.

Para permitir o acesso das soluções de trabalho e dos reagentes aos microdispositivos fluídicos recém-construídos, foram acopladas diretamente aos canais laterais, agulhas hipodérmicas com diâmetro externo de 0,45 mm (305111-BDTM). Para isto, as agulhas foram retiradas de seu canhão (base plástica) e a extremidade perfurante foi eliminada com auxílio de uma lixa, resultando em pequenos tubos metálicos, que foram introduzidos nos microcanais utilizando um pequeno suporte feito de tubo Tygon® e cola permanente. A estes tubos metálicos foram conectados tubos Tygon®, por onde as soluções iriam fluir até o microssistema.

3.2. Construção dos circuitos eletrônicos e desenvolvimento dos programas para controle e automação dos procedimentos

Conforme será apresentado em maiores detalhes nas próximas seções, todos os dispositivos microfluídicos avaliados neste trabalho foram conectados à um conjunto de válvulas solenóides para direcionamento dos fluidos nos microcanais, sendo a detecção realizada a partir de um par de fotodiodos ou de uma mini-fotomultiplicadora. Para permitir o controle destes dispositivos e a aquisição do sinal, foi inicialmente necessário desenvolver alguns circuitos eletrônicos, os quais serão brevemente descritos a seguir.

Com o objetivo de tornar os sistemas de automação e de aquisição do sinal mais simples e baratos, optou-se, em um primeiro momento, pela utilização de um circuito baseado em um microcontrolador da família PIC (PIC16F819) para o gerenciamento das operações e de um circuito com dois fotodiodos (OSD-50E) para a transdução do sinal. Conforme ilustrado no esquema da Figura 21, o microcontrolador foi devidamente conectado a um banco de transistores (CI – ULN2003A), permitindo o acionamento das válvulas solenóides (V) por comunicação TTL. Um outro CI (MAX 232) foi conectado ao PIC para permitir a comunicação do circuito com um computador via comunicação RS-232.

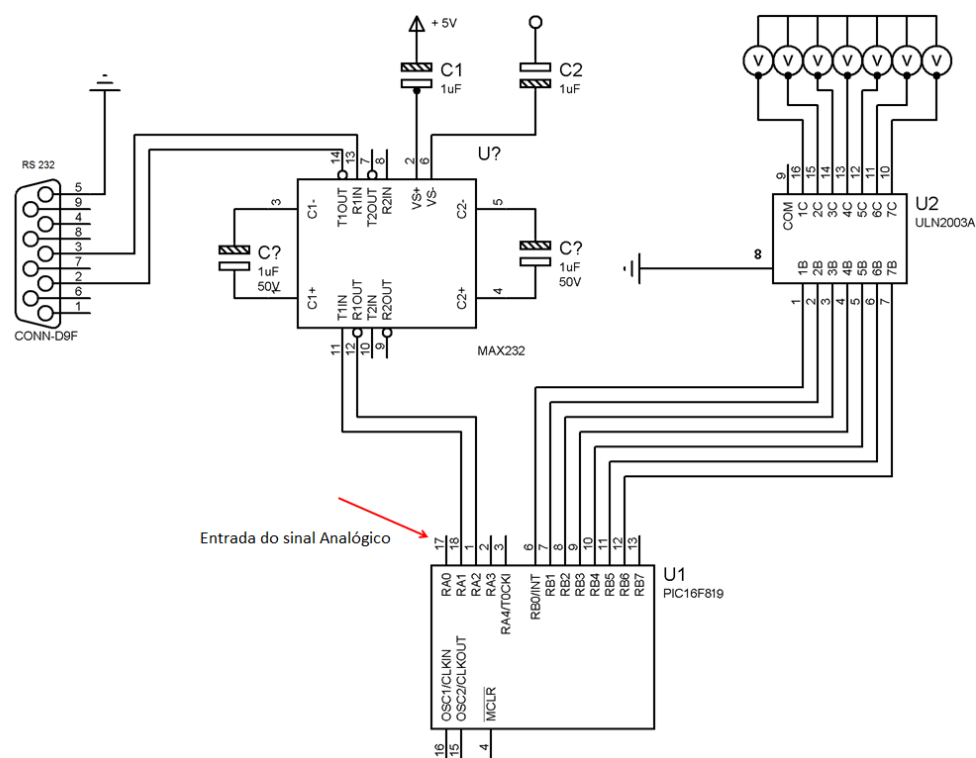


Figura 21. Circuito baseado no micontrolador PIC16F819 para acionamento das válvulas solenóides e aquisição do sinal analítico

A Figura 21 mostra ainda que o sinal analógico proveniente do circuito de detecção é admitido no PIC através do pino 17 (RA0). Neste caso, o sinal é convertido ao domínio digital por meio do conversor analógico/digital (A/D) do PIC com resolução de 8 bits e este sinal é enviado, via RS-232, à um microcomputador onde uma interface gráfica permite a visualização dos dados. Fotografias do circuito proposto são mostradas nas Figuras 22, 23 e 24.

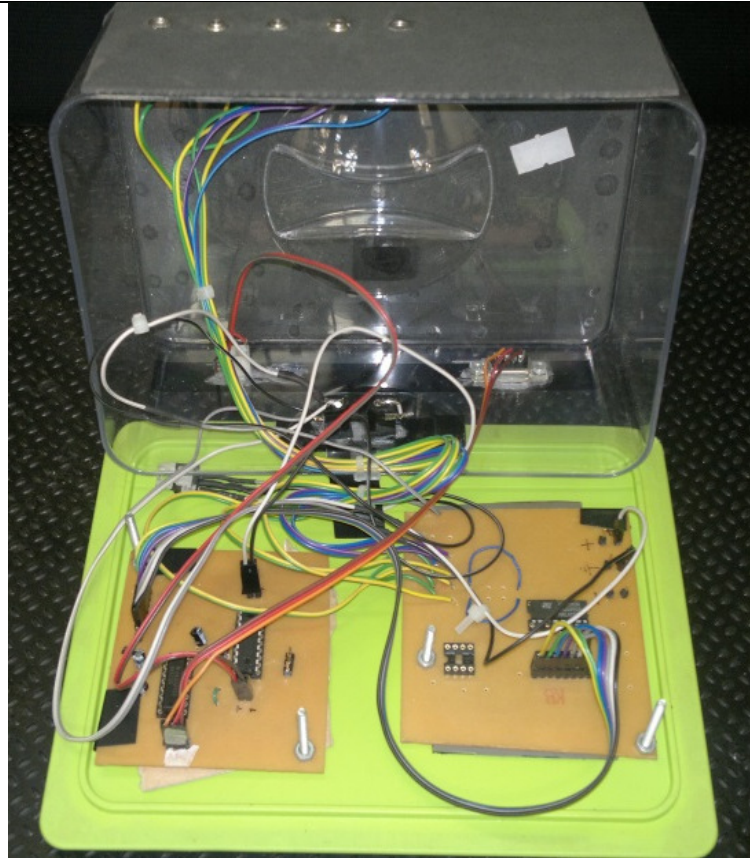


Figura 22. Fotografia do circuito eletrônico microcontrolado.



Figura 23. Fotografia da parte frontal da caixa plástica para acondicionamento do circuito microcontrolador.

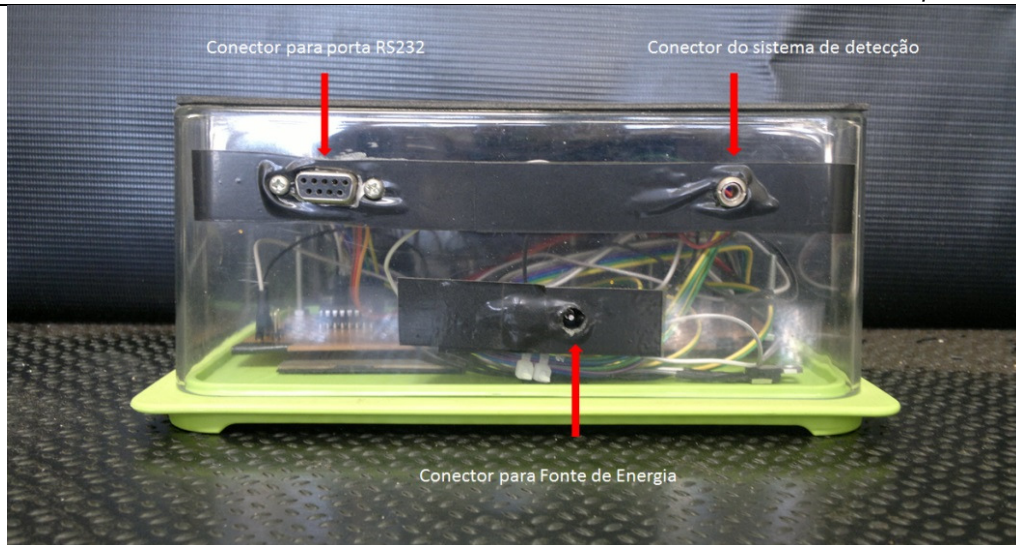


Figura 24. Fotografia da parte traseira da caixa plástica utilizada para acondicionamento do circuito microcontrolador.

Conforme citado anteriormente, um circuito de detecção baseado em dois fotodiodos foi utilizado em alguns experimentos para a detecção da quimiluminescência nos microssistemas. Este circuito foi baseado na configuração proposta por Borges et. al. [37] para a detecção da quimiluminescência em sistemas FIA de tamanho usual. Conforme ilustrado na Figura 25, os fotodiodos (OSD-50E) são conectados a circuitos conversores de corrente em tensão baseados em dois amplificadores operacionais (OP07) e os sinais de tensão gerados por estes circuitos são então somados e amplificados por um outro circuito também baseado no amplificador operacional OP07, antes de ser enviado ao circuito microcontrolador para a conversão A/D.

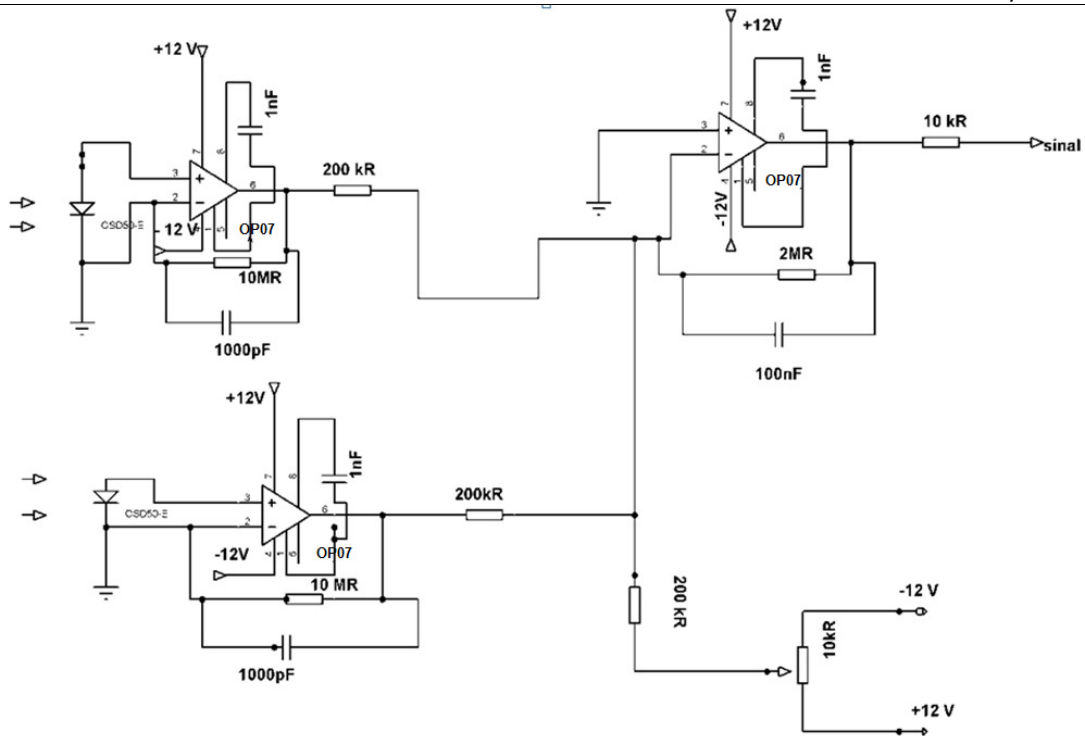


Figura 25. Esquema do Circuito Eletrônico desenvolvido para a detecção por quimiluminescência baseado em dois fotodiodos. (Circuito Baseado no proposto por Borges et. al [37]).

É importante observar que uma fonte simétrica (+12 V, -12 V) foi necessária para a alimentação dos circuitos mostrados na Figura 25. Uma fotografia de ambos os circuitos desenvolvidos é apresentada na Figura 26 e o esquema eletrônico da fonte construída é apresentado na Figura 27.

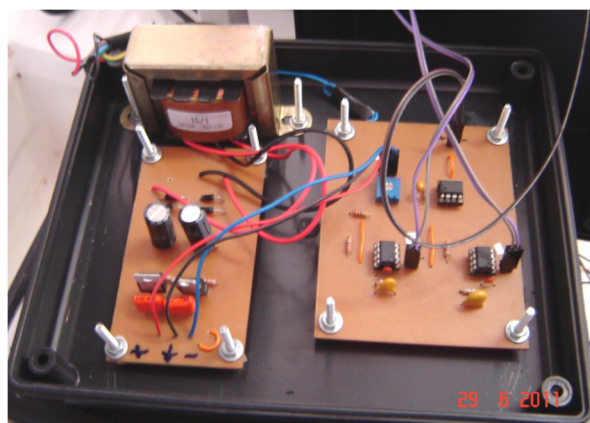


Figura 26. Fotografia dos circuitos da fonte simétrica e do sistema de detecção por Quimiluminescência propostos.

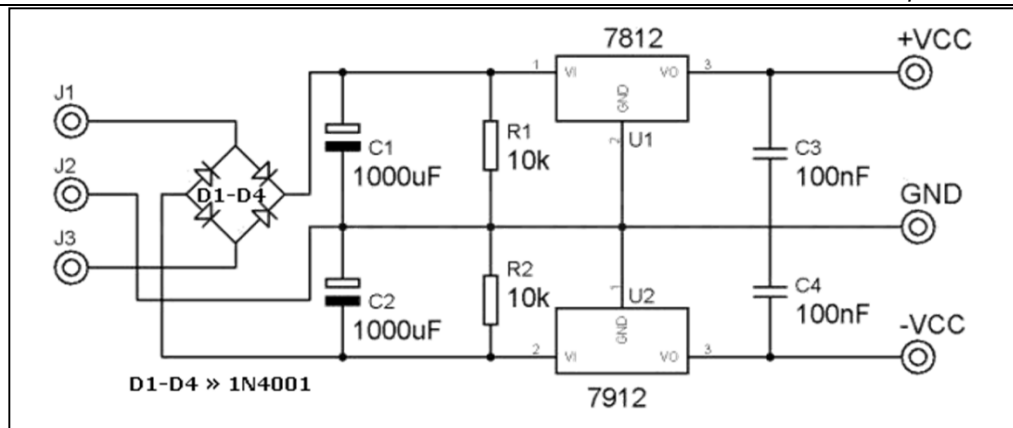


Figura 27. Esquema do Circuito Eletrônico para a fonte simétrica de alimentação dos circuitos.

