



Universidade de Brasília

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CORREÇÃO DO EFEITO SCHLIEREN E INTEGRAÇÃO DE UNIDADES DE
EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM
MICROSSISTEMAS DE ANÁLISE**

LAIZ DE OLIVEIRA MAGALHÃES

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília-DF

2015

LAIZ DE OLIVEIRA MAGALHÃES

**CORREÇÃO DO EFEITO SCHLIEREN E INTEGRAÇÃO DE
UNIDADES DE EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM FASE
SÓLIDA EM MICROSSISTEMAS DE ANÁLISE**

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para a obtenção
do título de mestre em Química.
Programa de Pós-Graduação em
Química, Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília - DF
2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

Laiz de Oliveira Magalhães

“Correção do Efeito Schlieren e Integração de Unidades de Extração e Pré-concentração em Fase Sólida em Microssistemas de Análise”

Dissertação apresentada à banca examinadora como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade de Brasília (UnB).

Aprovada em 6 de agosto de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Fonseca - IQ/UnB
(Presidente)

Prof. Dr. Carlos Martín Infante Córdova - FS/UnB
(Membro Titular)

Prof^a Dr^a Valéria Regina Bellotto - IQ/UnB
(Membro Titular)

Prof^a Dr^a Ana Cristi Basile Dias - IQ/UnB
(Membro Suplente)

“Não temas. Crê somente”.

- Marcos 5,36b.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a vida e a oportunidade de crescer a cada dia. Sem Ele eu não seria capaz de realizar meus objetivos. Com Ele vou mais longe e estou sempre amparada.

Agradeço a minha família, nas pessoas de Lúcio, meu pai, Leny, minha mãe, Lara, minha irmã e Luiz, meu irmão. Por todo apoio, incentivo e momentos vividos, sejam estes de tristezas ou de felicidades.

Agradeço ao meu namorado Daniel pela parceria, amor e dedicação em me ajudar, durante todos esses anos de relacionamento e pelo incentivo a aprofundar mais meus conhecimentos. Que a nossa vida seja repleta de amor e companheirismo.

Agradeço ao meu orientador, Alexandre Fonseca, uma pessoa única, que nasceu para ensinar e o faz muito bem, por toda a dedicação, também pela amizade e preocupação durante todos esses anos de trabalho em conjunto.

Agradeço também aos professores Ana Cristi, Valéria, Carlos, Jez e Fernando, os quais me acompanham de perto desde os anos da graduação (Ana, Valéria, Jez e Fernando) e que aceitaram o convite de participar da banca de avaliação deste trabalho (Carlos, Valéria e Ana).

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Camila, Hadassa, Lilian, Eduardo, Alan, Gerson, Angélica, Carla, Rosylane, Tatiane, Nancy, Victor, Thiago, Milenna e Gabriel. Por toda a ajuda, palavras de carinho e momentos de descontração.

Agradeço as minhas amigas Thauana, Deizy, Daniela e Sílvia, e também à família do meu namorado (Conceição, Carlos, Mateus e Leandro), por compartilharem também da vontade de crescer profissionalmente. Obrigada pelo companheirismo e amizade.

Enfim, agradeço a todos que fazem parte da minha vida e são essenciais na minha caminhada. A todos, o meu muito obrigada!

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de microssistemas fluídicos de uretano-acrilato integrados com coluna empacotada para a extração em fase sólida com trocador aniônico e detecção fotométrica com correção do efeito Schlieren. Um diodo emissor de luz (LED) emitindo sequencialmente em diferentes comprimentos de onda (470, 530 e 625 nm) foi utilizado para adquirir o sinal referente apenas ao efeito Schlieren e outro sinal referente ao efeito e também ao analito, permitindo a correção pela subtração dos sinais. Foi demonstrado que o referido efeito é eliminado ou minimizado mesmo quando soluções de trabalho com elevadas diferenças de concentração são gerenciadas no interior do dispositivo, permitindo a determinação de íons NO_2^- em meios com elevada concentração de eletrólitos, Cr (VI) em meios com elevada acidez e Fe (II) em amostras de medicamentos com elevado teor de sacarose, propiciando, neste último caso, erros relativos menores que 10% por meio da comparação com o método de referência. Um dispositivo com microesferas de resina aniônica Dowex 1X8 foi construído empacotando-se manualmente o material sólido em um reservatório com dimensões de 25 × 2,0 × 1,0 mm, previamente ao procedimento de selagem. O microssistema proposto não apresentou entupimentos ou vazamentos na região da coluna e a sua aplicação à determinação de íons NO_2^- em águas superficiais do lago Paranoá (Brasília-DF) proporcionou um fator de pré-concentração de aproximadamente quatro vezes a partir de um volume de apenas 3,80 mL da solução da amostra, permitindo a detecção do analito na faixa de 0,05 a 0,20 mg L⁻¹ com limite de detecção de 0,04 mg L⁻¹ (0,01 mg L⁻¹ N), o qual é cerca de 100 vezes inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira (CONAMA 357). A repetibilidade para quatro injeções do padrão de 0,10 mg L⁻¹ foi estimada em 5,35%. Adicionalmente, recuperações na faixa de 96 a 101% foram estimadas para o analito em todas as amostras avaliadas, demonstrando a possível aplicação do dispositivo para este tipo de análise a partir de um procedimento com baixo consumo de reagentes e pequena geração de resíduos.

ABSTRACT

This work describes the development of urethane-acrylate fluidic microsystems integrated with packed column for solid phase extraction based on anionic exchanger and photometric detection with Schlieren effect correction. A lighting emitting diode (LED) that sequentially emits on different wavelengths (470, 530 e 625 nm) was used to acquire a signal referent to the schlieren effect only and other signal for the sum of the effect with the analyte response, providing the correction of the effect by subtraction of the two signals. It was demonstrated that the effect is eliminated or quite reduced even when working solutions with elevated differences on concentrations are managed inside the microfluidic devices, allowing the determination of NO_2^- in a medium with high electrolyte concentrations, Cr (VI) in solutions with high acidity and Fe (II) in solutions with great concentration of saccharose, allowing, in this last case, relative errors lower than 10% by the comparison with the reference method. A microfluidic device, containing micro-spheres of the anionic exchanger Dowex 1X8, was constructed by manually packing the solid phase on a photolithographed reservoir with dimensions of $25 \times 2.0 \times 1.0$ mm prior the sealing of the structures. The proposed microsystem presents no clogging or leaking in the region of the packed column and its application for the determination of NO_2^- in surface waters of Paranoá Lake (Brasília-DF) provided a pre-concentration factor of approximately four fold, using only 3.80 mL of sample solution, permitting the detection of analyte in the concentration range of 0.05 a 0.20 mg L^{-1} with a limit of detection of 0.04 mg L^{-1} ($0.01 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$), which is approximately 100 times lower than the maximum concentration permitted by Brazilian regulations (CONAMA 357). The repetibility for four injections of the 0.10 mg L^{-1} standart was estimated in 5,35%. In addition, recoveries in the range of 96 to 101% were estimated for the analyzed samples, demonstrating the possible application of the proposed device for nitrite analysis using a procedure with low consumption of reagents and reduced generation of residues.

SUMÁRIO

RESUMO.....	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Miniaturização e Automação em Química Analítica.....	16
1.2 Microssistemas fluídicos de análise.....	18
1.3 Desafios na construção e aplicação de microdispositivos fluídicos	20
1.4 O efeito Schlieren	24
1.4.1 Correção do Efeito Schlieren.....	27
1.5 Extração e Pré-concentração em Fase Sólida.....	29
1.5.1 Resinas de troca iônica	31
1.5.2 Integração de colunas de extração em sistemas de análise em fluxo.....	35
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Fabricação dos microssistemas de análise por injeção em fluxo	39
3.1.1 Dispositivos para investigação da correção do efeito Schlieren.....	41
3.1.2 Dispositivos com coluna para SPE.....	43
3.2 Construção do Sistema de Detecção Fotométrica para correção do efeito Schlieren	45
3.3 Aparatos	49
3.4 Reagentes e soluções	49
3.4.1 Soluções para os ensaios de correção do efeito Schlieren .	49
3.4.2 Soluções para ensaios com a coluna de troca iônica.....	52
3.5 Estudos preliminares para Avaliação do Sistema de Detecção Fotométrica para Correção do Efeito Schlieren	53
3.5.1 Injeções de soluções concentradas de NaCl em fluxo de água destilada	53
3.5.2 Determinação de íons nitrito em solução concentrada de NaCl.....	54
3.5.3 Determinação de íons Cr (VI) em meios com diferentes níveis de acidez	56
3.5.4 Determinação de íons Cu (II)	58
3.5.5 Determinação de íons Fe (II) em medicamentos.....	61
3.6 Avaliação dos protótipos com colunas para SPE integradas.....	63
3.6.1 Estudos preliminares.....	64

3.7 Ensaio de extração e pré-concentração de nitrito utilizando microssistema com coluna Dowex 1X8 integrada.....	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1 Estudos preliminares para correção do Efeito Schlieren	68
4.1.1 Injeções de soluções concentradas de NaCl em fluxo de água destilada	68
4.1.2 Determinação de íons nitrito em solução concentrada de NaCl.....	73
4.1.3 Determinação de íons Cr (VI) em meios com diferentes níveis de acidez	74
4.1.4 Determinação de íons Cu (II)	79
4.1.5 Determinação de íons Fe (II) em medicamentos.....	81
4.2 Microssistemas com coluna integrada.....	87
4.2.1 Avaliações preliminares.....	87
4.2.2 Microssistema com coluna Dowex 1X8.....	89
4.3 Avaliação da coluna de troca iônica integrada.....	94
4.4 Pré-concentração de nitrito utilizando microssistema com coluna integrada de resina Dowex 1X8	96
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	106
6. REFERÊNCIAS.....	107

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

AAS	Atomic Absorption Spectrometry
Am	Alça de amostragem
BP	Bomba peristáltica
BR	Bobina reacional
C₁₈	Cartucho com fase sólida de cadeia alifática longa
C⁴D	Detecção por Condutividade sem Contato
CB	Córrego do Bananal
CD	Coluna Dowex 1X8
CF	Célula de fluxo
CH	Canal de amostragem hidrodinâmica
CI	Circuitos Integrados
CO	Centro Olímpico da UnB
CR	Confluência do reagente
D	Descarte
DFC	Difenilcarbazida
DVB	Divinilbenzeno
FIA	Flow Injection Analysis
I	Corrente
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
LED	Ligth Emitting Diode
LPS	Lago Paranoá - Estação de Tratamento de Águas Sul
MIP	Molecularly Imprinted Polymers
NED	1-n-naftil-etilenodiamina
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTFE	Politetrafluoroetileno
R_F	Resistência fixa
R_T	Resistência total
R_v	Resistência variável
SAM	Sulfanilamida
SIA	Sequential Injection Analysis
SPE	Solid Phase Extraction
ST	Estireno
UA	Uretano-acrilato
UV-Vis	Ultravioleta-visível
V	Válvula solenóide
μFIA	Microflow Injection Analysis
μPADs	Microfluidic paper-based analytical devices
μTAS	Micro Total Analytical Systems

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de resinas de troca iônica, suas matrizes e grupos trocadores comuns.....	32
Tabela 2. Configurações de acionamento de válvulas utilizadas para amostragem, limpeza e eluição.....	67
Tabela 3. Resultados obtidos para a determinação de cromo nas três soluções de simulação.	79
Tabela 4. Resultados obtidos para a determinação de ferro a partir da curva corrigida.....	84
Tabela 5. Resultados obtidos para a determinação de ferro a partir da curva para o sinal não corrigido (470 nm).....	85
Tabela 6. Resultados obtidos para determinação de ferro em solução de sacarose 0,05 mol L ⁻¹ a partir da curva com padrões em H ₂ SO ₄ 0,05 mol L ⁻¹	87
Tabela 7. Tamanhos dos segmentos do microdispositivo com coluna Dowex 1X8, seus respectivos volumes e volume total do dispositivo.	93
Tabela 8. Recuperações médias para amostras de águas naturais fortificadas com 0,12 mg L ⁻¹ de nitrito.....	104
Tabela 9. Comparação entre algumas características dos sistemas FIA convencionais e dos microdispositivos construídos neste trabalho.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Observação do efeito Schlieren em diferentes situações cotidianas. Em A, observa-se a alteração na propagação da luz devido à diferença de temperatura do ar em uma rodovia. Em B, observa-se essa alteração pela diferença de temperatura do ar próxima à chama da vela. Em C, a alteração da propagação da luz é consequência da adição de solução concentrada de sacarose em um copo com água.	25
Figura 2. Ilustração para a formação de segmentos de diferentes concentrações na célula de fluxo originando o efeito Schlieren (A) e resposta instrumental observada (B).	26
Figura 3. Esquema de mecanismos de adsorção/partição e exclusão em diferentes tipos de fase sólida. Em A, ocorre a extração orgânica de compostos polares (p) pela fase normal (N) e compostos apolares (a) pela fase reversa (R). Em B, ocorre a extração de moléculas específicas pelo MIP.	31
Figura 4. Esquema de mecanismos de troca iônica. Em azul, ocorre a extração de ânions (-) pela resina catiônica (+) e em amarelo, a extração de cátions (+) pela resina aniônica (-).	33
Figura 5. Representação do grupo trocador da resina aniônica Dowex 1X8.	34
Figura 6. Layouts dos microdispositivos utilizados neste trabalho. Em A, é apresentado o microdispositivo para os ensaios de correção do efeito Schlieren. Em B, o microdispositivo protótipo de inserção de coluna de fase sólida. Em C e D, os microdispositivos para teste e ensaios de pré-concentração, respectivamente.	39
Figura 7. Esquema para montagem do reservatório para resina e exposição da placa com canais. (A1: Montagem do reservatório com a placa de vidro, a máscara com o layout e a moldura de borracha; A2: Derramamento do fotoresiste no reservatório; A3: Nivelamento da resina; A4 e A5: Exposição; B1: Exposição da placa sem canais; B2: Lavagem da placa para ativação do filme não polimerizado; B3 e B4: Selagem física; B5: Selagem irreversível).	40

