



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

Janaína da Conceição Braga Silva

Dissertação de Mestrado

Orientador: Dr. Alexandre Fonseca

Brasília
Setembro de 2012



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

Desenvolvimento e Avaliação de um Microssistema Fluídico com Unidade de Difusão Gasosa Integrada

Janaína da Conceição Braga Silva

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, 04 de Setembro de 2012.

Agradecimentos

Quero agradecer a Deus por todas as bênçãos em minha vida.

Ao meu professor Dr. Alexandre Fonseca, que mais que professor, foi um exemplo de Educador, que me aceitou como sua aluna e que sempre esteve presente. Só tenho a agradecer o seu carinho, dedicação, amizade e educação.

À minha vó Merem, pelas inúmeras orações e companhia em todos esses anos.

À minha mãe querida que sempre me apoiou, me ofereceu toda a base para continuar nesse caminho, mesmo não sabendo muitas vezes o que faço, mas sempre com amor e carinho materno.

Ao meu pai, que mesmo distante, sempre acreditou em mim.

Aos meus irmãos, principalmente ao meu irmão André, que tenho muita gratidão, e respeito.

Às minhas amigas de infância, que sempre me fazem rir, e me alegram em nossos encontros de “luluzinha”.

Aos amigos de graduação, que mesmo distantes, um mais, outros nem tanto, sempre estiveram em meus pensamentos, orações e companhias.

Aos amigos de conversa e festa: Diego, Natasha, Pollyana, Joyce, Laylla, Everaldo, João, Caio e muitos outros que quero levar pra toda a vida...

Aos amigos do AQQUA (1 e 2) que sempre estão presentes nos momentos de conversa, de café, de viagens, de compras, de compartilhar trabalho e resultados.

Ao Instituto de Biologia/ UnB, pela disponibilidade do MEV, e aos funcionários receptivos que trabalham nele.

Aos que me esqueci de citar, mas que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho e na minha vida.

Ao DPP- UnB pelos auxílios em congressos nesses dois anos.

E a CAPES- Reuni pelo fornecimento da bolsa.

Muito obrigada mesmo!!!!

Resumo

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um Micro-Analisador de fluxo com unidade de difusão gasosa integrada. A fotolitografia profunda no ultravioleta foi empregada para gravar os canais (largura de 500 μm e profundidade de 440 μm) sobre duas placas de fotoresiste de Uretana-Acrilato (UA) e uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) foi adaptada entre as estruturas desenhadas para a manipulação das soluções doadora e aceptora. Para a realização de medidas de condutividade, três pares de eletrodos (seis fios de cobre com 0,5 mm de diâmetro) foram acoplados ao sistema, através de canais-guia, ortogonais ao canal de detecção. O dispositivo microfluídico proposto apresentou um volume interno total de 48 μL e suportou vazões de até 1,0 mL min^{-1} sem vazamentos ou rompimento da membrana. Os sinais analíticos obtidos para a determinação de bicarbonato em águas minerais demonstraram uma relação linear ($R^2 = 0,999$) para a faixa de concentração estudada (20 a 80 mg L^{-1}) proporcionando um limite de detecção (L.O.D.) de 2,3 mg L^{-1} com um desvio padrão relativo (RSD) de 2,5 % ($n = 5$) para injeções sucessivas de uma solução de referência com concentração de 80 mg L^{-1} . Um desempenho similar foi observado para a determinação de amônio em pastilhas medicinais ($R^2 = 0,998$, L.O.D. = 2,9 mg L^{-1} e RSD = 3,0 % ($n=5$)). Para ambas as aplicações, os resultados foram concordantes com aqueles obtidos por titulações potenciométricas (HCO_3^-) e espectrofotometria UV- Vis em batelada (NH_4^+). Adicionalmente, utilizando-se vazões de 40 $\mu\text{L min}^{-1}$ para as soluções aceptora e doadora, uma redução de aproximadamente 75 % na geração de resíduos foi calculada ao se comparar o micro- analisador com um sistema de análise em fluxo convencional. Estes resultados demonstraram a viabilidade de se desenvolver micro- analisadores de fluxo com unidade de difusão gasosa e detecção condutométrica.

Abstract

This work describes the development of a Flow Micro-analyzer with Integrated Gas Diffusion Unit. Deep ultraviolet photolithography was employed to engrave the channels (width of 500 μm and depth of 440 μm) on two plates of Urethane-Acrylate (UA) photoresist and a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane was attached between the structures designed for manipulation of donor and acceptor solutions, providing the on-line gas diffusion separations. In order to perform the conductivity measurements, three pairs of electrodes (six copper wires with 0.5 mm diameter) were coupled into guiding channels, orthogonal to detection channel. The proposed microfluidic device presented a total internal volume of 48 μL and supported flow rates up to 1.0 mL min^{-1} without leakages or membrane damages. Analytical signals obtained for the determination of bicarbonate in mineral waters demonstrated a linear relationship ($R^2=0.999$) for the concentration range studied (20 to 80 mg L^{-1}) providing a limit of detection (L.O.D.) of 2.3 mg L^{-1} with relative standard deviation (RSD) of 2.5 % ($n=5$) for successive injections of the 80 mg L^{-1} reference solution. Similar performance was observed for determination of ammonium in medicinal tablets ($R^2= 0.998$, L.O.D = 2.9 mg L^{-1} and RSD = 3,0 % ($n=5$)). For both applications, results agreed with those obtained by potentiometric titrations (HCO_3^-) and UV-Vis spectrophotometry (NH_4^+). In addition, by using a flow rate of only 40 $\mu\text{L min}^{-1}$ for donor and acceptor solutions, a reduction of approximately 75 % in residues generation was calculated by comparing the microanalyzer with a conventional flow analysis system. These results demonstrate the viability of developing micro flow analyzers with integrated gas diffusion unit and conductometric detection.

Índice

Folha de Rosto.....	II
Folha de aprovação.....	III
Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Lista de Abreviaturas e Acrônimos	IX
Lista de Figuras	X
Lista de Tabelas	XIII
1.- Introdução.....	1
1.1 - Microsistemas de análise.....	1
1.2 - Miniaturização de sistemas de análises em fluxo.....	3
1.3 - Sistemas analíticos miniaturizados, preparo de amostras e separação por membranas.....	6
1.3.1 - Separação por membranas.....	7
1.3.1.1 - Princípios Básicos.....	7
1.3.1.2 - Classificação das membranas.....	8
1.3.1.3. - Difusão Gasosa com membranas.....	12
1.3.1.4 - Microsistemas com unidades de separação por membrana.....	13
2.- Objetivos.....	15
3.- Parte Experimental.....	16
3.1 - Desenvolvimento dos microsistemas	16
3.1.1 - Construção de uma foto- expositora de radiação ultravioleta.....	16
3.1.2 - Microfabricação por fotolitografia profunda no UV.....	17
3.1.3 - Calibração do procedimento de fabricação.....	23
3.1.4 - Construção e avaliação preliminar de microsistemas com unidade de separação integrada.....	24
3.1.4.1 - Dispositivo com membrana de Uretana Acrilato	24
3.1.4.2 - Dispositivo com estruturas microfluídicas em placa única.....	27

3.1.4.3 - Dispositivos com membranas integradas entre duas estruturas microfluídicas.....	28
3.2 - Aplicação de Microdispositivos Fluídicos com Unidade de Difusão Gasosa Integrada para Determinações Analíticas.....	30
3.2.1 - Determinação de íons Bicarbonato em águas minerais.....	30
3.2.1.1 - Microsistema com Detecção Fotométrica.....	30
3.2.1.1.1 - Reagentes e Soluções.....	33
3.2.1.1.2 - Microsistemas com Detecção Condutométrica.....	34
3.2.1.2.1 - Reagentes e soluções.....	37
3.2.1.2.2 - Método de Referencia.....	37
3.2.2 - Determinação de íons Amônio em Pastilhas Medicinais.....	38
3.2.2.1 - Reagentes e soluções.....	38
3.2.2.2 – Método de Referencia.....	40
4 - Resultados e Discussão.....	41
4.1 - Fotolitografia em Uretana- Acrilato.....	41
4.2 - Calibração do procedimento de fabricação.....	42
4.3 - Construção e avaliação preliminar de microsistemas com unidade de separação integrada.....	48
4.3.1 - Microdispositivos com Membrana de Uretana Acrilato.....	48
4.3.2 - Dispositivo com estruturas microfluídicas em placa única...	50
4.3.3 - Dispositivos com membranas integradas entre duas estruturas microfluídicas.....	51
4.4 - Aplicação de Microdispositivos Fluídicos com Unidade de Difusão Gasosa Integrada para Determinações Analíticas.....	52
4.4.1 - Determinação de íons Bicarbonato em águas minerais.....	52
4.4.1.1 - Microsistema com Detecção Fotométrica.....	52
4.4.1.2 - Microsistema com Detecção Condutométrica.....	56
4.4.2 - Determinação de íons amônio em pastilhas medicinais.....	60
5 .- Conclusões e Perspectivas.....	63
6 - Referências Bibliográficas.....	64

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

Am - Amostragem

AM - Água Mineral

BP - Bomba peristáltica

BTB - Azul de Bromotimol

CFC - Célula de Fluxo Conduométrica

CFF- Célula de Fluxo Fotométrica

EC - Eletrodo de Cobre

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

FO- Fibra óptica

LED- Diodo emissor de luz

MEV - Micrografia eletrônica de varredura

PDMS - Polidimetilsiloxisano

PM - Pastilha Medicinal

PTFE - Politetrafluoretileno

PVC- Policloreto de Vinila

UA - Uretana Acrilato

UDG Unidade de Difusão Gasosa

UV/ UVA - Ultravioleta

μFIA - Microssistema de análise por injeção em fluxo

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

Lista de Figuras

Figura 1 - Processo básico de separação por membranas. Moléculas do analito (em vermelho) são isoladas das moléculas da fase doadora.....	7
Figura 2 - Representação das membranas em relação à morfologia (Adaptado de Habert et al ³⁹).....	8
Figura 3 - Micrografia eletrônica de varredura para uma membrana composta. (Adaptado de Mitra et al ⁴⁰).....	10
Figura 4 - Fotografia mostrando o interior da expositora ultravioleta.....	16
Figura 5 Fotografia da expositora com detalhe do suporte vazado.....	17
Figura 6 - Exemplo de uma máscara fotolitográfica empregada no processo de microfabricação.....	19
Figura 7 - Etapas do procedimento realizado para a formação dos canais a partir da Fotolitografia profunda no Ultravioleta. (a) Componentes da matriz fotolitográfica (b) Depósito do fotoresiste (c) Fechamento do conjunto. (d) Primeira etapa de exposição do conjunto à radiação UVA,(e) Segunda etapa de exposição do conjunto à radiação UVA (Ilustração retirada do trabalho de Fonseca et. al. ³⁰).....	20
Figura 8 - Esquema simplificado das etapas de exposição e revelação do resiste. Exposição para formação da base dos canais (a), exposição com regiões protegidas pela máscara (b) e estrutura obtida após a revelação (c). (Extraído de Fonseca et. al ³⁰).....	21
Figura 9 - Procedimento empregado para a selagem das estruturas. União das estruturas contendo um filme fino de resiste não polimerizado nas superfícies (A). Exposição à radiação UVA (B) e estrutura composta irreversivelmente selada (C).....	22
Figura 10 - Etapas de procedimento de selagem com uma placa polimérica sem canais: (a) fotopolimerização da placa, (b) placa com fina camada de resiste não polimerizado, (c) união com a estrutura microfluídica e (d) selagem da estrutura com exposição à radiação ultravioleta. (Extraído de Fonseca et. al. ³⁰).....	22
Figura 11 - <i>Layout</i> da máscara empregada para a calibração do procedimento de fabricação (valores referem-se às larguras das linhas em	

μm).....	23
Figura 12 - Exposição paralela (A) e perpendicular (B) das linhas da máscara em relação às lâmpadas.....	24
Figura 13 - Esquema de confecção da membrana de UA. a) Transferência do resiste sobre a matriz polimérica; b) Espalhamento do resiste sobre a superfície com uma lamínula; c) Disposição da placa de cobrimento sobre a matriz; d) Exposição de uma face do conjunto sob a radiação UVA por 60 segundos; e) Exposição da outra face do conjunto por 60 segundos.....	25
Figura 14 - <i>Layout</i> utilizado para o desenvolvimento de uma unidade de difusão gasosa.....	26
Figura 15 - Esquema de integração da membrana de UA às estruturas poliméricas. a) estrutura doadora, estrutura aceptora e a membrana de UA; b) União da membrana à matriz doadora; c) alinhamento e união das estruturas; d) selagem do conjunto formado por exposição à radiação UVA por 10 min.....	26
Figura 16 - <i>Layout</i> para o dispositivo com estruturas microfluídicas em placa única. Apresentando a fase doadora do microssistema com linhas em preto; a fase aceptora do microssistema com linhas em vermelho e a área de corte na cavidade central com linha tracejada em amarelo.....	27
Figura 17 - Procedimento de integração da membrana. a) Estrutura doadora, membrana e estrutura aceptora, respectivamente; b) Integração da membrana à estrutura doadora; c) Integração da estrutura aceptora ao conjunto fixado em b; d) selagem do conjunto por 10 minutos.....	29
Figura 18 - <i>Layout</i> das máscaras empregadas para a fabricação do dispositivo utilizado para a determinação de bicarbonato com detecção fotométrica. (A) Estrutura doadora, com canal para injeção hidrodinâmica (segmento AB) e bobina reacional; e (B) estrutura aceptora contendo a célula fotométrica de fluxo com caminho óptico de 5,0 mm.....	31
Figura 19 - Diagrama de fluxo para determinação de íons bicarbonato com detecção fotométrica. Bomba peristáltica (BP), V1-V4 Válvulas Solenóides desligadas (V1-V4), Descarte (D), “ <i>Plug</i> ” de amostragem 6,5 μL (Am), Unidade de Difusão gasosa (UDG). Linhas em vermelho (canais da fase doadora) e linhas em azul (canais da fase aceptora).....	32

Figura 20 - <i>Layout</i> da máscara utilizada para a construção da estrutura de manipulação da solução doadora contendo canais para a integração de eletrodos para detecção condutométrica.....	35
Figura 21 - Diagrama de fluxo para determinação de íons bicarbonato com detecção condutométrica. BP- bomba peristáltica, Am - <i>plug</i> de amostragem, UDG - Unidade de Difusão Gasosa, V1, V2, V3 e V4- - Válvulas solenóides de três vias, D - descarte, H ₂ SO ₄ como solução carreadora na fase doadora (linha em vermelho), Água destilada como solução carreadora na fase acceptora (linha em azul), Eletrodos de cobre ligados ao condutivímetro (linhas tracejadas).....	36
Figura 22 - Fotografia mostrando a montagem geral do sistema para realização dos estudos de difusão gasosa com o microssistema. Bomba peristáltica (A), Válvula solenóide (B), Microssistema com UDG (C), Condutivímetro (D), Circuito para controle das válvulas com interface eletrônica (E) e microcomputador (F).....	36
Figura 23 - Fotografia de um microssistema fluídico construído a partir da técnica de fotolitografia profunda no UV com uma nova expositora e novo resiste.....	41
Figura 24 - Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da seção transversal de canais expostos paralelamente à lâmpada de radiação. Diferentes aumentos foram utilizados e os valores indicados referem-se às larguras das linhas das máscaras empregadas.....	42
Figura 25 - Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da seção transversal de canais expostos perpendicularmente à lâmpada de radiação UV. Diferentes aumentos foram utilizados e os valores indicados referem-se às larguras das linhas das máscaras empregadas.....	43
Figura 26 - Micrografia óptica mostrando irregularidades na deposição do <i>Toner</i> para uma linha com 100 µm de largura. (Retirado do trabalho de Fonseca et. al. ³⁰).....	44
Figura 27 - Ilustração das medidas de largura (l) e profundidade (p) através da micrografia de um canal para calcular as dimensões encontradas nos canais.....	45
Figura 28 - Curvas de calibração relacionando as larguras das linhas da	

máscara fotolitográfica com a largura e profundidade dos canais medidos por MEV. Calibração por exposição paralela da largura (A) e profundidade (B) dos canais. Calibração por exposição perpendicular da largura (C) e profundidade (D) dos canais.....	47
Figura 29- Fotografia do microssistema com Membrana de Uretana Acrilato integrada.....	48
Figura 30 - Micrografia da membrana de UA. (A) Vista superficial do filme polimérico de UA. (B) Vista lateral do filme polimérico de UA.....	49
Figura 31 - Microssistema em placa única com membrana integrada. (A) Fotografia frontal do microdispositivo. (B) Fotografia lateral do microdispositivo.....	50
Figura 32 - Microssistema com membrana integrada entre duas estruturas microfluídicas.....	52
Figura 33 - Microsistemas com detecção fotométrica integrada. (A) UDG com cavidade central retangular (B) UDG com canais ondulados.....	53
Figura 34 - Diagrama para injeções de soluções padrão de bicarbonato (0,0 a 384 mg L ⁻¹ , indicações na figura) utilizando-se o microssistema com cavidade central (Figura 33-A) e o procedimento descrito na seção 3.2.1.1.....	54
Figura 35 - Diagrama para injeções de soluções padrão de bicarbonato (20 a 80 mg L ⁻¹ , indicações na figura) utilizando-se o microssistema com canais ondulados na UDG (Figura 33-B) e o procedimento descrito na seção 3.2.1.1.....	55
Figura 36 - Curva analítica construída com o microssistema com detecção fotométrica, para as soluções padrão na faixa de concentração de 20 a 80 mg L ⁻¹	56
Figura 37 - Microssistema com detecção condutométrica. (Am) plug de amostragem, (UDG) Unidade de difusão gasosa, (CFC) Célula de fluxo condutométrica e (EC) Eletrodos de cobre.....	56
Figura 38 - Diagrama para injeções de soluções padrão de bicarbonato (20 a 80 mg L ⁻¹ , indicações na figura) e as amostras de água mineral comercial (AM1, AM2 e AM3).....	58
Figura 39 - Curva analítica construída com o microssistema com detecção	

condutométrica, para as soluções padrão de bicarbonato na faixa de concentração de 20 a 80 mg L ⁻¹	58
Figura 40- Fiagrama para injeções de soluções padrão de amônio (0,0 a 40 mg L ⁻¹ , indicados na figura) e de amostras de pastilhas medicinais (PM1, PM2 e PM3).....	60
Figura 41 - Curva analítica construída com o microssistema com detecção condutométrica, para as soluções padrão de amônio na faixa de concentração de 10 a 40 mg L ⁻¹	61
Figura 42 - Fotografia das amostras de pastilhas medicinais utilizadas.....	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Medidas de largura e profundidade dos canais construídos por exposição paralela ou perpendicular de linhas com diferentes larguras....	45
Tabela 2 - Dimensões do dispositivo microfluídico proposto.....	57
Tabela 3 - Resultados para a determinação de íons bicarbonato em água mineral.....	59
Tabela 4 - Resultados para a determinação de íons amônio em pastilhas medicinais.....	62

1 - Introdução

1.1 - Microssistemas de análise

Nos últimos anos, a miniaturização de sistemas de análise tem surgido como tendência nas pesquisas sobre instrumentação e automação analítica. Características como a elevada frequência analítica (número de amostras processadas por tempo), a redução no consumo de reagentes e na geração de resíduos, além da portabilidade são alguns dos atrativos destes dispositivos que atendem aos conceitos da chamada Química Verde¹ e às exigências da sociedade moderna².

Na busca por metodologias menos agressivas ao meio ambiente e ao ser humano, associado aos princípios de miniaturização para a Química analítica, o conceito de microssistemas de análise total (μ TAS) foi proposto no início dos anos 1990 por Manz et al.³. Neste conceito, um pequeno “chip”, contendo estruturas micrométricas, é capaz de realizar todas as operações necessárias a um método analítico, desde o preparo de amostra até a detecção do analito. Para isto, estes dispositivos devem apresentar, de forma integrada, bombas, válvulas, reatores, unidades de separação e detectores que permitam automação de todo o processo analítico.

Embora a grande maioria dos microssistemas propostos não seja capaz de realizar todas as operações analíticas, portanto, não podem ser considerados como um μ TAS, a sua aplicação em determinações dedicadas tem se mostrado uma excelente alternativa para diversos métodos de análise. A literatura mostra a possibilidade de aplicação destes dispositivos, principalmente em monitoramentos de interesse clínico⁴ e ambientais⁵, com desempenho analítico bastante satisfatório.

Segundo Whitesides et al.⁶, o conjunto das tecnologias aplicadas para o controle de fluídos em estruturas com dimensões que variam de dezenas à centenas de micrometros é chamada de microfluídica. Em química analítica, esta ferramenta é empregada inicialmente para criar um arranjo de pequenos canais (sulcos) sobre um substrato sólido e, em um segundo momento, os

pequenos canais são selados para permitir a manipulação de volumes bastante reduzidos de soluções (da ordem de nL) durante as análises.

Muitas técnicas de microfabricação e materiais têm sido utilizados para este propósito. Ao se empregar materiais como quartzo, vidro e silício, utilizam-se, normalmente, as técnicas bem consolidadas para a fabricação de circuitos integrados (CI), como a corrosão por via úmida⁷ ou por via seca⁸, onde regiões específicas do substrato são atacadas por um banho químico ou por ação de um plasma, respectivamente. A selagem é normalmente efetuada unindo-se a placa que contém os canais com outra placa de substrato aplicando-se pressão e altas temperaturas.

Estas técnicas produzem canais bem definidos sobre materiais que são bastante inertes a ataques químicos. Apesar disto, estas técnicas costumam exigir o uso de equipamentos de alto custo e de condições especiais como sala “limpa” e reagentes em altas concentrações, o que inviabiliza o seu uso em laboratórios usuais de química.

Como alternativa para estas técnicas caras e laboriosas, tem se desenvolvido diversas estratégias de fabricação que utilizam polímeros como substrato. O uso de polímeros é considerado recente e apresenta vantagens do ponto de vista da diversidade, bem como da sua facilidade no desenvolvimento de dispositivos microfluídicos.

Devido ao grande número de polímeros disponíveis e às suas diferentes propriedades, existe hoje um grande número de técnicas para o desenvolvimento de estruturas microfluídicas nestes materiais. Microcanais podem ser gravados em polímeros sólidos como o polimetilmetacrilato (PMMA) e policarbonato empregando-se a micro-usinagem⁹, prensagem com molde à quente¹⁰, fotolitografia com laser¹¹, ablação por laser¹², entre outras. A selagem nestes materiais também costuma ser realizada com o auxílio de pressão e calor empregando-se uma placa do substrato que não contém canais.