Em um segundo momento do trabalho, alguns experimentos foram realizados empregando-se a automação do procedimento através de uma interface comercial (USB-6009) da *National Instruments*. Esta interface apresenta um conversor analógico digital de 14 bits e realiza o acionamento das válvulas solenóides de forma semelhante à realizada com o microcontrolador PIC. Neste caso, um circuito com o banco de transistores (ULN2003A) também foi necessário para a realização dos procedimentos.

Para as medidas realizadas com a mini-fotomultiplicadora (Hamamatsu - H7468-03), não foi necessário o desenvolvimento de circuitos eletrônicos específicos, uma vez que este dispositivo já apresentava, de forma integrada, uma fonte variável de tensão (0-1000V), um conversor A/D de 12 bits e também uma interface para comunicação via RS-232, a qual permitia a comunicação com o computador.

Os softwares para acionamento das válvulas e para aquisição dos sinais analíticos, via microcomputador, foram desenvolvidos na linguagem VisualBasics 6.0, os quais permitiram definir variáveis como o tempo de amostragem, número de leituras e os parâmetros para as medidas com a fotomultiplicadora, como o tempo de integração e diferença de potencial aplicada entre os dinodos. A interface gráfica de um dos programas desenvolvidos é apresentada na Figura 28.

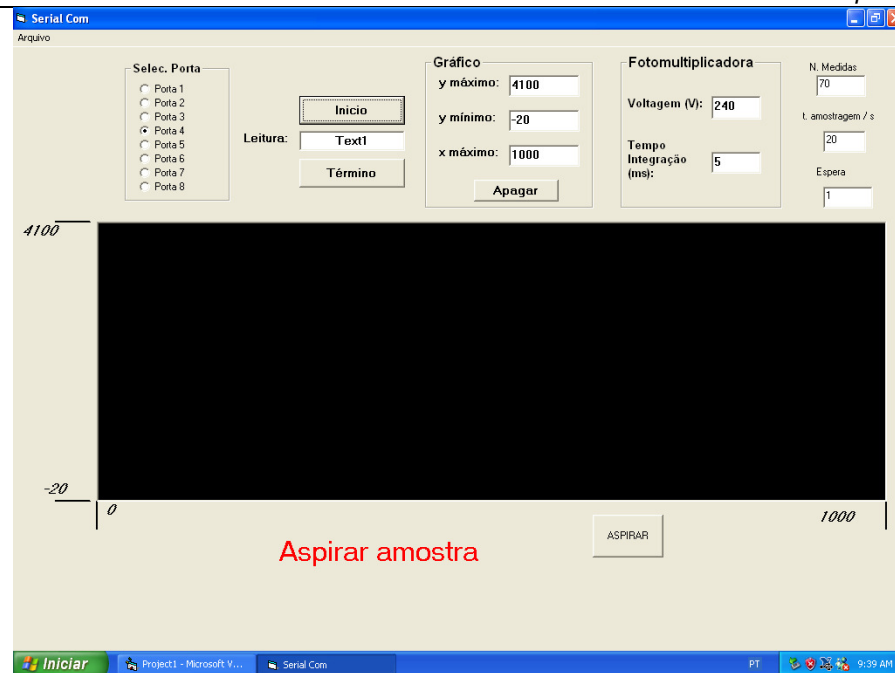


Figura 28. Interface ao usuário do programa desenvolvido para automação das operações com os microsistemas, detecção com mini fotomultiplicadora.

Os programas para a automação com o microcontrolador PIC16F819 foram desenvolvidos em linguagem C, sendo compilados e gravados neste CI com auxílio do aplicativo PIC-C-Compiler.

3.3. Adaptação dos transdutores aos microsistemas fluídicos.

Os fotodiodos utilizados para a realização das medidas (Centronic OSD50-E) são circulares (10 mm de diâmetro) e apresentam uma área ativa de detecção de 50 mm². Estes sensores foram previamente fixados em pequenas placas de acrílico (Figura 29-A) e, em seguida, chapas de Etil Vinil Acetato (E.V.A.) com 4,0 mm de espessura foram recortadas (Figura 29-B) e utilizadas para permitir o alinhamento com a célula de detecção quimiluminométrica integrada aos microsistemas (Figura 29-C). A Figura 29-D mostra a finalização da montagem, na qual um fotodiodo é colocado na parte superior da célula de detecção, enquanto o outro detector é fixado na parte inferior do dispositivo.

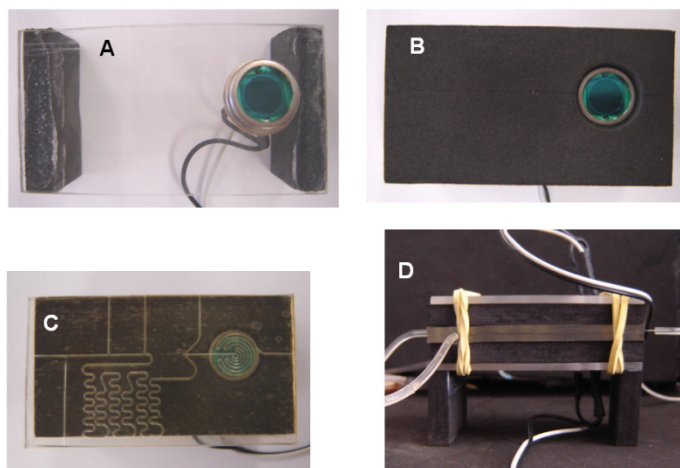


Figura 29. Seqüência de fotografias mostrando o acoplamento dos fotodiodos à célula de detecção por quimiluminescência. Adaptação do fotodiodo em uma lâmina de acrílico (A), Colocação de um suporte vazado de EVA (B), alinhamento do detector com a célula de detecção quimiluminométrica (C) e configuração em “sanduíche” com os dois fotodiodos (D).

Alternativamente, a detecção foi realizada substituindo os fotodiodos por uma mini fotomultiplicadora (Hamamatsu-H7468-03). Para isso a janela de entrada dos fótons foi alinhada com a célula de detecção e o dispositivo foi fixado à fotomultiplicadora, perpendicularmente ao plano da bancada, com o auxílio de fita adesiva dupla-face (Figura 30).

Vale destacar que para a realização das medidas com ambas as estratégias de detecção, os microssistemas e os sensores foram acondicionados em caixas plásticas pretas, devidamente perfuradas para as conexões de fluxo, proporcionando um ambiente escuro, com o mínimo de interferência por radiações externas.

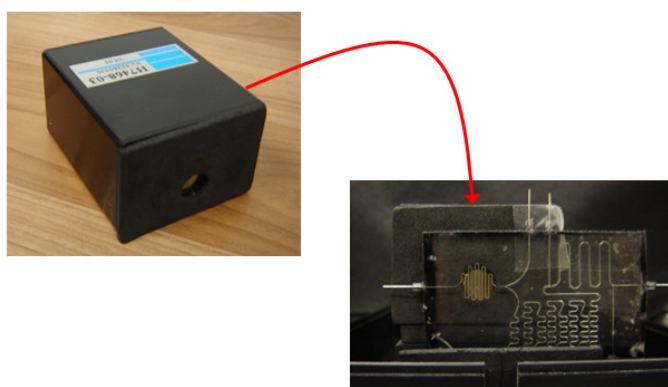


Figura 30. Mini fotomultiplicadora acoplada com o microssistema.

3.4 – Avaliação dos microssistemas com reação entre peróxido de hidrogênio e luminol catalisada por ferricianeto de potássio

3.4.1 – Instrumentação

Uma bomba peristáltica (Ismatec-Reglo Analog), equipada com tubos Tygon® (0,190 mm e 0,380 mm de diâmetro interno) foi usada para impulsionar as soluções de reagentes e para aspirar as soluções dos padrões e das amostras. Para o direcionamento de fluxo nos microssistemas foram utilizadas válvulas solenóides de três portas (Cole Parmer, NR-225T031). Os testes foram realizados utilizando-se os dois detectores disponíveis, fotodiodos e fotomultiplicadora. Para ajuste do pH das soluções empregou-se o pHmetro Hanna modelo pH 21.

3.4.2 – Reagentes, Soluções e Procedimentos

Todas as soluções empregadas foram preparadas em água purificada por osmose reversa. Uma solução tampão carbonato/bicarbonato 0,5 mol/L de pH 10,5 foi preparada pela dissolução da massa adequada de carbonato de sódio (Dinâmica, 99,5%) em água, seguida do ajuste do pH com adições de solução de HCl 50% (Cetus, 36,5-38%). Uma solução de luminol com concentração de 0,045 mol/L foi preparada pela dissolução da massa apropriada do reagente (Acros, 98%) em tampão carbonato pH 10,5. A solução do catalisador, ferricianeto de potássio 0,035 mol/L, foi preparada pela dissolução da massa apropriada do sal (Synth, 99%) em água. As soluções padrão de peróxido de hidrogênio foram preparadas em uma faixa de concentração entre 0,05 e 0,2 mmol/L para detecção com os fotodiodos, e na faixa de concentrações de 0,005 e 0,025 mmol/L para detecção com a fotomultiplicadora. Para isto, diluições de uma solução estoque do reagente (Audaz, 30%) foram devidamente realizadas em água. Vale ressaltar que, previamente a preparação destas soluções, foi realizada a padronização da solução estoque de H₂O₂ por permanganimetria [66].

O procedimento para esta avaliação foi realizado empregando-se a configuração de fluxo apresentada na Figura 31, a qual foi montada para permitir a injeção dos padrões, o controle da reação e a detecção da luminescência.

As vazões das soluções de ferricianeto de potássio e da solução de luminol foram de 0,15 ml/min, enquanto que a vazão da amostragem foi de 0,50 mL/min. Quando todas as válvulas eram acionadas simultaneamente (por cerca de 20 s), as soluções dos padrões eram aspiradas através de V2 e V3 preenchendo o plug de amostragem (Am) com aproximadamente 2,5 μ L. Desligando-se as válvulas, o plug de amostra era carregado pelo fluxo de luminol através do misturador (bobina de reação) até confluir com a solução de ferricianeto de potássio (catalisador) no ponto C, onde a luminescência tinha início e se estendia até o detector (CQ). Imediatamente após a injeção dos padrões as leituras eram iniciadas pelo computador em intervalos de aproximadamente 0,5 s. Uma fotografia com uma visão geral do sistema de análise utilizado é mostrada na Figura 32.

Todas as condições descritas neste procedimento, tal como as concentrações das soluções reagentes e padrões, o pH da solução tampão utilizada como solvente para o luminol e vazão das soluções, foram escolhidas baseadas em resultados preliminares.

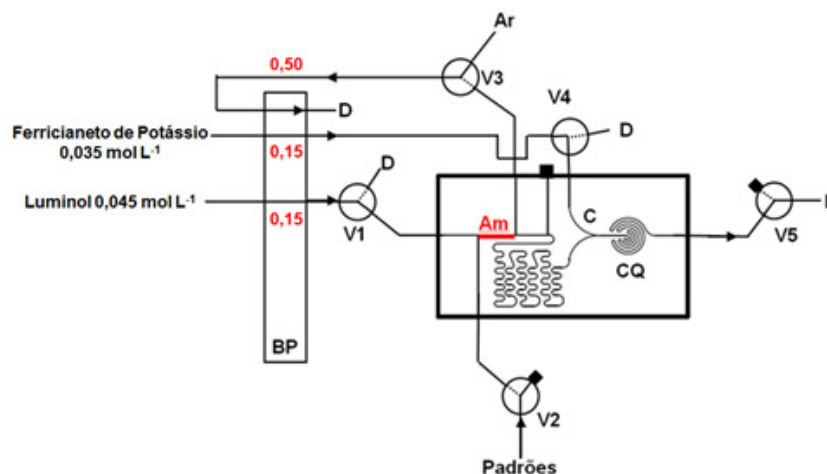


Figura 31. Configuração do sistema de fluxo utilizada para a realização da detecção de peróxido de hidrogênio em soluções padrão. **BP:** bomba peristáltica (vazões indicadas sobre as linhas em mL/min), **V1-V5:** Válvula solenóides de três vias (na posição desligada), **D:** Descarte, **Am:** Plug de solução injetada, **C:** ponto de confluência, **CQ:** Célula para detecção.

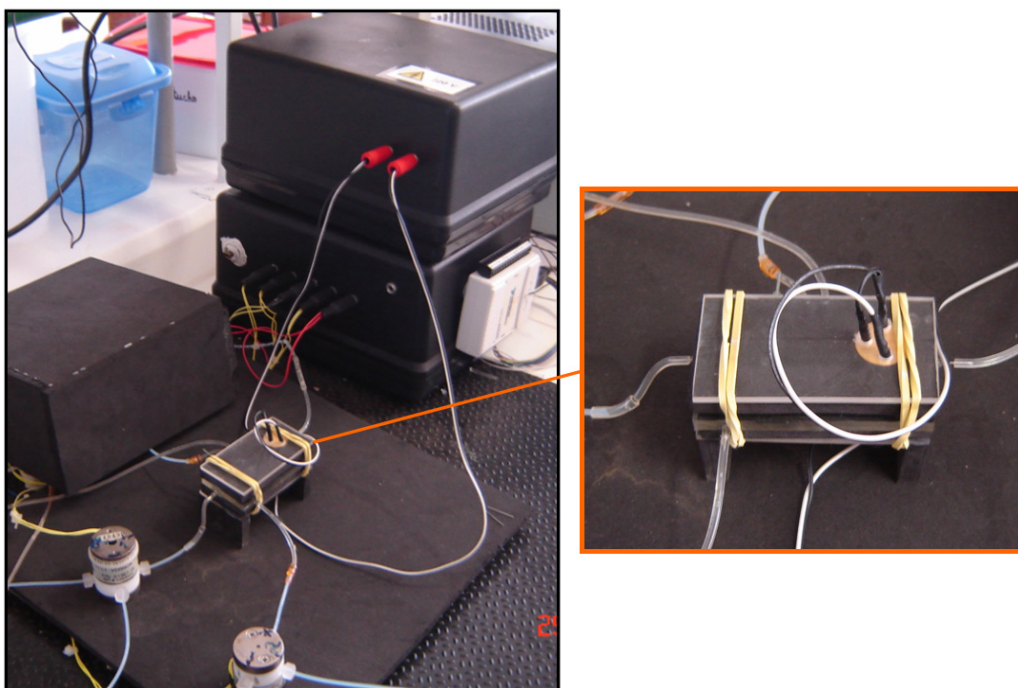


Figura 32. Fotografia geral do sistema desenvolvido para a realização dos estudos (Detecção utilizando fotodiodos).

3.5 – Avaliação de um microssistema na determinação de íons Hipoclorito (OCl^-) em amostras comerciais

3.5.1 – Instrumentação

A instrumentação utilizada para determinação de íons hipoclorito foi a mesma utilizada na determinação de peróxido de hidrogênio, descrita na seção anterior. Foram realizadas medidas empregando-se a fotomultiplicadora e também fotodiodos como transdutores do sinal.