Figura 8. Expositora <i>homemade</i> construída para polimerização do substrato dos microssistemas.....	41
Figura 9. Layout do microssistema utilizado para investigações sobre a correção do efeito Schlieren (A) e fotografia do microssistema fabricado (B).	42
Figura 10. Micrografia da seção transversal do canal do microssistema. ..	43
Figura 11. Microdispositivos fluídicos protótipos construídos com colunas extratoras de carvão ativo (A) e resina não iônica Amberlite XAD-4 (B). ...	43
Figura 12. Sequência de deposição da resina de troca aniônica Dowex 1X8 no reservatório do microssistema. Em A, uma quantidade de resina foi coletada com uma espátula. Em B, essa quantidade foi depositada no reservatório. Em C, o excesso de resina foi retirado. Em D, é apresentado o microdispositivo após a selagem final, inserção das agulhas hipodérmica e das duas fibras ópticas.....	44
Figura 13. LED utilizado para as determinações analíticas (acima) e esquema do circuito montado para o controle de luminosidade do LED, para dois comprimentos de onda (abaixo).	46
Figura 14. Fotodiodo utilizado para as determinações analíticas (acima) e esquema do circuito montado para a amplificação do sinal do detector (abaixo).	47
Figura 15. Fotografia do sistema completo (A: Microdispositivo; B: Sistema de detecção, o qual inclui a fonte, o detector e seus respectivos circuitos eletrônicos; C: Sistema eletrônico para o controle das válvulas solenoides; D: Interface eletrônica USB-6009; E: Válvulas solenoides; F: Bomba peristáltica e G: Frasco para descarte das soluções).....	47
Figura 16. Imagem do programa desenvolvido para o controle das válvulas solenoides, dos LED e aquisição do sinal das medidas.....	48
Figura 17. Configuração de fluxo utilizada para correção do efeito Schlieren, com injeções de soluções de NaCl em fluxo carregador de água, utilizando um LED com dois comprimentos de onda diferentes no sistema de detecção. BP: Bomba peristáltica (com indicações das vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$); V1 a V4: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem (2,7 μL); BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte.....	54

Figura 18. Configuração de fluxo utilizada para correção do efeito Schlieren, com injeções de soluções 1,0 mg L ⁻¹ de NO ₂ ⁻ em NaCl no fluxo carregador de NED/SAM, utilizando um LED com dois comprimentos de onda diferentes no sistema de detecção. BP: Bomba peristáltica (com indicações das vazões em µL min ⁻¹); V1 a V4: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem (2,7 µL); BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte.	55
Figura 19. Reação de Griess para formação do azo composto cromóforo, o qual absorve fortemente em 530 nm.....	55
Figura 20. Espectros de absorção do azo composto e emissão dos LED em 530 e 625 nm.	56
Figura 21. Configuração de fluxo utilizada para correção do efeito Schlieren, com injeções de soluções de Cr ⁶⁺ em fluxo carregador de DFC e H ₂ SO ₄ , utilizando um LED com dois comprimentos de onda diferentes no sistema de detecção. BP: Bomba peristáltica (com indicações das vazões em µL min ⁻¹); V1 a V4: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem (2,7 µL); BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte.....	57
Figura 22. Reação entre o Cr (VI) e a difenilcarbazida para formação do complexo, o qual absorve fortemente em 530 nm.....	57
Figura 23. Espectros de absorção do complexo de Cr (III) formado e emissão dos LED em 530 e 625 nm.....	58
Figura 24. Reação entre a cuprizona e o Cu (II) para formação do complexo, o qual absorve fortemente em 625 nm.....	59
Figura 25. Espectros de absorção do complexo de Cu (II) formado e emissão dos LED em 470 e 625 nm.....	60
Figura 26. Configuração de fluxo utilizada para correção do efeito Schlieren, com injeções de soluções de Cu ²⁺ em fluxo carregador de cuprizona, utilizando um LED com dois comprimentos de onda diferentes no sistema de detecção. BP: Bomba peristáltica (com indicações das vazões em µL min ⁻¹); V1 a V4: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem (2,7 µL); BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte.....	61
Figura 27. Configuração de fluxo utilizada para correção do efeito Schlieren, com injeções de soluções de Fe ²⁺ em sacarose ou H ₂ SO ₄ no fluxo carregador de ortofenantrolina, utilizando um LED com dois comprimentos de onda diferentes no sistema de detecção. BP: Bomba peristáltica (com	

indicações das vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$); V1 a V4: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem (2,7 μL); BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte.....	62
Figura 28. Reação entre o Fe (II) e a ortofenantrolina para formação do complexo cromóforo, o qual absorve fortemente em 470 nm.....	62
Figura 29. Espectros de absorção do complexo de Fe (II) formado e emissão dos LED em 470 e 625 nm.....	63
Figura 30. Configuração de fluxo para testes iniciais de extração com micro sistemas fluídicos protótipos com coluna integrada. (BP: Bomba peristáltica; CF: Célula de fluxo E D: Descarte).	64
Figura 31. Configuração de fluxo utilizada para realização dos primeiros testes de pré-concentração de nitrito. (BP: Bomba peristáltica; V1 a V5: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem; BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo; CD: Coluna Dowex 1X8 e D: Descarte. Valores em vermelho determinam a vazão em $\mu\text{L min}^{-1}$).	65
Figura 32. Configuração de fluxo utilizada (sistema multicomutado) para realização dos ensaios de pré-concentração de nitrito. (BP: Bomba peristáltica; V1 a V4: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem; BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte. Valores em vermelho determinam a vazão em $\mu\text{L min}^{-1}$).	67
Figura 33. Ilustração para a injeção em linha única, na qual se formam segmentos de solução carregadora e solução injetada.	68
Figura 34. Sinais transientes para o efeito Schlieren. (Em vermelho: sinal de absorção para o comprimento de onda do vermelho (625 nm); Em verde: sinal de absorção para o comprimento de onda do verde (530 nm); Em preto: sinal proveniente da subtração do sinal vermelho pelo verde).....	69
Figura 35. Sinal transiente para o efeito Schlieren, medido no FIALab [®] (A) e seu espectro (B). (Os números de 1 a 5 indicam os momentos referentes a cada espectro tirado para ambos os comprimentos de onda, sendo que o número 3 indica o máximo efeito de lente).....	71
Figura 36. Sinais transientes para o efeito Schlieren e sua correção em diferentes concentrações de NaCl.	72
Figura 37. Sinais transientes para uma solução 0,10 mol L ⁻¹ de NaCl (branco), outra solução contendo 0,10 mol L ⁻¹ de NaCl e 1,0 mg L ⁻¹ de NO ₂ ⁻ ,	

e para solução contendo somente 1,0 mg L ⁻¹ de NO ₂ ⁻ , com sua devida correção.	74
Figura 38. Fiagramas, com os sinais para os dois comprimentos de onda e o sinal corrigido, para determinação de cromo, obtidos com os padrões em 0,05 mol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄	75
Figura 39. Fiagramas, com os sinais para os dois comprimentos de onda e o sinal corrigido, para determinação de cromo, obtidos com os padrões em 0,30 mol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄	76
Figura 40. Fiagrama (sinal corrigido) para determinação de cromo com os padrões em água destilada, carregador 0,8 mol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ e difenilcarbazida a 0,05% m/m. Valores indicam a concentração de cromo em mg L ⁻¹ . O asterisco indica as soluções de concentração conhecida.	78
Figura 41. Curva analítica para a determinação de cromo apresentada na Figura 40.	78
Figura 42. Fiagramas (sinais para os dois comprimentos de onda e sinal corrigido) para determinação de Cu (II). Valores indicam a concentração de cobre em mg L ⁻¹	80
Figura 43. Curva analítica para a determinação de Cu (II).	81
Figura 44. Fiagramas (sinais para os dois comprimentos de onda e sinal corrigido) para determinação de ferro com os padrões e amostras (SG, SC, AG, VC e AC) em solução de sacarose. Valores indicam a concentração de ferro em mg L ⁻¹	82
Figura 45. Curvas analíticas para os fiagramas sem correção (marcado em vermelho) e para o com correção (marcado em preto) na determinação de ferro. As equações das retas e os coeficientes de correlação são apresentados na imagem.	83
Figura 46. Teste de correlação dos resultados obtidos para a determinação de Fe (II) com o μFIA e o método de referência (Uv-Vis). A reta em vermelho é a reta de referência, onde os valores de y equivalem aos de x (y = x)....	84
Figura 47. Curvas analíticas para determinação de ferro. A curva marcada em preto teve padrões preparados em sacarose 0,05 mol L ⁻¹ e a curva marcada em vermelho teve padrões preparados em H ₂ SO ₄ 0,05 mol L ⁻¹ ..	86

Figura 48. Diferença entre as colorações da solução de entrada (à esquerda) no microssistema com coluna carvão ativo e da solução de saída (à direita) do mesmo microssistema.....	88
Figura 49. Micrografia da coluna com a resina Dowex 1X8 previamente à selagem do dispositivo (esquerda). Em A, seção transversal do canal adjacente à coluna (indicado em A na imagem da coluna). Em B, seção transversal do canal seguinte ao canal adjacente à coluna (indicado em B na imagem da coluna).....	90
Figura 50. Micrografia óptica da extremidade da coluna previamente à selagem do microdispositivo.	91
Figura 51. Micrografia óptica da extremidade da coluna na qual foi inserida uma porção de esponja de poliuretano.	92
Figura 52. Fotografia do dispositivo microfluídico com coluna de troca aniônica Dowex 1X8. (CD: Coluna Dowex; BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo; CR: Confluência do reagente; CH: Canal de amostragem hidrodinâmica; Seta: Canais em cruz para comutação das soluções de trabalho).....	93
Figura 53. Espectro de absorção do complexo Zinco/Zincon. A linha vermelha é referente à concentração de 1,0 mg L ⁻¹ do analito e a linha preta é referente à 2,0 mg L ⁻¹ do analito.	95
Figura 54. Diagrama com sinais transientes para a injeção de 10,0 mg L ⁻¹ de nitrito a uma vazão de 0,20 mL min ⁻¹ (A), injeção de 2,0 mg L ⁻¹ de nitrito a uma vazão de 0,20 mL min ⁻¹ (B) e injeção de 2,0 mg L ⁻¹ de nitrito a uma vazão de 1,15 mL min ⁻¹ (C). O tempo de injeção da solução de nitrito para todos os picos foi de 400 segundos.	98
Figura 55. Diagramas (sinais para os dois comprimentos de onda e sinal corrigido) para determinação de nitrito com o microssistema com coluna integrada de troca aniônica Dowex 1X8, com concentrações de NED/SAM de 0,5 e 0,2 g L ⁻¹ , respectivamente.	99
Figura 56. Curva analítica para a determinação de nitrito na faixa de 0,20 a 0,80 mg L ⁻¹ , utilizando o microdispositivo com coluna Dowex 1X8 integrada e concentrações de NED/SAM de 0,5 e 0,2 g L ⁻¹ , respectivamente.....	100
Figura 57. Diagramas (sinais para os dois comprimentos de onda e sinal corrigido) para determinação de nitrito com o microssistema com coluna	

integrada de troca aniônica Dowex 1X8, com concentrações de NED/SAM de 1,0 e 7,0 g L ⁻¹ , respectivamente.	101
Figura 58. Fiagrama (sinal corrigido) para determinação de nitrito em águas naturais com o microssistema com coluna Dowex 1X8 integrada, com concentrações de NED/SAM de 1,0 e 7,0 g L ⁻¹ , respectivamente. (CB: Córrego Bananal; LPS: Lago Paranoá – Próximo à Estação de Tratamento de Águas Sul e CO: Centro Olímpico da UnB). O asterisco indica os sinais para as amostras fortificadas.	102
Figura 59. Curva analítica para a determinação de nitrito em amostras de águas naturais após a pré-concentração do analito na coluna de troca iônica Dowex 1X8, com concentrações de NED/SAM de 1,0 e 7,0 g L ⁻¹ , respectivamente.	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 Miniaturização e Automação em Química Analítica

A miniaturização pode ser definida como um processo que visa à redução em escala de qualquer objeto, sem que o mesmo perca as suas funcionalidades para que possa ser usado de modo mais compacto. Nos últimos anos, a miniaturização tem sido consolidada em diversas áreas como engenharias, química e ciências da saúde, promovendo avanços que não seriam possíveis sem o uso desta estratégia [1].

Os progressos da miniaturização podem ser constatados principalmente no que se refere a equipamentos eletroeletrônicos como computadores e telefones celulares. De fato, devido a uma revolução na indústria eletrônica, que culminou com o desenvolvimento de circuitos integrados (CI), foi possível transformar circuitos que exigiam um espaço demasiadamente grande em circuitos extremamente pequenos que cabem literalmente na ponta do dedo e que realizam a mesma função de forma tão ou mais eficiente que os circuitos não miniaturizados. Deste modo, computadores que nas décadas de 1940 a 1960 exigiam uma sala exclusiva para acomodá-los, hoje cabem na palma da mão e processam a informação milhares de vezes mais rápido que os antigos computadores [2].