Quando o material polimérico a ser utilizado para a fabricação das estruturas microfluídicas pode ser adquirido em uma forma líquida e transformado em um sólido, técnicas de fabricação como a moldagem e a fotolitografia¹³ podem ser utilizadas. Neste caso, microssistemas em poliuretano e polidimetilsiloxisano (PDMS) podem ser facilmente desenvolvidos.

Além do vidro, quartzo e polímeros a utilização de materiais como o papel¹⁴ e toner¹⁵ de impressoras tem sido proposta para o desenvolvimento de microssistemas de análise. Nestes casos, a principal vantagem está no custo extremamente baixo para o desenvolvimento das estruturas, o que permite a construção de dispositivos descartáveis.

1.2 - Miniaturização de sistemas de análises em fluxo

Sistemas de análises em fluxo consistem em uma alternativa elegante para a automação de procedimentos analíticos de via úmida. Estratégias como a Análise por Injeção em Fluxo (FIA)¹⁶, a Análise por Injeção Sequencial (SIA)¹⁷ e a Multicomutação¹⁸ tem sido empregadas de forma muito eficiente, ao longo das últimas quatro décadas, para muitas determinações analíticas¹⁸. Nestes sistemas, as soluções de trabalho são guiadas em pequenos tubos (usualmente de politetrafluoretileno (PTFE)) os quais são conectados a bombas e válvulas que permitem o domínio de todo o fluxo. Reatores, unidades de preparo de amostra e detectores, desenhados especificamente para o uso nestes sistemas, são empregados para permitir a realização de todas as etapas do método analítico de forma rápida e econômica.

A literatura mostra que sistemas de análise em fluxo são especialmente interessantes para determinações analíticas de rotina, nas quais um grande número de amostras deve ser processado por hora^{19,20}. Sistemas FIA ou SIA costumam permitir a análise de 30 a 100 amostras h⁻¹, aproximadamente, dependendo do tipo de aplicação. Além disso, o consumo de reagentes e a geração de resíduos é bastante baixa se comparada com os procedimentos realizados em batelada (utilizando equipamentos e vidrarias usuais de laboratório), o que caracteriza a redução nos custos das análises e a adequação do procedimento as exigências ambientais^{19,20,21}.

Deve-se destacar ainda que automação dos procedimentos, a partir destas estratégias, costuma reduzir os erros e os riscos associados às análises. Todas as operações podem ser realizadas de maneira reprodutiva sem envolvimento direto do operador, o que também minimiza o seu contato com reagentes ou produtos nocivos.

Embora estas características, por si só, representem um grande avanço para a automação em Química Analítica, muitos pesquisadores tem investigado a possibilidade de miniaturização de sistemas de análises em fluxo como forma de melhorar, ainda mais, o seu desempenho. Acredita-se que a redução no tamanho do sistema como um todo pode possibilitar ganhos significativos principalmente no que se refere ao consumo de reagentes, geração de resíduos, freqüência analítica e portabilidade, sem que haja, no entanto, alteração na resposta analítica destes dispositivos em relação aos sistemas em fluxo usuais²².

Ruzicka e Hansen propuseram um dos primeiros trabalhos sobre a miniaturização de um sistema FIA. Os pequenos canais (0,8 mm), o sistema de amostragem e os detectores foram gravados em um bloco de PVC, usando a técnica de moldagem por pressão a quente²³. Os autores avaliaram o desempenho do dispositivo para os procedimentos normalmente realizados em sistemas FIA como a amostragem, a detecção espectrofotométrica ou potenciométrica e a separação com membranas ou com colunas de troca iônica. Em todos os casos, foram observados desempenhos analíticos satisfatórios, mas não houve vantagens significativas no uso do sistema miniaturizado em relação aos sistemas convencionais no que se refere ao consumo de reagentes e amostras e freqüência analítica.

Uma série de materiais e de técnicas de microfabricação tem sido utilizada para o desenvolvimento de sistemas de análise em fluxo miniaturizados. Romoli et al.²⁴ propuseram o uso da ablação à laser para o desenvolvimento de microreatores e de micro-misturadores à base de PMMA que podem ser acoplados à sistemas em fluxo. Uma empresa holandesa denominada CHEMTRIX²⁵ oferece microreatores de vidro construídos por corrosão por via úmida^{7,8}, os quais podem ser utilizados em sistemas miniaturizados de análise em fluxo.

Almeida et al.²⁶ desenvolveram um microssistema de análise em fluxo em cerâmica com detecção potenciométrica integrada. O dispositivo foi avaliado para a determinação de sulfametoxazol, para o qual se estimou um limite de detecção de 3,85 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os autores mostraram ainda que o sistema é capaz de realizar a análise de 36 amostras h^{-1} com um consumo de apenas 3,3 mL de reagente por amostra analisada.

Songjaroen et al.²⁷ construíram um microssistema de análise em fluxo portátil utilizando o PDMS como substrato. O dispositivo foi aplicado para a determinação de creatinina em urina utilizando a detecção espectrofotométrica a partir de uma célula de fluxo integrada ao dispositivo. Os autores identificaram uma boa correlação linear para a curva de calibração (0 a 40 mg L⁻¹) e um limite de detecção de 3,3 mg L⁻¹. Apesar destes resultados, os autores não relataram se houveram vantagens no uso do dispositivo em relação aos sistemas em fluxo não miniaturizados.

Um microssistema de análise por injeção em fluxo (μ FIA) construído em vidro e PDMS foi desenvolvido por Al- Gailani et al.²⁸ para a determinação de amônia em águas naturais. O bombeamento eletrosmótico foi empregado para a manipulação das soluções e um detector integrado para medidas de quimiluminescência foi utilizado para aquisição do sinal analítico. O comportamento linear encontrado para a faixa de concentração de trabalho (0,0 a 0,5 μ g mL⁻¹) permitiu a determinação do analito em amostras reais com desempenho similar a de um sistema FIA convencional, mas com redução significativa do consumo de reagentes.

Fernandes e Ferreira²⁹ desenvolveram módulos misturadores e reatores microfluídicos por fotolitografia profunda no ultravioleta (UV), utilizando um fotoresiste (resina fotopolimerizável) baseado nos oligômeros Uretana e Acrilato (UA). Os microdispositivos elastoméricos foram selados com uma nova placa de UA pela aplicação de uma fina camada de fotoresiste não polimerizado sobre uma placa sem canais, seguida da união com a placa que continha os canais e da exposição do conjunto à radiação ultravioleta. Os autores relataram que este fotoresiste é usualmente utilizado para a fabricação de carimbos, de modo que as estruturas microfluídicas podem ser fabricadas de forma rápida (em poucos minutos) sem a necessidade de materiais caros e de condições especiais.

De fato, a partir desta proposta realizada por Fernandes e Ferreira²⁹, novos estudos foram desenvolvidos por pesquisadores brasileiros com o objetivo de aprimorar a técnica de fabricação com UA e desenvolver microssistemas de análise em fluxo.

Fonseca et al. demonstraram o uso desta técnica de fabricação para o desenvolvimento de dispositivos de análise por injeção em fluxo com detecção

fotométrica³⁰ ou fluorimétrica³¹ integradas. Os microssistemas foram avaliados na determinação de íons cloreto em águas minerais, íons Cr^{6+} em águas subterrâneas contaminadas e de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} em águas naturais. Para todas as aplicações foram observados desempenhos analíticos similares ao obtidos com sistemas FIA, acompanhadas de reduções significativas (maiores que 100%) na geração de resíduos.

Monte Filho et al.³² utilizou a mesma técnica e materiais para a construção de um microanalisador em fluxo-batelada (*Flow- Batch*). O dispositivo foi aplicado com sucesso para a determinação de Fe (II) em medicamentos por detecção fotométrica.

1.3 - Sistemas analíticos miniaturizados, preparo de amostras e separação por membranas

Um dos grandes desafios dos pesquisadores que realizam estudos sobre sistemas analíticos miniaturizados está no desenvolvimento de dispositivos capazes de realizar algum tipo de preparo de amostra. Devido às dificuldades encontradas durante o procedimento de microfabricação, torna-se relativamente difícil realizar a integração destes procedimentos aos dispositivos fluídicos, o que pode limitar a sua aplicação à poucas amostras de baixa complexidade que não exigem *clean-up*, extração, pré-concentração e derivatização, entre outras etapas prévias normalmente indispensáveis para a determinação das espécies de interesse^{33,34}. Vale ressaltar ainda que a integração de procedimentos que envolvem o uso de colunas empacotadas para a extração em fase sólida ou para a derivatização do analito, além dos procedimentos que envolvem a separação através de membranas seletivas são especialmente problemáticos em sistemas analíticos miniaturizados, uma vez que o emprego de materiais diferentes daqueles utilizados como substrato base para a construção dos dispositivos costumam dificultar a sua confecção, principalmente durante a etapa de selagem dos dispositivos³⁵.

Dentre as diversas estratégias empregadas para o preparo de amostras, uma das mais simples e eficientes é a separação por membranas. A vida útil relativamente longa e as facilidades para a manipulação, limpeza e automação,

além do baixo custo, são algumas das características dos processos de separação por membranas que contribuem para o seu uso extensivo em Química Analítica³⁶.

A seguir, serão descritas brevemente algumas características de membranas utilizadas para separações analíticas e alguns trabalhos recentes envolvendo microssistemas de análise com unidades de separação por membranas integradas.

1.3.1- Separação por membranas

1.3.1.1 - Princípios Básicos

Segundo a IUPAC³⁷, uma membrana pode ser definida como uma estrutura que possui uma espessura muito menor que as suas dimensões laterais, através da qual ocorrerá a transferência de massa sob a ação de uma força motriz (gradientes de concentração, pressão e/ou potencial elétrico).

As espécies de interesse atravessam a membrana de uma fase doadora (usualmente uma matriz complexa) para uma fase aceptora, líquida ou gasosa, sendo completamente ou parcialmente separada das outras substâncias que compõem a matriz.

O transporte de massa que ocorre nesta permeação somente ocorrerá por ação de alguma força motriz, que se desenvolve entre as superfícies da referida membrana. A Figura 1 traz uma ilustração geral deste processo de separação.

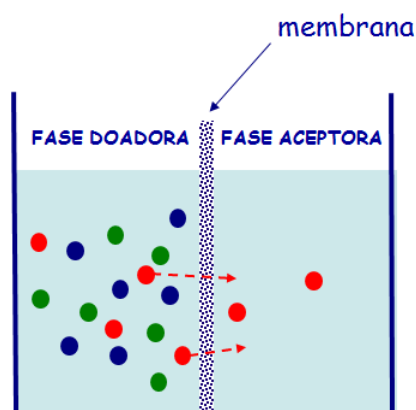


Figura 1 - Processo básico de separação por membranas. Moléculas do analito (em vermelho) são isoladas das moléculas da fase doadora.

Em Química Analítica, assim como em processos industriais, as membranas devem apresentar elevadas permeabilidade e seletividade, resultando em separações mais rápidas, eficientes e específicas para certa substância ou classe de substâncias. Estas características estão intimamente relacionadas com as propriedades do material tais como sua morfologia, composição, estrutura e geometria, devendo-se considerar também o processo de transporte de massa envolvido na separação.

1.3.1.2 - Classificação das membranas

As membranas apresentam diferentes composições, tanto de origem orgânica (polimérica), quanto de origem inorgânica (cerâmicas, metais), porém para a utilização em separações analíticas são comumente utilizadas as poliméricas sintéticas. Estas possuem além da seletividade e permeabilidade adequadas, elevadas resistência química, térmica e mecânica e costumam ser mais baratas que as inorgânicas^{38,39}.

De uma forma geral, as membranas são classificadas em porosas, densas e compostas. A Figura 2 representa esta classificação em relação à morfologia.

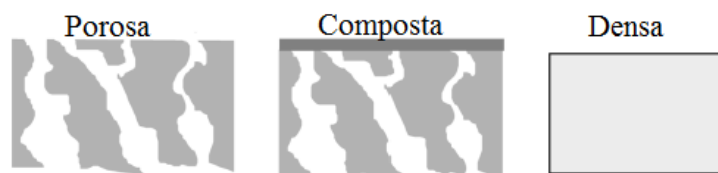


Figura 2 - Representação das membranas em relação à morfologia (Adaptado de Habert et al³⁹)

As membranas densas são aquelas que não apresentam poros, e as porosas, justificando o próprio nome, possuem poros. As membranas compostas, de uma maneira geral, são consideradas densas, pois apresentam uma camada superficial (com espessura na ordem de 1 μm) denominada pele, a qual é suportada em um substrato (poroso). A pele não apresenta poros e contribuirá fortemente para uma maior seletividade da membrana.

A separação das espécies de interesse através de membranas porosas ocorre por exclusão por tamanho, sendo as espécies maiores retidas na fase doadora e as espécies menores transportadas através das fendas (poros) até a fase aceptora. Algumas características como a porosidade superficial, o tamanho e a distribuição dos poros, assim como o tamanho das espécies presentes na fase doadora irão afetar a capacidade seletiva deste tipo de membrana, as quais são normalmente utilizadas em processos como a microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e diálise³⁹.

Mas, vale salientar, que os processos de filtração são normalmente auxiliados por um gradiente de pressão, favorecendo o transporte de massa por convecção. Já na diálise, a transferência ocorre fundamentalmente por um mecanismo de difusão devido a um gradiente de concentração desenvolvido ao longo da membrana.

As membranas porosas são consideradas de baixa seletividade. Isto ocorre, pois, espécies com características químicas diferentes, mas com tamanhos similares, serão concomitantemente extraídas para a fase aceptora. Em contrapartida, os fluxos de transferência de massa costumam ser elevados para este tipo de membrana, uma vez que não há interações das espécies a serem separadas com o material da membrana.

Com relação às membranas densas, as características físico-químicas do substrato serão determinantes para a separação eficiente das espécies de interesse. O transporte de massa nestas membranas é realizado pela sorção das espécies no polímero (adsorção e absorção das espécies na superfície limite da membrana), seguida da difusão ao longo desta e por fim a dessorção ou evaporação (no caso da pervaporação) para a outra fase⁴⁰.

A elevada seletividade alcançada com este tipo de membrana está relacionada com a diferença de solubilidade das espécies no material polimérico (parâmetro termodinâmico) e com as diferentes velocidades de difusão destas espécies ao longo da seção transversal (parâmetro cinético).

A permeabilidade, apesar de ser intrínseca ao material, pode ser influenciada pela temperatura, história térmica do polímero e cristalinidade, do tipo de gás e das condições utilizadas na permeação. Deve-se salientar também que a permeabilidade pode ser influenciada por reações envolvendo

as espécies a serem separadas, os solventes das fases doadora e aceptora e o polímero constituinte da membrana.

As membranas densas são mais seletivas, quando comparadas às porosas, uma vez que o processo de separação envolve a interação da espécie de interesse com o material da membrana. Apesar disso, o fluxo de transferência de massa neste tipo de membrana costuma ser bem menor do que aquele encontrado para as membranas porosas.

Em concomitância das qualidades observadas tanto nas membranas porosas, quanto nas densas, isto é, o alto fluxo de transferência de massa e boa seletividade, respectivamente, contribuíram para o desenvolvimento das membranas compostas.

Estas membranas apresentam dois ou mais tipos de polímeros em sua morfologia, um para a pele (parte superficial desta membrana) e outro para o suporte (região mais interna da membrana). Geralmente, a pele é composta de um polímero com estrutura densa, sendo, portanto, a camada seletiva da membrana composta, enquanto o suporte (normalmente poroso) confere um fluxo maior de espécies durante a separação. Na Figura 3 é apresentada a micrografia eletrônica de varredura (MEV) de um exemplo de membrana composta de polipropileno e poliamida.

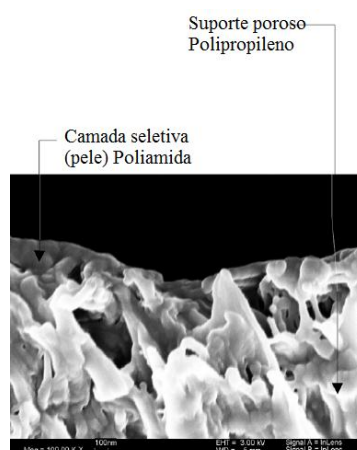


Figura 3 - Micrografia eletrônica de varredura para uma membrana composta. (Adaptado de Mitra et al⁴⁰)

Devido a estas propriedades, existe um grande interesse da comunidade científica no uso e desenvolvimento de membranas compostas, o que pode ser

o observado pelo elevado número de trabalhos que tratam da síntese⁴¹ e aplicação⁴² destes materiais.

A geometria das membranas também é outro fator que pode ser utilizado para a sua classificação. Deste modo, duas categorias são normalmente observadas, as planas e as de fibra oca. A primeira categoria consiste em um filme fino do polímero, o qual é normalmente fixado entre o fluido da matriz e o fluido extrator (acceptor). Por sua vez, as membranas ocas consistem um capilar ou uma fibra fabricada em material polimérico (di =600 a 1200 μm) em que a solução acceptora, usualmente, flui na parte interior do capilar, enquanto que a solução doadora flui na parte externa deste tubo. Os materiais mais utilizados nas membranas de fibra oca para separações analíticas são polipropileno, silicone, politetrafluoroetileno (PTFE), polivinilidenofluorida (PVDF), e polisulfona (PS). As membranas planas, geralmente, são usadas para os processos de filtração, e por isso, são porosas e usualmente, são constituídas de acetato de celulose e PTFE.

A literatura mostra que separações analíticas que empregam membranas são amplamente utilizadas para o preparo de amostras biológicas, ambientais⁴³, alimentícias⁴⁴, combustíveis⁴⁵ e apresentam eficiência comparáveis ou melhores aos métodos clássicos. Além disso, as membranas também são empregadas em processos de diálise⁴⁶, nanofiltração⁴⁷, permeação gasosa⁴⁸ e osmose reversa⁴⁹, pervaporação⁵⁰.

1.3.1.3. - Difusão Gasosa com membranas

Uma das principais técnicas utilizadas no processo de separação por membranas em sistemas de análises em fluxo é a difusão gasosa. Neste processo, as membranas porosas planas são bastante empregadas, permitindo que moléculas gasosas presentes na fase doadora (líquida ou gasosa) sejam transportadas até a fase acceptora (líquida) sob a ação de um gradiente de pressão que se desenvolve através da membrana. Para este tipo de separação, utiliza-se normalmente uma unidade de difusão gasosa (UDG), na qual a membrana é fixada entre os canais gravados na superfície de dois blocos planos construídos em PTFE ou em acrílico⁵¹.

É importante observar que, neste processo de separação, as membranas comumente utilizadas, apresentam características hidrofóbicas, sendo as fases doadora e aceptora aquosas. Nesta configuração, há a formação de uma fina camada gasosa entre as superfícies da membrana porosa (como, por exemplo, de PTFE), capacitando as espécies gasosas em permear de uma fase para a outra, mas também impedindo o contato entre as fases, devido ao gás preso nos poros da membrana hidrofóbica utilizada.

Geralmente, as separações analíticas são integradas aos sistemas de análise em fluxo para melhorar a seletividade dos métodos analíticos, assim como o desempenho das espécies químicas pré-concentradas^{52,53}. Um interessante trabalho sobre difusão gasosa é apresentado por de Oliveira et al.⁵⁴, em que foi baseado na construção de diferentes unidades de difusão gasosa em PMMA, para a determinação de íons bicarbonato em águas minerais comerciais em um sistema automatizado com detecção espectrofotométrica.

1.3.1.4 - Microssistemas com unidades de separação por membrana

Ultimamente, as membranas têm sido utilizadas em sistemas de análises em fluxo automatizado, como a análises por injeção em fluxo (FIA)^{41,52,53,57} ou a análise por injeção sequencial (SIA)^{50,55,56,57}.

A automação deste tipo de separação é justificada pelas características intrínsecas aos processos automatizados tais como, o regime dinâmico, a possibilidade de altas recuperações do analito, a minimização da contaminação do analista, a redução no consumo de reagentes e amostras, a frequência analítica, entre outros^{56,57}. Além disso, a possibilidade de acoplar outros dispositivos para o tratamento da amostra no sistema automatizado e a facilidade de hifenização com diversas técnicas de detecção favorecem a integração de unidades de separação por membranas aos sistemas on-line.

Apesar de todas as vantagens apresentadas por estes microdispositivos fluídicos, a integração desta unidade de separação ao microssistema ainda é uma etapa que apresenta dificuldades, uma vez que as técnicas de

microfabricação tendem a restringir o uso de outros materiais que aqueles utilizados para obter a estrutura principal do microdispositivo.

Considerando estes aspectos, estudos recentes têm conduzido para a integração da unidade de separação por membrana aos microdispositivos fluídicos.

Ruzicka e Hansen ⁵⁸ propuseram um dos primeiros trabalhos de μ FIA, com uma unidade de separação por membrana. Eles descreveram, dentre os vários componentes integrados aos microdispositivos propostos, um dispositivo microfluídico com uma unidade de difusão gasosa integrada. Esta continha uma membrana de policloreto de vinila (PVC), apresentando uma área de 10 mm², e detecção potenciométrica para determinar CO₂ em sangue. Sugeriram também, que o dispositivo poderia ser aplicado para quaisquer espécies difusíveis, como SO₂, NH₃.

Shameli et al. ³⁵ descreveram a construção de um chip de Quartzo/ SU-8 integrado com uma membrana de polidimetilsiloxano (PDMS), usada para separar os eletrólitos nos reservatórios dos canais de amostragem para a separação eletroforética de proteínas. Um reforço especial (furos na estrutura externa da membrana para a selagem) para selar a estrutura híbrida foi requerido para evitar vazamentos, mesmo em baixas pressões.

Kaufman et. al. ⁵⁹ apresentaram o desenvolvimento de um separador microfluídico construído com duas placas de polimetilmetaacrilato (PMMA) e uma membrana de PDMS. Eles demonstraram a possibilidade do uso da tecnologia microfluídica para o desempenho de separações sob alta pressão como a Osmose reversa (OR) e a Nanofiltração (NF). Em estudos propostos por Nge et. al. ⁶⁰, uma membrana de carga iônica negativa foi fotopolimerizada em uma área pontual de um microcanal (PMMA) e usada para separar proteínas baseada tanto no tamanho quanto na carga das moléculas.

Bowser et al. ⁶¹ propuseram um microdispositivo em que uma membrana de policarbonato disposta em sanduíche com canais de PDMS, para a purificação do DNA através da diálise contra corrente de pequenas sequencias genômicas. Neste trabalho, os canais foram fotolitografados com SU8-2050 (Fotoresiste vindo do SU-8, comumente utilizado em técnicas fotolitográficas), e o fotoresiste negativo é fotogravado pela técnica de “*spin coating*”. A membrana foi colocada sobre estas placas e o dispositivo foi selado a quente.