3.5.2 – Reagentes, soluções e procedimento

Os microssistemas propostos foram avaliados na detecção do íon hipoclorito (OCl^-) em soluções padrão previamente preparadas e também na determinação deste íon em amostras comerciais de água sanitária. Para isto, todas as soluções foram preparadas em água purificada por osmose reversa. Uma solução tampão borato 0,5 mol/L pH 9,0 foi preparada pela dissolução da

massa adequada de tetraborato de sódio (Vetec, 99,5-105%) em água seguida do ajuste do pH com ácido clorídrico 50% (Cetus, 36,5-38%). Uma solução de luminol 0,045 mol/L foi preparada pela dissolução da massa apropriada do reagente (Acros, 98%) na solução tampão descrita acima. Uma solução contendo ácido sulfúrico 0,5 mmol/L e peróxido de hidrogênio 0,5 mmol/L foi preparada pela diluição de alíquotas adequadas do ácido concentrado (Quimex, 96-99%) e de uma solução comercial de peróxido de hidrogênio (Audaz, 30%). Soluções padrão de hipoclorito foram preparadas em uma faixa de concentração entre 2 e 20 mg/L para detecção com os fotodiodos, e na faixa de concentrações de 10 a 100 µg/L para detecção com a fotomultiplicadora. Para isto, uma solução estoque de hipoclorito (4-6% VETEC) foi previamente padronizada por titulação iodimétrica [74] e alíquotas desta solução foram devidamente diluídas em água.

As vazões das soluções de ácido sulfúrico/peróxido de hidrogênio e da solução de luminol foram de 0,20 ml/min, enquanto que a vazão da solução amostra foi de 0,75 mL/min.

Para a determinação de hipoclorito em amostras comerciais de água sanitária, cujos rótulos indicavam concentrações em hipoclorito entre 2-2,5% (m/V), foram realizadas apenas as diluições adequadas destas soluções em água, a fim de que as concentrações finais fossem compatíveis com àquelas dos padrões da faixa de calibração. Para esta determinação, foi utilizada apenas detecção com os fotodiodos e os resultados foram comparados com o método de referência, baseado na titulação iodimétrica do hipoclorito de sódio [74].

A configuração de fluxo apresentada na Figura 33 foi montada para permitir a injeção dos padrões e amostras, o controle da reação e a detecção da quimiluminescência. Neste sentido, foram necessárias algumas alterações no sistema, que permitissem a quantificação de hipoclorito. Ao contrário do utilizado na determinação de peróxido (seção 3.4), onde o luminol era a solução carreadora de amostra e confluía com uma solução de ferricianeto para obtenção da emissão quimiluminescente, neste método a solução amostra é carreada por uma solução de peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico, posteriormente confluindo com a solução de luminol. Essa alteração foi necessária devido ao fato de o hipoclorito reagir com o luminol, impossibilitando a utilização da solução de luminol como solução carreadora.

Quando todas as válvulas eram acionadas simultaneamente, as soluções dos padrões e amostras eram aspiradas através de V2 e V3 preenchendo o plug de amostragem (Am) com aproximadamente 2,5 μL . Desligando-se as válvulas, o plug de amostra era carregado pelo fluxo de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio através do misturador até confluir com a solução de luminol, onde a luminescência tem início e se estende até o detector (CQ). Os dados foram coletados e posteriormente analisados.

Todas as condições descritas neste procedimento, tal como as concentrações das soluções reagentes e padrões, o pH da solução tampão utilizada como solvente para o luminol e vazão das soluções, foram escolhidas baseadas em resultados preliminares e no trabalho de Yaqoob e colaboradores [68].

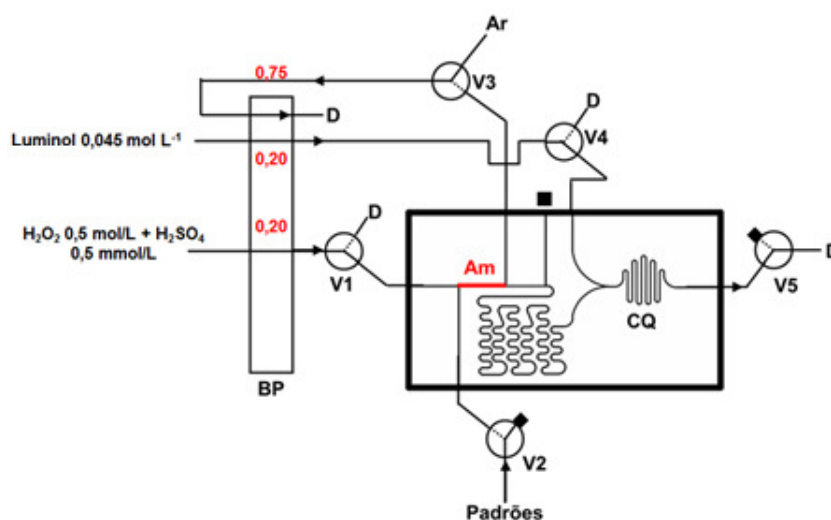


Figura 33. Configuração de fluxo utilizada para a realização da detecção de hipoclorito em soluções padrão e amostras. **BP:** bomba peristáltica (vazões indicadas sobre as linhas em mL/min), **V1-V5:** Válvulas solenóides de três vias (na posição desligada), **D:** Descarte, **Am:** Plug de solução injetada, **C:** ponto de confluência e **CQ:** Célula para detecção quimiluminométrica.

3.5.3 – Método de Referência

Os resultados obtidos com o microssistema proposto foram comparados com aqueles obtidos com o método de referência [74]. A água sanitária comercial é uma solução diluída de hipoclorito de sódio (NaOCl), obtida ao se passar gás

cloro por uma solução concentrada de hidróxido de sódio, de acordo com a seguinte reação:



O sistema iodo-iodeto possui um potencial padrão ($E_0 = 0,535$ Volts) intermediário, utilizado para oxidar substâncias fortemente redutoras ou para reduzir substâncias oxidantes relativamente fortes. O método de determinação baseia-se no fato do cloro poder deslocar o iodo de seus sais. Com isso, ao se adicionar iodeto de potássio (KI) à solução, pode-se determinar a quantidade de iodo liberado com solução padronizada de tiosulfato de sódio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_7$, usando goma de amido como indicador. A determinação de hipoclorito então é feita de forma indireta.

O procedimento consistiu em pipetar 5,00 mL da solução amostra de água sanitária para um balão de 50,00 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar. Com uma pipeta volumétrica, transferiu-se 5,00 mL da amostra diluída para um erlenmeyer, adicionou-se 10 mL de água destilada, 10 mL de iodeto de potássio 10% e 20 mL de ácido acético glacial 1:3. Titulou-se o iodo liberado com solução de tiosulfato 0,1 M padronizado, até a solução se tornar levemente amarelada. Adicionou-se então 5 gotas de solução de amido 0,5% (indicador) e continuou-se a titulação lentamente até mudança da cor azul para incolor. As titulações foram realizadas em triplicata, sendo calculada a porcentagem de OCl^- nas soluções da amostra.

3.6 – Avaliação de um microssistema na determinação de Nitrito em Patês Comerciais

3.6.1 – Instrumentação

A instrumentação utilizada para determinação de nitrito foi idêntica utilizada na determinação de peróxido de hidrogênio, descrita na seção 3.4.1., empregando-se a fotomultiplicadora como transdutor do sinal. Para fins comparativos medidas espectrofotométricas foram realizadas empregando-se um espectrofotômetro UV-VIS (Agilent 8453, $\lambda=543\text{nm}$).

3.6.2 – Reagentes, soluções e procedimento

Um dos microssistemas propostos foi avaliado na detecção do íon nitrito (NO_2^-) em soluções padrão previamente preparadas e na determinação deste íon em patês comerciais. Para isto, uma solução de luminol 0,045 mol/L e uma solução aquosa mista contendo ácido sulfúrico 0,5 mmol/L e peróxido de hidrogênio 0,5 mmol/L foi preparada de forma idêntica àquela descrita para a determinação de OCl^- na 3.5.2. Uma solução estoque de nitrito de sódio (500 mg NO_2^-/L) foi preparada pela dissolução da massa apropriada do sal anidro (Vetec, 99%), previamente seco em estufa, em água. Soluções padrão de nitrito foram preparadas em uma faixa de concentração entre 10 e 80 $\mu\text{g}/\text{L}$ pela diluição de alíquotas da solução estoque de NaNO_2 em uma solução de hipoclorito (OCl^-) 100 $\mu\text{g}/\text{L}$.

As vazões das soluções de ácido sulfúrico/peróxido de hidrogênio e da solução de luminol foram de 0,20 ml/min, enquanto que a vazão da solução amostra foi de 0,75 mL/min.

Amostras de patê que utilizam nitrito de sódio como conservante foram previamente preparadas seguindo-se um procedimento descrito na literatura [76]. Inicialmente, a desproteinização foi feita pesando-se 5 g da amostra e adicionando 20 mL de solução de tetraborato de sódio 0,05 % e aquecendo-a por 15 minutos a 80 °C. Em seguida foram adicionados 2 mL de solução de ferricianeto de potássio 0,05 % e 2 mL de solução de acetato de zinco 0,1% com agitação constante por 5 minutos. Após isso a amostra foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi aferido com água destilada. A amostra foi então filtrada a vácuo para eliminação dos sólidos remanescentes e a solução recém filtrada foi diluída adequadamente em solução contendo hipoclorito, cuja concentração final do hipoclorito foi de 100 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Todas as condições descritas neste procedimento, tal como as concentrações das soluções reagentes e padrões, o pH da solução tampão utilizada como solvente para o luminol e vazão das soluções, foram escolhidas baseadas em resultados preliminares e no trabalho de Yaqoob e colaboradores [69].

A configuração de fluxo apresentada na Figura 34 foi montada para permitir a injeção dos padrões e amostras, o controle da reação e a detecção da luminescência, no qual foi utilizado o microdispositivo que permitiu aumentar o volume de amostra. Quando todas as válvulas eram acionadas simultaneamente, as soluções dos padrões e amostras eram aspiradas através de V2 e V3 preenchendo o plug de amostragem (Am) com aproximadamente 8 μL . Desligando-se as válvulas, o plug de amostra era carregado pelo fluxo de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio através do misturador até confluir com a solução de luminol, onde a luminescência tem início e se estende até o detector (CQ). Os dados foram coletados e análise posterior foi feita.

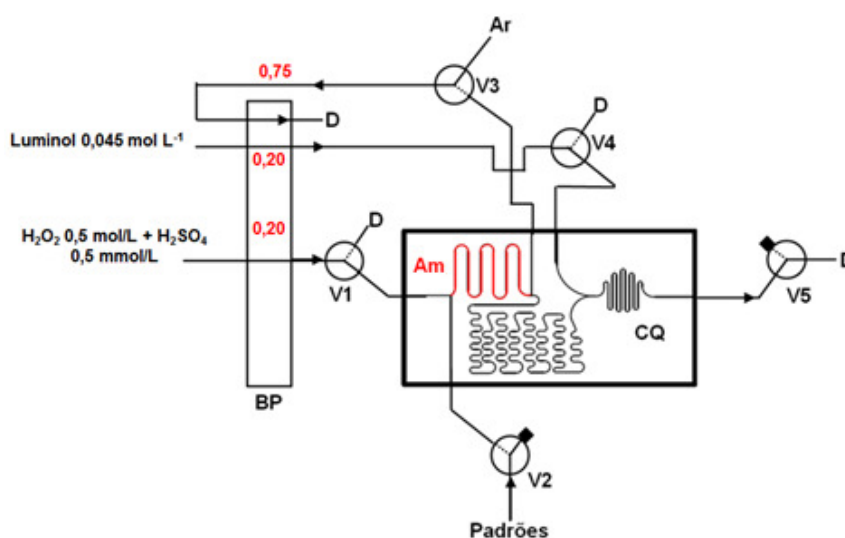


Figura 34. Configuração de fluxo utilizada para a realização da detecção de nitrito em soluções padrão e amostras. **BP:** bomba peristáltica (vazões indicadas sobre as linhas em mL/min), **V1-V5:** Válvula solenóides de três vias (na posição desligada), **D:** Descarte, **Am:** Plug de solução injetada, **C:** ponto de confluência e **CQ:** Célula para detecção quimiluminométrica.

3.6.3 – Método de Referência

O método oficial para determinação do nitrito envolve os procedimentos espectrofotométricos baseados na reação de Griess, na qual o nitrito reage, inicialmente, com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado desta reação reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), gerando

um composto de coloração vermelha intensa. A reação é controlada pelo tempo, e o produto deve ser determinado entre 10 min e 2 h após a mistura dos reagentes. [75] Na figura 35 é apresentada um mecanismo para a reação no método de Griess.

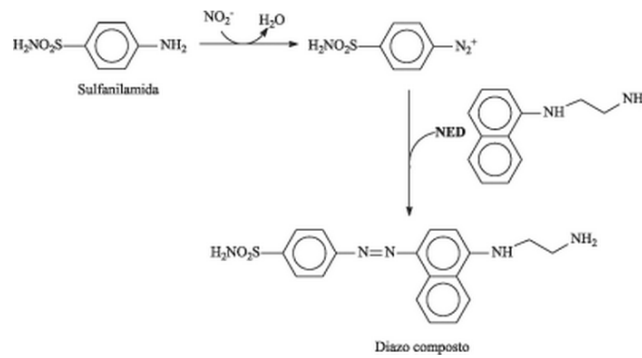


Figura 35. Mecanismo de reação utilizada para determinação de nitrito pelo método de Griess. [75]

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização dos Dispositivos Propostos

Nas Figuras 36 e 37 são apresentadas fotografias dos microdispositivos construídos avaliados na determinação de diversos analitos descritos neste trabalho. Nas mesmas figuras também são mostradas imagens, obtidas em tempo real empregando-se uma web-cam (Bright 480K), das emissões geradas pela reação quimiluminescente entre o luminol e peróxido de hidrogênio.