Em química analítica, a miniaturização pode ser entendida como qualquer estratégia que busque a redução da instrumentação e/ou dos volumes de reagentes e amostras necessários à realização de um eficiente procedimento de análise visando à redução dos custos operacionais e a diminuição da quantidade de resíduos gerados além de potencializar a portabilidade e expor a menos riscos as pessoas envolvidas nos procedimentos. Dentro deste conceito, busca-se também aumentar a velocidade de processamento das amostras e de obtenção dos sinais analíticos, proporcionando uma via rápida para investigações em tempo real [3].

Exemplos de miniaturização em química analítica podem ser vistos em aplicações de interesse ambiental e em análises clínicas, nas quais algum tipo de sensor (óptico ou eletroquímico) é aplicado de forma dedicada para a determinação da concentração de espécies químicas, como o eletrodo de Clark para oxigênio dissolvido em águas e o glicosímetro para a determinação de açúcar no sangue [4, 5], os quais são alternativas em relação aos métodos laboriosos, anteriormente utilizados. Nestes exemplos, praticamente nenhum pré-tratamento das amostras, nem mesmo uma simples diluição, são necessários para se obter a resposta analítica, o que facilita a aplicação da miniaturização, pois a medida é feita de forma direta. Entretanto, quando o processo exige a manipulação de reagentes e amostras, a miniaturização costuma ser acompanhada da automação dos procedimentos, objetivando um controle mais fino dos volumes de soluções a serem gerenciados.

Nestes casos, destaca-se o uso dos chamados sistemas de análise em fluxo, onde pequenos volumes de amostra e reagentes (poucos mililitros) são gerenciados no interior de tubos, usualmente de material polimérico como o politetrafluoretileno (PTFE) e com diâmetros internos da ordem de 0,8 mm, proporcionando uma enorme redução no consumo destas soluções e também na geração de resíduos, de modo que estas estratégias são consideradas miniaturizadas. Além disso, a literatura mostra que os sistemas de análise em fluxo contribuem para muitos dos preceitos da chamada Química Verde [6], contribuindo para análises mais seguras e adequadas do ponto de vista ambiental.

Embora os sistemas de análise em fluxo, como os sistemas de análise por injeção sequencial (em inglês *Sequential injection analysis* – SIA) [7], os sistemas de análise por injeção em fluxo (em inglês *Flow injection analysis* – FIA) [8] ou os sistemas multicomutados [9], já demonstrem um grande potencial no que se refere à automação/miniaturização de análises químicas, pesquisadores ao redor do mundo têm investigado formas de proceder com esta estratégia de maneira ainda mais miniaturizada, potencializando o seu desempenho no tocante às características como portabilidade, consumo de reagentes, rapidez analítica e praticidade. Partindo destas considerações, muitos trabalhos têm focado no desenvolvimento e avaliação de sistemas microfluídicos de análise,

onde volumes da ordem de microlitros a nanolitros de soluções são gerenciados no interior de minúsculos canais gravados sobre um substrato que deve conter, além dos canais, outros compartimentos necessários à realização de uma análise química.

Nas próximas seções serão apresentados os principais conceitos relacionados aos sistemas microfluídicos de análise, assim como alguns desafios que devem ser superados para a sua plena aplicação e as contribuições advindas do presente trabalho para esta linha de pesquisa tão importante em Química Analítica.

1.2 Microssistemas fluídicos de análise

O conceito denominado microssistemas de análise total ou μ TAS (em inglês *Micro Total Analytical Systems*) surgiu por volta dos anos de 1990 e sugeria determinações espectrofotométricas e eletroquímicas, por meio de separações cromatográficas e eletroforéticas, utilizando sistemas miniaturizados, que apresentassem, de forma integrada, bombas, válvulas, reatores e detectores [10], permitindo a realização de praticamente todo o processo de análise, desde o preparo de amostra até a detecção do analito.

Esse conceito começou a ser materializado, com as primeiras fabricações de microanalisadores em silício, quartzo e vidro [11], mas, atualmente, inúmeros são os substratos que podem ser utilizados para a fabricação destes sistemas, principalmente os polímeros. A microfabricação consiste, em geral, na gravação de um arranjo de microcanais em baixo relevo em uma placa de substrato sólido, seguido, a depender do microssistema, por uma selagem com outra placa do substrato, a fim de permitir o fluxo de líquidos em seu interior.

Devido a seu tamanho miniaturizado, um microssistema fluídico é capaz de trabalhar com vazões e volumes bem pequenos (vazões menores que $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volumes internos da ordem de poucas unidades de microlitros), fatos que o tornam atraente diante de alguns desafios na Química Analítica, como o gasto de reagentes e amostras, bem como a geração de resíduos [12]. Adicionalmente, eles englobam uma ampla faixa de aplicações, passíveis de serem utilizados em

processos cromatográficos, eletroforéticos, com determinações espectrofotométricas, condutimétricas, por fluorescência, entre outras [13].

Considerando as possibilidades de aplicação dos microsistemas de análise em fluxo, Sampaio e Fonseca [14] desenvolveram um microdispositivo polimérico de baixo custo à base de uretana-acrilato para aplicações quimiluminescentes, utilizando células de detecção integrada em diferentes formatos. A determinação de íons nitrito em amostras de patê foi baseada na diminuição da quimiluminescência proveniente da reação entre o luminol e hipoclorito, após a reação deste último com o analito. Os resultados demonstraram a viabilidade das determinações utilizando detecção quimiluminescente com boa qualidade das figuras de mérito, considerando o pequeno volume interno do dispositivo (menor que 50 μL), capaz de suportar vazões de até 2,0 mL min^{-1} .

Outra aplicação de microsistemas fluídicos foi desenvolvida por Coltro e colaboradores [1515]. Os autores desenvolveram um microdispositivo fluídico a base de polidimetilsiloxano (PDMS) para monitoramento da interação entre a biotina e a avidina com detecção por condutividade sem contato (C^4D). O dispositivo foi fabricado com técnicas de baixo custo, apresentando canais com diâmetro de 50 μL e vazão de 5,0 $\mu\text{L min}^{-1}$. Porém a determinação das constantes dos eventos obrigatórios (interação entre os compostos) não apresentou valores condizentes com a literatura. Com otimizações é possível tornar o microdispositivo eficiente para esse tipo de monitoramento.

Lee e colaboradores [16] desenvolveram um microchip fluídico de polimetilmetacrilato (PMMA) com canais em formato de cruz, os quais apresentaram dimensões de 100 μm de largura e 40 μm de profundidade. O dispositivo foi utilizado para separação e quantificação de fragmentos de DNA por eletroforese capilar utilizando detecção por infravermelho próximo, fluorescência e espectrometria de massas. Os resultados demonstraram a viabilidade e o baixo custo de fabricação dos dispositivos descartáveis, bem como a eficiência de identificação de alguns fragmentos de DNA em um tempo aproximado de 2 minutos.

As grandes vantagens de utilização desses dispositivos miniaturizados estão relacionadas à facilidade de manuseio, o que amplia a portabilidade e possibilidades de determinações *in situ*. Adicionalmente, alguns microdispositivos têm um custo baixo de fabricação, que os tornam descartáveis, possibilitando análises clínicas e imediatas.

Garcia e colaboradores [17] desenvolveram um dispositivo de análise microfluídico baseado em papel (em inglês *Microfluidic paper-based analytical devices* – μ PADs) para ensaios clínicos. Este microdispositivo apresentou dimensões de milímetros com uma superfície modificada, na qual era impresso um arranjo de canais com parafina, pelo qual a solução de amostra ou padrão era conduzida por capilaridade, chegando aos extremos, onde havia o composto reagente seletivo aos diferentes parâmetros. Ácido úrico, nitrito, glicose e albumina de uma amostra artificial de urina foram determinados simultaneamente de forma colorimétrica, utilizando imagens e programas computacionais. Este trabalho evidencia a facilidade de utilização de dispositivos microfluídicos descartáveis de baixo custo com aplicações em diversas áreas, como a área clínica.

Microdispositivos desenvolvidos por Duarte e colaboradores [18] e baseados em *toner* e poliéster apresentaram bons resultados na extração dinâmica em fase sólida de DNA, utilizando partículas magnéticas de sílica no preparo das amostras. Estes sistemas foram fabricados pela deposição de camadas de *toner* de impressora em um substrato de poliéster com posterior selagem para permitir da movimentação de fragmentos genéticos por eletroforese. Estes dispositivos possuíam canais da ordem de algumas dezenas de micrômetros e um baixo custo de fabricação, fato que poderia torná-los descartáveis.

1.3 Desafios na construção e aplicação de microdispositivos fluídicos

As maiores dificuldades, no que diz respeito ao desenvolvimento e aplicação de microdispositivos fluídicos, estão no próprio processo de microfabricação, que pode limitar a construção de determinadas estruturas, na

integração de unidades de preparo de amostras e de detecção (ópticas ou eletroquímicas) e também na correção de efeitos de fluxo, os quais podem prejudicar a mistura das soluções de estudo e até mesmo inviabilizar a aquisição de sinal analítico a depender da técnica de detecção utilizada.

Dependendo do substrato utilizado como base para o desenvolvimento do microsistema e do nível de resolução das estruturas que se deseja obter, a microfabricação pode ser um processo laborioso, lento e com poucas vantagens na relação custo/benefício [3]. Usualmente, os microdispositivos fabricados em quartzo e vidro necessitam de técnicas complexas para a gravação de microcanais [1] sendo também muito suscetíveis a falhas durante o processo de selagem, que necessita de rígidas condições de limpeza, para ser bem sucedida [19]. Apesar dessas dificuldades, os microdispositivos de vidro e quartzo apresentam boa robustez e durabilidade, uma vez que estes costumam ser inertes diante de muitas substâncias em soluções aquosas [3].

De modo alternativo, outras técnicas de microfabricação, mais baratas e de simples realização, têm surgido para o desenvolvimento de microsistemas em outros materiais. Microsistemas analíticos à base de polímeros são muito promissores na área, devido as suas características mais importantes, como a selagem menos suscetível a falhas, maleabilidade e resistência [2020]. Dispositivos microfluídicos, como os já citados na seção anterior, construídos por Lee e colaboradores [16] e baseados em materiais como polimetilmetacrilato (PMMA) ou os dispositivos construídos por Yamada e colaboradores [21] com substrato de polidimetilsiloxano (PDMS), surgiram como alternativa de uma microfabricação mais simples em relação aos microsistemas de quartzo ou vidro. Apesar de um procedimento de microfabricação ainda complexo, os microsistemas com substrato à base desses polímeros apresentam boa resistência e funcionalidade analítica.

Ainda com relação à microfabricação de dispositivos, Fonseca e colaboradores [22] demonstraram a facilidade na construção e a eficiência de microdispositivos fabricados com uma resina fotopolimerizável à base de uretano-acrilato. A técnica de microfabricação, denominada fotolitografia profunda no ultravioleta, utilizada por estes pesquisadores, foi também utilizada

neste trabalho para a fabricação de microdispositivos, pois a mesma apresenta um custo bastante baixo e pode ser realizada sem a necessidade de condições especiais. Esta técnica de microfabricação é baseada na gravação de canais utilizando uma máscara impressa com o arranjo desejado. A resina, comercialmente utilizada na confecção de carimbos, é exposta à radiação ultravioleta através dessa máscara, sendo polimerizada nas áreas onde não há desenho dos canais e não polimerizada nas áreas com este perfil impresso. Na seção de materiais e métodos, este processo será explicado com maiores detalhes.

Outros tipos de substratos têm ganhado muito interesse por parte de alguns pesquisadores. Recentemente, microdispositivos de papel tem sido desenvolvidos, com técnica de impressão de estruturas as quais formam os canais, onde as soluções fluem por capilaridade [23]. Esses sistemas apresentam baixo custo de fabricação e resposta analítica eficiente para determinações clínicas, por exemplo.

Apesar do grande desenvolvimento na área de μ TAS, a inserção de unidades de preparo de amostras em microdispositivos fluídicos, principalmente aquelas baseadas em colunas com material sólido ou em membranas, é ainda um desafio que tem como objetivo aperfeiçoar todo o processo analítico e aumentar a abrangência de aplicações do sistema miniaturizado. De fato, integrar colunas ou membranas em microssistemas não é uma tarefa trivial, devido ao tamanho do dispositivo, a incompatibilidade dos materiais que compõem o microdispositivo ou a unidade de preparo de amostras, a possibilidade de entupimento que inviabiliza a utilização do sistema, a dificuldade de selagem e a necessidade de adequações do processo de preparo de amostra quando da inserção da unidade em um microssistema [24].

Neste sentido a integração de unidades de extração e/ou separação em fase sólida nestes dispositivos é um desafio que vem sendo investigado por muitos pesquisadores. Grodzinski e colaboradores [25] desenvolveram um microssistema fluídico polimérico com diferentes módulos integrados para o preparo de amostra genética e pré-concentração de células. A pré-concentração miniaturizada foi realizada pela conjugação das células com esferas

imunomagnéticas de anticorpos e foi uma alternativa funcional neste caso, uma vez que as células de interesse estavam em baixa concentração em uma matriz muito complexa que é a matriz biológica.

Nóbrega e colaboradores [26] demonstraram a possibilidade de inserção de uma coluna derivatizadora de cádmio em um microssistema à base de uretano-acrilato para redução de nitrato a nitrito e posterior reação com reagente de Griess [27]. O microdispositivo apresentou boa selagem, ausência de entupimentos e eficiência na reação de redução investigada, sendo aplicado para determinação de nitrato em águas minerais comerciais e em águas naturais.