Considerando os aspectos discutidos até agora, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um microsistema fluídico com uma unidade de difusão gasosa construído em fotoresiste à base de Uretana-Acrilato e à sua avaliação em determinações analíticas de íons bicarbonato em águas minerais e íons amônio em pastilhas medicinais.

2 - Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de microssistemas de análise em fluxo à base de Uretana- Acrilato integrados com unidades de difusão gasosa por membranas. Foi também objetivo do trabalho avaliar o desempenho analítico dos dispositivos propostos na determinação de espécies químicas facilmente convertidas em substâncias gasosas empregando-se a detecção fotométrica ou condutométrica.

3 - Parte experimental

3.1- Desenvolvimento dos microssistemas

3.1.1 - Construção de uma foto-expositora de radiação ultravioleta

Todos os dispositivos microfluídicos desenvolvidos neste trabalho foram construídos a partir de uma expositora construída no próprio laboratório. Para isto, duas lâmpadas do tipo “luz negra” da marca Philips modelo TL-D 15 W Actinic BL (380 nm) foram afixadas no fundo de uma caixa plástica preta com dimensões de 52 cm x 24 cm x 19,5 cm. Na mesma caixa, foi acoplado também o reator de alimentação das lâmpadas assim como uma pequena ventoinha para resfriamento da câmara. A Figura 4 mostra uma fotografia do interior da expositora com indicação dos seus componentes.

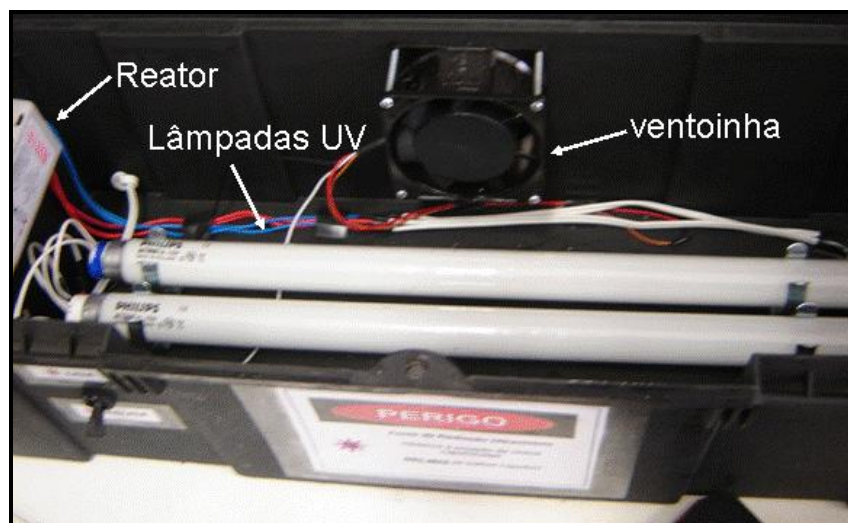


Figura 4- Fotografia mostrando o interior da expositora ultravioleta.

A 10 cm acima das lâmpadas foi adaptada uma base vazada de madeira para suporte do conjunto fotolitográfico contendo a máscara fotolitográfica e a resina fotopolimerizável durante o procedimento de construção. A Figura 5 mostra uma fotografia deste suporte com detalhe da região vazada.



Figura 5- Fotografia da expositora com detalhe do suporte vazado.

3.1.2 - Microfabricação por fotolitografia profunda no UV

Conforme citado anteriormente, o processo de microfabricação empregado neste trabalho para a construção dos microssistemas utilizou uma resina fotopolimerizável (resiste) à base de Uretana- Acrilato (UA), a qual é normalmente utilizada para a confecção de carimbos. Atualmente, há no mercado uma variedade considerável de resinas à base de UA, as quais podem apresentar diferentes teores de solventes e monômeros, afetando sobremaneira a velocidade de polimerização e o aspecto final do produto.

O resiste utilizado nos microssistemas desenvolvidos por Fonseca et al.³⁰ e Fernandes e Ferreira²⁹ era distribuído pela indústria de carimbos Medeiros Ltda. (São Paulo), com o código de distribuição M50-LBS. Porém, desde o início de 2010 a referida empresa descontinuou o fornecimento deste material, sendo o mesmo substituído por um similar com código de distribuição G50-LBS. É importante destacar que, para nenhum dos resistes, a empresa fornece informações sobre a sua composição por considerá-las “um segredo industrial”.

Devido a esta alteração, diferentemente do usado por Fonseca et al.³⁰, todos os dispositivos desenvolvidos neste trabalho foram construídos com o

resiste G-50 LBS. É importante salientar que, a nova resina utilizada apresenta características similares à M50 LBS como a resistência às soluções concentradas de ácidos e bases, mas também a ataques de alguns solventes orgânicos normalmente empregados em métodos de extração.

O processo de fabricação dos microssistemas empregado neste trabalho pode ser dividido em três etapas:

- 1ª) Montagem das matrizes fotolitográficas.
- 2ª) Gravação e Revelação dos canais.
- 3ª) Selagem das estruturas.

A seguir, serão descritas brevemente cada uma destas etapas.

1ª Etapa: Montagem das matrizes fotolitográficas:

Na parte inicial do processo de fotolitografia foi realizada a confecção das matrizes fotolitográficas que definiram as estruturas efetivamente gravadas em baixo relevo sobre o resiste.

Primeiramente, um desenho bidimensional da estrutura microfluídica desejada foi projetada a partir do software gráfico AutoCAD 2002 (AutoDesk®). Este desenho definia o tamanho dos canais e o arranjo de todos os componentes efetivamente empregados no microssistema como o “plug” de amostragem, bobina de reação, unidade de difusão gasosa e sistema de detecção.

A máscara fotolitográfica foi obtida então pela impressão deste desenho em uma transparência (PLTA4 - Abezeta), utilizando uma impressora a laser (P2055dn - HP LaserJet), com resolução de 1200 pontos polegadas. Na Figura 6 é mostrado o exemplo de um *layout* impresso empregado para a fabricação de um microssistema fluídico.

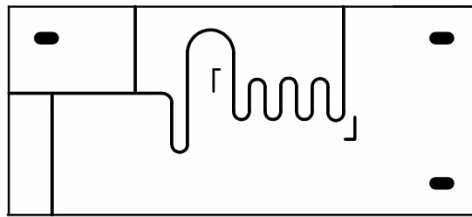


Figura 6 - Exemplo de uma máscara fotolitográfica empregada no processo de microfabricação.

Para finalizar a montagem da matriz fotolitográfica, a máscara (transparência) foi devidamente unida com auxílio de fita adesiva dupla face à uma placa de acrílico e a uma moldura de borracha, ambas com 2,0 mm de espessura (Figura 3.1.2.2 - A), para permitir o depósito do resiste (líquido) previamente a polimerização. É importante relatar que a face impressa da máscara ficou voltada para a placa de acrílico, o que permitiu a sua reutilização após a devida limpeza, evitando o desgaste da impressão e a perda do *layout*.

2ª. Etapa: Gravação e Revelação dos Canais

Nesta etapa, o resiste líquido foi inicialmente depositado lentamente sobre a matriz fotolitográfica até o preenchimento do volume definido pela moldura de borracha (Figura 7- A). Durante o procedimento, foi importante evitar a formação de bolhas que poderiam interferir na formação dos canais e na polimerização do resiste. Antes da exposição à radiação UV, uma segunda placa de acrílico, com as mesmas dimensões da primeira, foi colocada vagarosamente sobre o resiste para o fechamento do conjunto (Figura 7- C). Em seguida, o conjunto foi fixado com grampos apropriados, sendo eliminados eventuais excessos de resiste das extremidades com auxílio de papel absorvente.

Para efetuar a gravação dos canais, o resiste que preenche a matriz fotolitográfica foi exposto à radiação UVA em duas etapas empregando-se diferentes tempos de exposição. Por se tratar de um resiste diferente daquele utilizado por Fonseca et al.³⁰, além de se utilizar uma expositora diferente da utilizada por esses autores, foi necessária a otimização destes tempos, os

quais são fundamentais para a perfeita formação das estruturas assim como para a selagem de todo o dispositivo.

Na primeira etapa, necessária para a formação da base dos canais, o conjunto foi exposto por 120 s através da face sem a máscara fotolitográfica (Figura 7 -D), evitando que a mesma produzisse sombras sobre o resiste. Na segunda etapa (Figura 7- E), o conjunto foi exposto pelo lado oposto ao da primeira etapa, por 20 segundos, permitindo que apenas as regiões não protegidas pela máscara fotolitográfica fossem polimerizadas.

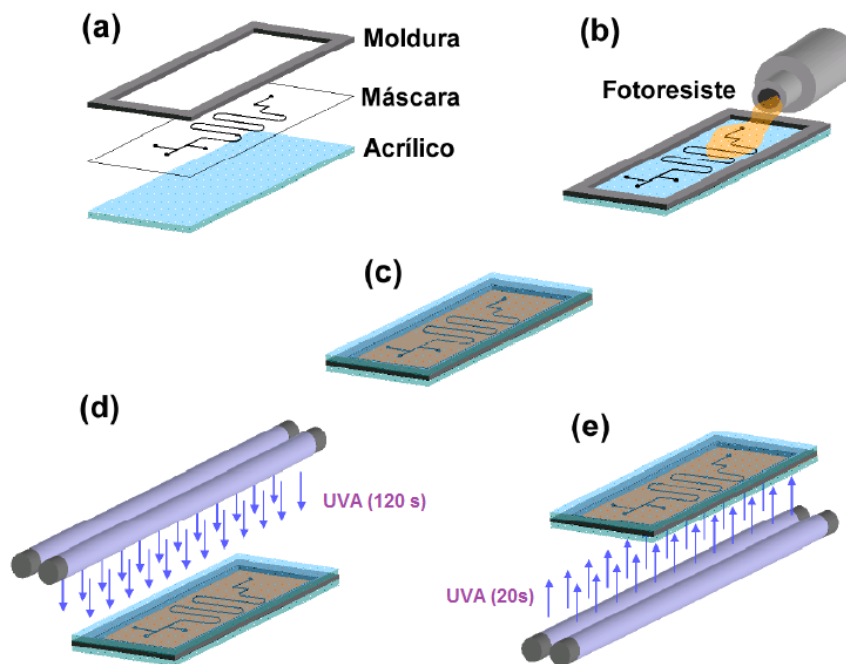


Figura 7 - Etapas do procedimento realizado para a formação dos canais a partir da Fotolitografia profunda no Ultravioleta. (a) Componentes da matriz fotolitográfica (b) Depósito do fotoresiste (c) Fechamento do conjunto. (d) Primeira etapa de exposição do conjunto à radiação UVA, (e) Segunda etapa de exposição do conjunto à radiação UVA (Ilustração retirada do trabalho de Fonseca et. al.³⁰)

Após a etapa de exposição, foi realizada a revelação das estruturas microfluídicas, a qual consiste na eliminação do resiste não polimerizado das regiões que foram protegidas pela máscara. Para isto, a placa polimérica recém fotolitografada foi retirada cuidadosamente da matriz fotolitográfica e sonicada por 10 minutos em um banho ultrassônico (USC 1400, Unique) com solução aquosa de detergente comercial 25 % (v/v). Na metade deste tempo, a sonicação foi interrompida para que eventuais excessos de resiste fossem eliminados com o auxílio de um pincel de cerdas macias.

Terminada a etapa de revelação, a estrutura foi lavada com água de torneira seguida da lavagem com etanol comercial em abundância. Feito isto, um pequeno secador de cabelos foi empregado para a secagem da estrutura, a qual foi então acondicionada em um reservatório hermeticamente fechado para evitar a agregação de partículas de poeira. Neste ponto, a estrutura estava pronta para a realização do procedimento de selagem.

A Figura 8 ilustra um resumo das etapas de gravação e revelação das estruturas microfluídicas.

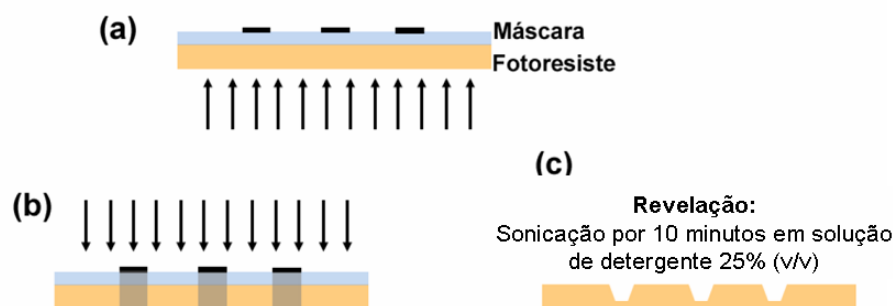


Figura 8 - Esquema simplificado das etapas de exposição e revelação do resiste. Exposição para formação da base dos canais (a), exposição com regiões protegidas pela máscara (b) e estrutura obtida após a revelação (c). (Extraído de Fonseca et. al.³⁰)

3ª. Etapa: Procedimento de selagem das estruturas:

Conforme será discutido mais adiante, a maioria das estruturas microfluídicas desenvolvidas neste trabalho foram seladas pela união de duas placas poliméricas contendo canais. Com o controle do tempo de exposição relatado na 2ª Etapa (120 segundos para a primeira exposição e 60 segundos para a segunda exposição), as superfícies das placas poliméricas apresentaram um filme fino de resiste não polimerizado, o qual atuou como uma camada adesiva para a selagem irreversível das estruturas^{29,30,31}. A Figura 9 ilustra este procedimento de selagem, no qual as placas são inicialmente colocadas em contato e depois expostas à radiação ultravioleta por 10 minutos para a união das estruturas.

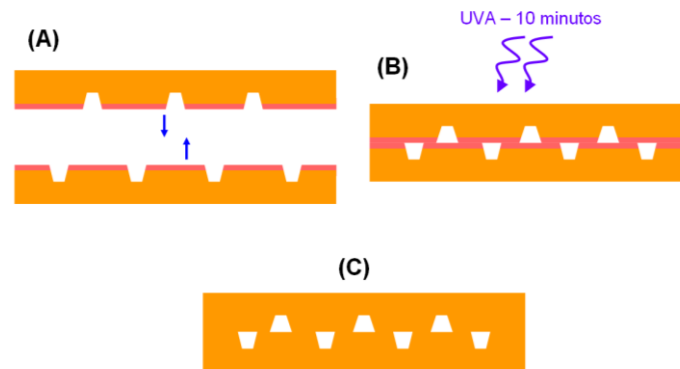


Figura 9 - Procedimento empregado para a selagem das estruturas. União das estruturas contendo um filme fino de resiste não polimerizado nas superfícies (A). Exposição à radiação UVA (B) e estrutura composta irreversivelmente selada (C).

Para alguns poucos ensaios realizados neste trabalho, uma placa de polímero sem canais foi unida a uma placa contendo canais, a qual foi utilizada para a selagem da estrutura, com o tempo de exposição de 180 segundos. A Figura 10 ilustra este procedimento.

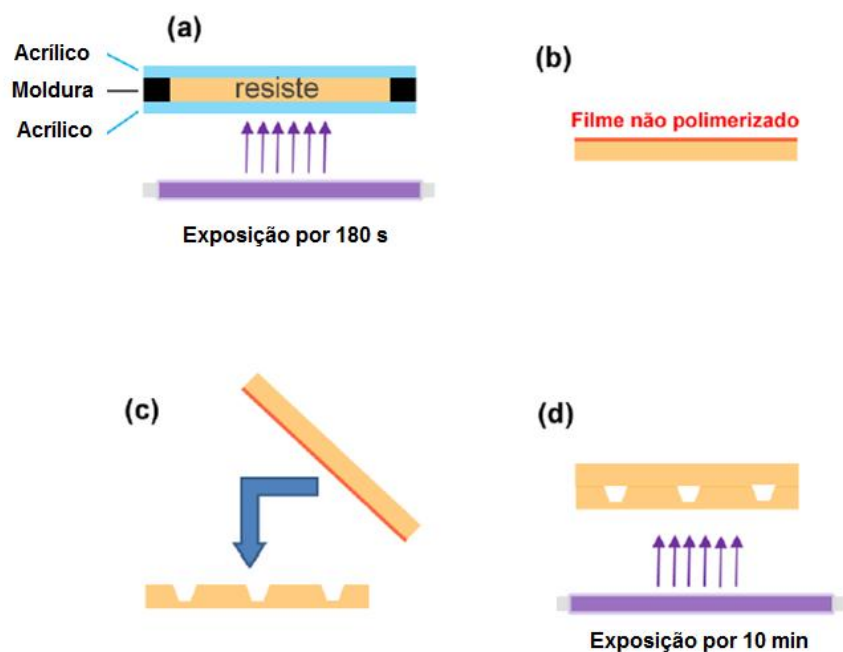


Figura 10 - Etapas de procedimento de selagem com uma placa polimérica sem canais: (a) Fotopolimerização da placa, (b) placa com fina camada de resiste não polimerizado, (c) união com a estrutura microfluídica e (d) selagem da estrutura com exposição à radiação ultravioleta. (Extraído de Fonseca et. al.³⁰)

3.1.3 - Calibração do procedimento de fabricação

Com o objetivo de relacionar as larguras das linhas utilizadas na máscara da matriz fotolitográfica com as dimensões dos canais obtidos após a polimerização da placa polimérica, foi realizada a calibração do procedimento de fabricação. Para isto, foi desenhada uma máscara simples, variando a largura das linhas entre 100 a 800 μm (Figura 11) e a partir do procedimento descrito na seção anterior, empregou-se a selagem com uma placa polimérica sem canais, e foi construída as estruturas para calibração.

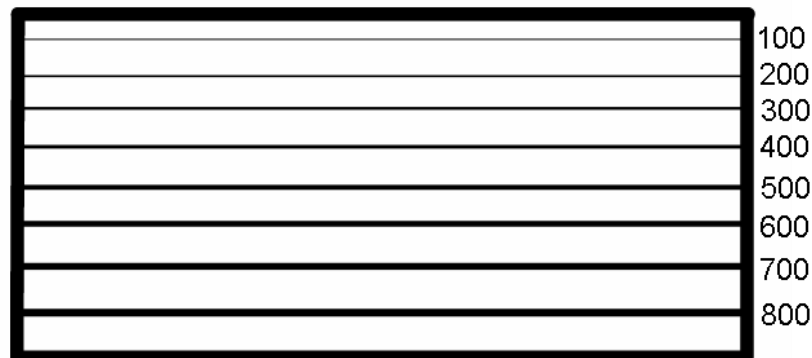


Figura 11- Layout da máscara empregada para a calibração do procedimento de fabricação (valores referem-se às larguras das linhas em μm).

Para observar a variação das dimensões dos canais obtidos no processo de fabricação do microsistema, o conjunto contendo a matriz fotolitográfica e o resiste foi exposto à radiação ultravioleta em duas conformações diferentes:

- 1) Com as linhas da máscara em posição paralela em relação às lâmpadas (Figura 12-A)
- 2) Com as linhas da máscara em posição perpendicular em relação às lâmpadas (Figura 12-B).

Após a fabricação das duas estruturas (exposição perpendicular e paralela), segmentos das seções transversais dos canais foram devidamente recortados com o auxílio de um estilete e preparados para a obtenção de imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e medição dos microcanais.

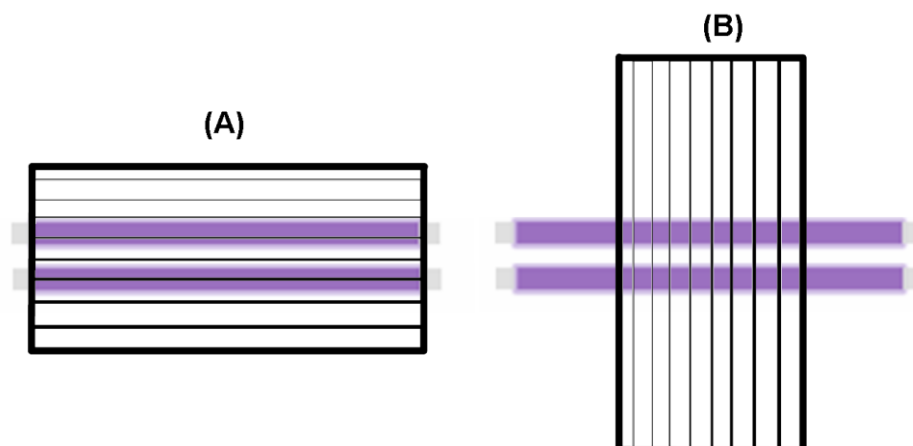


Figura 12- Exposição paralela (A) e perpendicular (B) das linhas da máscara em relação às lâmpadas.

3.1.4- Construção e avaliação preliminar de microssistemas com unidade de separação integrada

Conforme citado anteriormente, o principal objetivo do presente trabalho foi propor um procedimento simples para a integração de unidades de separação por membranas aos microdispositivos. Para isto, foram avaliadas diferentes estratégias, as quais serão descritas a seguir.

3.1.4.1- Dispositivo com membrana de Uretana Acrilato

Em um primeiro momento, uma membrana fabricada com o mesmo fotoresiste usado para a construção dos microssistemas (UA) foi avaliada com relação à possibilidade de integração aos microdispositivos e à sua aplicação para separações por difusão gasosa ou diálise.

Para isto, o resiste foi espalhado uniformemente sobre uma placa plana de acrílico com o auxílio de uma lamínula de vidro, sendo a espessura do filme (cerca de 200 μm) delimitada por fitas isolantes previamente fixadas a esta superfície. Outra placa de acrílico foi colocada sobre o filme não polimerizado para que houvesse um espalhamento mais uniforme da resina. O conjunto formado foi então exposto à radiação UVA por 60 s através de uma das faces,

seguida da exposição por mais 60 s através da outra face. Na figura 13 é apresentado o esquema de confecção da membrana de UA.

Após a exposição, a membrana foi retirada cuidadosamente da placa de acrílico e, em seguida, lavada com água, detergente neutro e etanol comercial. Feito isto, realizou-se a secagem com ar quente.