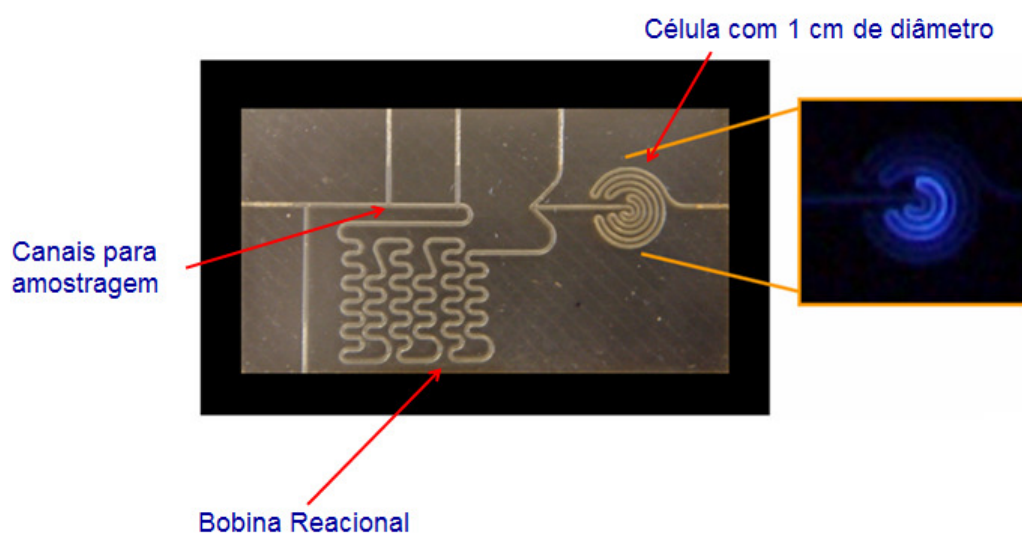


Figura 36. Microdispositivo com célula de detecção em formato caracol (A)

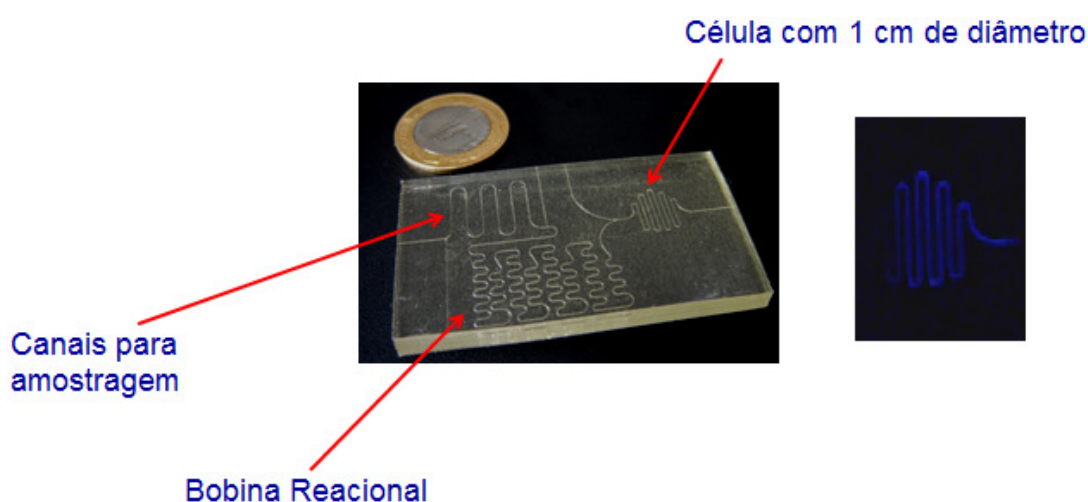


Figura 37. Microdispositivo com célula de detecção em formato serpentina (B)

O principal foco na construção destes microdispositivos foi integrar a célula de detecção ao monólito, que juntamente com as outras partes importantes dos microdispositivos (bobina de reação, plug de amostragem e ponto de confluência) fossem condizentes com uma análise que utiliza a detecção por quimiluminescência, permitindo assim a avaliação das respostas obtidas em vista do tamanho reduzido dos microdispositivos. Vale ressaltar que como a quimiluminescência não necessita de fonte externa de excitação, onde a reação química é a responsável pela emissão eletromagnética, os microdispositivos necessariamente devem ser transparentes a radiação visível. De fato, como já havia sido observado por Fonseca et. al. [17] e por Fernandes et. al. [6]., o polímero resultante não absorve uma quantidade significativa de radiação na região visível do espectro, o que permite a realização das medidas de quimiluminescência com os microssistemas propostos.

A célula para detecção por quimiluminescência baseou-se na disposição dos canais no formato de um “caracol” e em formato serpentina, ambos com aproximadamente 10 mm de diâmetro. O tamanho da célula de detecção é compatível com o tamanho dos fotodiodos empregados para a detecção. Conforme apresentado nas Figuras 36 e 37, estas duas células de detecção foram avaliadas (Figura 36, formato caracol) (Figura 37, formato serpentina). A discussão sobre o desempenho de ambas está descrita na seção 4.2.

Uma constatação bastante importante durante o trabalho foi a selagem eficiente dos microssistemas na região das células de detecção. Em ambos os casos, a distância entre canais adjacentes era da ordem de 0,5 mm, o que poderia comprometer o processo de selagem nesta região devido à pequena área de contato entre a placa que continha os canais e a placa de cobertura. Entretanto, ensaios mostraram que os microssistemas podem operar com vazões superiores à 3,0 mL/min sem que haja comprometimento da sua integridade, comprovando o sucesso do processo de selagem.

Durante o trabalho foi necessário alterar os volumes de amostragem para determinadas aplicações. É possível observar que o plug de amostragem no microdispositivo com célula de detecção em formato caracol (Figura 36), que possui extensão de aproximadamente 2 cm (cerca de 2,5 μ L), possui comprimento menor do que o plug de amostragem apresentado no

microdispositivo com célula de detecção em formato serpentina (Figura 37), com extensão de aproximadamente 4 cm (cerca de 8 μL). Foi observado, em testes preliminares, que o aumento no volume de injeção leva normalmente a uma maior sensibilidade na análise, embora o plug de amostragem de dimensão menor também proporcione resultados satisfatórios. Assim, para determinações com concentrações menores foram utilizados volumes maiores de amostragem. Entretanto, otimizações não foram realizadas para a escolha do volume (comprimento) ideal.

Os microdispositivos, depois de concluído o processo de fabricação, apresentaram dimensões aproximadas de 6,5 cm x 3,5 cm x 0,4 cm. Os microcanais apresentaram formato em U, devido à forma que o microssistema é exposto a radiação e à interação da radiação com a máscara fotolitográfica. Utilizando as imagens de micrografia de varredura eletrônica (MEV) (Figura 38) foi possível observar o formato e dimensões dos microcanais e também, estimar os volumes de diferentes regiões do dispositivo (Tabelas 2 e 3).

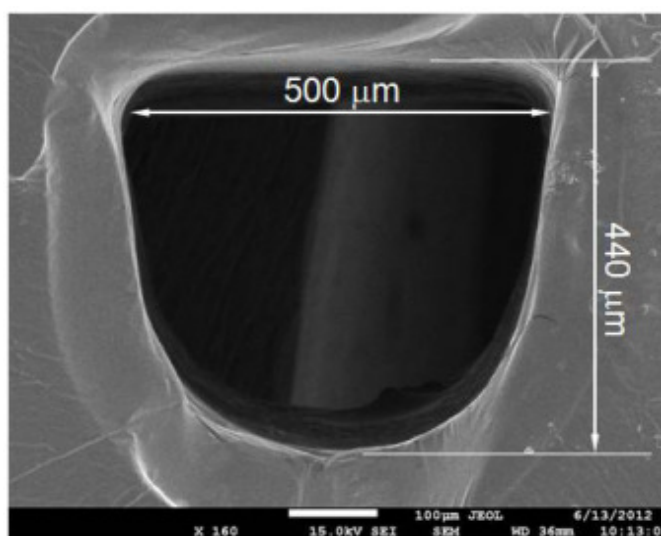


Figura 38. Micrografia eletrônica de varredura de um microcanal construído por fotolitografia profunda no UV.

Tabela 2. Volumes estimados para diferentes regiões (Microdispositivo A, célula de detecção em formato caracol)

	Seção Transversal			Volume μL
	Largura mm	Profundidade mm	Comprimento mm	
Plug de Amostragem	0,5	0,44	10	2,2
Bobina Reacional	0,5	0,44	295	64,9
Célula de Fluxo	0,5	0,44	85	18,7

Tabela 3. Volumes estimados para diferentes regiões (Microdispositivo B, célula de detecção em formato serpentina)

	Seção Transversal			Volume μL
	Largura mm	Profundidade mm	Comprimento mm	
Plug de Amostragem	0,5	0,44	40	8,8
Bobina Reacional	0,5	0,44	360	79,2
Célula de Fluxo	0,5	0,44	50	11

4.2. Avaliação de microssistemas para a reação entre peróxido de hidrogênio e luminol catalisada por ferricianeto de potássio

O monitoramento inicial desta reação no interior dos microssistemas foi realizado, preliminarmente, a partir de imagens obtidas em tempo real com o auxílio de uma web-cam. As imagens mostraram que um controle fino das vazões das soluções reagentes deve ser realizado para minimizar a segmentação dos fluídos devido à pulsação do fluxo ocasionada pela bomba peristáltica.

A avaliação dos sinais analíticos obtidos para diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (curva analítica) foi inicialmente realizada com os microssistemas 1 (célula de detecção em formato caracol) e microssistema 2 (célula de detecção em formato serpentina) cujos “layouts” são apresentados na

Figura 17, da seção 3.1. Este primeiro teste foi realizado de forma a obter resultados iniciais comparativos sobre o formato da célula de detecção.

Neste ensaio, o luminol, utilizado como solução carreadora, é misturado com a solução de peróxido de hidrogênio recém injetada para em seguida confluir com a solução de ferricianeto (catalisador). Neste caso, há a oxidação catalítica do luminol pelo peróxido, conforme a equação abaixo.

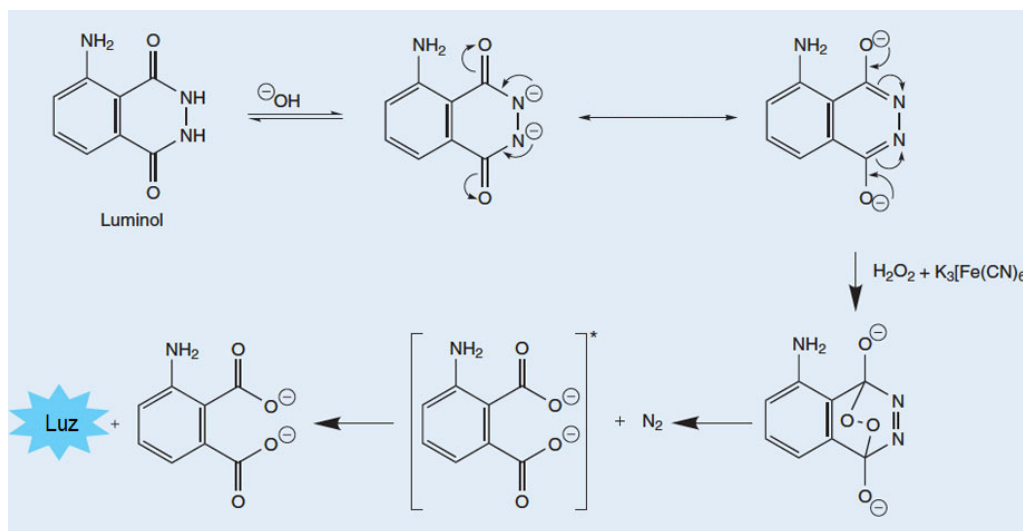


Figura 39. Esquema simplificado da reação de luminol com peróxido de hidrogênio catalisada por Ferricianeto de potássio (adaptado de [77])

Para esta determinação preliminar, a aquisição de dados e controle da automação foi feita utilizando o circuito eletrônico baseado no microcontrolador PIC construído no próprio laboratório, conforme apresentado na seção 3.2, utilizando como sistema de detecção dois fotodiodos.

Na Figura 40 é apresentado o diagrama obtido com o microsistema com célula de detecção em formato caracol. Observa-se nesse diagrama que a linha de base apresentou um ruído considerável. Parte deste ruído, que leva às menores intensidades de sinal (pico para baixo), está relacionada à uma instabilidade no sistema provocada pelo acionamento das válvulas solenóides e posterior desligamento das mesmas. Isto foi possivelmente ocasionado devido a necessidade de uma elevada amplificação proporcionada pelos circuitos eletrônicos, a qual pode contribuir para o aumento do sinal analítico mas também dos ruídos. Nota-se pelo diagrama que o valor inicial do eixo y está por volta de 2,0 V, isso se deve ao fato de não ter sido possível realizar o ajuste de auto-zero neste sistema, devido ao tipo de amplificadores utilizados.

Desconsiderando essa instabilidade momentânea, da qual o sistema se recupera a cada início de leitura, a razão sinal/ruído obtida para a menor concentração injetada ($50 \mu\text{mol/L}$) foi de 6,25. Além disto, a curva analítica construída empregando-se as médias das alturas dos picos (Figura 41) apresentou um comportamento linear ($R=0,98905$), entretanto, o desvio entre as medidas referentes à concentração de $200 \mu\text{mol/L}$, foi superior a 5%.

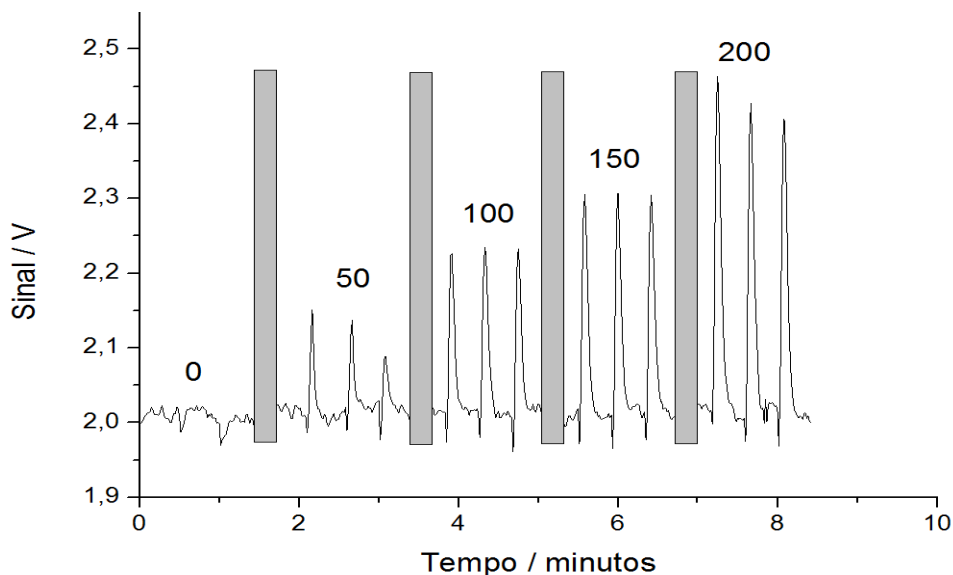


Figura 40. Diagrama obtido para injeções de soluções padrão de peróxido de hidrogênio (concentrações em $\mu\text{mol/L}$ indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-1. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

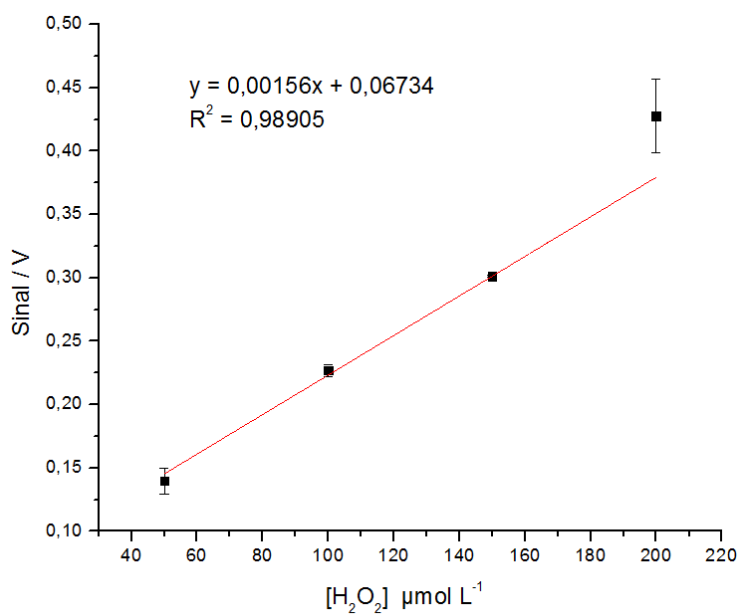


Figura 41. Curva analítica obtida com injeções de padrões de H_2O_2 , microsistema 1 (célula de detecção com formato em caracol).