Para extração de DNA, Legendre e colaboradores [28] desenvolveram um microdispositivo fluídico de vidro para o preparo de amostras com uma coluna extratora integrada. A técnica de fotolitografia foi utilizada para a construção do microssistema que apresentou canais com profundidade de 200 μm . A coluna extratora foi integrada inserindo-se grânulos de sílica híbrida anteriormente preparada para extração dos fragmentos de DNA, com posterior reação em cadeia com a polimerase. Os resultados obtidos indicaram uma boa eficiência da coluna extratora para amostras de DNA, porém a coluna necessitou de passivação, para que não houvesse adsorção da enzima Taq polimerase antes e durante o procedimento.

Fonseca e Silva [29] descreveram a construção e utilização de um microssistema de análise em fluxo à base de uretano-acrilato com uma unidade integrada de difusão gasosa para a determinação de íons bicarbonato em águas minerais e de íons amônio em pastilhas medicamentosas. Para tanto, os autores utilizaram uma membrana de politetrafluoetileno (PTFE) adaptada no interior da célula de difusão do dispositivo. Os resultados demonstraram a viabilidade de integração, com desempenho analítico adequado, porém os autores relataram dificuldades em relação à compatibilidade da membrana utilizada com o material do microssistema, as quais dificultaram a selagem do dispositivo na região da célula de difusão.

Zhai e colaboradores [30] desenvolveram um microchip à base de vidro e PDMS para tratamento *on-line* de amostra, separação por eletroforese e detecção por condutividade sem contato. O microchip era composto por uma

coluna de um monólito molecularmente impresso (para extração inicial de auramina O), unidades de injeção, separação e detecção, todos construídos em sequência. Segundo os autores a microfabricação foi de baixo custo e de simples realização, gerando um microchip durável com boa sensibilidade para a determinação do analito em questão. Apesar disso, os autores afirmaram que o fator de enriquecimento do analito na coluna foi baixo, necessitando de adaptações no microchip para determinações mais eficientes.

Com relação aos micro sistemas em fluxo que possuem coluna com fase sólida integrada para extração ou pré-concentração de analitos, deve-se destacar a necessidade de uso de soluções aquosas com concentrações elevadas de solutos ou de diferentes solventes orgânicos para a eluição dos compostos da fase sólida. Sob esta condição, surgem dificuldades relacionadas à baixa dispersão das espécies nos microcanais após a eluição, as quais irão limitar a mistura do analito pré-eluído com outros reagentes ou mesmo inviabilizar a detecção *online* baseada em medidas ópticas como a espectrofotométrica [31].

É importante relatar que a dispersão das espécies em solução é consideravelmente menor em sistemas miniaturizados do que em sistemas de maior escala. Como o diâmetro dos canais utilizados nestes sistemas é da ordem de micrômetros, o fluxo é altamente laminar, o que dificulta a mistura das soluções [13], fato que pode levar a uma alteração no sinal analítico conhecido como efeito Schlieren, o qual será discutido de forma mais aprofundada na próxima seção.

1.4 O efeito Schlieren

O efeito Schlieren, descrito pela primeira vez por Robert Hooke [32], ocorre devido uma alteração na propagação da luz quando esta atravessa meios com gradientes de temperatura ou concentração. Visualmente, o efeito Schlieren é constatado pela formação de “estrias” no meio em estudo, sendo o próprio nome “Schlieren” uma tradução desta palavra para o alemão [32]. Em se tratando de diferença de temperatura, a luz é desviada ao atravessar de um meio mais quente para um mais frio e vice versa. Isso comumente é observado em

autoestradas em um dia muito quente, quando a camada de ar mais próxima do asfalto adquire maior energia térmica em relação à camada superior, que se mantém a temperatura do ambiente. Este fenômeno também pode ser observado ao se ferver água em um recipiente de vidro. As correntes de convecção são responsáveis por emanar energia térmica para toda a massa de água, porém, enquanto esta não é homogeneizada, é possível observar diferenças na propagação da luz em regiões com distintas temperaturas.

Quando causado por diferença de concentração de soluções, o efeito Schlieren também é evidente, uma vez que a luz que atravessa a interface entre as duas soluções de concentrações distintas é desviada pela mudança no índice de refração de um meio para o outro. Isto ocorre até que a mistura das duas soluções seja totalmente homogeneizada, como quando se mistura uma solução saturada de sacarose em água. A Figura 1 mostra fotografias que representam tal efeito em situações cotidianas.

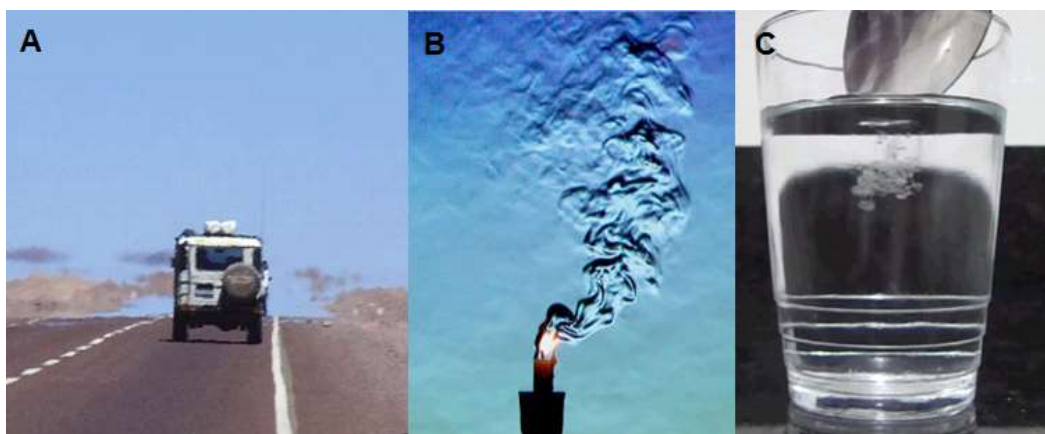


Figura 1. Observação do efeito Schlieren em diferentes situações cotidianas. Em A, observa-se a alteração na propagação da luz devido à diferença de temperatura do ar em uma rodovia. Em B, observa-se essa alteração pela diferença de temperatura do ar próxima à chama da vela. Em C, a alteração da propagação da luz é consequência da adição de solução concentrada de sacarose em um copo com água.

O efeito Schlieren tem sido muito utilizado para observação da dispersão de fluídos, tanto de gases como de líquidos, com um aparato composto por fontes de luz, lentes e espelhos, capazes de tornar mais visível a heterogeneidade de gases e líquidos de um meio [33]. Como outro exemplo de utilização deste efeito, Abreu e colaboradores [34] desenvolveram uma técnica de determinação espectrofotométrica de etanol em bebidas comerciais a partir

da injeção das amostras em um fluxo carregador de água destilada, obtendo-se o sinal para o efeito Schlieren, proporcional à concentração de etanol nas soluções de amostras. Embora existam algumas aplicações, como as mostradas acima, para este efeito, pode-se dizer que em sistemas em fluxo com detecção espectrofotométrica, o mesmo é quase sempre indesejável.

De fato, a literatura mostra que em sistemas fluídicos, quando um segmento de solução com elevada concentração de soluto é carregado por uma solução menos concentrada (Figura 2A), a pequena dispersão que ocorre no interior dos tubos/canais pode levar à formação de “lentes” ou “espelhos”, na interface destas soluções, que intensificam ou diminuem a intensidade de radiação que atinge o detector, respectivamente. Conforme ilustrado na Figura 2B, se o sinal está sendo medido em unidades de absorbância, o efeito “espelho”, causa o espalhamento da radiação incidente, aumentando a absorbância, enquanto o efeito de “lentes” concentra a radiação no detector, diminuindo a absorbância.

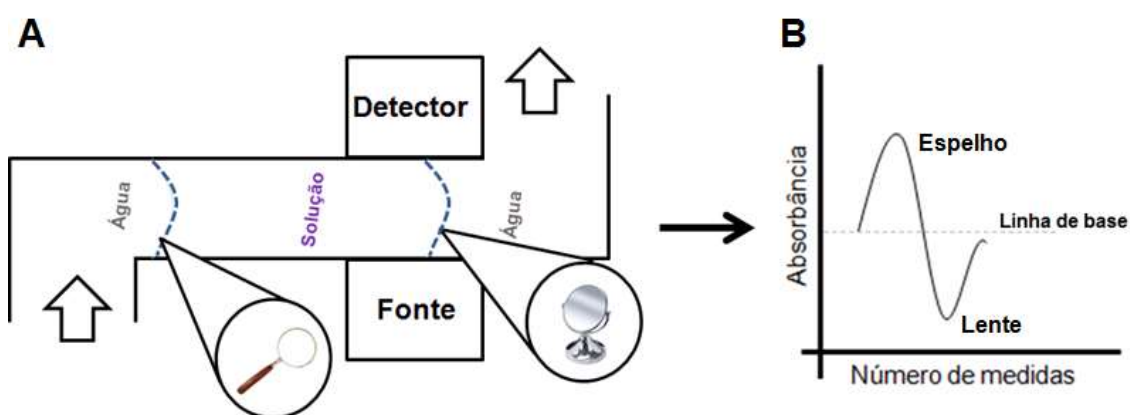


Figura 2. Ilustração para a formação de segmentos de diferentes concentrações na célula de fluxo originando o efeito Schlieren (A) e resposta instrumental observada (B).

Em determinados casos em que o efeito é muito pronunciado, como em micro sistemas de análise, o sinal de absorbância obtido para o analito pode ser mascarado pelo sinal do efeito Schlieren, dificultando, ou até mesmo impedindo o seu uso analítico. Pode-se afirmar também que o grau de comprometimento do sinal neste tipo de estratégia será maior quanto menor for a concentração do analito e mais concentrada for a matriz em diferentes solutos.

1.4.1 Correção do Efeito Schlieren

A correção do efeito Schlieren é muitas vezes necessária para melhorar a aquisição de sinal em determinações em fluxo baseadas em medidas espectrofotométricas, pois eliminando-se ou minimizando-se este efeito, haverá um aumento da razão sinal/ruído para as respostas transientes referentes aos analitos.

Existem formas variadas de se diminuir a influência do efeito Schlieren em detecções espectrofotométricas. Entre elas estão o aumento dos diâmetros dos tubos ou canais utilizados na análise para tornar o fluxo mais turbulento, a utilização de confluências para propiciar maiores perturbações no meio que favorecem a homogeneidade das soluções, o ajuste de concentrações, o qual favorece a diminuição do gradiente de concentração no meio e a utilização de dois comprimentos de onda, onde um absorve para o analito e também para o efeito e outro somente para o efeito, proporcionando, por diferença, a eliminação matemática do efeito Schlieren no sinal de resposta [39].

McKelvie e colaboradores [35] realizaram ensaios para a correção do efeito Schlieren na determinação espectrofotométrica de fósforo em análise em fluxo. Para tanto, os autores adaptaram as concentrações de reagentes, soluções carregadoras, padrões e amostras, ajustando a força iônica do meio com NaCl, a fim de fornecer índices de refração semelhantes para todas as soluções. Desse modo, foi possível eliminar o efeito indesejável e possibilitar a visualização do sinal para o analito.

Vishnikin e colaboradores [36] partiram do mesmo princípio para a correção do efeito Schlieren, ajustando as concentrações das soluções para determinação espectrofotométrica de p-aminofenol em formulações de paracetamol, com o intuito de não gerar uma diferença de índices de refração, as quais evidenciam a formação do sinal relativo ao efeito. Um problema que pode surgir utilizando esta técnica de eliminação do efeito Schlieren é a dificuldade de interação do analito com o reagente cromóforo devido à intensa força iônica do meio (alteração no equilíbrio) ou diminuição da concentração dos

reagentes, fato que pode prejudicar a sensibilidade de resposta da determinação [37].

Outra forma de correção do efeito foi descrita por Carneiro e colaboradores [38] para a determinação espectrofotométrica de ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico em amostras farmacêuticas em fluxo, utilizando calibração multivariada. Cada parâmetro, incluindo o efeito Schlieren, foi considerado nesta determinação, o que possibilitou a identificação da contribuição do efeito Schlieren como um componente independente, o qual pode ser corrigido. Apesar de ser uma ferramenta matemática que auxilia na resolução de muitos problemas analíticos, a calibração multivariada requer programas computacionais e tempo que, muitas vezes, não são disponíveis ao analista.

Zagatto e colaboradores [39] foram os primeiros a desenvolver uma forma de compensação do efeito Schlieren em fluxo a partir da subtração de sinais com o uso de dois comprimentos de onda diferentes. Um espectrômetro com arranjo de diodos e dois detectores diferentes foram utilizados. Dois comprimentos de onda foram necessários para observação da absorbância do verde de bromocresol injetado em um fluxo de diferentes soluções, as quais intensificam o efeito Schlieren. Adicionalmente vários parâmetros foram estudados, dentre eles as vazões de injeção e do carregador, volume de injeção e tamanho da bobina de mistura. A técnica de compensação utilizada apresentou bons resultados, os quais podem ser observados em diferentes instrumentos.