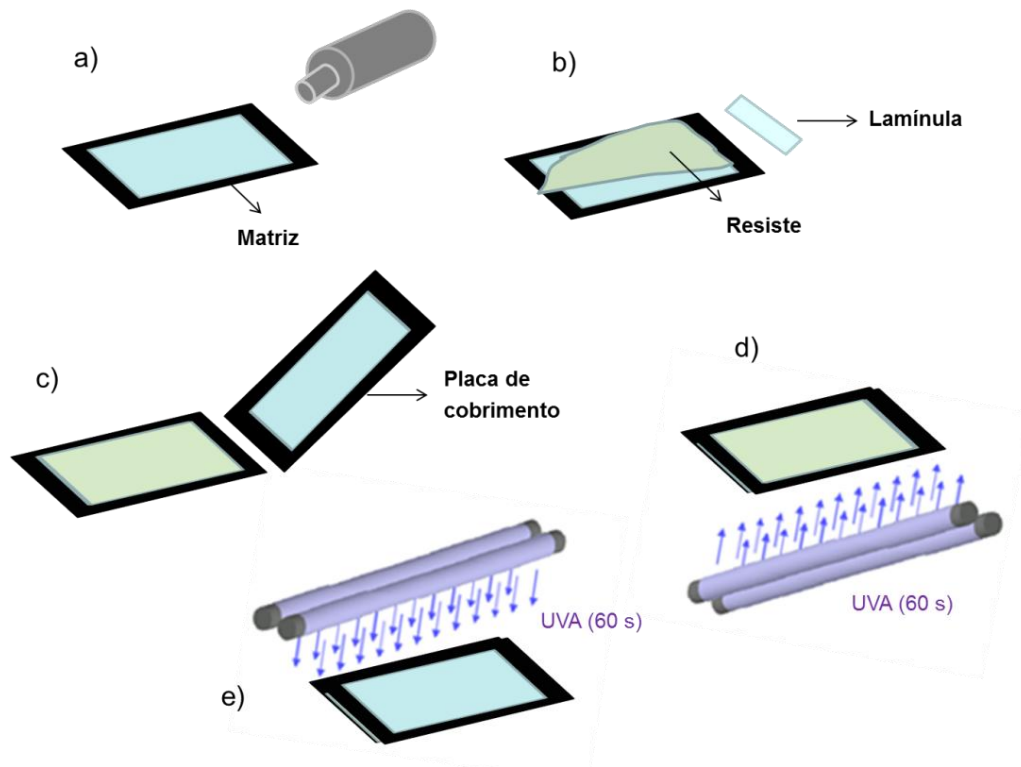


Figura 13- Esquema de confecção da membrana de UA. a) Transferência do resiste sobre a matriz polimérica; b) Espalhamento do resiste sobre a superfície com uma lamínula; c) Disposição da placa de cobertura sobre a matriz; d) Exposição de uma face do conjunto sob radiação UVA por 60 segundos; e) Exposição da outra face do conjunto por 60 segundos.

Uma unidade de difusão gasosa (UDG) com estrutura similar àquelas normalmente utilizadas em sistemas de análise em fluxo para fixação de membranas planas⁵¹ foi construída em UA para o acoplamento da membrana recém-preparada. Para isso, o *layout* apresentado na Figura 14 foi fotolitografado sobre duas placas distintas de UA, as quais permitiram a manipulação das soluções doadora e aceptora através dos canais de acesso e da cavidade central.

A membrana foi disposta manualmente sobre uma das estruturas previamente confeccionadas e, em seguida, a outra placa foi colocada sobre o conjunto formando uma configuração em “sanduíche” com a membrana (Figura

15). O alinhamento das cavidades centrais foi realizado apenas por observação visual.

O conjunto todo foi então exposto à radiação UVA durante 10 min. para a realização da selagem (Figura 15). É importante destacar que, antes deste procedimento, todas as superfícies apresentavam uma fina camada adesiva que permitiu a união irreversível das estruturas com a membrana.

Deve-se ressaltar também que, nesta configuração, a membrana ficou disposta sobre toda a superfície das duas placas poliméricas, cobrindo todos os canais e a cavidade central.

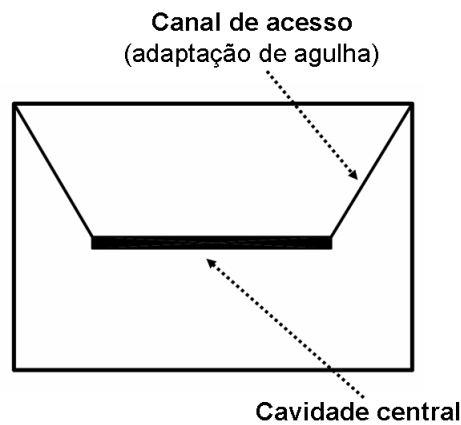


Figura 14- Layout utilizado para o desenvolvimento de uma unidade de difusão gasosa.

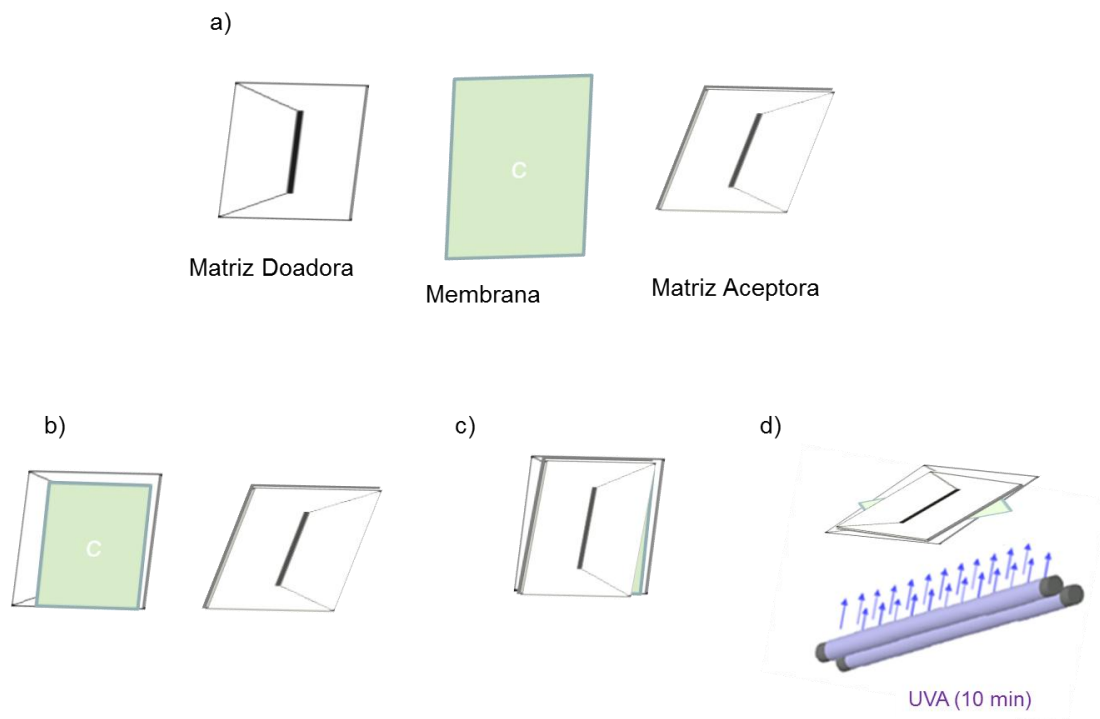


Figura 15- Esquema de integração da membrana de UA às estruturas poliméricas. **a)** estrutura doadora, estrutura aceptora e a membrana de UA; **b)** União da membrana à matriz doadora; **c)** alinhamento e união das estruturas; **d)** selagem do conjunto formado por exposição à radiação UVA por 10 min.

Com o dispositivo selado, agulhas hipodérmicas com 0,45 mm de diâmetro externo (305111-BD™) foram fixadas aos canais de acesso, permitindo o bombeamento das soluções de trabalho e a avaliação preliminar da estrutura para separações analíticas.

3.1.4.2 - Dispositivo com estruturas microfluídicas em placa única

Nesta estratégia, as estruturas para manipulação das soluções doadora e aceptora foram fotolitografadas sobre uma única placa de UA conforme ilustrado na Figura 16. A selagem foi realizada conforme o procedimento descrito na seção 3.1.2 com uma placa de cobertura sem canais.

Para a integração das membranas, um pequeno corte foi efetuado com o auxílio de um estilete na região da cavidade central (linha tracejada da Figura 16). Um filme polimérico (Acetato de celulose (Saco de Diálise, INLAB, 133), PTFE (Tigre, 70µm), Sebiagel® (19001, 210-250 µm) ou Cellogel® (Filme em gel de acetato de celulose)) com dimensões aproximadas de 2,0 cm x 1,0 cm foi inserido pelo corte, atravessando todo o dispositivo de uma face à outra. Devido à característica elastomérica do microssistema, foi possível o alongamento manual da região do corte durante o procedimento, facilitando a inserção do filme. Após a inserção da membrana, esta foi pressionada e colada com auxílio de uma cola (Superbonder®), a qual foi espalhada por toda a linha externa do corte, nas duas faces.

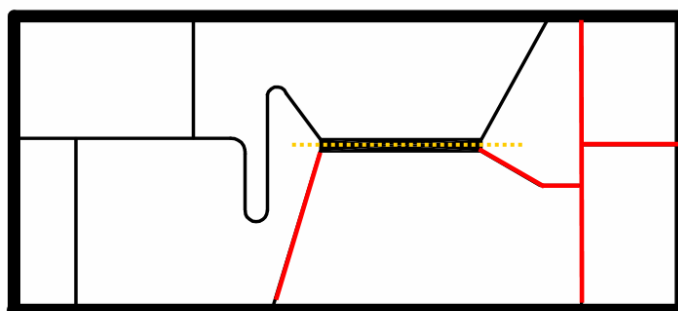


Figura 16- *Layout* para o dispositivo com estruturas microfluídicas em placa única. Apresentando a fase doadora do microssistema com linhas em preto; a fase aceptora do microssistema com linhas em vermelho e a área de corte na cavidade central com linha tracejada em amarelo.

Após a secagem de todo o microssistema, agulhas hipodérmicas (305111-BD™) foram fixadas nas extremidades externas dos canais para que pudessem ser realizados testes com estes microdispositivos. Os testes realizados consistiram em verificar possíveis vazamentos na superfície do corte durante o bombeamento de água destilada ao longo dos canais.

3.1.4.3 - Dispositivos com membranas integradas entre duas estruturas microfluídicas

Uma terceira estratégia de integração de membranas aos microssistemas avaliada neste trabalho consistiu na adaptação de um pequeno filme polimérico (2,0 cm x 1,0 cm) entre duas placas de UA contendo os canais para a manipulação das soluções doadora e aceptora, respectivamente. Este procedimento se assemelhou àquele descrito na seção 3.1.4.1, por utilizar a configuração em “sanduíche” para a fixação da membrana. Entretanto, o uso de membranas de outros materiais e a aplicação do filme polimérico apenas sobre uma região restrita da estrutura microfluídica (região da unidade de separação), diferenciou esta estratégia das demais apresentadas anteriormente.

A Figura 17 ilustra o procedimento empregado, no qual a membrana é inicialmente estendida sobre a placa polimérica com a estrutura fluídica doadora (Figura 17 - C). Conforme indicado, a membrana foi recortada nas mesmas dimensões das marcações gravadas sobre o substrato, o que permitiu a sua correta adaptação sobre os canais onde foram efetuados os procedimentos de separação. Em seguida (Figura 17-D), a outra placa polimérica (contendo a estrutura microfluídica aceptora) é alocada sobre aquela com a membrana e todo o conjunto é exposto à radiação UVA durante 10 minutos a fim de proceder à selagem. Deve-se salientar que o alinhamento dos canais das estruturas doadoras e aceptoras é uma etapa crítica do procedimento, uma vez que a própria membrana dificulta a observação dos canais e seu alinhamento. Para minimizar este problema, o procedimento de união das placas foi realizado sobre uma placa de acrílico transparente iluminada em sua face inferior por uma lâmpada incandescente.

Filmes poliméricos de (Acetato de celulose (Saco de Diálise, INLAB, 133), PTFE (Tigre, 70 μ m), Sebiagel® (19001, 210-250 μ m), e Cellogel® (Filme em gel de acetato de celulose) foram avaliados quanto a possibilidade de integração aos dispositivos a partir desta técnica. Todos os microsistemas efetivamente aplicados para as determinações analíticas que serão descritas mais adiante (Seções 3.2.1 e 3.2.2), foram desenvolvidos a partir deste procedimento.

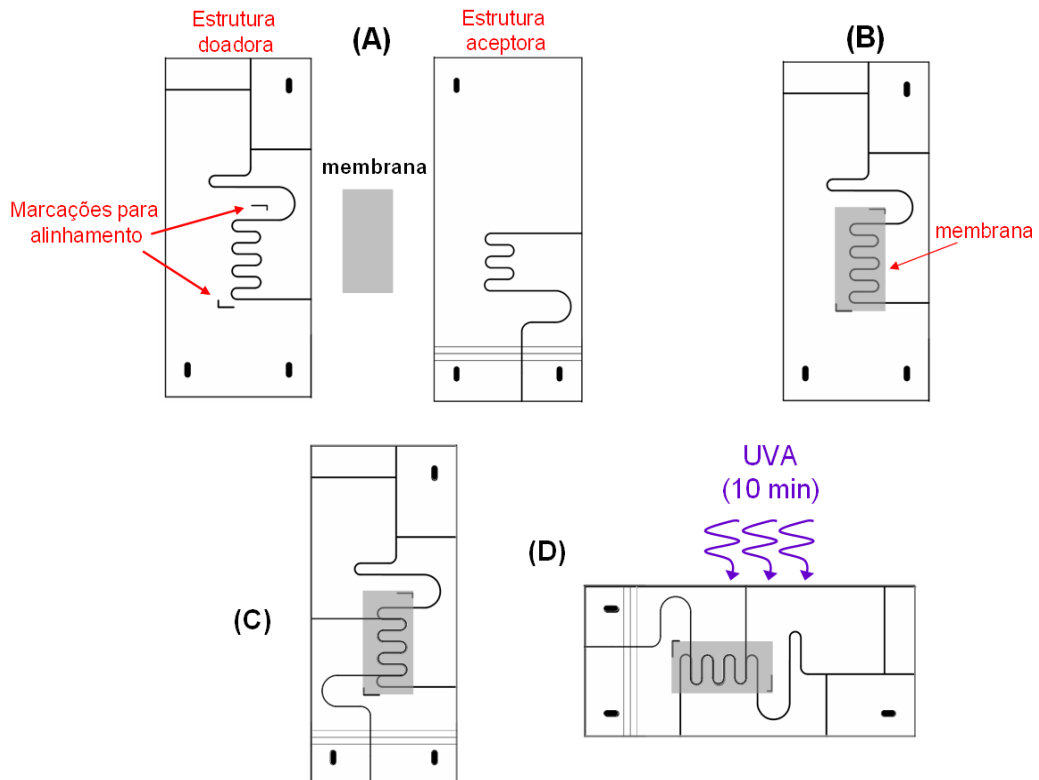


Figura 17 – Procedimento de integração da membrana. a) Estrutura doadora, membrana e estrutura aceitadora, respectivamente; b) Integração da membrana à estrutura doadora; c) Integração da estrutura aceitadora ao conjunto fixado em b; d) selagem do conjunto por 10 minutos.

3.2 - Aplicação de Microdispositivos Fluídicos com Unidade de Difusão Gasosa Integrada para Determinações Analíticas.

No presente trabalho, microssistemas construídos, a partir da estratégia para a integração de membranas descrita na seção 3.1.4.3, foram utilizados para a determinação de íons bicarbonato em águas minerais e íons amônio em pastilhas medicinais. Para isto, foram propostos dispositivos que apresentavam, além de uma unidade de difusão gasosa, sistemas de detecção fotométrica ou condutométrica integrados, os quais permitiram a avaliação do desempenho analítico destes dispositivos.

3.2.1 - Determinação de íons Bicarbonato em águas minerais

3.2.1.1 - Microssistema com Detecção Fotométrica

Estudos preliminares para avaliação do desempenho da unidade de difusão gasosa integrada ao microssistema foram realizados a partir de um dispositivo com detecção fotométrica integrada. As máscaras, cujos “*layout*” são apresentados na Figura 18, foram empregadas para a construção do microssistema. Conforme indicado, a estrutura doadora (Figura 18- A) era composta por um canal de injeção hidrodinâmica (Segmento AB) e por uma bobina de reação sobre a qual era adaptada uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE, Sartorius Biolab Products - 11806-47). A estrutura acceptora continha além da bobina para o transporte do fluxo acceptor, uma célula fotométrica com caminho óptico de 5,0 mm. A integração do sistema de detecção fotométrica foi baseada no proposto por Fonseca et al.³⁰. Assim, microcanais previamente gravados no substrato foram empregados para alinhar e fixar duas fibras ópticas plásticas de 250 µm de diâmetro (Toray, Europe) ao dispositivo. Os microcanais utilizados para a inserção das fibras ópticas apresentavam dimensões menores que o diâmetro da fibra, permitindo

a sua fixação por pressão. É importante salientar que as superfícies das fibras ficavam em contato com as soluções.

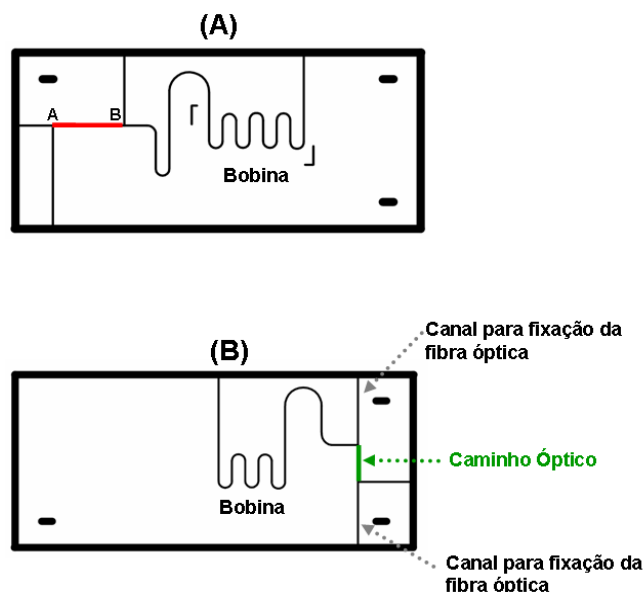


Figura 18 - *Layout* das máscaras empregadas para a fabricação do dispositivo utilizado para a determinação de bicarbonato com detecção fotométrica. **(A)** Estrutura doadora, com canal para injeção hidrodinâmica (segmento **AB**) e bobina reacional; e **(B)** estrutura aceptora contendo a célula fotométrica de fluxo com caminho óptico de 5,0 mm.

Os estudos foram realizados com a configuração de fluxo em linha única mostrada no diagrama da Figura 19. Uma bomba peristáltica (Ismatec, Reglo-Analog) equipada com tubos Tygon[®] (0,19mm e 0,38mm de diâmetro interno) foi utilizada para a propulsão dos fluidos e quatro válvulas solenóides de três vias (V1- V4, NRResearch- 225T031) foram utilizadas para o direcionamento do fluxo. Um diodo emissor de luz (LED) com máximo de emissão em 636 nm (LZ4- 00MA10, LedEngin) foi utilizado como fonte de radiação monocromática para as medidas fotométricas. Fibras ópticas plásticas, já mencionadas anteriormente, foram utilizadas para guiar a radiação do LED até o microsistema e deste para o detector (Fotodiodo Sd223, Hamamatsu). A aquisição do sinal analítico, assim como o controle das válvulas, foram realizados através de um software escrito em VisualBasic 6.0, a partir de um microcomputador equipado com uma interface eletrônica (USB-6009, National Instruments) com conversor A/D de 14 bits .

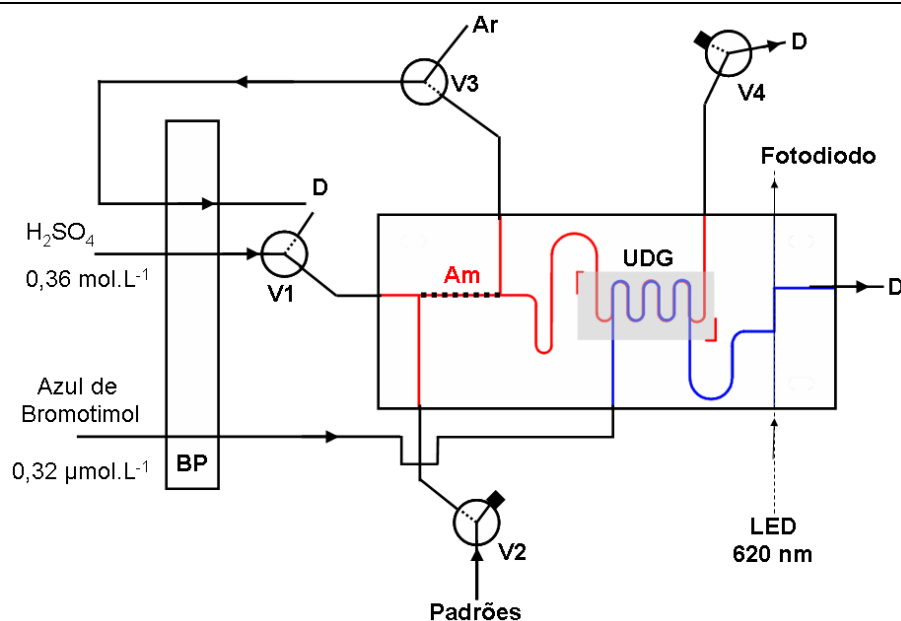
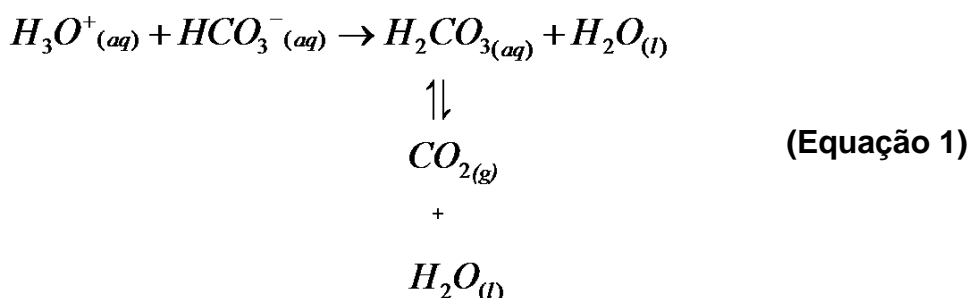


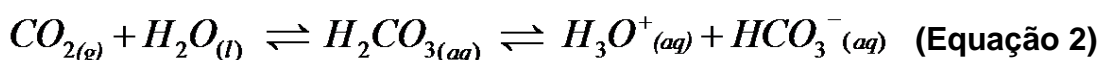
Figura 19 - Diagrama de fluxo para determinação de íons bicarbonato com detecção fotométrica. Bomba peristáltica (BP), V1-V4 Válvulas Solenóides desligadas (V1-V4), Descarte (D), “Plug” de amostragem 6,5 µL (Am), Unidade de Difusão gasosa (UDG). Linhas em vermelho (canais da fase doadora) e linhas em azul (canais da fase aceptora).