Na Figura 42 é apresentado o diagrama obtido com o microsistema com célula de detecção em formato serpentina. Observa-se nesse diagrama o mesmo comportamento da linha base provocado pela instabilidade proveniente do acionamento das válvulas solenóides e posterior desligamento das mesmas. Desconsiderando essa instabilidade, a razão sinal/ruído obtida para a menor concentração injetada ($50 \mu\text{mol/L}$) nesse microsistema foi de 12,2. Para este microdispositivo, a curva analítica construída empregando-se as médias das alturas dos picos (Figura 43) apresentou um comportamento linear ($R=0,99987$), indicando a possibilidade de uso analítico deste dispositivo. Ainda de acordo com as medidas apresentadas na Figura 43, a utilização deste dispositivo mostrou boa repetibilidade (0,92% para $n = 4$, e concentração de $50 \mu\text{mol/L}$, com um limite de detecção estimado em $15 \mu\text{mol/L}$. Adicionalmente, a frequência analítica estimada foi de aproximadamente 110 injeções/h.

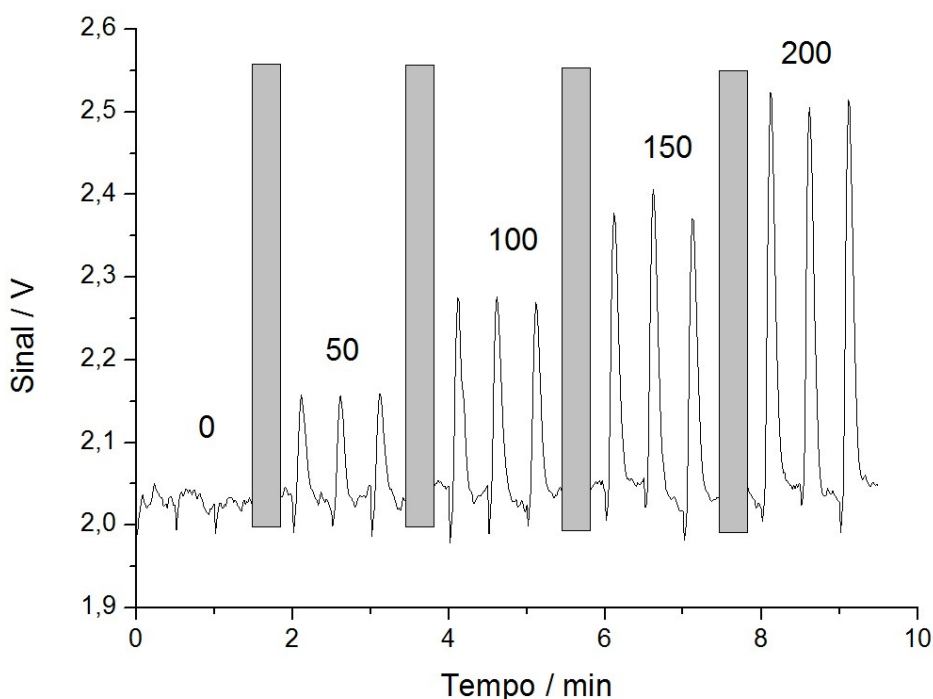


Figura 42. Diagrama obtido para injeções de soluções padrão de peróxido de hidrogênio (concentrações em $\mu\text{mol/L}$ indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-2. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

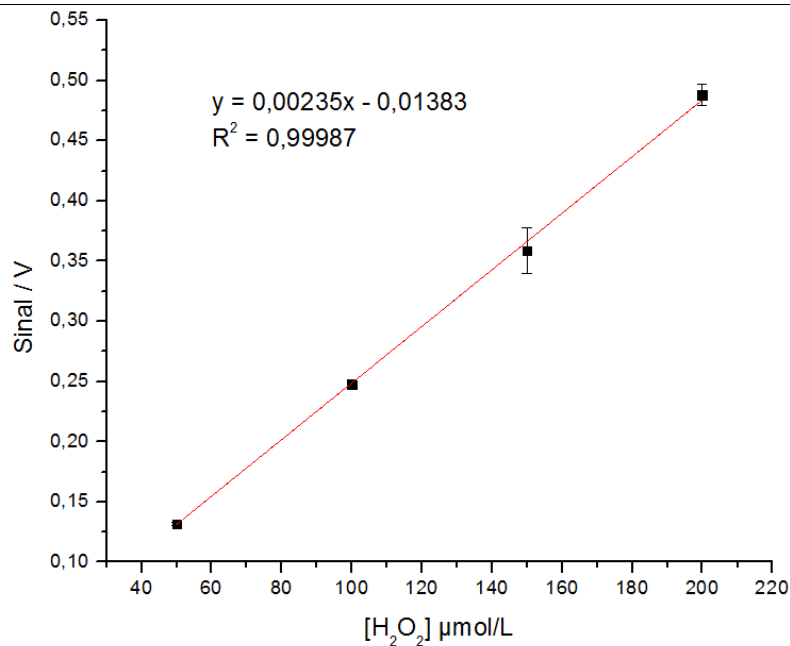


Figura 43. Curva analítica obtida com injeções de padrões de H₂O₂, microsistema 2 (Célula em formato serpentina).

Embora tenham sido obtidas curvas analíticas com boas linearidades para ambos os dispositivos ($R > 0,98$), pode-se observar no diagrama apresentado na Figura 40, referente a utilização do microdispositivo com célula de detecção em formato caracol, que as repetibilidades dos picos para alguns dos padrões injetados é insatisfatória, maiores do que 5 % para o padrão de 200 μmol/L de H₂O₂, por exemplo, o que certamente poderia comprometer a precisão das medidas. Observou-se também que as medidas realizadas com a célula em serpentina proporcionaram maior sensibilidade para a determinação, uma vez que a inclinação para a curva analítica obtida com o sistema com célula em serpentina foi maior que aquela obtida com a célula em caracol. Baseado nesses resultados, o microdispositivo com célula de detecção em formato serpentina foi escolhido para a realização dos testes posteriores.

Alternativamente, foram feitas medidas analíticas utilizando a mini fotomultiplicadora como transdutor do sinal. Testes preliminares mostraram que para esta análise os valores adequados dos parâmetros de ganhos de voltagem e tempo de integração associados à fotomultiplicadora foram de 450 V e 10 ms, respectivamente. As vazões das soluções reagentes foram aumentadas para

0,20 ml/min, enquanto que a vazão da solução amostra foi aumentada para 0,75 ml/min. Tais mudanças foram feitas baseadas em testes preliminares.

Na Figura 44 é apresentado o fiagrama obtido com o microssistema com célula de detecção em formato serpentina. Foi possível observar que esta estratégia de detecção, eliminou as flutuações da linha de base provocadas pelo acionamento e desligamento das válvulas solenóides. A utilização da fotomultiplicadora proporcionou também uma melhora na repetibilidade das medidas permitindo também a detecção de concentrações mais baixas de peróxido de hidrogênio devido a sua maior sensibilidade. A curva analítica construída com a altura média dos picos (Figura 45) apresentou uma resposta linear ($R^2= 0,99999$) na faixa de concentrações de 5 a 25 $\mu\text{mol/L}$ de peróxido, desvio médio relativo entre as medidas de 0,8% e com um limite de detecção estimado em 1,0 $\mu\text{mol/L}$. Adicionalmente, a frequência analítica foi calculada sendo de aproximadamente 150 injeções/h, esse aumento na frequência analítica foi devido ao aumento do fluxo de injeção das soluções reagentes, padrões e amostras. A razão sinal/ruído obtida para a menor concentração injetada (5 $\mu\text{mol/L}$) nesse microssistema foi superior a 50.

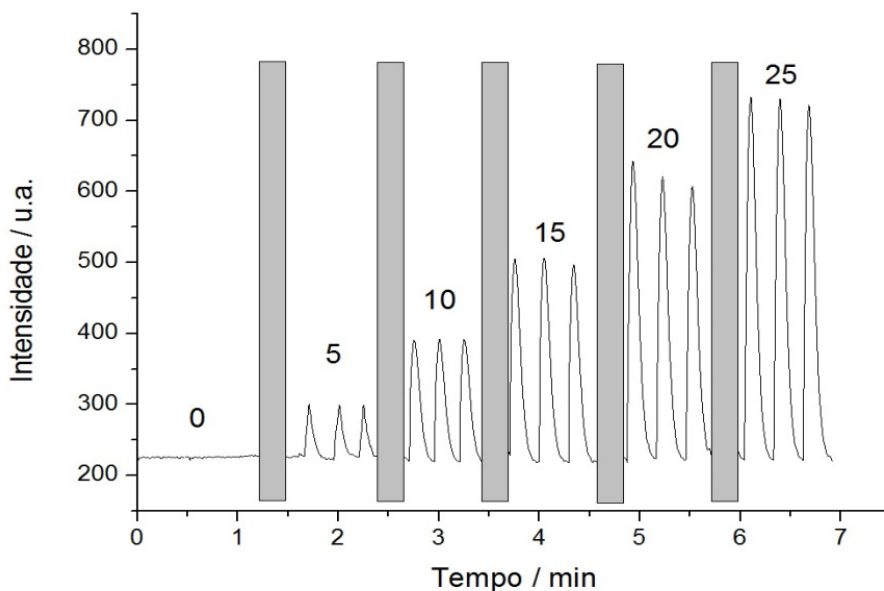


Figura 44. Fiagrama obtido para injeções de soluções padrão de peróxido de hidrogênio (concentrações em $\mu\text{mol/L}$ indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-2 e detecção com fotomultiplicadora. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

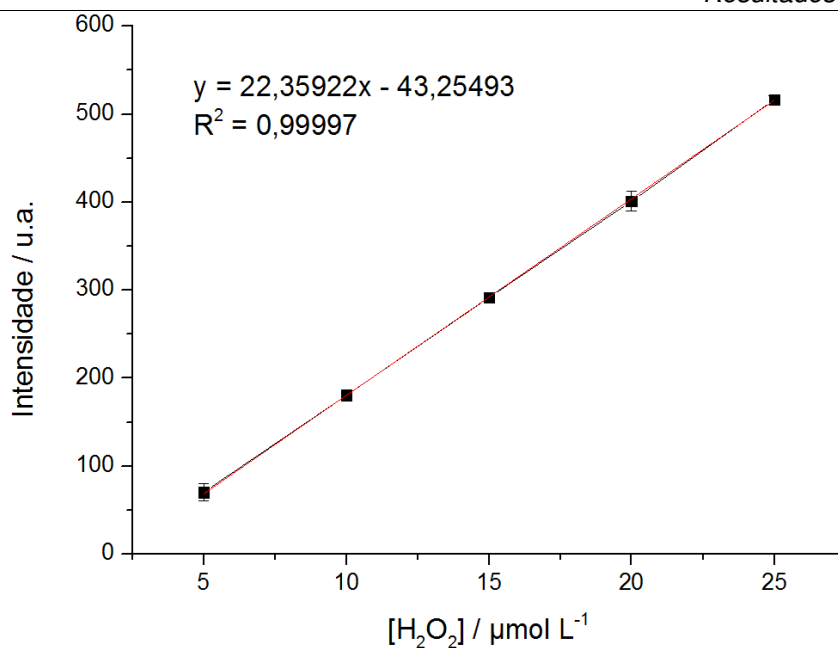


Figura 45. Curva analítica obtida com injeções de padrões de H₂O₂, microssistema 2, detecção com fotomultiplicadora.

A comparação dos *layouts* permitiu concluir que o microdispositivo com célula de detecção em formato de serpentina se mostra mais adequado para as análises com determinação por quimiluminescência descritas neste trabalho. Tal comparação foi feita baseada em somente um teste, futuramente há a possibilidade de fazer novos testes com diferentes formatos de célula de detecção. Com a comparação de dois sistemas de detecção, com sensibilidade diferentes (fotodiodos e fotomultiplicadora), foi possível identificar melhoras significativas na sensibilidade ao se utilizar a fotomultiplicadora, permitindo a análise de soluções padrão de peróxido de hidrogênio com concentrações 10 vezes menores das utilizadas com detecção com fotodiodos. Entretanto, o sistema com detecção com fotodiodos também se mostrou adequado para determinação de peróxido por quimiluminescência, e se mostra uma alternativa mais barata para análises que não necessitam de um limite de detecção tão baixo, tendo em vista que o custo de uma fotomultiplicadora (aproximadamente R\$ 2000,00) é mais elevado se comparado com os fotodiodos utilizados (aproximadamente R\$ 400,00 cada).

4.3. Avaliação de um microsistema na determinação de íons Hipoclorito (OCI⁻) em amostras comerciais

Testes iniciais utilizando o microdispositivo apresentado na Figura 17(2) (sistema com menor volume de injeção, menor bobina de reação e célula em formato de serpentina), não apresentaram resultados satisfatórios para análise de hipoclorito, devido a baixa sensibilidade e baixa repetibilidade das medidas analíticas. Para solucionar este problema, foi preciso aperfeiçoar algumas condições, e a primeira alteração foi a utilização de um outro dispositivo com um comprimento maior para a bobina reacional (360 mm), cujo layout é apresentado na Figura 17-3. Esta alteração foi sugerida para proporcionar uma melhor mistura da solução reagente com a amostra (com maior tempo de residência), o que poderia melhorar a repetibilidade das medidas. Entretanto, mesmo com esta alteração, o dispositivo apresentou problemas de repetibilidade, e uma nova configuração (Figura 17-4) foi proposta. Neste caso a extensão do plug de amostragem foi aumentada, passando de 2,5 cm para aproximadamente 4 cm, para possibilitar um volume maior de injeção, visto que para determinar concentrações muito baixas em dispositivos de tamanho reduzido a dificuldade de quantificação é aumentada, devido ao baixo número de espécies do analito disponíveis para reagir.

Além destas alterações no layout do dispositivo, observou-se também a necessidade de uma alteração no procedimento inicialmente proposto para a determinação. Em um primeiro teste, a solução da amostra ou dos padrões era carregada com uma solução de água purificada, porém os resultados obtidos não foram satisfatórios, no que se refere à reprodutibilidade nas medidas. Com o intuito de aumentar a sensibilidade, foi utilizada uma alternativa que consistia em utilizar como solução carreadora uma solução de peróxido de hidrogênio com concentração definida (0,5 mol/L) em meio ácido. Esta alternativa proporcionou uma melhora significativa nos resultados obtidos e foi adotada para os testes subsequentes.

Considerando estas alterações, o microsistema apresentado na Figura 17(4) foi utilizado na determinação de hipoclorito a partir da configuração de fluxo ilustrada na Figura 37. Este método baseia-se na reação quimiluminescente

entre luminol e hipoclorito/peróxido de hidrogênio. Em meio básico essa reação gera uma forte emissão na região do visível. Um esquema simplificado da reação entre o luminol e hipoclorito/peróxido de hidrogênio é apresentado na Figura 46.