A necessidade de eliminação desse efeito se torna maior quando as determinações são realizadas em baixas concentrações ou a nível traço das espécies de interesse, uma vez que a resposta analítica é pequena em relação à resposta ao efeito Schlieren. Desse modo, o sinal para o efeito pode encobrir o sinal analítico, prejudicando a sensibilidade nas determinações. Conforme proposto por Dias e colaboradores [40], o efeito Schlieren pode ser corrigido em sistemas em fluxo convencionais (não miniaturizados) utilizando a diferença dos sinais para dois comprimentos de onda (λ). Neste caso, ambos os λ devem responder ao efeito Schlieren, mas somente um deve responder ao analito e também ao efeito, para permitir a correção. Os autores realizaram um estudo dos componentes causadores do efeito Schlieren em análise em fluxo.

Considerando estes aspectos, uma das propostas do presente trabalho foi corrigir a influência do efeito Schlieren no sinal analítico para medidas fotométricas em microssistemas de análise baseada na proposta de Dias e colaboradores [40], mas empregando-se as medidas com LED em microssistemas de análise e não em sistemas em fluxo convencionais. Isto se faz necessário, pois existem procedimentos, como os de extração em fase sólida, principalmente aqueles realizados com colunas de troca iônica, os quais envolvem o uso de soluções com enormes diferenças de concentração, como ácidos concentrados e água destilada, o que dificulta a realização da detecção fotométrica em linha, devido à intensidade do sinal referente ao efeito Schlieren.

1.5 Extração e Pré-concentração em Fase Sólida

A extração em fase sólida (em inglês *Solid Phase Extraction – SPE*) é uma das técnicas de preparo de amostra mais utilizadas para isolamento do analito de uma matriz complexa e/ou para eliminação de potenciais interferentes em uma amostra [41]. Seu funcionamento é baseado na interação das substâncias contidas em um fluido amostral, seja ele líquido ou gasoso, com uma fase sólida que deve reter, em condições controladas, as substâncias que se deseja analisar (extração) ou os interferentes indesejados (*clean-up*).

No modo de extração, após o isolamento do analito, realiza-se a eluição do mesmo com um solvente adequado, dando-se sequência à análise por meio de algum método instrumental. Em muitos casos é comum proceder-se com a extração a partir de volumes grandes da amostra (em determinadas situações da ordem de litros) e a eluição com volumes significativamente menores de solvente (da ordem de mililitros), tendo como objetivo a pré-concentração do analito, normalmente requerida para se atingir os limites de quantificação instrumentais [42].

A SPE tem sido utilizada desde o fim da década de 1970 em determinações que utilizam técnicas cromatográficas e eletroforéticas de separação, fornecendo um extrato mais limpo e concentrado no analito que auxilia na minimização de interferências, bem como na interpretação do sinal analítico com maior eficiência [41].

Normalmente, a fase sólida se apresenta compactada em forma de cartuchos ou discos descartáveis, não sendo recomendada a sua reutilização para se evitar possíveis efeitos de memória. Além disso, a fim de tornar o procedimento mais reprodutível, é comum se controlar a vazão com que o fluido é aspirado através do material sólido, o que é feito utilizando-se uma bomba a vácuo ou uma bomba peristáltica [43].

Considerando estes aspectos, pode-se afirmar que a SPE é uma técnica simples, de fácil operação e que proporciona uma redução considerável no consumo de solventes e reagentes se comparada a outras técnicas de extração como a extração líquido-líquido. Apesar disto, deve-se considerar que a SPE pode ser lenta, o que irá depender do nível de pré-concentração que se deseja e, conseqüentemente, da quantidade de amostra que será submetida ao processo. Deve-se relatar também que muitos cartuchos para SPE apresentam um valor relativamente elevado, o que pode inviabilizar o seu uso por alguns laboratórios. Adicionalmente, existe uma dificuldade de adequação do sorvente ideal, isto é, da fase sólida correta para um determinado analito [41].

A SPE tem diversas aplicações a depender do material que compõe a fase sólida e do analito de interesse, sendo comumente empregada em extrações orgânicas com materiais sólidos (sorventes) específicos, os quais possuem em sua composição grupos para a extração de compostos apolares (fase reversa), ou sorventes polares (fase normal) para a extração de compostos orgânicos que apresentem polaridade na molécula. Nestes casos, o mecanismo de extração é baseado nos fenômenos de partição e adsorção, dirigidos por forças de Van der Waals [41].

Outras fases sólidas que podem ser destacadas para uso em SPE são as baseadas em polímeros molecularmente impressos (em inglês *Molecularly imprinted polymers* – MIP), estruturas sintetizadas com o formato da molécula de interesse para extração pelo mecanismo de exclusão de forma bem seletiva [44] e também as chamadas resinas de troca iônica, em que interações eletrostáticas entre as espécies de interesse em sua forma iônica e a fase sólida com grupamentos carregados possibilitam a extração com elevada eficiência, controlando-se as condições experimentais. Na Figura 3 são apresentados os

funcionamentos de fases sólidas que extraem compostos por adsorção/partição e por exclusão. Considerando que o presente trabalho envolveu o uso de uma resina de troca aniônica em seu desenvolvimento, será dado um enfoque maior a este tipo de fase sólida na próxima seção.

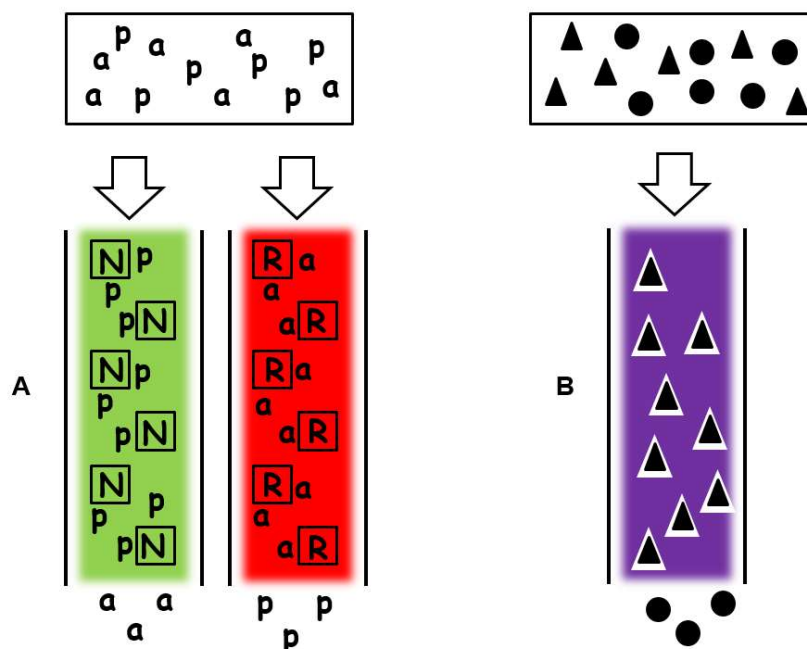


Figura 3. Esquema de mecanismos de adsorção/partição e exclusão em diferentes tipos de fase sólida. Em A, ocorre a extração orgânica de compostos polares (p) pela fase normal (N) e compostos apolares (a) pela fase reversa (R). Em B, ocorre a extração de moléculas específicas pelo MIP.

1.5.1 Resinas de troca iônica

As resinas de troca iônica são um dos tipos de fase sólida para extração e pré-concentração disponíveis comercialmente [45] que realizam a extração de íons do meio em estudo através de interações eletrostáticas destes com a fase sólida [41]. Os primeiros relatos sobre o fenômeno foram realizados por Way e Thompson em meados do século XIX, quando os pesquisadores constataram a diminuição da concentração de íons amônio e potássio ao atravessarem o solo [46]. As resinas de troca iônica são amplamente utilizadas em cromatografia para a separação de aminoácidos e também para qualquer tipo de determinação que necessite de uma separação prévia dos íons [46, 47]. A afinidade dos íons pela fase sólida é determinada pelas diferenças de cargas, as quais podem ser controladas alterando-se o pH e a força iônica do meio [46].

No mercado estão disponíveis as resinas trocadoras de cátions e as resinas trocadoras de ânions, e estas se subdividem de acordo com a faixa de pH na qual atuam, sendo classificadas em fortemente e fracamente ácida, para resinas catiônicas, e fortemente e fracamente básicas, para resinas aniônicas [48]. Essas classificações estão relacionadas aos grupos trocadores das resinas. As resinas de troca iônica fortemente ácidas ou básicas são aquelas que se mantêm ionizadas em uma ampla faixa de pH. Já as resinas fracamente ácidas ou básicas têm a ionização influenciada pelo pH, sendo assim, a capacidade de troca dessas resinas possui uma relação com o pH do meio [46].

Na tabela 1 são listados os tipos de resinas de troca iônica e suas classificações, além dos suportes utilizados para se afixar o grupo trocador de íons da resina de troca iônica, conhecidos como matriz. A matriz é comumente constituída por um material poroso, insolúvel em água e em solventes orgânicos, que seja inerte diante às mudanças bruscas de pH e concentrações de íons [46], podendo ser constituída de polímeros sintetizados ou de polímeros naturais modificados. Ligações covalentes cruzadas entre a matriz e os grupos trocadores são responsáveis por mantê-los unidos, de forma que os íons de interesse possam ser extraídos da fase móvel para a fase sólida ou estacionária [46].

Tabela 1. Tipos de resinas de troca iônica, suas matrizes e grupos trocadores comuns.

Matriz		Tipo Resina	Grupo trocador
Polímeros Sintéticos	Polímeros naturais modificados		
Poliestireno, poliacrilato e metacrilato	Dextrana, agarose e celulose	Catiônica forte	Sulfônico, propilsulfônico
		Catiônica fraca	Carboxílico, metilcarboxílico
		Aniônica forte	Di(2-hidroxipropil)aminoetil, amônio quaternário
		Aniônica fraca	Poliamina, dietilaminoetil

A quantidade de ligações cruzadas entre a matriz e o grupo trocador também interfere na seletividade da resina para diferentes íons. Quanto mais ligações cruzadas, menor a capacidade de troca com íons volumosos e maior a seletividade da fase sólida [46]. Em muitos casos, concentrações elevadas de eluentes são necessárias, pois apenas com o aumento da força iônica é possível se retirar os íons trocados na fase sólida [41].

O mecanismo de troca das resinas iônicas é baseado nas interações eletrostáticas. Quando se deseja separar íons em uma determinada solução, inicialmente a coluna de troca iônica é condicionada com soluções específicas, as quais tornam os grupos de troca da resina mais disponíveis. Em seguida, a solução de interesse passa pela coluna, a fim de separar o analito da matriz ou retirar interferentes da solução. Se a extração for de um analito, uma etapa de limpeza pode ser realizada, na qual outra solução passa pela coluna eliminando qualquer vestígio não extraído. Por fim, ocorre a eluição dos compostos de interesse com soluções, muitas vezes, de elevada concentração de solutos. Na Figura 4 é apresentado o mecanismo de funcionamento das resinas de troca iônica.

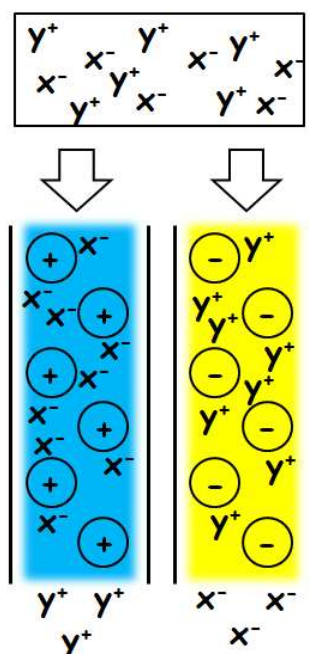


Figura 4. Esquema de mecanismos de troca iônica. Em azul, ocorre a extração de ânions (-) pela resina catiônica (+) e em amarelo, a extração de cátions (+) pela resina aniônica (-).

Outro parâmetro muito importante a ser considerado em resinas de troca iônica é a capacidade de troca de íons, a qual é definida como a quantidade de grupos efetivamente carregados (íons) que podem ser trocados por grama de massa seca da fase sólida [46], considerando a definição de equivalência. Essa capacidade é expressa como miliequivalentes por grama (meq g^{-1}), e indica que, quanto maior for a capacidade de troca de íons de uma resina, maior será a massa de íons trocada e a eficiência de pré-concentração.

Neste contexto, uma resina que se destaca é a Dowex 1X8, a qual foi utilizada neste trabalho. Este material se apresenta na forma de microesferas, de tamanhos que variam de 150 a 300 μm de diâmetro (100 a 50 *mesh*). Os grupos trocadores dessa resina são grupos aniônicos de amônio quaternário, tendo o cloreto como contra-íon, sendo esta resina classificada como fortemente básica. O suporte da resina Dowex 1X8 é baseado em um copolímero microporoso a base de estireno (ST) e divinilbenzeno (DVB), o qual torna a resina resistente a uma ampla faixa de pH, bem como à ação de oxidantes e redutores [49]. Os grupos trocadores são ligados ao suporte por meio de ligações covalente cruzadas. A Figura 5 apresenta um esquema da superfície da resina Dowex 1X8.