O procedimento para a injeção hidrodinâmica (Am) dos padrões ou das amostras contendo íons bicarbonato (20 a 80 mg L^{-1}) foi realizado pelo acionamento simultâneo de todas as válvulas solenóides. Nesta condição, as soluções eram aspiradas através das válvulas V2 e V3 a uma vazão de 40 µL min^{-1} preenchendo o plug de amostragem (Am) de aproximadamente $2,5 \text{ µL}$. As válvulas permaneciam ligadas por 10 s , garantindo o preenchimento de todo amostrador. Deve-se destacar que este tempo era alterado para 120 s quando havia a substituição dos padrões ou das amostras, permitindo a limpeza de toda a linha de fluxo entre V2 e V3, o que evitou intercontaminação.

Após a injeção hidrodinâmica, todas as válvulas eram desligadas ao mesmo tempo (condição ilustrada na Figura 19), permitindo que o segmento recém-amostrado fosse carregado até a unidade de difusão gasosa por ação do fluxo da solução carregadora (H_2SO_4 $0,36 \text{ mol L}^{-1}$), a qual era bombeada a uma vazão de 40 µL min^{-1} . Como consequência da mistura da solução amostrada com a solução carregadora, havia o despreendimento de gás carbônico (CO_2), conforme demonstrado na equação 1:



Parte do CO₂ desprendido difundia através da membrana de PTFE sendo recolhida por uma solução levemente básica (pH 8) do indicador azul de bromotimol (BTB) com concentração de 0,32 μmol L⁻¹. A coloração do indicador alterava-se então de levemente azul para levemente esverdeado como consequência da mudança de pH ocasionada pela dissolução do gás carbônico na solução aceptora (equação 2).



A alteração na cor do indicador era mensurada pelo detector fotométrico e relacionada à concentração de bicarbonato na amostra.

É importante relatar que a solução de BTB era continuamente bombeada através da estrutura aceptora do microdispositivo a uma vazão de 40 μL min⁻¹. Além disto, esta solução ficou reservada em um frasco devidamente fechado conectado a uma coluna preenchida com CaCl₂ sólido para evitar a contaminação da mesma com o CO₂ do ar atmosférico.

3.2.1.1.1- Reagentes e Soluções

Reagentes de grau analítico e água destilada foram utilizados para o preparo de todas as soluções utilizadas nesta determinação. Uma solução estoque contendo 2000 mg L⁻¹ em HCO₃⁻ foi preparada a partir da dissolução da massa apropriada de NaHCO₃ (Synth) em água. A partir das diluições apropriadas desta solução foram preparados os padrões contendo 20 a 80

mg.L⁻¹ do analito, os quais foram utilizados para a construção da curva analítica.

Uma solução de H₂SO₄ 0,36 mol L⁻¹, utilizada como solução carreadora na fase doadora, foi preparada pela diluição do ácido concentrado em estoque 97% (Vetec). Uma solução estoque do indicador azul de bromotimol (BTB) 0,32 mmol L⁻¹ foi preparado pela dissolução do reagente sólido (Carlo Erba) em água destilada. Em seguida, a solução preparada foi diluída para a concentração de 0,32 μmol. L⁻¹ com tampão CO₃²⁻/HCO₃⁻ 7μmol. L⁻¹ a pH 8. Este tampão foi preparado pela dissolução da massa adequada de Na₂CO₃ (Synth) em água destilada, seguido da purga com gás nitrogênio por 20 minutos, para a eliminação de CO₂ dissolvido na solução. O pH foi ajustado com adições gota a gota de uma solução de HCl 0,5 mol L⁻¹.

3.2.1.2 - Microssistemas com Detecção Condutométrica

Microssistemas com detecção condutométrica integrada também foram avaliados para a determinação de bicarbonato em águas minerais empregando-se a difusão de CO₂ através de uma membrana de PTFE. A mesma máscara, ilustrada na Figura 18-A, foi utilizada para a fabricação da estrutura microfluídica para manipulação das soluções doadoras. A máscara empregada para o desenvolvimento da estrutura de manipulação da solução acceptora e para a integração de uma célula condutométrica é apresentada na Figura 20. Conforme ilustrado, o *layout* empregado era bastante semelhante ao utilizado para a detecção fotométrica. Entretanto, seis canais, dispostos perpendicularmente ao canal principal de fluxo, foram gravados sobre o substrato a fim de permitir a fixação dos eletrodos para realização das medidas condutométricas. Os eletrodos consistiam de fios de cobre com 3,0 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro, os quais tiveram suas extremidades cortadas com um alicate de corte e devidamente polidas com uma lixa d'água antes da sua fixação no microssistema já selado.

É importante relatar que, após o preparo, os eletrodos apresentavam áreas superficiais de aproximadamente 0,5 mm² e que a distância entre as

superfícies de eletrodos opostos era de aproximadamente 500 μm , a qual era delimitada pela largura do canal de fluxo.

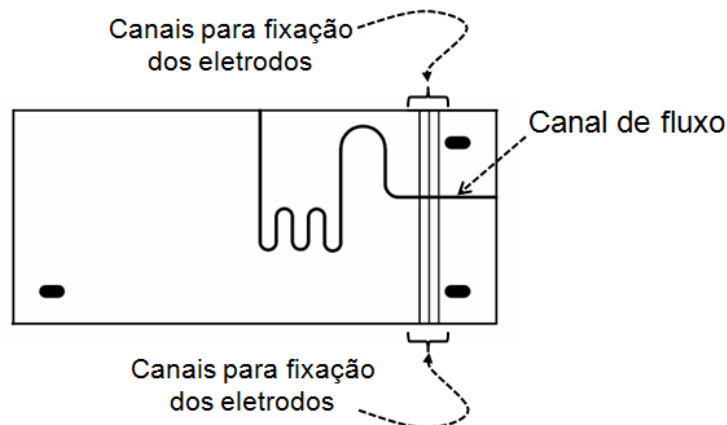


Figura 20- Layout da máscara utilizada para a construção da estrutura de manipulação da solução doadora contendo canais para a integração de eletrodos para detecção condutométrica.

O diagrama de fluxo representado na Figura 21 foi utilizado para a realização dos estudos. Os mesmos dispositivos utilizados para a determinação fotométrica (bomba, válvulas e interface eletrônica) foram utilizados para a realização das operações com este microssistema, modificando-se apenas o sistema de detecção. Cada conjunto contendo três eletrodos de cobre foi soldado a um único fio, o qual foi conectado à uma das entradas de um condutivímetro (Cole Parmer- Modelo 19101-10). Para registro das medidas, a saída analógica do condutivímetro foi conectada a interface eletrônica, permitindo a conversão analógico/digital (A/D) e a visualização dos dados no computador. A Figura 22 mostra uma fotografia geral da montagem realizada para a realização dos estudos.

Os mesmos procedimentos descritos na seção 3.2.1.1 para a injeção da amostra, geração de CO_2 e sua separação na unidade de difusão gasosa foram realizados nesta determinação. Entretanto, aqui, apenas água destilada foi empregada como fase aceptora do gás difundido. A alteração na condutividade da água, ocasionada pela dissolução do gás no meio, foi então medida e relacionada com a concentração de íons bicarbonato nas amostras.

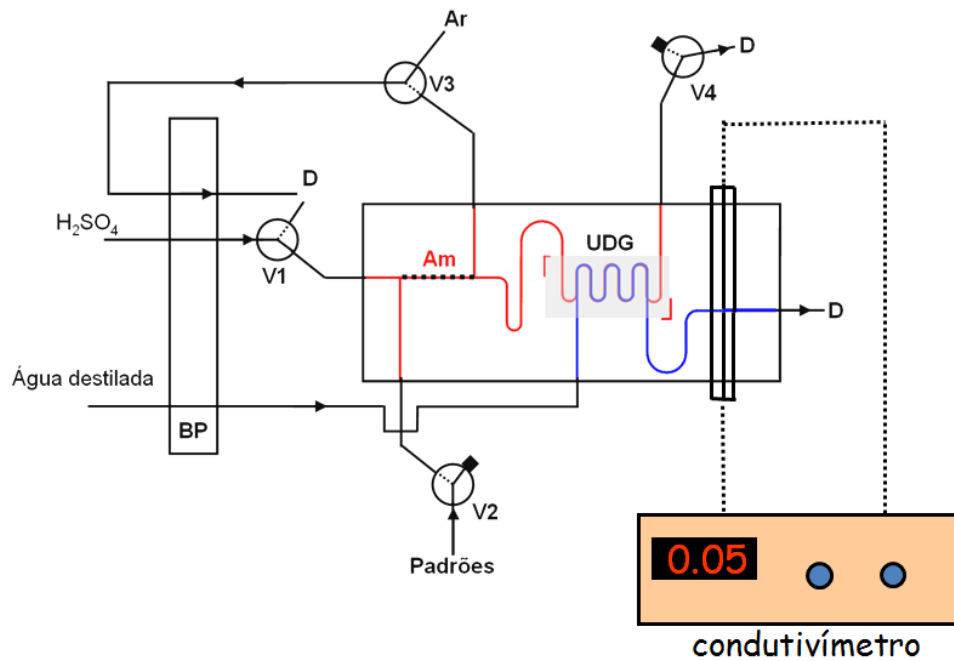


Figura 21 - Diagrama de fluxo para determinação de íons bicarbonato com detecção condutométrica. **BP**- bomba peristáltica, **Am**- plug de amostragem, **UDG**- Unidade de Difusão Gasosa, **V1, V2, V3 e V4**. - Válvulas solenóides de três vias, **D** - descarte, H_2SO_4 como solução carreadora na fase doadora (linha em vermelho), Água destilada como solução carreadora na fase aceitadora (linha em azul), Eletrodos de cobre ligados ao condutivímetro (linhas tracejadas).

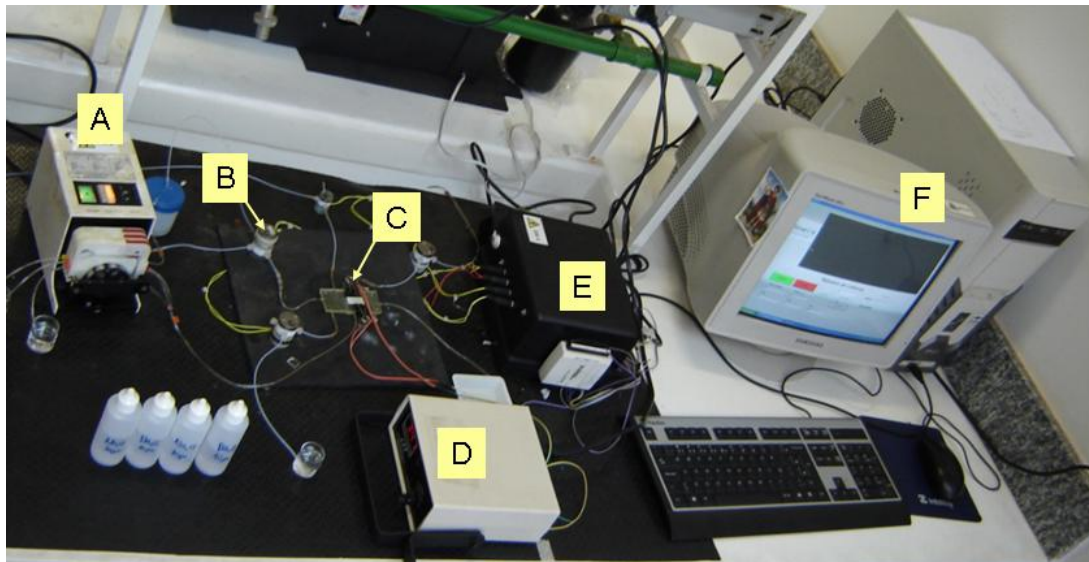


Figura 22- Fotografia mostrando a montagem geral do sistema para realização dos estudos de difusão gasosa com o microsistema. Bomba peristáltica (A), Válvula solenóide (B), Microsistema com UDG (C), Condutivímetro (D), Circuito para controle das válvulas com interface eletrônica (E) e microcomputador (F).

3.2.1.2.1 - Reagentes e soluções

Soluções padrão de bicarbonato foram preparadas como descrito na seção 3.2.1.1.1. Uma solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol. L}^{-1}$, utilizada como solução carreadora, foi preparada pela diluição do volume apropriado do ácido concentrado 97% m/m (Vetec) em água.

Três amostras de águas minerais comerciais: fonte Água Santa (Campos do Jordão - SP), fonte Marisa (Campos do Jordão - SP) e fonte Hidrolândia (Hidrolândia- GO) foram adquiridas no mercado local e diluídas adequadamente com água destilada antes da injeção no sistema microfluídico para a determinação de bicarbonato.

Uma solução de ácido clorídrico com concentração aproximada de $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi preparada a partir do reagente (Vetec) em estoque (37 % m/m) e empregada para a titulação potenciométrica das amostras. Esta solução foi padronizada com uma solução de carbonato de sódio ($5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), a qual foi preparada pela dissolução do sal (Dinâmica) em água.

3.2.1.2.2 - Método de Referência

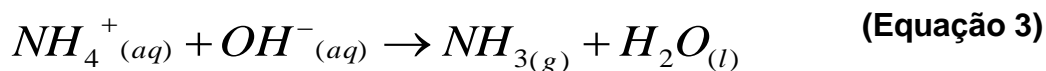
Os resultados obtidos com o microsistema na determinação de bicarbonato em águas minerais foram comparados com aqueles obtidos por titulação potenciométrica. Volumes adequados das amostras foram transferidos para um frasco de Erlenmeyer de 125 mL e titulados com uma solução recém-padronizada de HCl $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$, realizando-se medidas ponto a ponto com um pHmetro comercial (Hanna-pH21).

Os pontos finais das titulações foram determinados a partir da primeira derivada das curvas de titulação, sendo todas as amostras analisadas em triplicata.

3.2.2 - Determinação de íons Amônio em Pastilhas Medicinais

O mesmo microssistema descrito na seção 3.2.1.2 para determinação de íons bicarbonato em águas minerais foi também aplicado à determinação de íons amônio em pastilhas medicinais. Conforme será discutido mais adiante, apenas o microssistema com detecção condutométrica foi empregado nos estudos.

O diagrama de fluxo da Figura 3.2.1.2.2 foi utilizado para esta determinação substituindo-se apenas a solução de H_2SO_4 por uma solução de NaOH ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$). As soluções das amostras e dos padrões ($10,0$ a $40,0 \text{ mg L}^{-1}$ em NH_4^+) foram inseridas no sistema por injeção hidrodinâmica ($2,5 \text{ }\mu\text{L}$) e bombeadas até a unidade de difusão gasosa pela solução carreadora (NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$). Com a reação dos íons amônio e hidróxido nos canais da estrutura doadora, o gás amônia era produzido (**Equação 3**) e difundido através da membrana de PTFE.



Seguindo a reação inversa àquela mostrada na **equação 3**, o NH_3 difundido reagia com a água (fluido aceptor) alterando a sua condutividade, a qual foi medida e relacionada com a concentração de NH_4^+ na solução injetada.

3.2.2.1- Reagentes e soluções

Soluções padrão de íons amônio com concentrações de 10 a 40 mg L^{-1} foram preparadas a partir de diluições de alíquotas de uma solução estoque (2000 mg L^{-1} em NH_4^+) em água destilada. A solução estoque foi preparada pela dissolução da massa apropriada do sal NH_4Cl (Synth) em água.

Uma solução de NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, utilizada como solução carreadora no sistema em fluxo, foi preparada pela dissolução de NaOH em pérolas (Dinâmica) em água.

Pastilhas medicinais utilizadas para o tratamento de irritações na garganta e baseadas nos princípios ativos cloridrato de difenildramina, cloreto de amônio e citrato de sódio foram utilizadas para avaliação do desempenho analítico do microsistema. Amostras de três laboratórios diferentes, nos sabores menta (1 amostra) e framboesa (2 amostras), foram adquiridas em drogarias locais e dissolvidas diretamente em água. Três pastilhas de cada fabricante foram pesadas independentemente e transferidas para um frasco de Erlenmeyer com aproximadamente 150 mL de água destilada. Os frascos foram transferidos para um banho ultrassônico e sonicados até que fosse observada a máxima dissolução do medicamento. Em seguida, o extrato foi filtrado (filtro qualitativo) diretamente para um balão volumétrico de 250 mL, empregando-se as águas de lavagem do Erlenmeyer e do filtro para completar o seu volume.

O reagente de Nessler⁶² utilizado no método de referência (seção 3.2.2.2) foi preparado conforme descrito a seguir. Uma solução de iodeto de potássio 35% (m/V) foi preparada pela dissolução de 35 g do sal (Merck) em 100 mL de água destilada. Uma solução de cloreto de Mercúrio (II) 4% (m/m) foi também preparada pela dissolução da massa apropriada do sal (Carlo Erba) em água destilada. Uma solução de NaOH 50% (m/V) foi preparada pela dissolução da base na forma de lentilhas (Dinâmica) em 250 mL de água.

Sob agitação constante, a solução de HgCl₂ foi adicionada lentamente sobre a solução de KI até que houvesse a formação de um precipitado vermelho/alaranjado constante (cerca de 330 mL da solução de HgCl₂ foram necessários). Em seguida, adicionou-se à mistura 250 mL da solução de NaOH 50% (m/V) e completou-se o volume até 1,0 L com água destilada. Por último, algumas gotas de solução de Hg₂Cl₂ foram adicionadas à mistura até que houvesse a turvação da mesma. O frasco com a suspensão foi reservado por 24 h em frasco escuro e sob-refrigeração antes do primeiro uso e apenas o sobrenadante, resultante da sedimentação, foi utilizado para a realização das determinações.

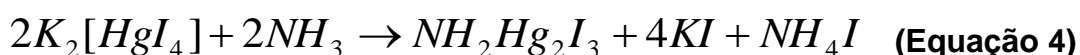
As soluções dos padrões (0,5 a 2,5 mg L⁻¹ em NH₄⁺) e das amostras utilizadas no método de referência foram preparadas como se segue. Em balões volumétricos de 50,00 mL foram adicionados, na ordem, o volume necessário da solução estoque de NH₄⁺ (padrão) ou da amostra, 20,00 mL de

água destilada e 1,00 mL do reagente de Nessler⁶². Em seguida, completou-se o volume do balão com água destilada.

3.2.2.2 - Método de Referência

O método de Nessler⁶² foi utilizado como referência para a determinação de íons amônio nos medicamentos. Nesta determinação, um volume conhecido da amostra é tratado com uma solução altamente alcalina, contendo iodeto de mercúrio (II) e iodeto de potássio (Reagente de Nessler), o que leva a formação de um produto castanho alaranjado cuja medida colorimétrica/espectrofotométrica é relacionada com a concentração de amônio.

De fato, conforme mostra a equação 3, os íons amônio são transformados em amônia no meio básico. A amônia formada reage então o tetraiodomercurato (II) de potássio (**Equação 4**) para formar um produto colorido ($NH_2Hg_2I_3$), o qual se apresenta como uma suspensão coloidal não observável à olho nu. A literatura⁶² orienta que as medidas espectrofotométricas entre 350 a 420 nm devem ser realizadas logo após o preparo dos padrões e das amostras, a fim de se evitar problemas causados pelo espalhamento da luz.



No presente trabalho, as medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro (Agilent - 8453) empregando-se o comprimento de onda de 380 nm. As medidas foram realizadas ao menos em 10 minutos após o preparo das soluções descritas na seção 3.2.2.1.

4 - Resultados e Discussão

4.1- Fotolitografia em Uretana- Acrilato

Conforme citado na seção 3.1.2, o resiste (Uretana Acrilato- G50-LBS) e a expositora (*Home-Made*) utilizados no presente trabalho para a construção dos microssistemas foram diferentes daqueles empregados por Fernandes e Ferreira²⁹ e Fonseca et al.³⁰. Apesar destas modificações, os microdispositivos apresentaram as mesmas características que aquelas relatadas por estes autores. A transparência para região visível do espectro, a ausência de cor e o aspecto elastomérico dos microdispositivos foram mantidas, permitindo o uso analítico dos mesmos. A fotografia de um microssistema fluídico construído a partir destas novas condições é mostrada na Figura 23.

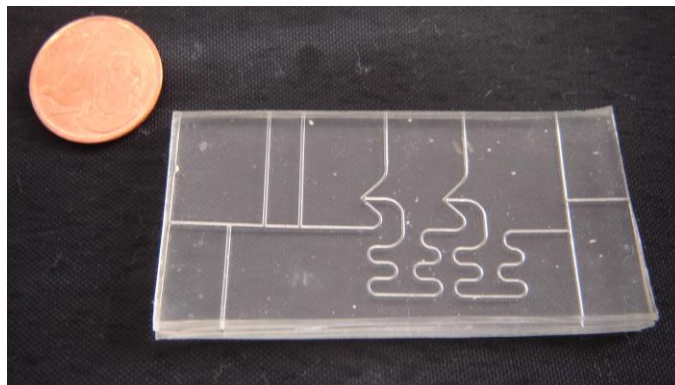


Figura 23 - Fotografia de um microssistema fluídico construído a partir da técnica de fotolitografia profunda no UV com uma nova expositora e novo resiste.

Outra constatação importante foi a eficiente selagem dos microssistemas. Todos os dispositivos fabricados, seja com canais em uma única placa de UA, seja com canais nas duas placas de UA, apresentaram a selagem irreversível das estruturas. É importante destacar que, para cada tipo de estrutura confeccionada, foi necessária a otimização dos tempos de exposição, o que permitiu que as placas apresentassem um filme adesivo de resiste não polimerizado nas superfícies a serem unidas. Esta condição foi imprescindível para a selagem eficiente, utilizando os tempos de exposição ótimos destacados nas figuras 7 e 10.

A comprovação da selagem eficiente das estruturas foi constatada por micrografias eletrônicas de varredura (MEV) obtidas para seções transversais dos microcanais (Figuras 24 e 25). Como pode ser observada nas imagens, a placa que contém os canais (placa inferior) se uniu perfeitamente à placa que não contém canais (placa superior), não sendo observadas fissuras entre as mesmas, o que comprova a eficiência da selagem. Adicionalmente, testes realizados com um microsistema selado com uma placa sem canais (Seção 3.1.4.2), como o mostrado na Figura 23, foi possível observar que este suportou vazões maiores do que $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ sem que fossem observados vazamentos ocasionados por uma suposta má selagem da estrutura.