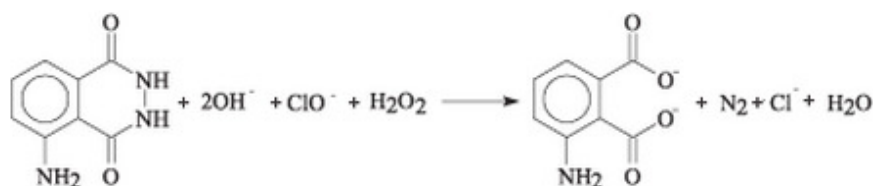


Figura 46. Esquema simplificada da reação quimiluminescente luminol/peróxido de hidrogênio.

Na Figura 47 é apresentado o diagrama obtido para esta determinação empregando-se os fotodiodos como transdutores do sinal. A curva analítica construída com a altura média dos picos (Figura 48) apresentou uma boa resposta linear ($R^2 = 0,99848$) na faixa de concentrações de 2 a 20 mg/L, com desvio médio relativo entre as medidas de 0,5%, limite de detecção estimado em 0,5 mg/L e repetibilidade de 0,5% ($n = 4$, para concentração de 5 $\mu\text{mol/L}$). Adicionalmente, a frequência analítica foi calculada sendo de aproximadamente 80 injeções/h. A razão sinal/ruído obtida para a menor concentração injetada (2 mg/L) nesse microssistema foi igual a 15,5.

É importante notar também que, nesta determinação, não houveram flutuações significativas da linha de base causadas pelo acionamento das válvulas. Nesta determinação foi feita uma importante mudança, que foi a troca dos amplificadores operacionais CP 034, por amplificadores modelo OP 07. Esta troca permitiu um ajuste fino na aquisição do sinal, o que permitiu incluir a ferramenta de auto zero ao sistema. Devido à maior sensibilidade obtida para a determinação de íons hipoclorito, foi possível operar o sistema de detecção com ganhos significativamente menores nos amplificadores operacionais, o que minimizou a detecção de pequenas flutuações instrumentais.

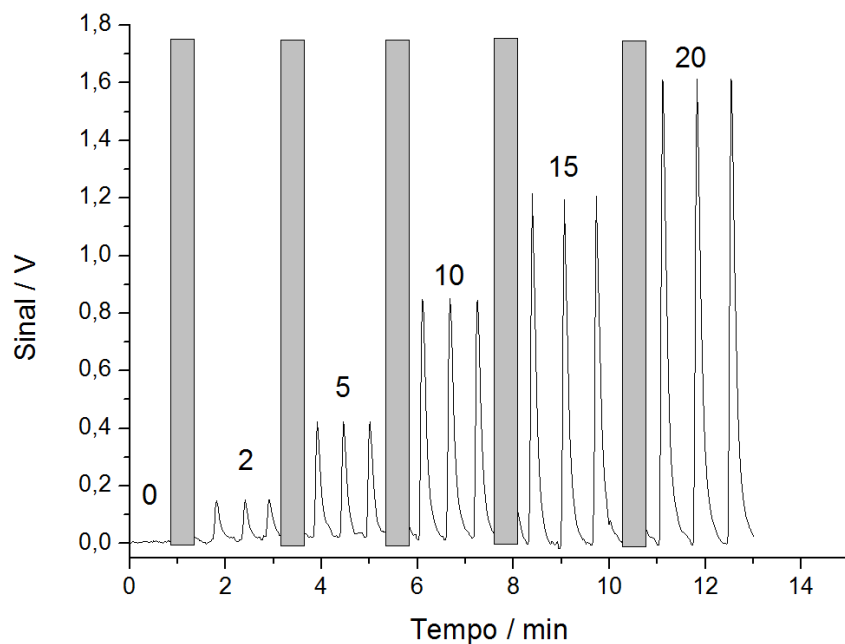


Figura 47. Diagrama obtido para injeções de soluções padrão de hipoclorito (concentrações em mg/L indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-4 e detecção com fotodiodos. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

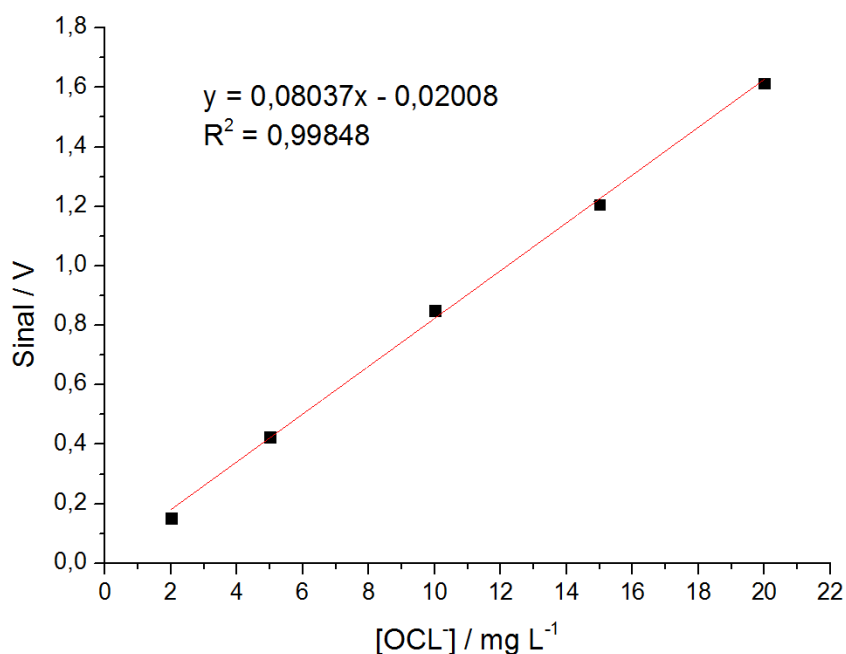


Figura 48. Curva analítica obtida com injeções de padrões de OCl^- , detecção com fotodiodos. As barras de erros são menores do que os pontos indicados no gráficos.

Para efeito de comparação, também foram realizadas medidas analíticas utilizando a mini fotomultiplicadora. Testes preliminares mostraram que para esta determinação os valores adequados dos parâmetros de ganhos de voltagem e tempo de integração associados à fotomultiplicadora foram de 950 V e 10 ms, respectivamente. Na figura 49 é apresentado o fiograma obtido para injeções de soluções padrão de hipoclorito sob estas condições. A utilização da fotomultiplicadora permitiu a detecção de concentrações mais baixas de hipoclorito de sódio devido a sua maior sensibilidade. A curva analítica construída com a altura média dos picos (Figura 50) apresentou uma resposta linear ($R^2 = 0,9998$) na faixa de concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/L}$, desvio médio relativo entre as medidas de 0,4%, limite de detecção estimado em 5 $\mu\text{g/L}$ e repetibilidade de 0,5% ($n = 4$, para concentração de 10 $\mu\text{g/L}$). Adicionalmente, a frequência analítica foi calculada sendo de aproximadamente 150 injeções/h, esse aumento na frequência analítica foi devido ao aumento do fluxo de injeção das soluções reagentes, padrões e amostras. A razão sinal/ruído obtida para a menor concentração injetada (5 $\mu\text{mol/L}$) nesse microssistema foi igual a 10.

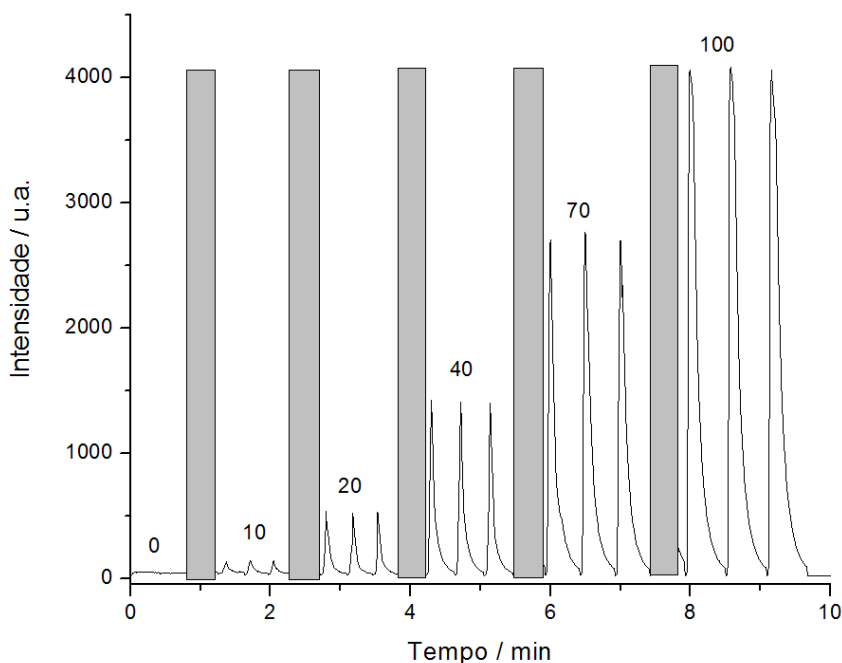


Figura 49. Fiograma obtido para injeções de soluções padrão de hipoclorito (concentrações em $\mu\text{g/L}$ indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-4 e detecção com fotomultiplicadora. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

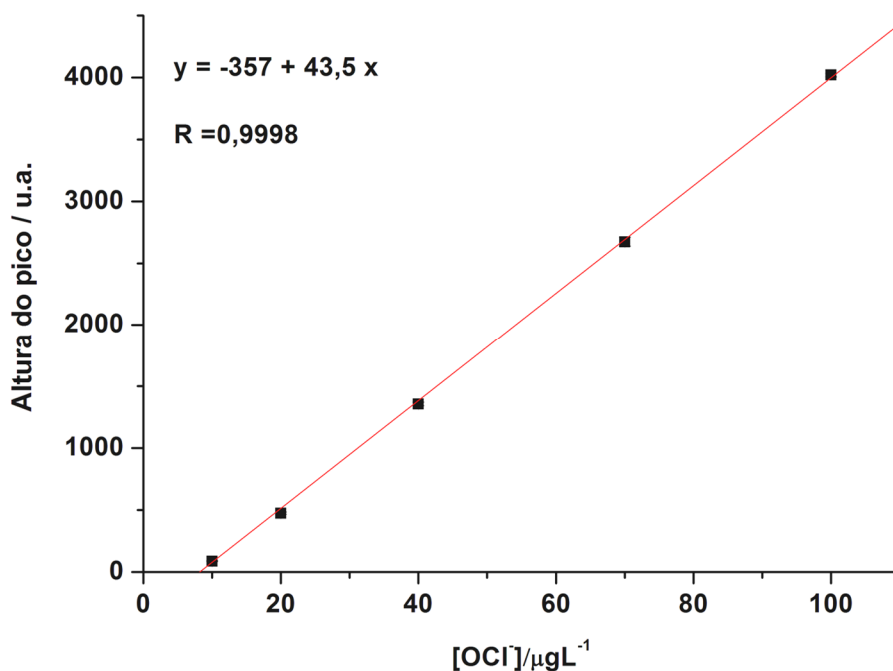


Figura 50. Curva analítica obtida com injeções de padrões de OCl⁻, detecção com fotomultiplicadora. As barras de erros são menores do que os pontos indicados no gráficos.

Ao se comparar os resultados obtidos na determinação de hipoclorito utilizando a detecção com a fotomultiplicadora e com os fotodiodos, observa-se uma melhora significativa na sensibilidade, o que permitiu a análise de concentrações 200 vezes menores (10 μg/L contra 2 mg/L). Entretanto, os resultados obtidos com a detecção por fotodiodos demonstraram a aplicabilidade do sistema proposto para amostras que não exijam um método com sensibilidade elevada e instrumentação complexa, este microssistema foi utilizado para determinar a concentração de hipoclorito em amostras comerciais de água sanitária, e os resultados obtidos foram comparados com o método de referência.

Na figura 51 é apresentado o diagrama obtido para os padrões (idem à Figura 47) acompanhado dos picos obtidos para as soluções das amostras comerciais. A partir da curva analítica obtida (Figura 48) foi possível quantificar as amostras comerciais de hipoclorito, sendo os resultados apresentados na Tabela 4.

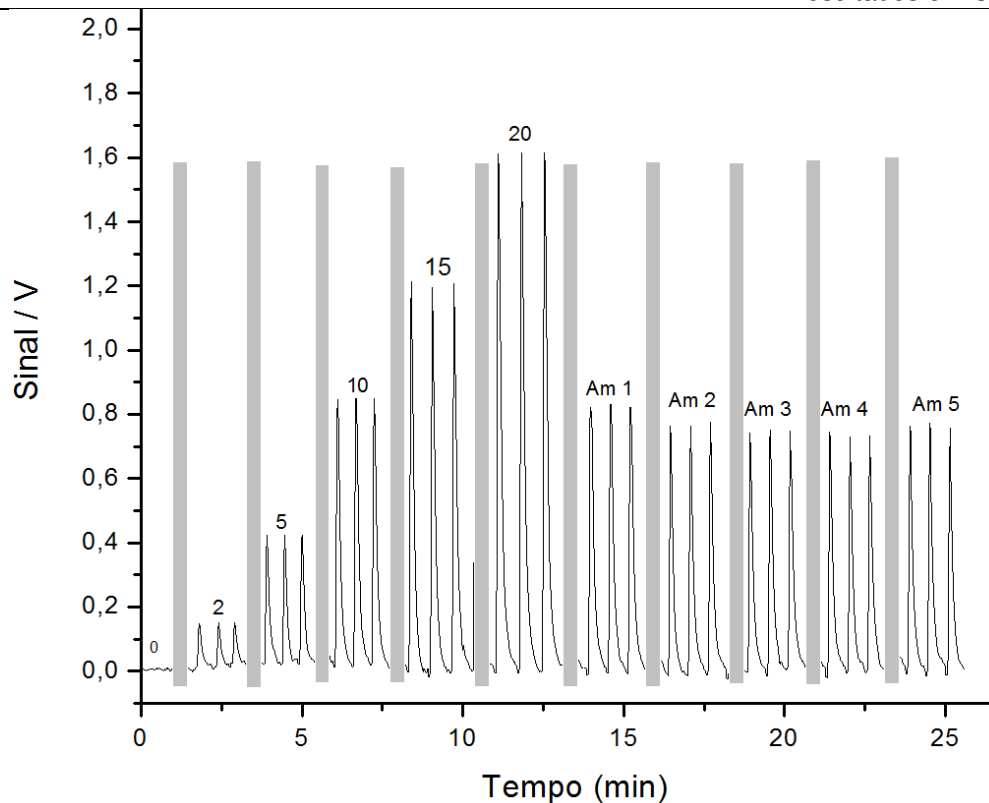


Figura 51. Diagrama obtido para injeções de soluções padrão de hipoclorito (concentrações em $\mu\text{g/L}$ indicadas sobre os picos), e amostras comerciais de água sanitária empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-4 e detecção com fotodiodos. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

Tabela 4. Resultados comparativos (Análise de Hipoclorito em amostras comerciais)

Amostra	μFIA [OCI ⁻]/g L ⁻¹	Titulação [OCI ⁻]/g L ⁻¹	Erro relativo %
1	22,02 \pm 0,13	21,95 \pm 0,10	+ 0,32
2	19,59 \pm 0,20	20,04 \pm 0,16	-2,25
3	19,34 \pm 0,13	19,65 \pm 0,13	-1,57
4	18,82 \pm 0,19	19,17 \pm 0,11	-1,82
5	18,73 \pm 0,31	17,95 \pm 0,05	+4,34

A precisão do método baseado no μ FIA foi comparável àquela obtida com o método de referência (95% de confiabilidade), o que foi confirmado empregando-se o teste estatístico F (Tabela 5). Os resultados médios para as determinações em cinco amostras de água sanitária comercial também demonstraram uma boa exatidão para o método proposto com o μ FIA, não sendo observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos pela proposta ou pelo método de referência ao se aplicar o “teste T” com 95% de confiança. Além disso, a obtenção erros relativos positivos e negativos para as comparações demonstraram a inexistência de erros sistemáticos, como pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 5. Teste F entre os resultados obtidos por μ FIA e Titulação

Amostra	F observado	F crítico uni-caudal
1	1,74	19
2	1,10	19
3	1,57	19
4	2,86	19
5	4,16	19

O desempenho do dispositivo foi ainda avaliado quanto ao consumo de amostras de reagentes e geração de resíduos. Baseado na quantidade gasta de reagentes na titulação iodimétrica, a quantidade gerada de resíduos foi de aproximadamente 750 mL, enquanto que no método proposto por μ FIA onde a análise das cinco amostras em triplicata demorou cerca de 30 minutos, a quantidade de resíduos gerados foi de 45 mL, uma redução de 94% na geração de resíduos, demonstrando um bom desempenho tendo em vista os conceitos da Química Verde. Vale ressaltar que essa comparação baseia-se na quantidade de volume de resíduos gerados, não levando em consideração a natureza dos reagentes utilizados em cada análise, que é completamente diferente.