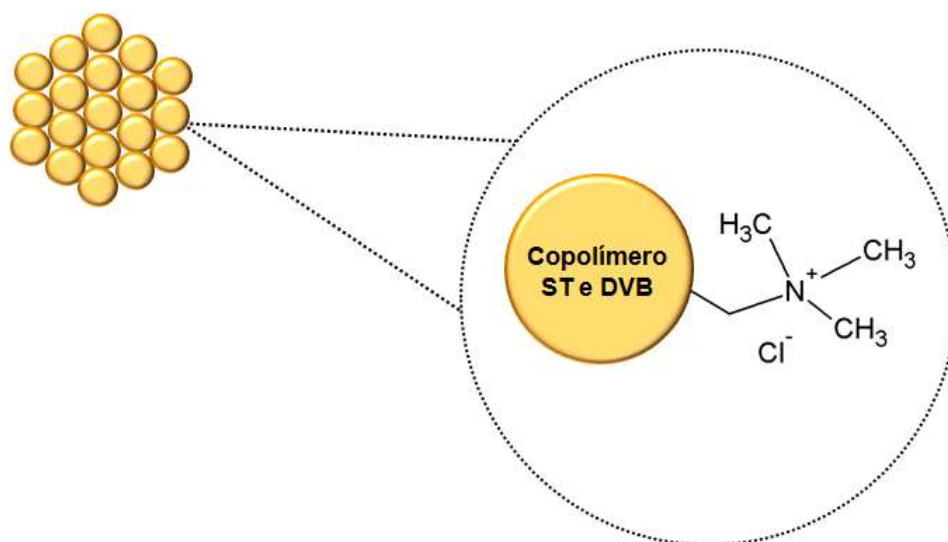


Figura 5. Representação do grupo trocador da resina aniônica Dowex 1X8.

Em se tratando da detecção de analitos em sistemas fluídicos com colunas de extração, esta é usualmente realizada por Espectrometria de massas

com plasma indutivamente acoplado (em inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry* – ICP-MS), Espectrometria de absorção atômica (em inglês *Atomic absorption spectrometry* – AAS) e outras técnicas de detecção que não são espectrofotométricas [50]. Um dos motivos para isso é a elevada concentração de solventes que pode influenciar na observação do sinal fotométrico, gerando o efeito Schlieren, ou diminuir e até mesmo eliminar a possibilidade de formação do composto cromogênico necessário em uma determinação desse tipo. Ácidos e bases concentrados podem desfavorecer o meio ideal para reação entre o analito e o reagente cromogênico, impedido a determinação por medidas espectrofotométricas.

1.5.2 Integração de colunas de extração em sistemas de análise em fluxo

A automação dos procedimentos de extração em fase sólida utilizando sistemas de análise em fluxo tem sido explorada, há longa data, com o objetivo de aumentar a reprodutibilidade do processo, minimizar o uso de fase sólida e de solventes além de proporcionar uma via integrada do preparo da amostra até a detecção em um único sistema de análise, tornando-o mais dinâmico e portátil [51].

A integração de colunas de extração nestes sistemas é normalmente realizada pela adaptação de pequenos reservatórios cilíndricos, empacotados com o material sólido de interesse, em diferentes pontos do sistema, sendo comum a integração no próprio injetor, o que facilita o processo de amostragem/pré-concentração e a posterior eluição/injeção. Embora existam mini-colunas comerciais para o empacotamento do material sólido empregado na extração, pode-se utilizar estratégias alternativas para o seu desenvolvimento no próprio laboratório (*lab-made*), baseadas, por exemplo, em ponteiras de micro-pipetas [52]. Deve-se atentar, no entanto, que em qualquer uma das estratégias, o material sólido não pode ser firmemente compactado, a fim de se evitar problemas com a pressão fluídica no sistema. A formação de caminhos preferenciais no material sólido também deve ser evitada para potencializar a interação da amostra com a fase sólida. Neste sentido, muitos pesquisadores têm proposto o uso de colunas fluidizadas, que consistem em preencher com o

material sólido apenas uma fração da coluna, permitindo a movimentação aleatória e homogênea da fase sólida com o fluxo ascendente da solução da amostra [53].

Para a separação e pré-concentração de morfina em urina humana, Idris e colaboradores [54] descreveram o acoplamento de um cartucho com fase sólida de cadeia alifática longa (C₁₈) em um sistema SIA com posterior detecção espectrofotométrica a partir da derivatização da espécie de interesse, pela reação com o sal diazônio de hidrocloreto de anilina. O sistema apresentou bons resultados, com limite de detecção baixo (menor que 30 µg L⁻¹) e amostras fortificadas apresentaram resultados de recuperação da ordem de 97%, indicando a possibilidade de uso eficiente deste sistema.

Méndez e colaboradores [55] desenvolveram um sistema FIA com uma coluna multicamadas de nanotubos de carbono para a pré-concentração de cádmio em urina. O composto ficava retido na coluna, anteriormente oxidada, e era eluído de forma quantitativa com ácido nítrico para determinação por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. Resultados demonstraram a eliminação do efeito de matriz da urina através do uso da coluna de pré-concentração, com um fator de pré-concentração de 3,4, limite de detecção de 0,010 µg L⁻¹ e recuperações variando de 94 a 100%.

Ribeiro e colaboradores [56] descreveram a construção de uma mini-câmara com partículas móveis (*fluidized beds*) da resina aniônica Dowex 1X8, acoplada a um sistema FIA para determinação de zinco em plantas. A formação de cloro-complexos de zinco foi realizada para posterior troca dos ânions formados na coluna fluidizada, a qual favoreceu uma maior interação do composto de interesse com a resina aniônica, evitando a formação de caminhos preferenciais e pontos de pressão comuns em colunas empacotadas.

Para os microdispositivos de análise em fluxo, as colunas com o material sólido necessitam de ser integradas durante o processo de microfabricação, o que, por si só, constitui um desafio considerável. Neste sentido, diferentes estratégias de integração têm sido propostas, sendo mais comum o empacotamento previamente a selagem, o uso de colunas monolíticas e a síntese de material sólido *in situ*.

Nge e colaboradores [24] desenvolveram um microchip de copolímero de olefina cíclica com um monólito de butilmetacrilato integrado, o qual foi sintetizado no interior do microchip durante sua fabricação. Os autores avaliaram o microchip com ensaios de retenção de proteínas e aminoácidos, que confirmaram a potencialidade de utilização deste dispositivo em análise laboratoriais rápidas, simples e de forma automatizada.

Thongchai e colaboradores [57] demonstraram a viabilidade de fabricação de um microdispositivo de vidro com um monólito de MIP para pré-concentração de cloranfenicol em mel de abelha, com detecção por quimiluminescência. O MIP foi sintetizado e compactado em um canal profundo do dispositivo. Resultados confirmaram a seletividade do MIP e boa sensibilidade para o método, com limite de detecção para o cloranfenicol de 7,46 pmol L⁻¹.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos gerais:

- O desenvolvimento e a avaliação de microssistemas de análise por injeção em fluxo (μ FIA) com coluna integrada para extração e pré-concentração de analitos em resina de troca iônica;
- A construção e aplicação de um sistema de detecção fotométrica baseada em LED para a correção do efeito Schlieren em escala microfluídica.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Avaliação do sistema de correção do efeito Schlieren a partir das determinações de nitrito, cromo, cobre e ferro;
- Integração de uma coluna de resina de troca iônica Dowex 1X8 em um microdispositivo fluídico à base de uretano-acrilato;
- Avaliação da eficiência de pré-concentração da coluna a partir da troca de íons nitrito;
- Aplicação do microssistema proposto na determinação de íons nitrito em águas naturais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fabricação dos microssistemas de análise por injeção em fluxo

Todos os dispositivos microfluídicos desenvolvidos neste trabalho foram fabricados a partir do procedimento descrito por Fonseca e colaboradores [58], utilizando-se a técnica de fotolitografia profunda no ultravioleta e uma resina para fabricação de carimbos à base de uretano-acrilato (UA) como substrato. Mais detalhes sobre esta técnica serão abordados nos próximos parágrafos. Quatro configurações diferentes foram utilizadas neste trabalho, as quais são apresentadas na Figura 6.

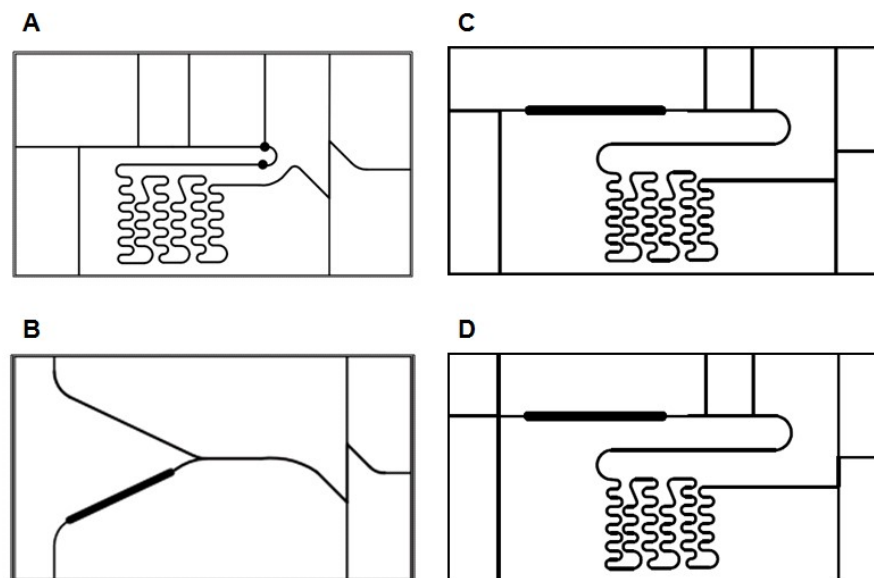


Figura 6. Layouts dos microdispositivos utilizados neste trabalho. Em A, é apresentado o microdispositivo para os ensaios de correção do efeito Schlieren. Em B, o microdispositivo protótipo de inserção de coluna de fase sólida. Em C e D, os microdispositivos para teste e ensaios de pré-concentração, respectivamente.

As estruturas desejadas foram desenvolvidas em programa computacional AutoCad® 2002, sendo impressas em folha de transparência (Abezeta – PLT A4) com uma impressora a laser (HP LaserJet P2055dn) com resolução de 1200 dpi. Cada uma das estruturas impressas foi utilizada como máscara para posterior exposição do substrato à radiação ultravioleta.

A Figura 7 ilustra todas as etapas do procedimento de fotolitografia. A máscara com a configuração dos canais foi fixada sobre uma placa de vidro e uma moldura de borracha foi colocada sobre o conjunto, formando um reservatório com aproximadamente 2,0 mm de profundidade (Etapa 1, Figura 7A). Sobre este reservatório, a resina (também chamada de resiste ou fotoresiste) foi depositada, preenchendo todo o seu volume (Etapa 2, Figura 7A). Para evitar deformações nos canais a serem formados, bolhas que pudessem surgir na resina foram retiradas com o auxílio de uma agulha. Após esta etapa, outra placa de vidro foi colocada sobre o reservatório, fechando-o (Etapa 3, Figura 7A). Por fim, grampos mantiveram as placas unidas, para evitar o derramamento de resina durante a exposição.

Para a exposição ultravioleta, uma expositora *homemade* (Figura 8) foi utilizada. Esta consistiu em uma caixa preta com duas lâmpadas de luz “negra” (Philips Actinic-BL, TL-D 15W, 380 nm) e um suporte para o reservatório de resina. A resina foi inicialmente irradiada pela face do conjunto que não continha a máscara por 35 segundos, a fim de que uma base para os canais fosse formada (Etapa 4, Figura 7A). Em seguida, a face que continha a máscara foi exposta por mais 35 segundos, formando os canais sobre o substrato (Etapa 5, Figura 7A).

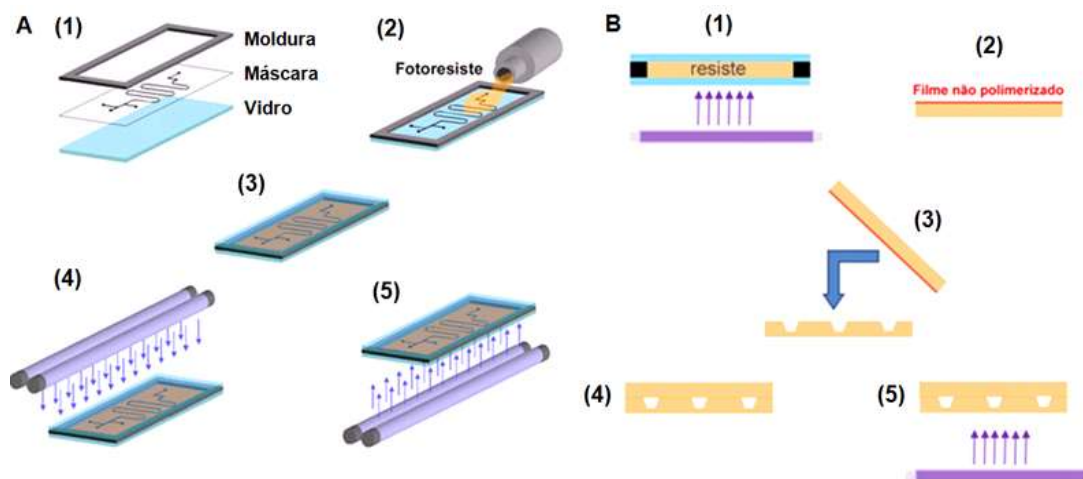


Figura 7. Esquema para montagem do reservatório para resina e exposição da placa com canais. (A1: Montagem do reservatório com a placa de vidro, a máscara com o layout e a moldura de borracha; A2: Derramamento do fotoresiste no reservatório; A3: Nivelamento da resina; A4 e A5: Exposição; B1: Exposição da placa sem canais; B2: Lavagem da placa para ativação do filme não polimerizado; B3 e B4: Selagem física; B5: Selagem irreversível).



Figura 8. Expositora *homemade* construída para polimerização do substrato dos microssistemas.