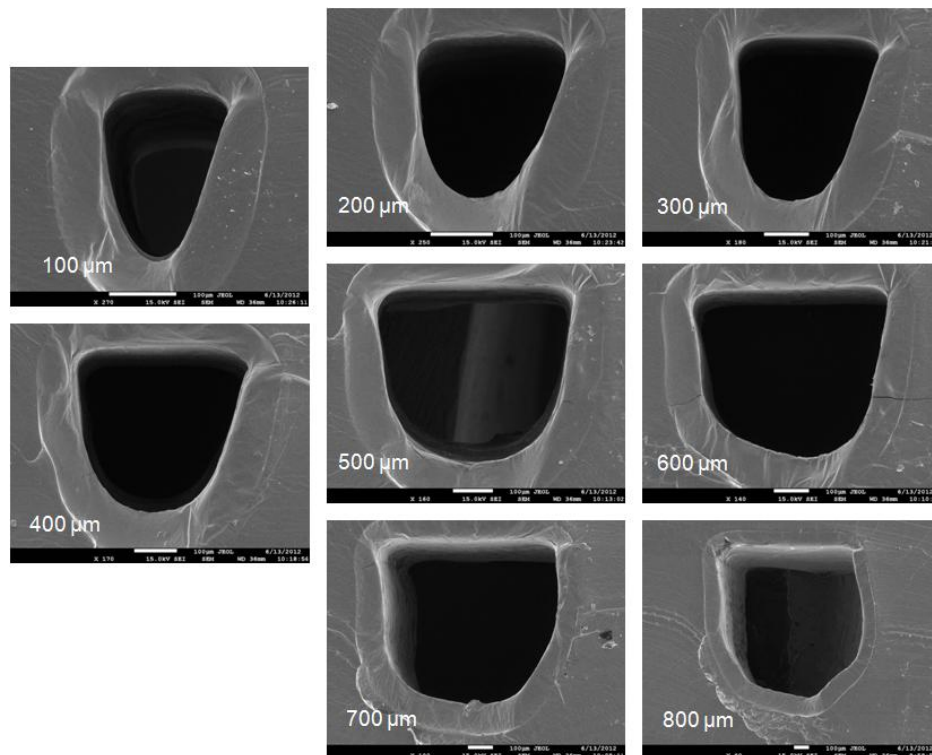


Figura 24 - Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da seção transversal de canais expostos paralelamente à lâmpada de radiação. Diferentes aumentos foram utilizados e os valores indicados referem-se às larguras das linhas das máscaras empregadas.

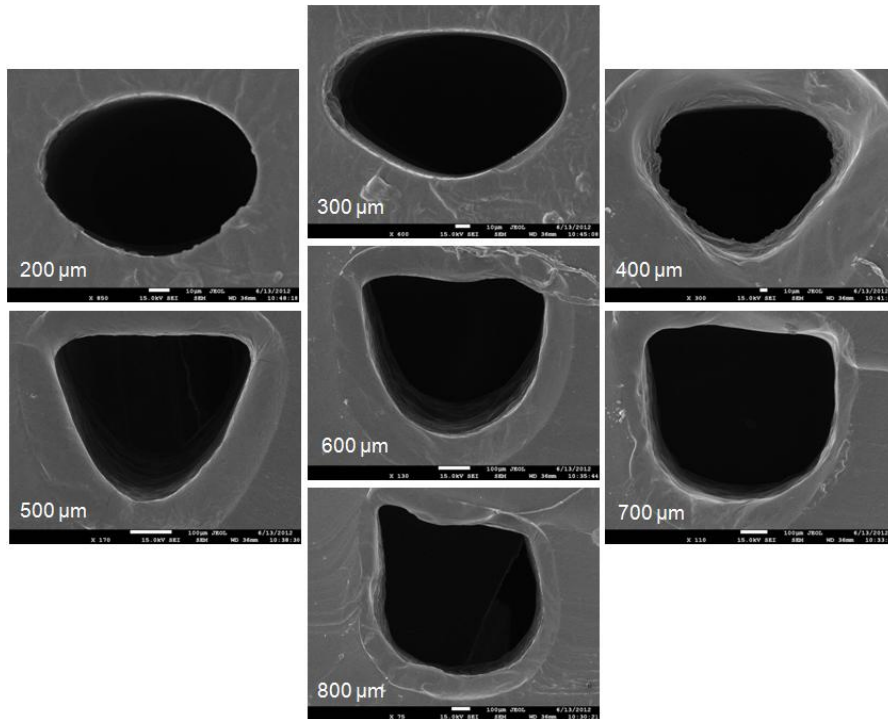


Figura 25 - Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da seção transversal de canais expostos perpendicularmente à lâmpada de radiação UV. Diferentes aumentos foram utilizados e os valores indicados referem-se às larguras das linhas das máscaras empregadas.

4.2 - Calibração do procedimento de fabricação

As Figuras 24 e 25 mostram as micrografias das seções transversais dos canais obtidos pela exposição em paralelo e em perpendicular, respectivamente, das linhas das máscaras em relação às lâmpadas de radiação UV (Seção 3.1.3). É possível observar que a maioria dos canais apresentou um perfil em “U”, o que difere dos perfis triangulares relatados por Fonseca et al.³⁰. Esta diferença pode ser atribuída principalmente à distância das lâmpadas em relação à matriz fotolitográfica nos dois procedimentos. Perfis mais arredondados são esperados quando a matriz fotolitográfica é colocada mais afastada da fonte de radiação, uma vez que há uma maior homogeneidade dos fótons que interagem com o resiste às distâncias maiores. Como as lâmpadas na expositora *home-made* desenvolvida neste trabalho ficaram mais distantes da matriz fotolitográfica, quando comparadas com a distância utilizada em uma expositora comercial (utilizada por Fonseca et al.³⁰), perfis mais arredondados eram esperados.

Deve-se considerar ainda que uma expositora comercial é desenhada para permitir a fabricação eficiente de carimbos, onde estruturas em alto relevo (letras) e não canais (baixo relevo) são gravados sobre o resiste. Neste caso, uma forma triangular (com base larga) é desejada para dar sustentação a estrutura, proporcionando a robustez necessária ao seu uso contínuo.

Observou-se também nas micrografias que o perfil dos canais foi dependente das larguras das linhas da máscara empregadas para a fabricação. Para a exposição em paralelo, os canais apresentam perfis mais arredondados quanto maior larga fosse a linha da máscara. Já para a exposição perpendicular, foram observados canais com formas elípticas para as linhas mais finas, canais triangulares para linhas intermediárias e canais em “U” para linhas mais largas. De fato, conforme descrito por Fonseca et. al.³⁰ e apresentado na Figura 26, a deposição do *toner* sobre uma transparência para impressoras à *Laser* é irregular nas laterais impressas de uma linha. Assim, para linhas muito finas (da ordem de 100 μm), estas irregularidades podem representar até 50 % da largura total da linha, enquanto para linhas mais largas (500 μm ou mais) estas irregularidades representam menos que 10% da largura. Desta maneira, há uma penetração mais pronunciada da radiação através das laterais das linhas finas das máscaras, o que pode proporcionar alterações nas formas dos canais.

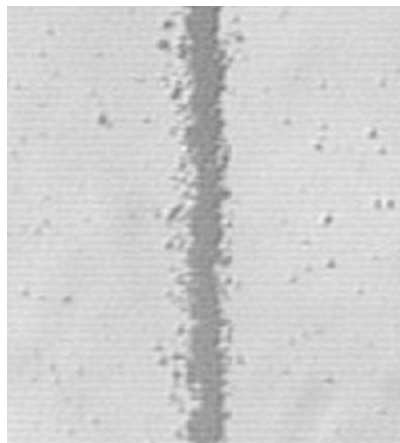


Figura 26 - Micrografia óptica mostrando irregularidades na deposição do *Toner* para uma linha com 100 μm de largura. (Retirado do trabalho de Fonseca et. al.³⁰)

É importante destacar que linhas maiores que 300 μm foram utilizadas no desenvolvimento dos microssistemas efetivamente avaliados neste trabalho.

Para estes dispositivos, não foram observados problemas relacionados ao transporte dos fluidos nos microcanais.

A Tabela 1 lista os valores de largura (l) e profundidade (p) dos canais obtidos por exposição perpendicular e paralela das linhas da máscara com diferentes larguras (Seção 3.1.3). A Figura 27 ilustra como foram mensuradas estas dimensões para um canal com formato em “U”.

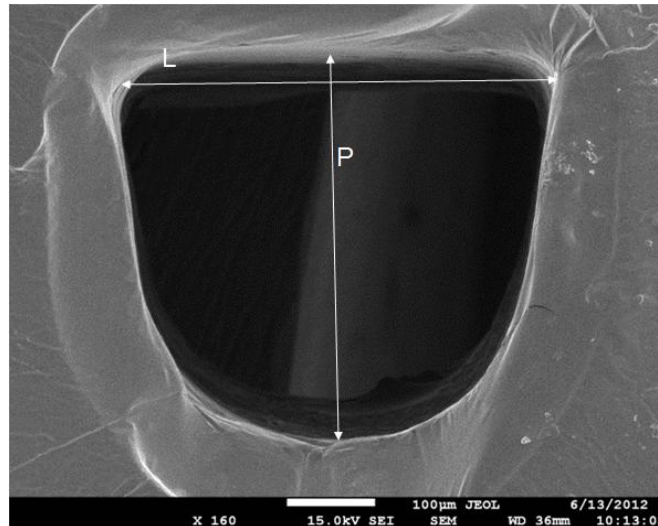


Figura 27- Ilustração das medidas de largura (l) e profundidade (p) através da micrografia de um canal para calcular as dimensões encontradas nos canais.

Tabela 1 - Medidas de largura e profundidade dos canais construídos por exposição paralela ou perpendicular de linhas com diferentes larguras.

	Exposição		Exposição	
	Paralela		Perpendicular	
Largura da Linha (µm)	Largura (µm)	Profundidade (µm)	Largura (µm)	Profundidade (µm)
100	193	256	---	----
200	243	266	105	78
300	320	367	170	101
400	409	393	311	237
500	500	442	481	403
600	563	488	585	508
700	----	-----	717	655

Como pode ser observado, as dimensões dos canais construídos com a linha de máscara de 800 µm de largura foram omitidas da Tabela 1. De fato, os canais construídos com esta linha apresentaram dimensões que não

permitiram uma boa calibração linear ($r < 0,9$) ao se correlacionar as larguras das linhas com as dimensões dos microcanais. Além disso, canais com dimensões maiores que 0,7 mm são muito comuns em sistemas em fluxo convencionais, não caracterizando um sistema microfluídico.

O canal construído com a linha de 100 μm de largura por exposição perpendicular entupiu após o procedimento de selagem, não sendo possível realizar as medidas de suas dimensões e, por isto, as mesmas não foram listadas na Tabela 1. Isto mostra que, para a exposição perpendicular, linhas iguais ou maiores que 200 μm devem ser empregadas no procedimento de fabricação utilizando máscara de transparência impressa com Toner.

Para a exposição paralela empregando-se a linha de 700 μm também não foi observada uma boa correlação linear ($r < 0,9$) para a calibração do procedimento de fabricação, sendo os seus valores também omitidos da Tabela 1. De fato, os resultados mostram que para a exposição paralela deve-se utilizar linhas com larguras entre 100 e 600 μm para que se possa correlacionar as larguras das linhas com as dimensões dos canais.

Uma constatação importante relatada por Fonseca et. al.³⁰ e também observada no presente trabalho foi que, para a maioria dos casos, os canais construídos por exposição perpendicular das linhas são menores que aqueles obtidos por exposição paralela das linhas. Na realidade, a Tabela 1 mostra que ao se utilizar linhas com larguras de até 500 μm este efeito é observado. A explicação para isto não foi ainda investigada, mas pode estar relacionada com uma penetração maior da radiação no resiste quando as linhas estão perpendicularmente dispostas em relação às lâmpadas, o que diminui o tamanho dos canais.

Observa-se também na Tabela 1, que as larguras dos canais são maiores que as larguras das linhas da máscara quando estas últimas são menores que 500 μm . É possível inferir que a posição das lâmpadas em relação às linhas das máscaras na nova expositora tenha contribuído para que fossem formadas sombras no resiste maiores que a própria dimensão da linha, favorecendo o alargamento do canal.

As curvas de calibração apresentadas na Figura 28 mostram a relação entre as larguras das linhas usadas nas máscaras fotolitográficas com as larguras e profundidades efetivamente medidas nos canais. Com a exclusão de

alguns pontos já descritos anteriormente, foram observados coeficientes de correlação para o ajuste linear por mínimos quadrados (r) maiores que 0,98 para todas as calibrações. Entretanto, a calibração para a largura dos canais apresentou uma maior linearidade ($r > 0,99$) que aquela obtida para a calibração das profundidades.

Vale destacar que as equações de calibração indicadas na Figura 28 poderão ser utilizadas para estimar as dimensões efetivas dos canais quando novos microssistemas forem construídos, desde que os mesmos materiais e condições de fabricação sejam mantidos.

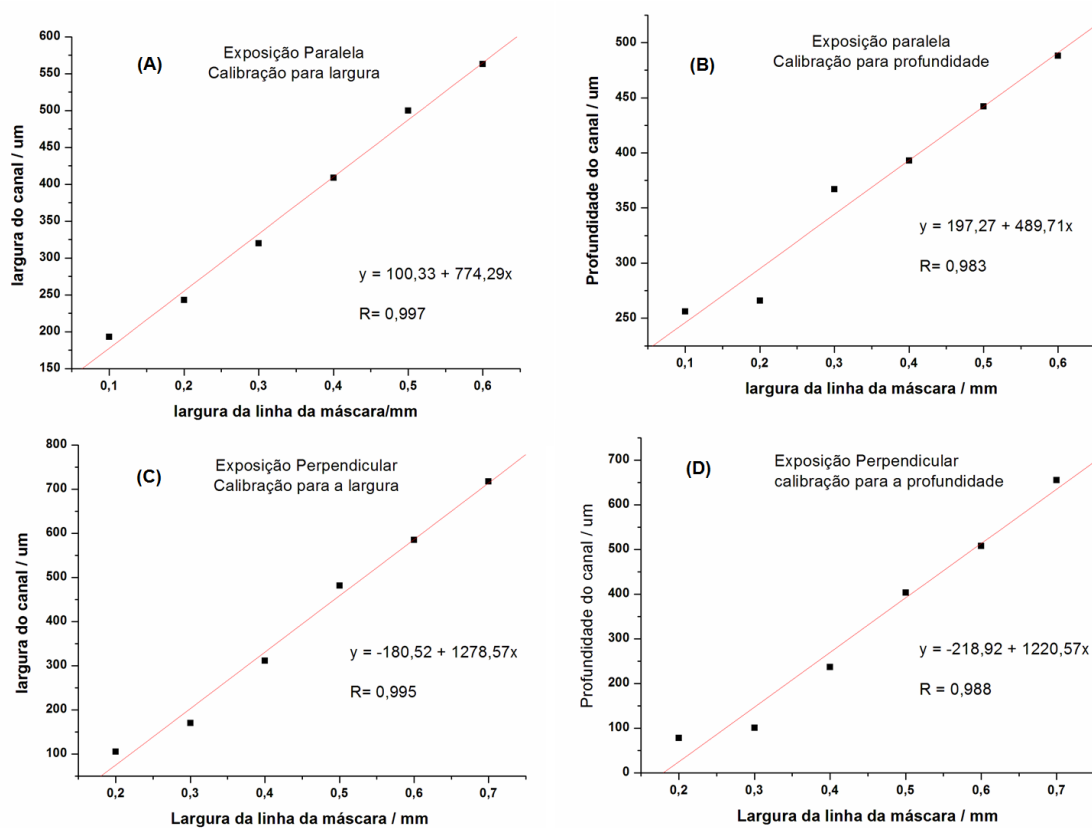


Figura 28 - Curvas de calibração relacionando as larguras das linhas da máscara fotolitográfica com a largura e profundidade dos canais medidos por MEV. Calibração por exposição paralela da largura (A) e profundidade (B) dos canais. Calibração por exposição perpendicular da largura (C) e profundidade (D) dos canais.

4.3 - Construção e avaliação preliminar de microssistemas com unidade de separação integrada

4.3.1 - Microdispositivos com Membrana de Uretana Acrilato

A fotografia do mini- difusor construído com membrana de Uretana-Acrilato (mesmo material de fabricação dos canais), cujo procedimento de fabricação foi descrito na seção 3.1.4.1, é apresentada na Figura 29. A união de ambas as placas poliméricas com a membrana foi realizada com sucesso, não sendo observados vazamentos ou entupimentos na estrutura quando água destilada era bombeada com vazões de até $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ através das cavidades doadora e aceptora.

Deve-se salientar que este resultado foi bastante positivo pois mostrou que um procedimento simples e barato pode ser empregado para criar estruturas com membranas integradas. Em microfluídica, membranas podem ser utilizadas não só para separações analíticas, mas também como unidades indispensáveis para o funcionamento de micro- bombas e micro- válvulas de diafragma que permitem o controle integrado das soluções nos dispositivos⁵².

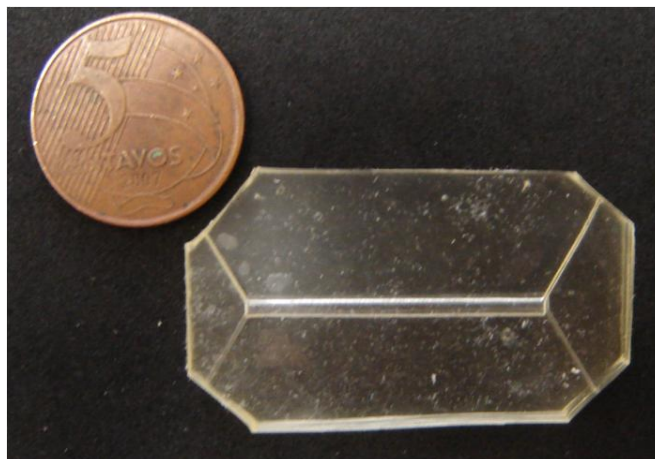


Figura 29- Fotografia do microssistema com Membrana de Uretana Acrilato integrada.

Apesar do procedimento de fabricação ter se mostrado eficiente, a membrana de UA não apresentou um bom desempenho para a realização da separação de espécies por difusão gasosa. De fato, testes preliminares foram

realizados em um sistema FIA convencional com detecção fotométrica, adaptando-se uma membrana de UA (semelhante à fabricada para o mini-difusor) a um difusor para membranas planas fabricado em PTFE. Ao se injetar soluções com altas concentrações (1000 mg L^{-1}) de HCO_3^- em fluxo de H_2SO_4 (solução doadora) não foram observadas quaisquer alterações na absorbância da solução aceptora (solução básica de fenolftaleína), indicando que o CO_2 formado na fase doadora não permeava membrana. É importante relatar que bolhas de CO_2 eram observadas no fluxo doador e que, mesmo assim, não eram observadas alterações na solução aceptora. Além disto, o mesmo teste foi realizado empregando-se uma membrana de PTFE no lugar da membrana de UA, sendo observado um sinal analítico com elevada razão sinal/ruído, indicando o funcionamento adequado do sistema FIA com outra membrana.

A explicação para esta ineficiência de separação pode ser inferida pela observação das micrografias eletrônicas de varredura (MEV) da membrana de UA apresentadas na Figura 30. Como pode ser observado, mesmo com um aumento de 20.000 vezes, a superfície da membrana (Figura 30 (A)) e sua estrutura interna (Figura 30 (B)) não apresentaram poros, o que impede a realização de separações por difusão gasosa⁵¹. Para contornar este problema, alterações na composição do fotoresiste, tais como modificações na quantidade e tipo de solventes utilizados, deverão ser efetuadas para que membranas porosas sejam fabricadas com este material. Estes estudos iam além do escopo do trabalho e, por isto, não foram realizados.

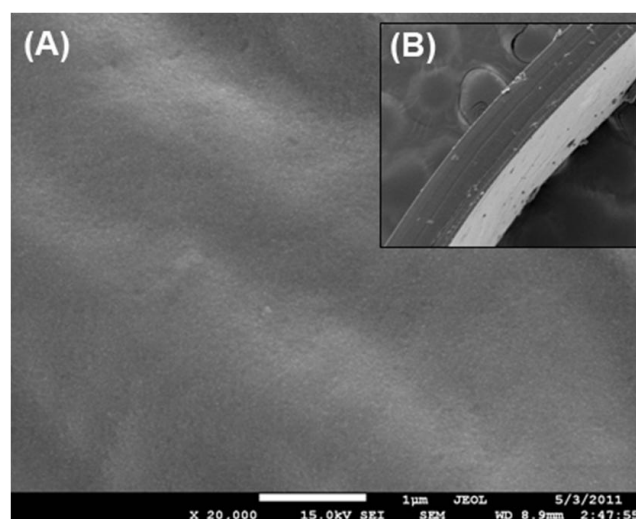


Figura 30 - Micrografia da membrana de UA. (A) Vista superficial do filme polimérico de UA. (B) Vista lateral do filme polimérico de UA.

4.3.2 - Dispositivo com estruturas microfluídicas em placa única

As Fotografias de um dispositivo com estrutura microfluídica em placa única, construído a partir do procedimento descrito na seção 3.1.4.2, são apresentadas na Figura 31. Como podem ser observadas, as membranas foram colocadas de forma que atravessassem toda a espessura do monólito que contém a estrutura microfluídica e colados à mesma com o uso de cola instantânea.

Todos os quatro dispositivos com membranas integradas (quatro membranas diferentes) construídos com este procedimento apresentaram vazamentos na região do difusor, mesmo quando água destilada era bombeada a vazões da ordem de $100 \mu\text{L min}^{-1}$. Este resultado inviabilizou o uso analítico dos dispositivos e mostrou que o procedimento proposto foi insatisfatório para a integração de membranas.

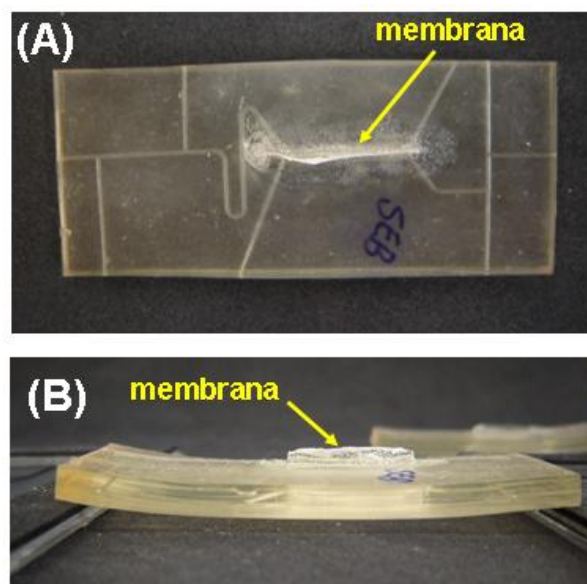


Figura 31 - Microsistema em placa única com membrana integrada. (A) Fotografia frontal do microdispositivo. (B) Fotografia lateral do microdispositivo.