4.4. Avaliação de um microsistema na determinação de Nitrito em Patês Comerciais

Inicialmente foram realizado estudos utilizando uma solução carreadora contendo peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio em meio ácido, porém a reprodutibilidade das medidas analíticas não foi satisfatória, devido ao fato de o hipoclorito consumir o peróxido de hidrogênio ao longo do tempo, diminuindo a intensidade do sinal ao longo da corrida. Outras possibilidades de inserção da amostra contendo nitrito foram testadas, mas os resultados preliminares foram insatisfatórios. Foram feitas tentativas de adaptar outros métodos de determinação de nitrito ao formato do microdispositivo, porém não houve sucesso.

Para a utilização deste microdispositivo no formato proposto foi necessário a diluição dos padrões e das amostras em solução com concentração final de hipoclorito de 100 µg/L. Com o intuito de obter maior sensibilidade e valores de limite de detecção menores, nestes testes foi utilizado somente a detecção com a fotomultiplicadora, utilizando os mesmos parâmetros de ganho de voltagem e de tempo de integração descritos na seção 4.3.

Na Figura 52 é apresentado o diagrama para as injeções de soluções padrão de nitrito (NO_2^-) na faixa de concentração de 10 a 80 µg/L. Nota-se que a forma de avaliação da curva se dá pela atenuação do sinal analítico, causada pela reação entre hipoclorito e o nitrito presentes na solução amostra, onde a concentração de hipoclorito é reduzida de acordo com a concentração de nitrito. Este método baseia-se na reação quimiluminescente entre luminol e hipoclorito/peróxido de hidrogênio. Em meio básico essa reação gera uma forte emissão na região do visível. O nitrito reage com o hipoclorito reduzindo o sinal quimiluminescente pois diminui a quantidade de hipoclorito para a reação quimiluminescente, ou seja, quanto maior a quantidade de nitrito menor o sinal obtido (quenching), pois a quantidade de hipoclorito disponível para reagir com luminol é menor, assim sendo a reação entre nitrito e hipoclorito é a base para determinação de nitrito neste método.

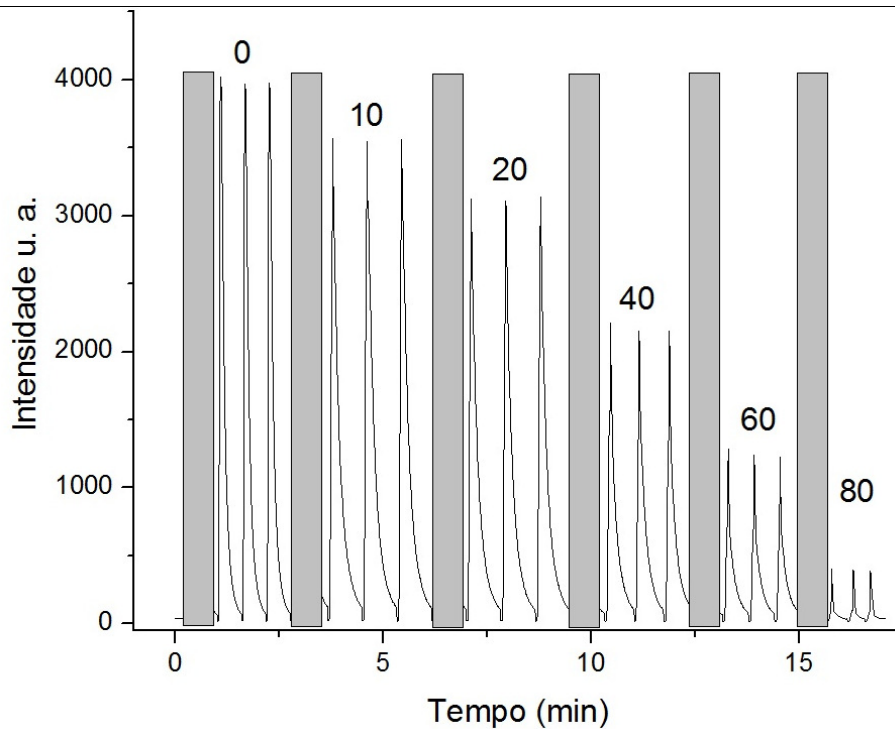


Figura 52. Diagrama obtido para injeções de soluções padrão de nitrito (concentrações em $\mu\text{g/L}$ indicadas sobre os picos), empregando-se a configuração mostrada na Figura 17-4 e detecção com fotomultiplicadora. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

A curva analítica (Figura 53) foi construída a partir da diferença entre as alturas médias dos picos dos padrões pela altura média dos picos do branco (0 $\mu\text{g/L}$) e apresentou uma resposta linear ($R^2 = 0,99965$) na faixa de concentrações estudada. Além disso, foram observados um desvio médio relativo entre as medidas de 0,9%, um limite de detecção estimado em 5 $\mu\text{g/L}$ e repetibilidade de 0,6 % ($n = 4$, para concentração de 10 $\mu\text{g/L}$). Adicionalmente, a frequência analítica foi calculada sendo de aproximadamente 60 injeções/h. Se comparado com os outros testes descritos neste trabalho, esta análise é a que possui a menor frequência analítica, isso se deve ao fato de que após o aparecimento do sinal analítico o sistema demorava cerca de um minuto para voltar ao estado de equilíbrio e possibilitar a injeção de outra amostra. A razão sinal/ruído obtida para a menor concentração injetada (10 $\mu\text{mol/L}$) nesse micro sistema foi igual a 16,26.

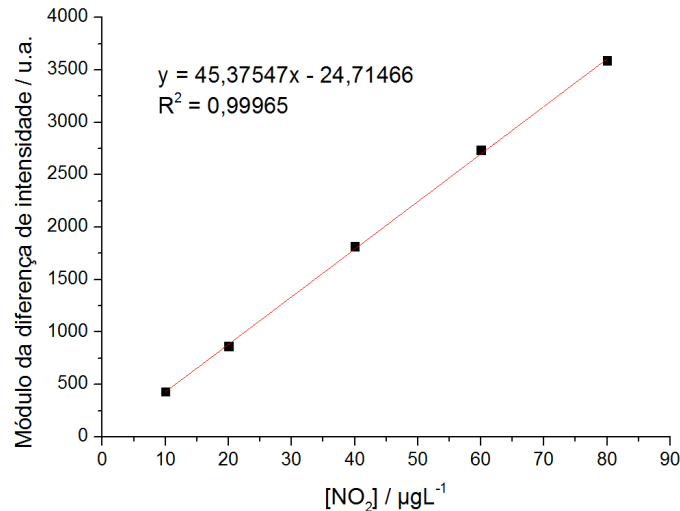


Figura 53. Curva analítica obtida com injeções de padrões de NO₂⁻, detecção com fotomultiplicadora. As barras de erros são menores do que os pontos indicados no gráficos.

Após este teste inicial que apresentou resultados satisfatórios, o microdispositivo foi testado na determinação de nitrito em patês comerciais. Foram utilizadas quatro amostras de patês e os resultados obtidos foram comparados com o método de referência.

Na figura 54 são apresentados os fiagramas para injeções dos padrões (54a) e das amostras (54b). Posteriormente foi construída uma curva de calibração da mesma forma que foi construída na Figura 53. A partir da equação obtida por regressão linear (figura 55) foi possível calcular a concentração de nitrito nas amostras.

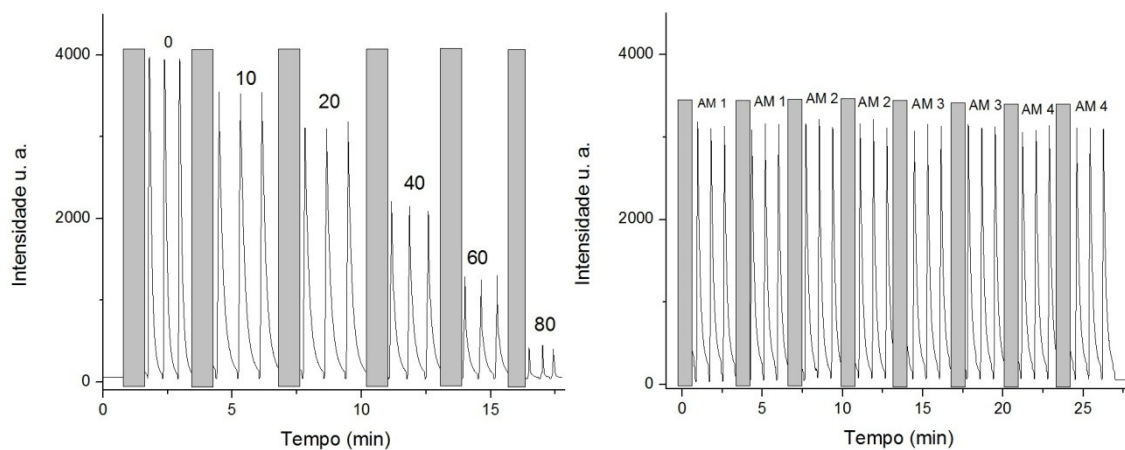


Figura 54. a) Fiagrama obtido para injeções de soluções padrão de nitrito (concentrações em µg/L indicadas sobre os picos). b) Fiagrama das soluções amostra. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

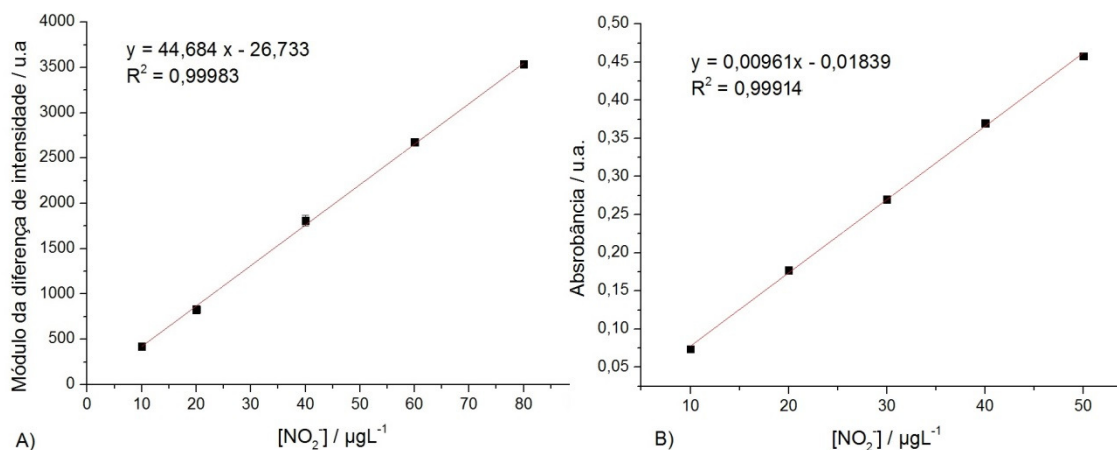


Figura 55. A) Curva analítica obtida por μFIA . B) Curva analítica obtida pelo método de referência (espectrofotometria)

Os resultados obtidos com microssistema para as quatro amostras avaliadas (Tabela 6) foram comparados àqueles obtidos com o método de referência (95% de confiança), não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos. Além disso, erros relativos menores que 5% confirmaram a boa exatidão do método. Foi observado, entretanto, erros relativos positivos para todas as amostras, de modo que as concentrações determinadas através do μFIA foram sempre maiores que aquelas determinadas pelo método de referência (espectrofotometria em batelada). Este resultado pode sugerir um suposto erro sistemático, que não foi diagnosticado, nas medidas, mas acredita-se que isto tenha ocorrido casualmente devido ao pequeno número de amostras analisadas (apenas 4).

Tabela 6. Resultados comparativos entre μFIA e Espectrofotometria na determinação de nitrito em patês comerciais

Amostra	μFIA $[\text{NO}_2^-]$ mg/kg	Espectrofotometria $[\text{NO}_2^-]$ mg/kg	Erro relativo %
1	$191,68 \pm 0,79$	$185,51 \pm 0,71$	3,33
2	$185,78 \pm 0,63$	$179,01 \pm 1,41$	3,78
3	$193,69 \pm 2,05$	$191,51 \pm 2,12$	1,13
4	$199,70 \pm 2,05$	$197,03 \pm 1,38$	1,35

A legislação vigente estabelece diversos níveis máximos de nitrito em produtos cárneos, para os patês em específico, a quantidade máxima de nitrito é de 200 ppm (mg/kg). Os resultados encontrados tanto para análise por μ FIA, quanto por espectrofotometria, mostram que todas as amostras testadas estão dentro limite máximo estabelecido.

Um dos problemas encontrados na utilização do método proposto, foi a alteração da matriz por conta da necessidade de preparar as soluções na presença de hipoclorito, visto a impossibilidade de realizar a mistura no sistema. Por outro lado, os resultados encontrados foram satisfatórios e comparáveis aos resultados obtidos com o método de referência, e com uma frequência analítica elevada (60 injeções/h). Desta forma o método avaliado pode ser uma alternativa barata para análise de nitrito em patês comerciais, além de haver a possibilidade de expandir seu uso na determinação de nitrito em outras matrizes, como água de rios.

5. Conclusões e Perspectivas

O trabalho desenvolvido demonstrou o desenvolvimento e aplicação de microssistemas de análise por injeção em fluxo com células integradas de detecção por quimiluminescência a partir da técnica de fotolitografia profunda no ultravioleta com fotorresiste à base de UA.

No teste realizado para determinação de peróxido de hidrogênio foi observado que as células com formato em serpentina proporcionaram melhores resultados analíticos que aqueles obtidos com as células em formato de caracol. Entretanto, em trabalhos futuros, outros formatos de células poderão ser avaliados, visto que o procedimento empregado na fabricação dos microssistemas é simples, de baixo custo e relativamente rápido. De fato, um microssistema como os descritos neste trabalho pode ser construído com um custo de aproximadamente R\$ 10,00 em aproximadamente uma hora de trabalho.