Prosseguindo a microfabricação, a placa polimerizada foi retirada da máscara e colocada em banho ultrassônico (Ultra Cleaner 1400 - Unique) com água e detergente (5% v/v) por cerca de 5 minutos. Após isso, os canais formados foram limpos com o auxílio de um pincel com detergente e água. A placa foi lavada com água e também com álcool (92,8° INPM) para posterior secagem com ar quente. Após esse procedimento, deixou-se a placa com canais protegida da poeira ou demais partículas que poderiam se aderir a ela. Em seguida, a placa de cobertura para selagem foi polimerizada, utilizando-se um reservatório de resina sem a máscara impressa com canais (Etapa 1, Figura 7B). A exposição foi realizada somente por um dos lados durante 240 segundos, garantindo a formação de um filme fino de resina não polimerizado sobre uma de suas superfícies, o qual atuou como adesivo na selagem (Etapa 2, Figura 7B). A placa polimerizada, sem canais, foi lavada com água e detergente e, após isso, lavada com álcool etílico, da mesma forma que a placa com canais foi lavada. Por último, esta foi seca com ar quente para então se proceder com as próximas etapas de microfabricação a depender do microssistema a ser construído.

3.1.1 Dispositivos para investigação da correção do efeito Schlieren

Estudos iniciais para a correção do efeito Schlieren nos dispositivos foi realizada com microssistemas sem coluna para extração em fase sólida.-Nestes

casos, a placa de cobertura foi unida manualmente à placa com canais, conforme mostram as etapas 3 e 4 da Figura 7B. Feito isto, procedeu-se a selagem definitiva da estrutura, colocando as placas unidas diretamente sobre a lâmpada UV, e expondo o conjunto à radiação por cerca de 10 minutos (Etapa 5, Figura 7B). Após a selagem irreversível, agulhas hipodérmicas (BD Precision Glide – 0,45 × 13 mm) foram fixadas aos canais de entrada e saída de fluxo do microsistema, de forma a permitir o acesso dos fluidos ao microdispositivo.

Inicialmente, um dispositivo com célula de detecção fotométrica integrada foi construído empregando-se a máscara fotolitográfica ilustrada na Figura 9A, o qual permitiu a realização de investigações sobre a correção do efeito Schlieren. O microsistema obtido é apresentado na Figura 9B e possui dimensões menores que as de um cartão de crédito (6,6 cm x 3,9 cm x 4,0 mm) com diâmetro interno médio dos canais da ordem de 300 μm (Figura 10). Este dispositivo comporta canais para a introdução da amostra (Am), mistura dos reagentes (BR) e uma célula de fluxo fotométrica (CF). Para a realização das medidas fotométricas, fibras ópticas plásticas ($\varnothing = 250 \mu\text{m}$) foram utilizadas, guiando a radiação da fonte para a célula de fluxo e da célula de fluxo para o detector.

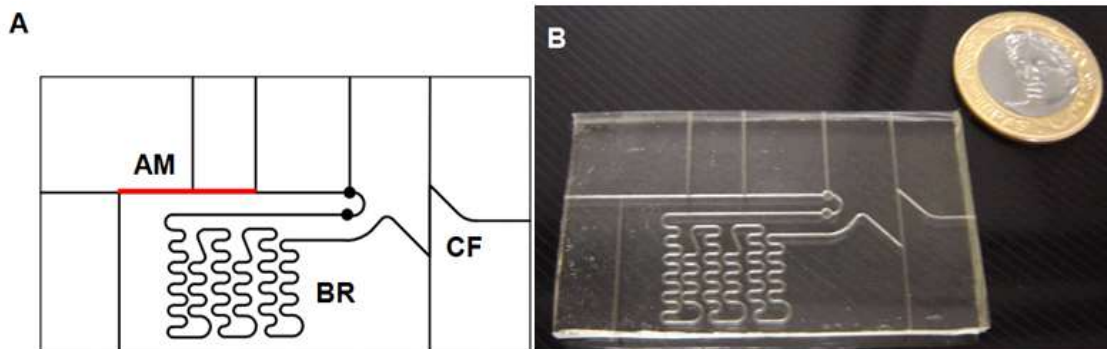


Figura 9. Layout do microsistema utilizado para investigações sobre a correção do efeito Schlieren (A) e fotografia do microsistema fabricado (B).

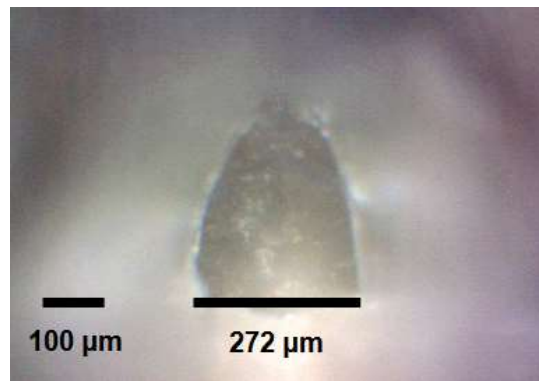


Figura 10. Micrografia da seção transversal do canal do microssistema.

3.1.2 Dispositivos com coluna para SPE

Estudos preliminares para a integração do sistema de extração em fase sólida aos microssistemas foram realizados a partir da configuração apresentada na Figura 6B (seção anterior), na qual um canal com cerca de 2,0 mm de largura, 25 mm de comprimento e 1,0 mm de profundidade foi utilizado como reservatório para a deposição do material sólido de extração. Neste caso, após a gravação dos canais e imediatamente antes da selagem, realizou-se o empacotamento manual da coluna com carvão ativado ou com microesferas de resina não-iônica, Amberlite XAD-4 (Aldrich). A Figura 11 mostra fotografias para os protótipos desenvolvidos.

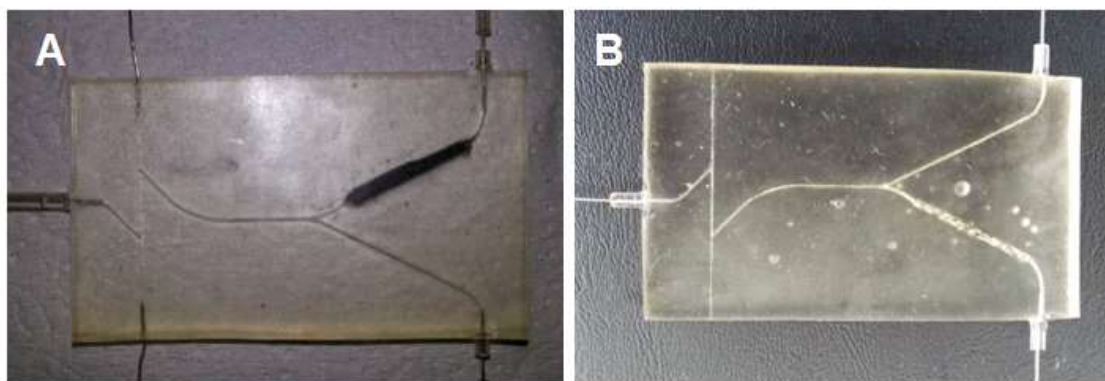


Figura 11. Microdispositivos fluidicos protótipos construídos com colunas extratoras de carvão ativo (A) e resina não iônica Amberlite XAD-4 (B).

Também foram fabricados microssistemas com coluna Dowex 1X8 (Figura 6 - C e D). Neste caso, a microfabricação foi realizada de forma semelhante a anterior, introduzindo-se ou não uma pequena porção de esponja de poliuretano

em uma das extremidades do reservatório a fim de evitar a saída das microesferas da coluna. Como ilustrado na Figura 12, procedeu-se com o empacotamento manual de aproximadamente 0,35 g da resina aniônica Dowex 1X8 (50 a 100 *mesh*) em sua forma clorada (Sigma), empregando-se uma espátula para auxiliar no procedimento. Após esta etapa, a placa com canais foi unida à placa de cobertura para exposição final e selagem da estrutura. Deve-se relatar que as dimensões da coluna integrada foram as mesmas utilizadas nos protótipos apresentados na Figura 11 e que agulhas hipodérmicas para acesso das soluções, assim como fibras ópticas para a detecção fotométrica *on-line* foram devidamente adaptadas, da mesma forma descrita na seção 3.1.1.

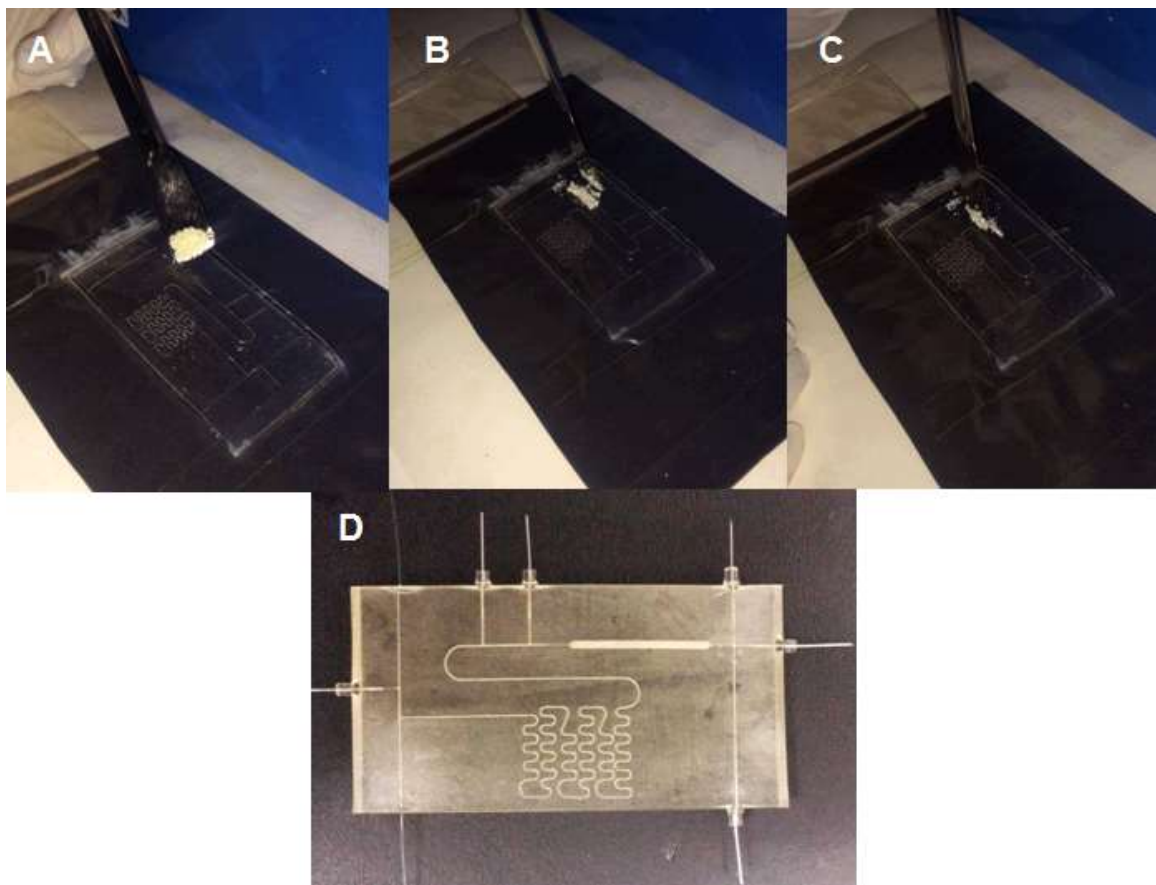


Figura 12. Sequência de deposição da resina de troca aniônica Dowex 1X8 no reservatório do microsistema. Em A, uma quantidade de resina foi coletada com uma espátula. Em B, essa quantidade foi depositada no reservatório. Em C, o excesso de resina foi retirado. Em D, é apresentado o microdispositivo após a selagem final, inserção das agulhas hipodérmica e das duas fibras ópticas.

3.2 Construção do Sistema de Detecção Fotométrica para correção do efeito Schlieren

Antes da realização de qualquer teste com os microdispositivos com colunas para pré-concentração ou extração, foi realizada a construção e otimização do sistema de detecção para correção do efeito Schlieren a ser utilizado nas determinações fotométricas. Para isto, o dispositivo LZ4-00MA10 (LED Engin), o qual possui em um mesmo corpo quatro diodos emissores de luz (LED), emitindo em 470, 530, 590 e 625 nm, respectivamente, foi utilizado como fonte de radiação eletromagnética e um fotodiodo (OPT-101) foi utilizado como detector de fótons. Vale destacar que somente três dos quatro comprimentos de onda disponíveis foram utilizados neste trabalho (470, 530 e 625 nm), alternando-os dois a dois a depender do ensaio a ser realizado. Em outras palavras, o sistema foi desenvolvido para que durante as medidas a radiação de um dos LED fornecesse uma resposta apenas ao efeito Schlieren enquanto o outro respondesse ao efeito e a espécie de interesse, permitindo a correção deste primeiro.