4.3.3 - Dispositivos com membranas integradas entre duas estruturas microfluídicas

Conforme descrito na seção 3.1.4.3, a última estratégia avaliada para a integração de membranas aos microdispositivos consistiu em adaptar um filme polimérico entre duas placas de UA contendo as estruturas microfluídicas. Nesta estratégia, os mesmos filmes descritos na seção 3.1.4.2 (Acetato de celulose, PDMS, PTFE) foram avaliados e, para todos eles, não foi observada a selagem eficiente da estrutura na região do difusor. Mesmo para vazões relativamente baixas (da ordem de $100 \mu\text{L min}^{-1}$), os fluxos das soluções de trabalho causaram o desprendimento dos filmes que ficavam em contato com a superfície de UA.

Este resultado mostrou que, embora as superfícies das placas poliméricas, antes da selagem, apresentem uma superfície adesiva que permite a união efetiva entre duas estruturas de UA, não há uma ligação efetiva de uma placa de UA com qualquer um dos materiais estudados (PTFE, PDMS ou acetato de celulose), o que comprometeu a selagem do dispositivo na região em que estes filmes foram inseridos. De fato, este resultado era esperado uma vez que a combinação de diferentes materiais na construção de microdispositivos é uma dificuldade normalmente relatada por muitos pesquisadores da área³⁵, principalmente com relação à selagem dos dispositivos.

Para contornar este problema, duas placas de acrílico com dimensões de (3.0 cm x 3.0 cm x 0.2 cm) foram colocadas acima e abaixo do microssistema, apenas na região do difusor, e fixadas com o auxílio de grampos conforme mostra a Figura 32.

Com o auxílio das placas de acrílico, as quais foram colocadas antes que qualquer solução fosse inserida nos canais, os microssistemas com membrana de PTFE não apresentaram vazamentos ao se bombear soluções com vazões de até $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Deste modo, dispositivos microfluídicos construídos a partir deste procedimento e integrados com membranas de PTFE foram avaliados em separações por difusão gasosa discutidas nas seções 4.4.1 e 4.4.2. Para as outras membranas avaliadas, a fixação com placas de acrílico e

grampos não foi suficiente para evitar vazamentos na região do difusor. Por este motivo, os microssistemas construídos com membranas de acetato de celulose e PDMS não puderam ser avaliados quanto ao seu desempenho para separações analíticas *online*.

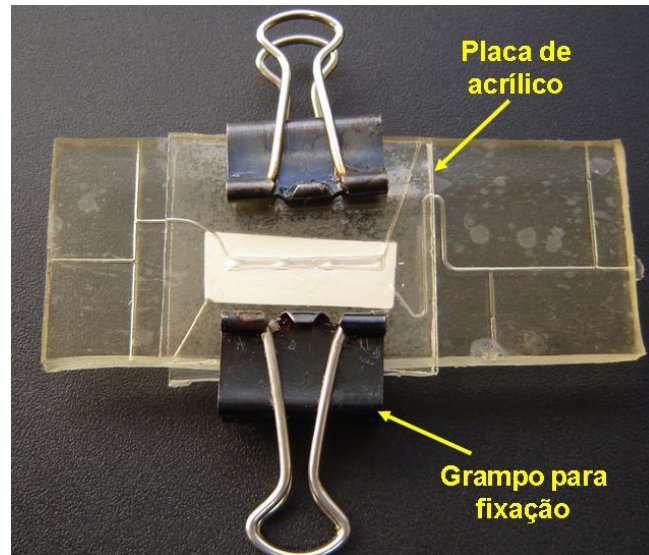


Figura 32 - Microssistema com membrana integrada entre duas estruturas microfluídicas.

4.4 - Aplicação de Microdispositivos Fluídicos com Unidade de Difusão Gasosa Integrada para Determinações Analíticas

4.4.1 - Determinação de íons Bicarbonato em águas minerais

4.4.1.1 - Microssistema com Detecção Fotométrica

Para a determinação de bicarbonato em soluções aquosas foram avaliados dois dispositivos microfluídicos com detecção fotométrica. Conforme mostra a Figura 33-A, em um deles a UDG foi baseada em uma cavidade retangular com 20 mm x 2 mm x 1 mm e no outro (Figura 33 - B), canais ondulados foram utilizados para compor a UDG. A Figura 33 também mostra as regiões dos dispositivos que foram utilizadas como o *plug* de amostragem (Am) e célula de fluxo fotométrica (CFF), assim como as fibras ópticas (FO) e agulhas hipodérmicas (AH) utilizadas guiar a radiação e para acesso das soluções, respectivamente.

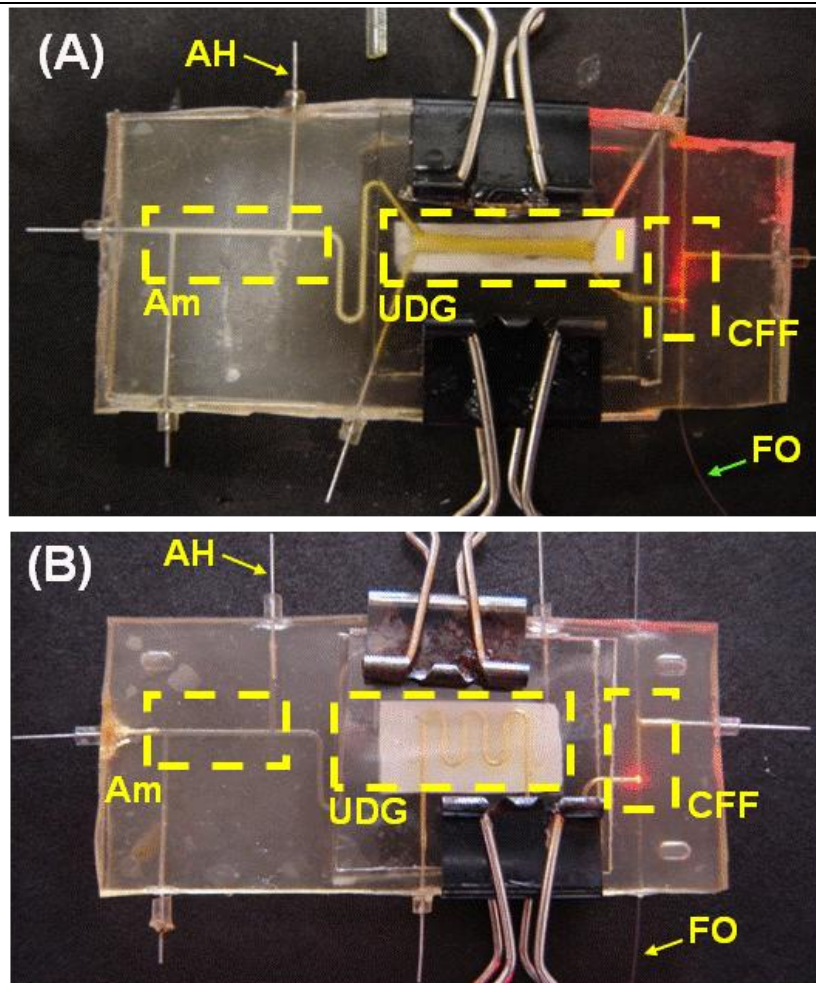


Figura 33 - Microsistemas com detecção fotométrica integrada. (A) UDG com cavidade central retangular (B) UDG com canais ondulados. (Am) *plug* de amostragem, (AH) agulhas hipodérmicas, (UDG) Unidade de difusão gasosa, (CFF) célula de fluxo fotométrica e (FO) fibras ópticas.

O microsistema contendo a UDG com cavidade retangular (Figura 33-A) foi desenvolvido com base nos difusores normalmente empregados em sistemas FIA para utilização de membranas planas^{50,51}. Para este dispositivo, a integração da membrana foi realizada com maior facilidade, uma vez que a geometria mais simples facilitou o alinhamento das estruturas durante a união das placas, antes da selagem.

Conforme ilustrado na Figura 34, a aplicação deste dispositivo para a determinação de íons bicarbonato não forneceu resultados satisfatórios. Sinais analíticos com razões sinal/ruído razoáveis (> 100) foram observados apenas para a injeção de padrões com altas concentrações de HCO_3^- (acima de 50 mg L^{-1}). Além disso, foi observada também uma variação para a linha de base, com decaimento de aproximadamente 350 mV do sinal ao longo de toda a análise, o que pode estar relacionado com a adsorção do cromóforo (BTB) nas

paredes dos canais. De fato, como pode ser observada, na Figura 33, parte deste reagente coloriu as estruturas microfluídicas no tom amarelo persistente mesmo após sucessivas lavagens.

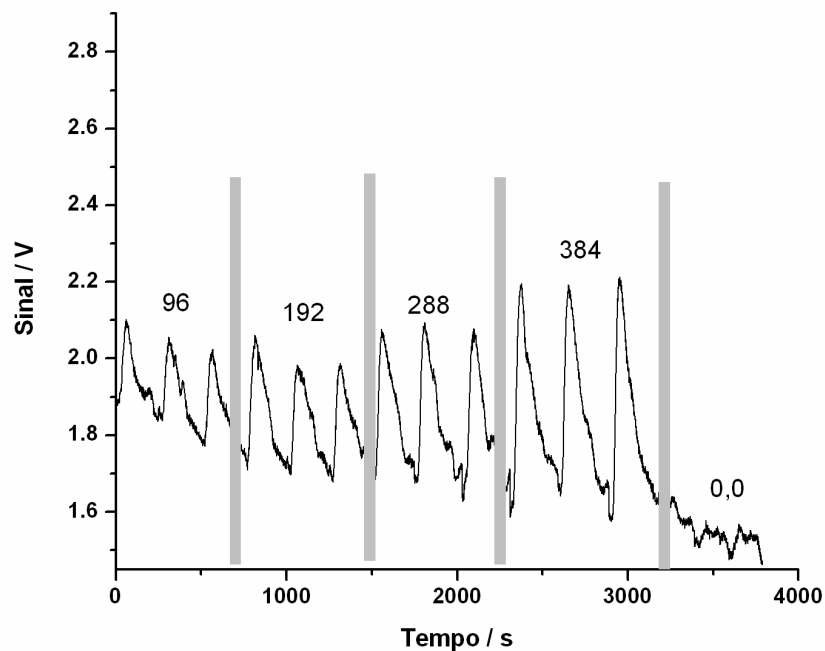


Figura 34 - Diagrama para injeções de soluções padrão de bicarbonato (0,0 a 384 mg L⁻¹, indicações na figura) utilizando-se o microsistema com cavidade central (Figura 33-A) e o procedimento descrito na seção 3.2.1.1.

A baixa sensibilidade obtida ao se empregar o microsistema com cavidade retangular foi inicialmente atribuída ao elevado volume deste difusor (cerca de 80 μ L, considerando as cavidades em ambas as placas). Devido ao uso de uma linha de máscara com largura de 2,0 mm durante a gravação fotolitográfica das cavidades, a profundidade destas estruturas foi de aproximadamente 1,0 mm, o que acarretou no grande volume do difusor. Na realidade, nos difusores convencionais a profundidade das cavidades costuma não ultrapassar 0,5 mm^{53,54}.

Com o volume elevado, a amostra recém-injetada poderia ser diluída no próprio difusor proporcionando um pico com menor altura e conseqüente redução na sensibilidade da análise.

Para contornar este problema, o microsistema com canais ondulados (Figura 33-B) foi desenvolvido para proporcionar um volume menor à UDG sem que houvesse uma grande redução nas superfícies de contato da membrana com as soluções aceptora e doadora. Com base nas dimensões internas dos canais, estimou-se um volume de 19 μ L para este novo difusor.

Com esta alteração, foi possível obter sinais analíticos para as injeções de padrões de HCO_3^- com concentrações entre 20 mg L^{-1} e 80 mg L^{-1} . Pode-se observar na Figura 35 que os picos obtidos se assemelharam mais àqueles observados em sistemas FIA ^{19,20}, sendo notada também certa melhora nas razões sinal/ruído, embora a linha de base tenha mantido a tendência de diminuição do sinal.

Empregando-se as alturas dos picos, calculadas pela subtração do sinal máximo daquele obtido imediatamente antes da elevação do sinal, construiu-se a curva analítica apresentada na Figura 36. Uma boa correlação linear foi obtida ($R^2 = 0,998$) sendo estimado um limite de detecção de $0,64 \text{ mg L}^{-1}$, o qual foi calculado como o módulo do coeficiente linear adicionado de três vezes o desvio padrão ($3 \times \text{SD} = 9,48 \times 10^{-4}$) para o ajuste por mínimos quadrados ⁶².

Apesar desta relativa melhora nos resultados, este dispositivo não foi aplicado à determinação de íons bicarbonato em amostras de águas minerais comerciais. Mesmo com alterações no procedimento analítico tais como, mudanças nas concentrações de BTB e H_2SO_4 e uso de diferentes vazões para estas soluções, os sinais analíticos não diferiram muito daqueles apresentados na Figura 34. Assim, conforme será descrito na seção 4.4.1.2, optou-se pela alteração do sistema de detecção para a realização das determinações nas amostras.

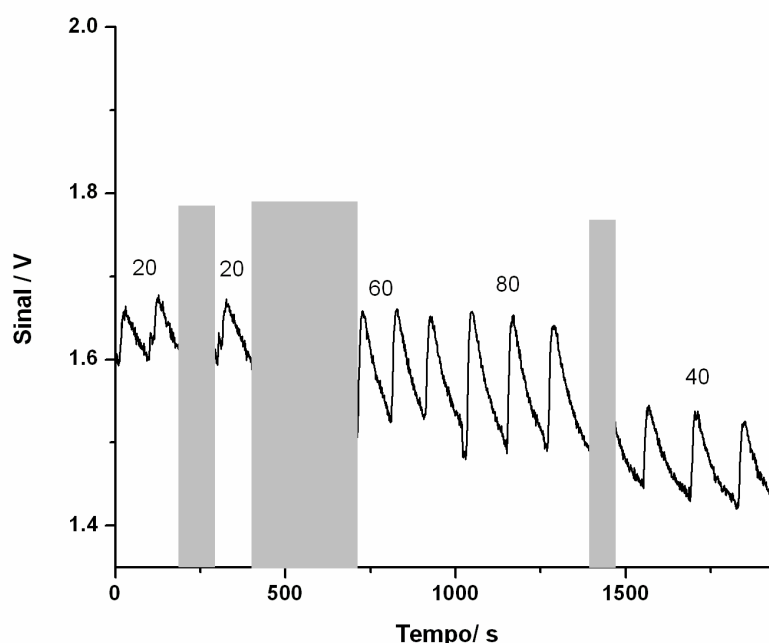


Figura 35 - Diagrama para injeções de soluções padrão de bicarbonato (20 a 80 mg L^{-1} , indicações na figura) utilizando-se o microsistema com canais ondulados na UDG (Figura 33-B) e o procedimento descrito na seção 3.2.1.1.

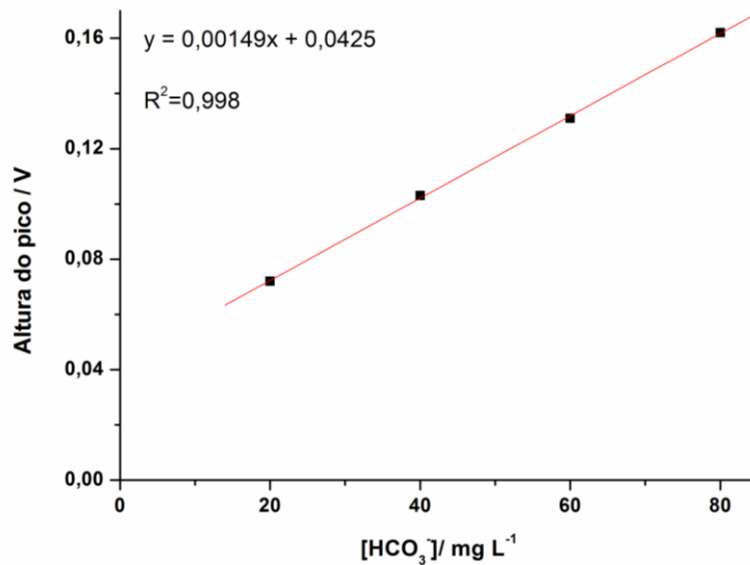


Figura 36 - Curva analítica construída com o microsistema com detecção fotométrica, para as soluções padrão na faixa de concentração de 20 a 80 mg L⁻¹.

4.4.1.2. - Microsistema com Detecção Condutométrica

Segundo citado na seção 3.2.1.2, foi utilizado um microsistema com detecção condutométrica e com canais ondulados na UDG para a determinação de íons bicarbonato em águas minerais. A fotografia deste dispositivo é apresentada na Figura 37. O *plug* para amostragem hidrodinâmica (Am), a unidade de difusão gasosa (UDG) com membrana de PTFE e a célula de fluxo condutométrica foram integradas em um monólito com 7,0 cm x 3,0 cm x 0,4 cm, ocupando uma área menor que a de um cartão de crédito.

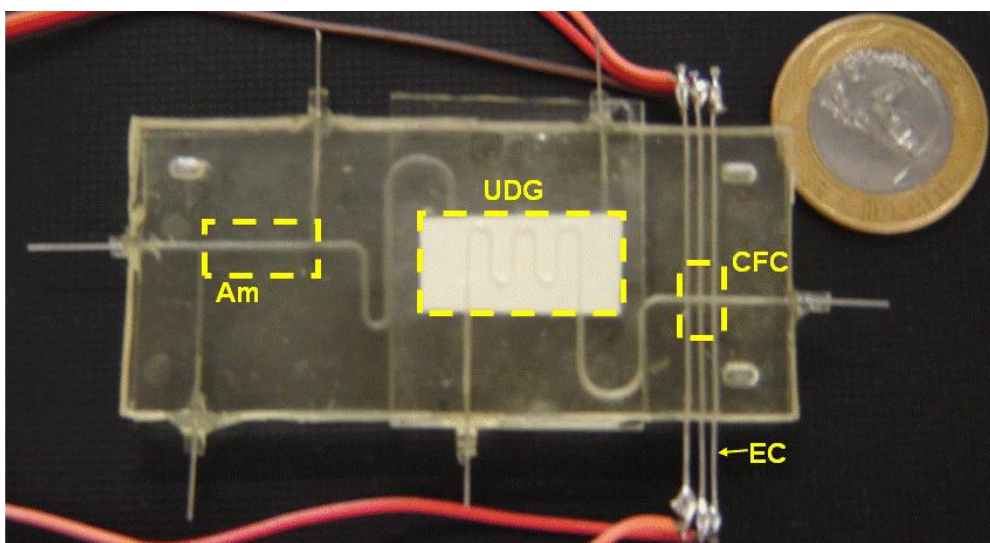


Figura 37 - Microsistema com detecção condutométrica. (Am) *plug* de amostragem, (UDG) Unidade de difusão gasosa, (CFC) Célula de fluxo condutométrica e (EC) Eletrodos de cobre.

Com base nos resultados discutidos na seção 4.2 para a calibração do procedimento de fabricação e sabendo-se que as larguras das linhas da máscara utilizada para a fabricação deste dispositivo foram de 500 μm , estimou-se os volumes de regiões específicas do dispositivo e também de todo o microsistema a partir das dimensões dos canais. A Tabela 2 traz os valores calculados.

Tabela 2 - Dimensões do dispositivo microfluídico proposto.

	Comprimento/ mm	Volume / μL
Plug de amostragem	13	2,5
UDG*	100	19
Célula de fluxo condutométrica	3	0,6
Dispositivo completo	250	48

* Soma das estruturas doadora e aceptora.

Os eletrodos de cobre utilizados para as medidas de condutância foram integrados com sucesso ao dispositivo microfluídico. Devido às características elastoméricas do fotoresiste UA, os eletrodos foram fixados adequadamente aos canais guia, evitando vazamentos durante os testes preliminares e as análises. O uso de três pares de eletrodos foi adotado com o objetivo de aumentar a área de contato com as soluções de trabalho e minimizar possíveis alterações nas leituras causadas pela retenção de microbolhas.

O diagrama para a determinação de íons bicarbonato empregando-se o dispositivo e o procedimento descrito na seção 3.2.1.2 é apresentado na Figura 38. Um *drift* de aproximadamente 30 nS h^{-1} foi observado e pode estar relacionado possivelmente à pequena área dos eletrodos, os quais podem reter microbolhas ou partículas ultrafinas na solução aceptora, causando alterações no sinal analítico. Apesar disto, este drift é bastante pequeno e não interferiu na quantificação de íons bicarbonato, uma vez que boas razões sinal/ruído foram observadas para todas as injeções.

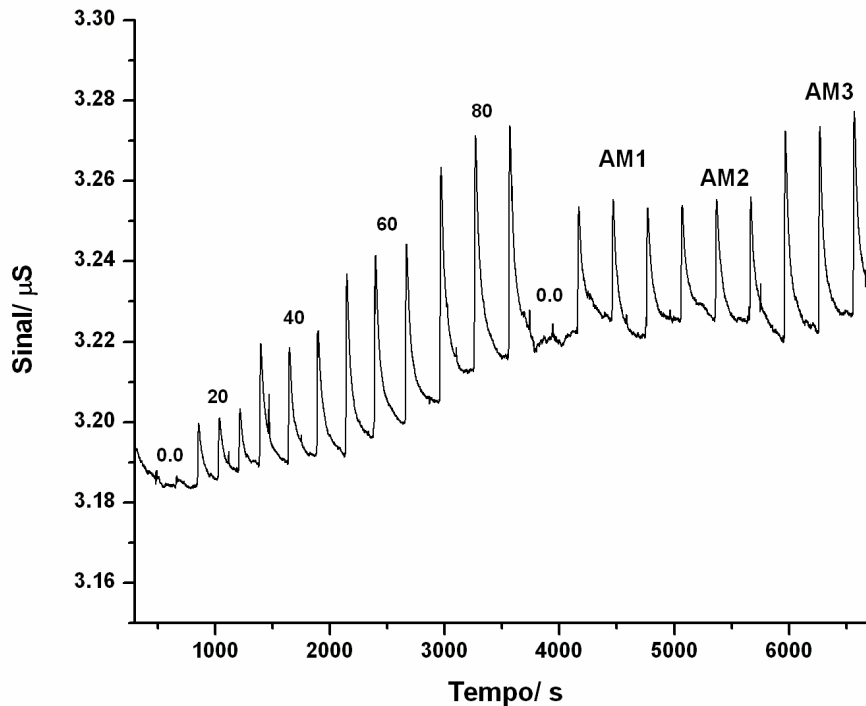


Figura 38 - Diagrama para injeções de soluções padrão de bicarbonato (20 a 80 mg L⁻¹, indicações na figura) e as amostras de água mineral comercial (AM1, AM2 e AM3).