Da comparação entre as duas estratégias de detecção utilizadas, é possível concluir que as medidas com a fotomultiplicadora são mais sensíveis e menos ruidosas para as aplicações propostas. Entretanto, vale ressaltar que a diferença significativa de preço entre os dois tipos de detectores é um fator a ser considerado na determinação de espécies que não exijam a elevada sensibilidade do detector e que permitam, portanto, o uso dos fotodiodos.

Além disto, foi comprovada também a aplicabilidade dos dispositivos em determinações analíticas simples, as quais poderão subsidiar estudos futuros para outras aplicações, realizando-se as otimizações necessárias para um melhor desempenho analítico dos dispositivos.

Como perspectiva futura, é possível inferir que microssistemas fluídicos, similares aos propostos neste trabalho, poderão ser desenvolvidos e adaptados para serem utilizados na determinação de diferentes tipos de analitos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, visto a gama de reações quimiluminescentes conhecidas atualmente.

6. Referências Bibliográficas

1. MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Anal Chim Acta**, v. 714, p. 8-19, Fev 10 2012.
2. HE, L.; TOH, C. S. Recent advances in analytical chemistry--a material approach. **Anal Chim Acta**, v. 556, n. 1, p. 1-15, Jan 18 2006.
3. RIOS, A.; ZOUGAGH, M.; AVILA, M. Miniaturization through lab-on-a-chip: utopia or reality for routine laboratories? A review. **Anal Chim Acta**, v. 740, p. 1-11, Ago 31 2012.
4. TERRY, S. C.; JERMAN, J. H.; ANGELL, J. B. A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer, **IEEE Trans Electron Devices**, V. 26, n. 12, p. 1880-1886, Dez 1979.
5. COLTRO, W. K. T., et al. Microssistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações, **Quím. Nova**, v.30, n.8, p. 1986-2000, Nov 9 2007
6. FERNANDES J.C.B.; 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.**, V.17, p. 643, 2006.
7. CHEN, Q.; LI, G.; JIN, Q. H.; ZHAO, J. L.; REN, Q. S.; XU, Y. S. J. A Rapid and Low-Cost Procedure for Fabrication of Glass Microfluidic Devices, **Microelectromech. Syst.** v. 16, p. 1193-1200. **2007**,
8. JIA, Z. J.; FANG, Q.; FANG, Z. L. Bonding of glass microfluidic chips at room temperatures. **Anal Chem**, v. 76, n. 18, p. 5597-602, Set 15 2004.
9. HOWLADER, M. M. R.; SUEHARA, S.; SUGA, T. Room temperature wafer level glass/glass bonding. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 127, n. 1, p. 31-36, 2006.
10. DO LAGO, C. L. et al. A dry process for production of microfluidic devices based on the lamination of laser-printed polyester films. **Anal Chem**, v. 75, n. 15, p. 3853-8, Ago 1 2003.

-
11. BECKER, H.; LOCASCIO, L. E. Polymer microfluidic devices. **Talanta**, v. 56, n. 2, p. 267-87, Fev 11 2002
 12. XU, J. et al. Room-temperature imprinting method for plastic microchannel fabrication. **Anal Chem**, v. 72, n. 8, p. 1930-3, Abr 15 2000.
 13. TAN, A. et al. Rapid fabrication of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) by photocopying. **Lab Chip**, v. 1, n. 1, p. 7-9, Set 2001.
 14. FERNANDES J.C.B.; 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.**, V.17, p. 643, 2006.
 15. ROBERTS, M. A. et al. UV Laser Machined Polymer Substrates for the Development of Microdiagnostic Systems. **Anal Chem**, v. 69, n. 11, p. 2035-42, Jun 1 1997.
 16. NÓBREGA, L. N., Integração de uma Coluna Redutora à um Microdispositivo Fluídico e Avaliação de Sistemas Miniaturizados na Determinação de Nitrito, Nitrato e Fosfato em Águas Naturais. **IQ-UnB**, Brasília, 2013.
 17. FONSECA, A. Construção e avaliação de microssistemas para análises em fluxo. IQ-UNICAMP, Campinas, 2008
 18. KHUDYAKOV, I. V.; SWIDERSKI, K. W.; GREER, R. W. Structure-property relations in UV-curable urethane acrylate oligomers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, n. 2, p. 489-494, 2006.
 19. FUJII, T. PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications, **Microelectronic Engineering**, V. 61–62, 907–914, 2002.
 20. FONSECA, A.; RAIMUNDO, I. M. Jr.; ROHWEDDER, J. J. R.; FERREIRA, L. O. S.; **Analytica Chimica Acta**, v. 603, p. 159-166, Nov 12 2007.
 21. WANG, H.Y; FOOTE R.S; JACOBSON, S.C; Schneibel J.H; RAMSEY J.M., Low temperature bonding for microfabrication of chemical analysis devices, **Sensors and Actuators B: Chemical**, V. 45, n 3, p. 199–207, Dez 15 1997.
-

-
22. BECKER, H.; LOCASCIO, L. E. Polymer microfluidic devices. **Talanta**, v. 56, n. 2, p. 267-87, Fev 11 2002.
23. VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Recent developments. **Anal Chem**, v. 76, n. 12, p. 3373-85, Jun 15 2004.
24. WEST, J. et al. Micro total analysis systems: latest achievements. **Anal Chem**, v. 80, n. 12, p. 4403-19, Jun 15 2008.
25. ARORA, A. et al. Latest developments in micro total analysis systems. **Anal Chem**, v. 82, n. 12, p. 4830-47, Jun 15 2010.
26. KUSWANDI, B. et al. Optical sensing systems for microfluidic devices: a review. **Anal Chim Acta**, v. 601, n. 2, p. 141-55, Oct 10 2007.
27. Disponível em <<http://www.elveflow.com/microfluidic-reviews-and-tutorials/electrochemistry-and-microfluidic>>. Acesso em 15/06/2013.
28. COLLIER, W. A.; HART, A. L., Electrochemical Detection in Microfluidic Devices, **1st International Conference on Sensing Technology** November 21-23, New Zealand, 2005.
29. NIE, Z., et al. Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices **Lab Chip**, v. 10, p. 477-483, Dez 9 2010.
30. SHI J., et al. Electrochemical Detection of Pb and Cd in Paper-Based Microfluidic Devices, **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23 n.6, Jun 2012.
31. BAKER, C. A. et al. Recent advances in microfluidic detection systems. **Bioanalysis**, v. 1, n. 5, p. 967-75, Aug 2009.
32. COLTRO, W. K. T., et al. Capacitively coupled contactless conductivity detection on microfluidic systems-ten years of development, **Anal. Methods**, v.4, p.25-33, Out 7 2012
33. SEGATO, T. P., Avanços no processo de fabricação de microdispositivos analíticos e em seu acoplamento com a detecção condutométrica sem contato, IQ-USP, São Carlos, 2011.
34. LIMA, R. S. et al. Contactless conductivity biosensor in microchip containing folic acid as bioreceptor. **Lab Chip**, v. 12, n. 11, p. 1963-6, Mai 8 2012.
-

-
35. MORAES, F. C. et al. Glass/PDMS hybrid microfluidic device integrating vertically aligned SWCNTs to ultrasensitive electrochemical determinations. **Lab Chip**, v. 12, n. 11, p. 1959-62, Mai 8 2012.
36. KUSWANDI, B. et al. Optical sensing systems for microfluidic devices: a review. **Anal Chim Acta**, v. 601, n. 2, p. 141-55, Out 10 2007.
37. BORGES, E. P, et al, Desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo para medidas por quimiluminescência, **Quím. Nova** v.25 n.6b Nov./Dez. 2002
38. VAZ, A. C. C., Desenvolvimento de um biossensor de ADN integrado num chip de microfluídica, **Universidade Nova de Lisboa**, 2012.
39. JINDAL, R.; CRAMER, S. M. On-chip electrochromatography using sol-gel immobilized stationary phase with UV absorbance detection. **J Chromatogr A**, v. 1044, n. 1-2, p. 277-85, Jul 30 2004.
40. NISHIHAMA, S.; YOSHIZUKA K., Urinary Assay Using Micro Flow Injection Analysis.
41. PETERSEN, N. J.; MOGENSEN, K. B.; KUTTER, J. P. Performance of an in-plane detection cell with integrated waveguides for UV/Vis absorbance measurements on microfluidic separation devices. **Electrophoresis**, v. 23, n. 20, p. 3528-36, Oct 2002.
42. STEIGERT, J. et al. Fully integrated whole blood testing by real-time absorption measurement on a centrifugal platform. **Lab Chip**, v. 6, n. 8, p. 1040-4, Ago 2006.
43. SCHWARZ, M. A.; HAUSER, P. C. Recent developments in detection methods for microfabricated analytical devices. **Lab Chip**, v. 1, n. 1, p. 1-6, Set 2001.
44. BISHOP, S. C.; LERCH, M.; MCCORD, B. R. Detection of nitrated benzodiazepines by indirect laser-induced fluorescence detection on a microfluidic device. **J Chromatogr A**, v. 1154, n. 1-2, p. 481-4, Jun 22 2007.
-

-
- 45.HELLMICH, W. et al. Single cell manipulation, analytics, and label-free protein detection in microfluidic devices for systems nanobiology. **Electrophoresis**, v. 26, n. 19, p. 3689-96, Out 2005.
- 46.HELLMICH, W. et al. Improved native UV laser induced fluorescence detection for single cell analysis in poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices. **J Chromatogr A**, v. 1130, n. 2, p. 195-200, Out 20 2006.
- 47.SHI, B.; HUANG, W.; CHENG, J. Determination of neurotransmitters in PC 12 cells by microchip electrophoresis with fluorescence detection. **Electrophoresis**, v. 28, n. 10, p. 1595-600, May 2007.
- 48.SCHROTT, W. et al. Detection of immunoglobulins in a laser induced fluorescence system utilizing polydimethylsiloxane microchips with advanced surface and optical properties. **Biomicrofluidics**, v. 5, n. 1, p. 14101, 2011.
- 49.PAIS, A. et al. High-sensitivity, disposable lab-on-a-chip with thin-film organic electronics for fluorescence detection. **Lab Chip**, v. 8, n. 5, p. 794-800, May 2008.
- 50.ZHAO, Y. et al. An LED-induced fluorescence detection system with integrated on-chip lens based on microfluidic chips technology/Ein LED-induziertes Fluoreszenzdetektionssystem mit integrierter „Lens-on-Chip“ basierend auf der mikrofluidischen Chiptechnologie. **Photonics and Lasers in Medicine**, v. 2, n. 1, 2013.
- 51.GARCIA-CAMPANA, A. M., Chemiluminescence in Analytical Chemistry, CRC Press, New York, 23/03/2001.
- 52.GARCIA-CAMPANA, A. M.; BAEYENS, M., Principles and recent analytical applications of chemiluminescence, **Analusis**, v. 28, N. 8, Luminescence spectroscopy: applications and recent trends p. 686 – 698, Out 2000
- 53.BARTOLONI, F. H. et al . Luz: um raro produto de reação. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 34, n. 3, 2011.
-

-
54. FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V.. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 25, n. 6a, Nov. 2002
55. Disponível em <<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Luminol.jpg>>, acesso em 28/07/2013.
56. Disponível em <<http://www.infoescola.com/bioquimica/bioluminescencia>> acessado em 28/07/2013
57. NERY, A. L. P.; BAADER, W. J.. Quimiluminescência de peróxidos orgânicos: geração de estados eletronicamente excitados na decomposição de 1,2-dioxetanos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 5, Out. 2001.
58. STEVANI, C. V; BAADER, W. J.. O sistema quimiluminescente peróxi-oxalato. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, Set. 1999.
59. OLIVEIRA, M. A., Estudo de mecanismos de quimi-excitação na composição induzida de peróxido: uma comparação entre sistemas inter e intramoleculares, **IQ-USP**, São Paulo , 2007.
60. RONSEIN, G. E., Oxidação do triptofano pelo oxigênio molecular no singlete [O₂(¹Δg)]: estudos mecanísticos envolvendo marcação isotópica, espectrometria de massa e quimiluminescência. **IQ-USP**, São Paulo, 2008.
61. XIMENES, V. F., Estudos de novos sistemas quimiluminescentes aplicados na determinação de atividade enzimática, **IQ-USP**, São Paulo, 2000.
62. BAEYENS, W. R. et al. Chemiluminescence-based detection: principles and analytical applications in flowing streams and in immunoassays. **J Pharm Biomed Anal**, v. 17, n. 6-7, p. 941-53, Set 1 1998.
63. VAN ZONEN, P. et al. HPLC detection of choline and acetylcholine in serum and urine by an immobilized enzyme reactor followed by chemiluminescence detection. **J Pharm Biomed Anal**, v. 5, n. 5, p. 485-92, 1987.
-

-
64. YAMAMOTO, Y.; AMES, B. N. Detection of lipid hydroperoxides and hydrogen peroxide at picomole levels by an HPLC and isoluminol chemiluminescence assay. **Free Radic Biol Med**, v. 3, n. 5, p. 359-61, 1987.
65. MESEGUER-LLORET, S.; MOLINS-LEGUA, C.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. Selective determination of ammonium in water based on HPLC and chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 536, n. 1-2, p. 121-127, 2005.
66. HARRIS, D. C., Quantitative Chemical Analysis, 6th. ed., Freeman, 2002.
67. GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. et al. Chemiluminescence detection coupled to capillary electrophoresis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 973-986, 2009.
68. YAQOOB, M. et al. Determination of nitrate and nitrite in freshwaters using flow-injection with luminol chemiluminescence detection. **Luminescence**, v. 27, n. 5, p. 419-25, set 2012.
69. YAQOOB, M. et al. Determination of nitrate and nitrite in freshwaters using flow-injection with luminol chemiluminescence detection. [**Acta Chimica Slovenica**, v. 58(3), p.569-575, 2011.
70. WABAIDUR, S. M. et al. Flow injection-chemiluminescence determination of dopamine using potassium permanganate and formaldehyde system. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 96, p. 221-5, Out 2012.
71. BASHAR R. M., et al. Miniaturized flow-injection-analysis (μ FIA) system with on-line chemiluminescence detection based on the luminol-hypochlorite reaction for the determination of ammonium in river water **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 87, n. 6, p. 425-436, 2007.
72. WANG, X.; YIN, X.; CHENG, H. Microflow injection chemiluminescence system with spiral microchannel for the determination of cisplatin in human serum. **Anal Chim Acta**, v. 678, n. 2, p. 135-9, Set 30 2010.
73. Disponível em <<http://www.medeiros.com.br/>>, acessado em 15/06/2013.
-

74. BACCAN, N. et al. **Química analítica quantitativa elementar**. 3. Ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2004.
75. RAMOS, Luiz Antônio; CAVALHEIRO, Carla Cristina Schmitt; CAVALHEIRO, Éder Tadeu Gomes. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, Out. 2006.
76. BORSATO, D., et al., TEORES DE NITRATOS E NITRITOS EM CONSERVAS DE CARNE COMERCIALIZADAS EMLONDRINA (PR), **Semina**, v. 10(4), p. 235-238, 1989.
77. Disponível em <<http://www.scienceinschool.org/print/2267>>, acessado em 15/08/2013.