A curva analítica construída com base nas alturas dos picos (Figura 39) apresentou uma boa correlação linear ($R^2 = 0,999$) para a faixa de concentração estudada (20 a 80 mg L⁻¹), proporcionando um limite de detecção de 2,3 mg L⁻¹, o qual foi calculado como o módulo do coeficiente linear adicionado de três vezes o desvio padrão ($3 \times SD = 1,6 \times 10^{-3}$) para o ajuste por mínimos quadrados.

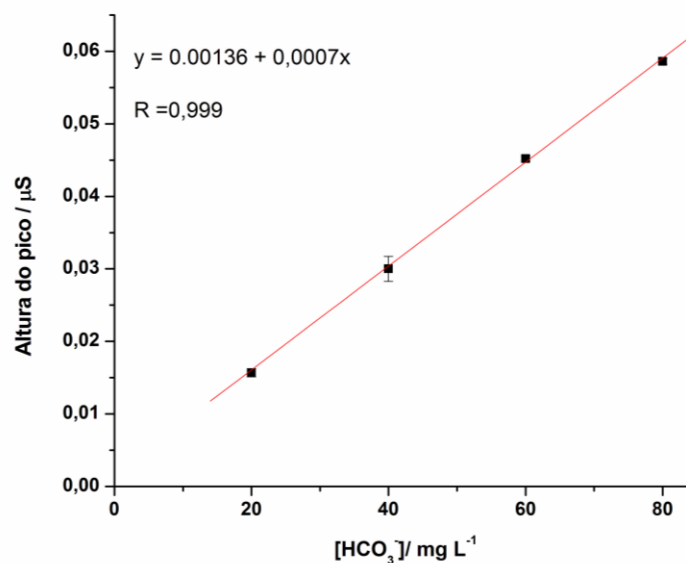


Figura 39 - Curva analítica construída com o microsistema com detecção condutométrica, para as soluções padrão de bicarbonato na faixa de concentração de 20 a 80 mg L⁻¹.

A repetibilidade das medidas foi avaliada pela injeção sucessiva de soluções padrão com 80 mg L^{-1} de bicarbonato sendo encontrado um desvio padrão relativo de 2,3 % ($n=5$), o que indica uma boa precisão dos procedimentos.

Adicionalmente, uma frequência analítica de 15 amostras h^{-1} foi obtida ao se bombear as soluções aceptora e doadora com vazões de $40 \mu\text{L min}^{-1}$. Sob esta condição, um volume de apenas 20 mL de resíduos foi produzido após 50 injeções. Este volume representa cerca de $\frac{1}{4}$ do volume de resíduos produzidos em um sistema de análise em fluxo convencional⁵².

A Tabela 3 lista os resultados para a quantificação de íons bicarbonato em três amostras de água mineral comercial. Não foi observada diferença significativa (teste T com 95% de confiança) nos resultados do microsistema de análise em fluxo (μFIA), quando comparados com o método de referencia (Titulação Potenciométrica). Os erros relativos, menores que 3%, também indicaram uma boa concordância dos resultados e a inexistência de erros sistemáticos.

Tabela 3 - Resultados para a determinação de íons bicarbonato em água mineral

Amostra	μFIA (mg L^{-1})	Titulação Potenciométrica (mg L^{-1})	Erro relativo %
AM1	$103,3 \pm 4,0$	$101,2 \pm 0,1$	+ 2,1
AM2	$98,6 \pm 6,0$	$100,2 \pm 1,0$	- 1,6
AM3	$69,5 \pm 1,3$	$69,4 \pm 1,7$	+ 0,2

4.4.2 - Determinação de íons amônio em pastilhas medicinais

Na determinação de íons amônio em pastilhas medicinais foi utilizado apenas o microssistema com detecção condutométrica (semelhante ao microdispositivo apresentado na seção 3.2.1.2) visto que os resultados obtidos para a detecção fotométrica não foram satisfatórios.

A Figura 40 mostra o fiagrama para a determinação de íons amônio com o microdispositivo fluídico. A linha de base apresentou um *drift* de 220 nS h^{-1} , possivelmente explicado pela a formação de micro bolhas e de particulados ultrafinos que ficaram retidos na solução acceptora, interferindo no sinal analítico. Apesar disto, uma boa razão sinal/ ruído foi apresentada para todas as injeções, não interferindo na quantificação de amônio proposta.

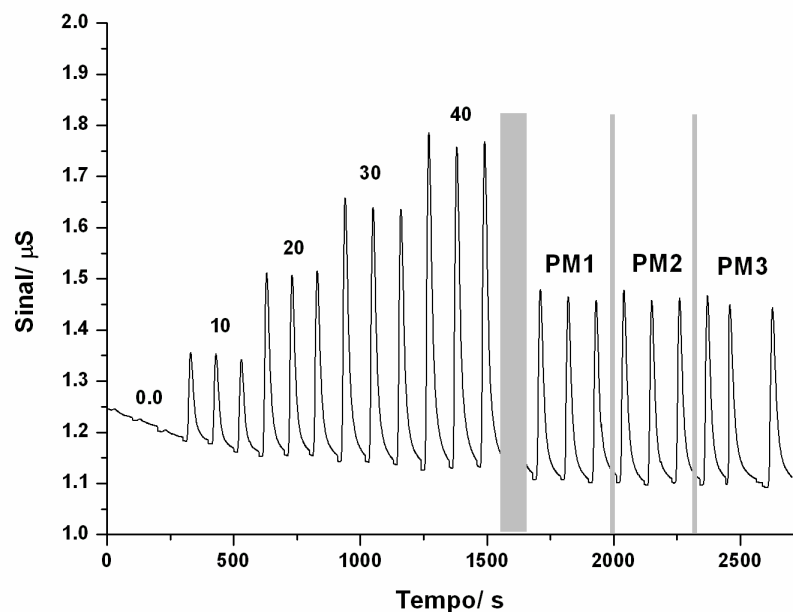


Figura 40- Fiagrama para injeções de soluções padrão de amônio (0,0 a 40 mg L^{-1} , indicados na figura) e de amostras de pastilhas medicinais (PM1, PM2 e PM3).

A curva analítica (Figura 41) foi construída a partir das alturas dos picos das soluções padrão de amônio e apresentou boa linearidade ($R^2 = 0,996$) para o intervalo de concentrações estudadas ($10 \text{ a } 40 \text{ mg L}^{-1}$). O limite de detecção de $2,9 \text{ mg L}^{-1}$, foi calculado a partir desta curva, de forma idêntica à realizada para a determinação de íons bicarbonato.

É importante observar que a sensibilidade do método para a determinação de íons amônio foi maior que aquela observada para a determinação de íons bicarbonato. Como o gás amônia apresenta uma maior solubilidade (541 g L^{-1} em 20°C) que o dióxido de carbono ($1,7 \text{ g L}^{-1}$ em 20°C) em água, há uma maior eficiência na transferência de massa do NH_3 através da membrana de PTFE ao se empregar apenas água destilada como fluido acceptor.

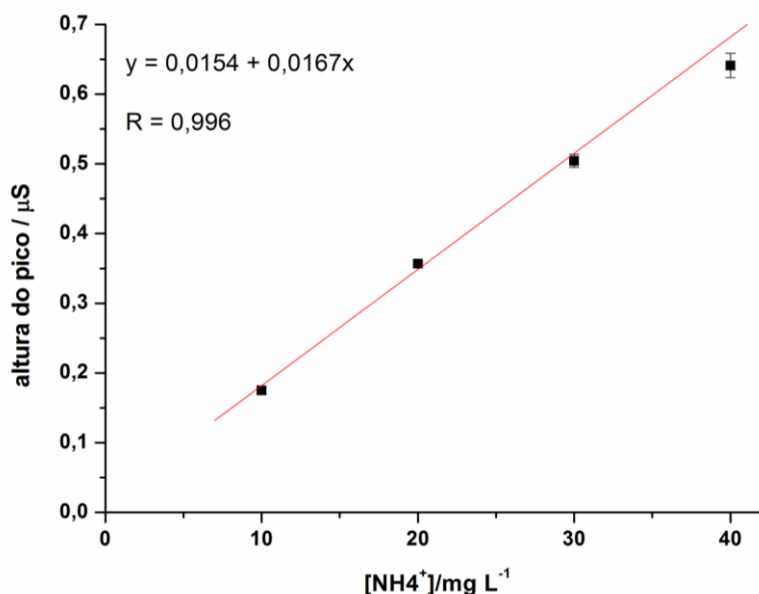


Figura 41 - Curva analítica construída com o microsistema com detecção condutométrica, para as soluções padrão de amônio na faixa de concentração de 10 a 40 mg L^{-1} .

A repetibilidade das medidas foi avaliada pelas sucessivas injeções de uma solução padrão com 40 mg L^{-1} de amônio, na qual se obteve um desvio padrão relativo de 3% ($n = 5$), e mostrou que o procedimento utilizado apresenta uma boa precisão.

Além disso, a frequência analítica do procedimento foi de 25 injeções h^{-1} ao se bombear as soluções doadora e acceptora em uma vazão de $40 \mu\text{L min}^{-1}$. Para esta condição, foi gerado apenas 10 mL de resíduos em 50 injeções, o que demonstrou também uma redução significativa no volume de reagentes consumidos.

Os resultados obtidos para a determinação de íons amônio em pastilhas medicinais são listados na Tabela 4. Considerando as concentrações determinadas através do método proposto (μFIA) e do método de referência (Espectrofotometria em batelada), um erro considerável (- 22%) foi observado

apenas para a amostra PM2. De fato, diferenças menores que 5% foram calculadas pela comparação de todos os resultados do microssistema com as concentrações apresentadas nos rótulos das pastilhas medicinais. Embora as concentrações apresentadas nas bulas não sejam totalmente confiáveis, os resultados obtidos podem indicar interferências, causadas por substâncias presentes na amostra PM2, sobre o método de referencia, as quais foram eliminadas pelo uso do processo de separação por membrana no método com o microdispositivo fluídico.

Tabela 4- Resultados para a determinação de íons amônio em pastilhas medicinais

Amostra	μFIA (mg g^{-1})	Referencia (mg g^{-1})	Erro Relativo %	Bula (mg.g^{-1})
PM1	$4,8 \pm 0,1$	$4,90 \pm 0,01$	- 2,0	4,6
PM2	$5,4 \pm 0,1$	$6,94 \pm 0,02$	-22,2	5,3
PM3	$6,8 \pm 0,2$	$7,04 \pm 0,05$	-3,4	6,7

É importante ressaltar também que todas as soluções das amostras injetadas no microssistema apresentavam consideráveis quantidades de corantes (Figura 42). Apesar disso, não houve interferências nos resultados analíticos, mostrando que o microssistema proposto possui desempenho satisfatório para isolar e detectar o analito de interesse.



Figura 42 - Fotografia das amostras de pastilhas medicinais utilizadas.

5 – Conclusões e Perspectivas

O trabalho desenvolvido demonstrou a possibilidade de construção de microssistemas de análise em fluxo com unidades de difusão gasosa integradas empregando-se a técnica de fotolitografia profunda no ultravioleta a partir de um fotoresiste à base de UA. O procedimento empregado e otimizado para a fabricação foi rápido (apenas 3 horas para a obtenção de um microssistema completo), apresentando um custo bastante baixo (aproximadamente US\$ 20 por dispositivo), mostrando-se bastante eficiente. Além disto, foi comprovada também a aplicabilidade dos dispositivos em determinações analíticas simples, as quais poderão subsidiar estudos futuros para um melhor desempenho analítico, realizando-se as otimizações necessárias, principalmente em termos de sensibilidade com o uso de estratégias de fluxo, como a recirculação, stopped-flow e contra- fluxo na UDG.

Como perspectiva futura, é possível inferir que microssistemas similares aos propostos neste trabalho poderão ser desenvolvidos para a determinação de Carbono Orgânico Total ou de Nitrogênio Total em águas naturais. Neste caso, um procedimento de automação para a oxidação *online* da amostra deverá ser adaptado e otimizado para uma escala em miniatura. Estudos adicionais para a integração de membranas fabricadas com outros materiais, diferentes de PTFE, deverão ser realizados para que microssistemas de UA possam ser utilizados em processos de separação como filtração e diálise, ampliando a aplicação dos dispositivos para outros analitos.

6. Referências Bibliográficas

1. Armenta, S.; Garrigues, S.; de La Guardia, M.; *Trends in Analytical Chemistry*, **2008**, vol 27, nº 6, 497- 511.
2. Simonet, B. M, Valcárcel, M.; *Microchim. Acta*, **2006**, 153, 1-5.
3. Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. M.; *Sens. Actuators*, **1990**, vol 1, 244-248.
4. Sun, Y.; Kwok, Y. C.; *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 556, 80-96.
5. Tachikawa, K.; Dittrich, P. S.; Manz, A.; *Sensors and Actuators B*, **2009**, 137, 781-788.
6. Whitesides, G.M.; *Nature* , **2006** , 442 , 368.
7. Coltro, W. K. T.; Piccin, E.; Carrilho, E.; de Jesus, D. P.; da Silva, J. A. F.; da Silva, H.D. T.; do Lago, C. L.; *Quim. Nova*, **2007**, vol 30, nº 8, 1986.
8. Madou, M. J., *Fundamentals of Microfabrication*, Boca Raton, 1st. Ed., CRC. Press, **1997**.
9. Beaton, A.D.; Sieben, V.J.; Floquet, C.F.A; Waugh, E. M.; Bey, S. A. K.; Ogilvie, I. R. G.; Mowlem, M. C.; Morgan, H.; *Sensors and Actuators B*, **2011**, 156, 1009-1014.
10. Guillemette, M. D.; Roy, E.; Auger, F. A.; Veres, T.; *Acta Biomaterialia*, **2011**, 7, 2492-2498.
11. Roberts, M. A., Rossier, J. S., Bercier, P. e Girault. H.; *Anal.Chem.*, **1997**, 69, 2035.
12. Lin, Y. C.; Ho, H. C.; Tseng, C. K.; Hou, S. Q.; *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **2001**, 11, 189-194.
13. Becker, H. Gärtner, C.; *Anal Bioanal Chem*, **2008**, 390, 89-111.
14. Yu, J.; Wang. S.; Ge, L.; Ge, S.; *Biosensors and Bioelectronics*, **2011**, 26, 3284- 3289.
15. Duarte, G. R. M.; Price, C. W.; Augustine, B. H.; Carrilho, E.; Landers, J. P.; *Analytical Chemistry*, **2011**, 83, 5182-5189.
16. Ruzicka, J. ; Hansen, E. H., *in Flow injection Analysis (Chemical Analysis)*, 1st ed., Wiley-Interscience, New York, **1981**, vol. 62.
17. Pérez- Olmos, R.; Soto, J. C.; Zárate, N.; Araújo, A. N.; Montenegro, M. C. B. S. M.; *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 554, 1-16.

18. Feres, M. A.; Fortes, P. R.; Zagatto, E. A. G.; Santos, J. L. M.; Lima, J. L. F. C.; *Analytical Chimical Acta*, **2008**, 618, 1-17.
19. Dunec, A.F.; Cheregi, M.; Calatayud, J.M.; Mateo, J.V.G.; Eneim, H.Y.A.; *Crit Rev Anal Chem*; **2003**, 33, 57–68.
20. Cerda, V.; Estela, J.M.; Forteza, R.; Cladera, A.; Becerra, E.; Altimira, P.; Sitjar, P.; *Talanta*, **1999**, 50, 695–705.
21. Sakai, T.; Teshima, N.; *Analytical Sciences*, **2008**, 24, 855-863.
22. Zimina, T.M.; Luchinin, V.V.; *Journal of Analytical Chemistry*, **2011**, 66,12, 1136-1158.
23. Ruzicka, J.; Hansen, E.H.; *Flow Injection Analysis*, Wiley-VCH, 1988, 2^a ed.
24. Romoli, L.; Tantussi, G.; Dini, G.; *Optics and Lasers in Engineering*, **2011**, 49, 419-427.
25. www.chemtrix.com/products/5/REACTORS (acessado em 27/08/2012 às 16:32)
26. Almeida, S. A. A.; Arasa, E.; Puyol, M.; Martinez-Cisneros, C. S.; Alonso-Chamarro, J.; Montenegro, M. C. B. S. M.; Sales, M. G. F.; *Biosensors and Bioelectronics*, **2011**, 30, 197-203.
27. Songjaroen, T.; Maturros, T.; Sappat, A.; Tuantranont, A.; Laiwattanapaisal, W.; *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 647, 78-83.
28. Al- Gailani, B. R. M.; Greenway, G. M.; McCreedy, T.; *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **2007**, 87, 425-436.
29. Fernandes, J. C. B.; Ferreira, L. O. S.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2006**, 17, 4, 643-647.
30. Fonseca, A.; Raimundo, I. M. Jr.; Rohwedder, J. J. R.; Ferreira, L. O. S.; *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 603, 159-166.
31. Fonseca, A.; Raimundo, I. M. Jr.; Rohwedder, J. J. R.; Lima, R. S.; Araújo, M. C. U.; *Anal. Bional. Chem.*, **2010**, 396, 715-723.
32. Monte- Filho, S. S.; Lima, M. B.; Andrade, S. E.; Harding, D. P.; Fagundes, Y. N. M.; Santos, S. R. B.; Lemos, S. G.; Araujo, M. C. U.; *Talanta*, **2011**, 86, 208-213.
33. Chen, X.; Cui, Da-Fu.; *Microsyst Technol*, **2009**, 15, 667-676.

34. Roman, G. T.; Kennedy, R. T.; *Journal of Chromatography A.*; **2007**, 1168, 170,188.
35. Shameli, S. M.; Elbuken, C.; Ou, J.; Ren, C. L.; Pawliszyn, J.; *Electrophoresis*, **2011**, 32, 333-339.
36. Jönsson, J. A.; Mathiasson, L.; *Journal of Chromatography A*, **2000**, 902, 205-225.
37. Koros, J.W.; Ma, Y. H.; Shimidzu, T.; *Pure & appl Chem.*, **1996**, 68, 1479-1489.
38. Pandey, P.; Chauhan, R. S.; *Progress in Polymer Science*, **2001**, 26, pg 853-893.
39. Harbert, A. C.; Borges, C. P.; Nobrega, R.; *Processo de separação por membranas*, Coppe/ UFRJ, **2006**.
40. Hylton, K.; Mitra, S. ; *J. Chromatogr. , A. .* **2007**, 1152, 199-214.
41. Peisino, A. L.; *Membranas Anisotrópicas densas para a remoção de CO₂ e H₂S do gás natural*. Abril de 2009. 120 folhas. Dissertação- UFRJ. Rio de Janeiro, Abril de 2009.
42. Moreira, G.F.; *Membranas tipo fibra oca de carbono a partir da pirólise de fibras poliméricas de PEI/PVP para separação de gases em escala molecular e altas temperaturas*, Maio de 2008. 165 folhas. Tese- UFRJ. Rio de Janeiro de 2008.
43. Kondo, M. M.; Arcos, M. A. S. V.; Grassi, M. T.; *Brazilian Archives of Biology and technology*, **2002**, 45, 81-87.
44. Araujo, C.S.T.A.; Carvalho, J. L.; Mota, D. R.; Araujo, C.L.; Coelho, N. M. M.; *Food Chem.*, **2005**, 92, 765-770.
45. Araujo, A. R. T. S.; Saraiva, M. L. M. F. S.; Lima, J. L. F. C.; Korn, M.G. A.; *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 613, 177-183.
46. Kritsunankul, O.; Pramote, B.; Jakmune, J.; *Talanta*, **2009**, 79,1042-1049.
47. Rundel, J. T.; Paul, B. K.; Remcho, V. T.; *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1162, 167.
48. Guo, Z. X.; Li, Y. Z.; Zhang, X. X.; Chang, W. B.; Ci, Y. X.; *Anal Bioanal Chem.*; **2002**, 374, 1141-1146.

-
49. Lee, K. P.; Arnot, T.C.; Mattia, D.; *Journal of Membrane Science*, **2011**, 370, 1-22.
 50. Satiemperakul, S.; Phongdong, P.; Liawruangrath, S.; *Food chemistry*, **2010**, 121, 893-898.
 51. Miró, M.; Frenzel, W.; *Trends Anal. Chem.* **2004**, 23 (9), 624.
 52. Oliveira, P. C. C.; Masini, J.C.; Galhardo, C.X.; Lima, J.C.S.; Sant'ana A.E.G.; Vasconcelos, A.M.G.; Nunes, W.P.; Amaral, O.L.C., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2006**, vol 17, 5, 976-980.
 53. Ljunggren, E.; Kalberg, B.; *Journal of Automatic Chemistry*, **1995**, 17, nº 3, 105-108.
 54. De Oliveira, P. C. C.; Masini, J. C.; Galhardo, C. X.; Lima, J. S. L.; Sant'ana, A. E. G.; Vasconcelos, A. M. G.; Nunes, W. P.; Amaral, O. L. C.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2006**, vol 17, nº 5, 976-980.
 55. Tue- Ngeun, O.; Sandford, R. C. ; Jakmunee, J. ; Grudpan, K.; McKelvie, I. D.; Worsfold, P. J.; *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 554, 17.
 56. Moskvina, L. N.; Nikitina, T. G.; *Journal of Analytical Chemistry*, **2004**, 59, 2-16.
 57. Melchert, W. R.; Reis, B. F.; Rocha, F. R. P.; *Analytica Chimica Acta*, **2012**, 714, 8-19.
 58. Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *Analytica Chimica Acta*; **1984**, 161, 1-25.
 59. Kaufman, Y.; Kasherb, R.; Lammertink, R. G.H.; Fregerd, V.; *J. Membr. Sci.*, **2012**, 396, 67.
 60. Nge, P.N.; Yang, W.; Pagaduan, J. V.; Wooley, A. T.; *Electrophoresis*, **2011**, 32, 1133.
 61. Sheng, Y.; Bowser, M. T.; *Analyst*, **2012**, 137, 1144.
 62. Vogel, A. I.; *In Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, 5^a ed.; Longman: New York, **1989**.
 63. Miller, J. C. e E Miller, J. N., *Statistics for analytical chemistry*, 3rd ed., Ellis Horwood, 1993.