Nas Figuras 13 e 14, são apresentados os circuitos eletrônicos desenvolvidos para o acionamento sequencial dos LED e para a amplificação do sinal proveniente do detector utilizado, respectivamente. Para o acionamento de cada LED, o sinal lógico gerado por computador através de uma interface eletrônica (National Instruments USB-6009) é enviado ao circuito integrado (CI) ULN 2003, o qual permite a passagem de corrente pelo diodo, fazendo com que o mesmo seja acionado. A intensidade de emissão de radiação é então ajustada pelo CI LM317, limitando-se a corrente (I) que circula o LED através do controle de uma das resistências variáveis (RV_1 ou RV_2). Este ajuste obedece à Equação 1.

$$I = \frac{1,25V}{R_T} \quad \text{Equação 1}$$

Onde I é a corrente, R_T a resistência total ($RV_1 + RF_1$ ou $RV_2 + RF_2$), 1,25V é uma constante intrínseca ao LM317 e RF_1 e RF_2 são as resistências fixas do circuito. É importante observar que foram utilizados dois circuitos baseados no

CI LM317 para que fosse possível acessar cada um dos LED do dispositivo LZ4-00MA10 e assim ajustar a intensidade de radiação em cada comprimento de onda de forma independente.

No circuito para aquisição e amplificação do sinal fotométrico, a radiação que atinge o fotodiodo (OPT101) é transformada em um sinal de tensão que pode ser lido no pino 5 deste CI. Este sinal é então amplificado por um amplificador operacional (OP07), através da realimentação negativa, e enviada a uma interface eletrônica com conversor analógico/digital de 14 bits (National Instruments USB-6009), permitindo a sua leitura em um computador. O sistema completo, com todas as unidades necessárias para a realização das medidas, é apresentado na Figura 15.

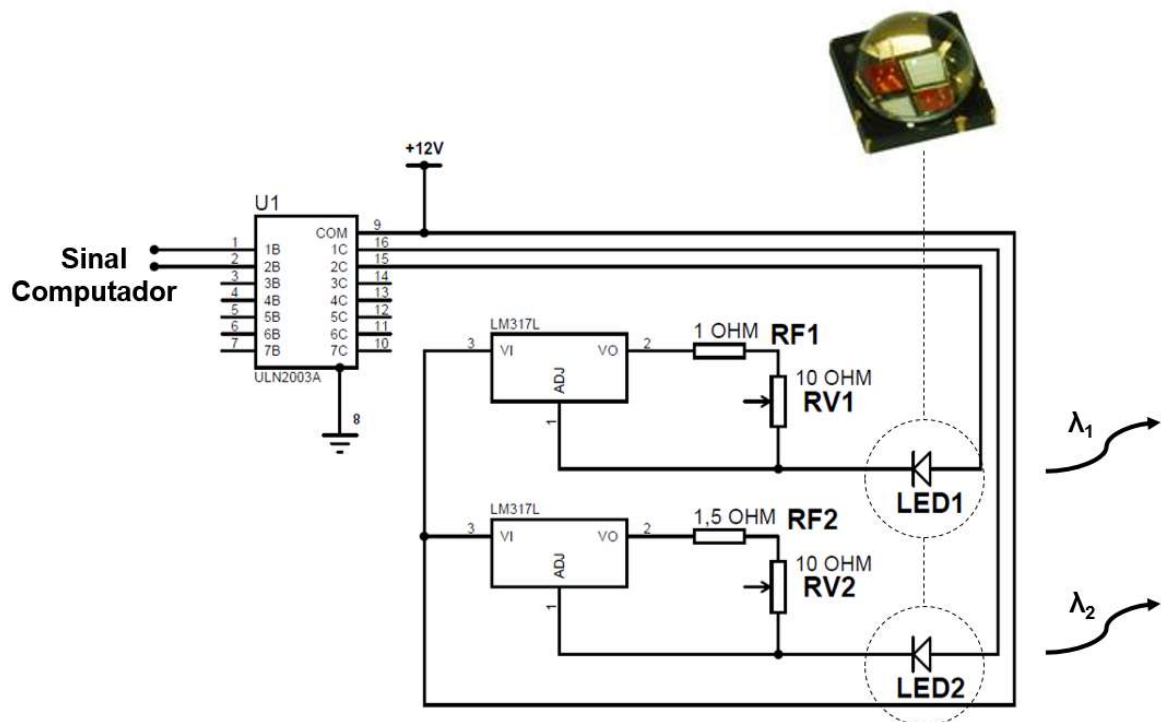


Figura 13. LED utilizado para as determinações analíticas (acima) e esquema do circuito montado para o controle de luminosidade do LED, para dois comprimentos de onda (abaixo).

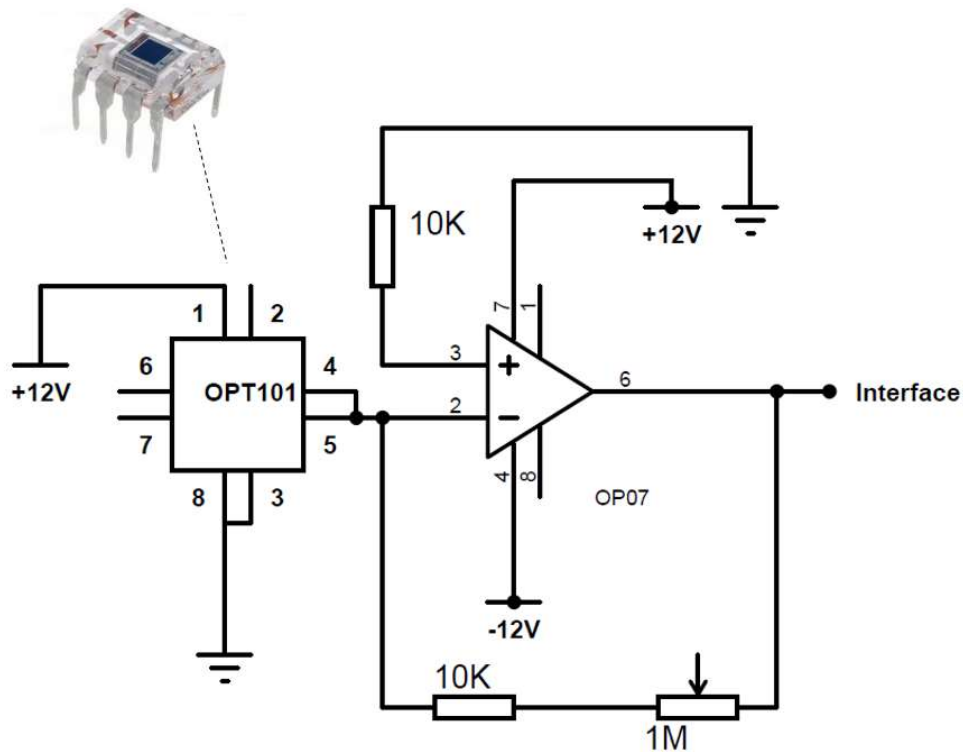


Figura 14. Fotodiodo utilizado para as determinações analíticas (acima) e esquema do circuito montado para a amplificação do sinal do detector (abaixo).

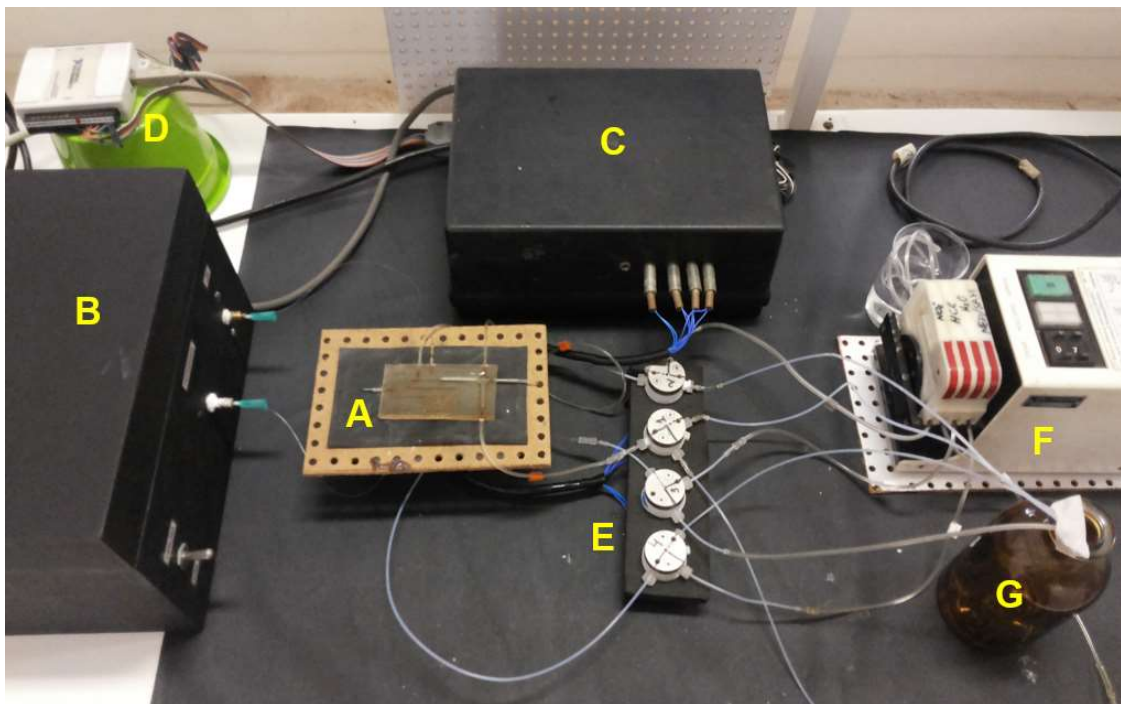


Figura 15. Fotografia do sistema completo (A: Microdispositivo; B: Sistema de detecção, o qual inclui a fonte, o detector e seus respectivos circuitos eletrônicos; C: Sistema eletrônico para o controle das válvulas solenoides; D: Interface eletrônica USB-6009; E: Válvulas solenoides; F: Bomba peristáltica e G: Frasco para descarte das soluções).

Todas as medidas efetuadas neste trabalho foram realizadas de forma sequencial, acionando-se um dos LED (por exemplo, o de 530 nm), adquirindo a leitura do sinal referente a este comprimento de onda e desligando este LED. Imediatamente depois, o outro LED (625 nm, por exemplo) era acionado e a leitura de sinal realizada, num ciclo intermitente. Neste caso, as leituras eram adquiridas em intervalos de aproximadamente 100 ms para cada comprimento de onda, sendo o sinal médio para 20 leituras (intervalos de 2s) efetivamente utilizado como sinal analítico.

Todo o controle do sistema de detecção foi realizado por computador a partir de um programa escrito em VisualBasic 6.0. Este programa (Figura 16) permitiu a visualização gráfica dos sinais para os diferentes comprimentos de onda e também para a diferença entre os mesmos, a qual foi utilizada como alternativa para a correção do efeito Schlieren.

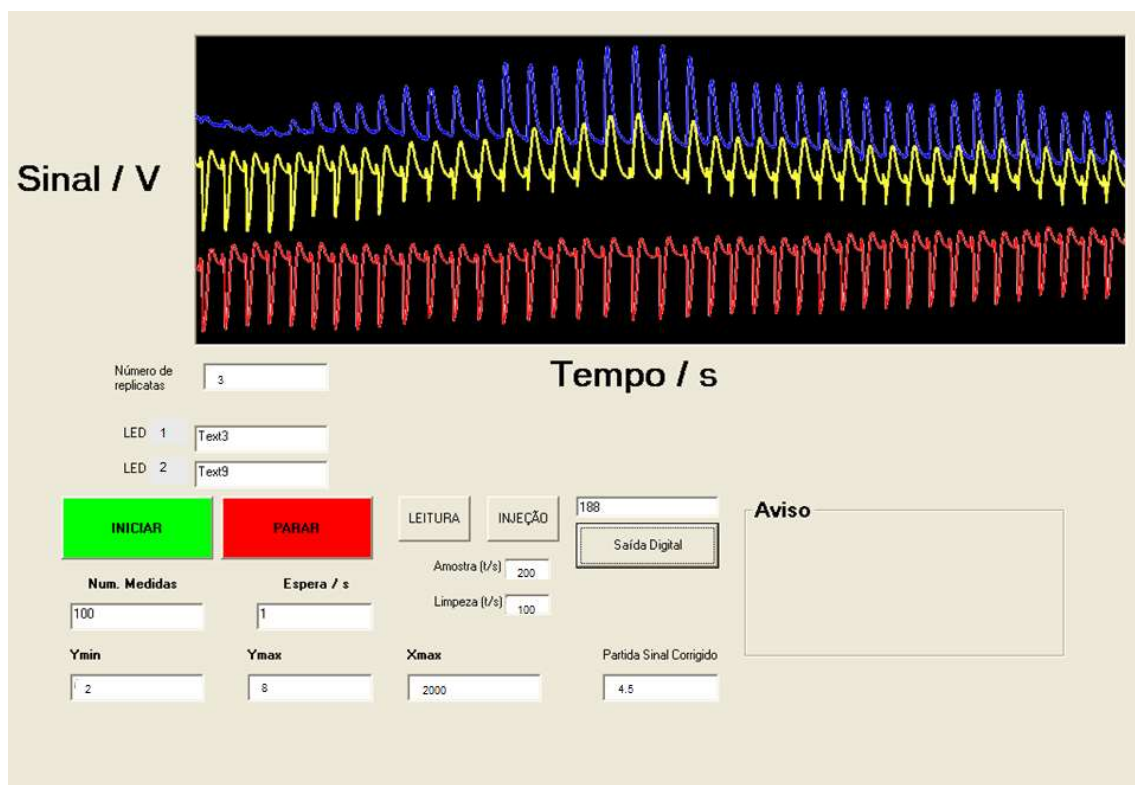


Figura 16. Imagem do programa desenvolvido para o controle das válvulas solenoides, dos LED e aquisição do sinal das medidas.

3.3 Aparatos

Utilizou-se um espectrofotômetro (Agilent Cary 8454 UV-Vis), para realização da determinação de referência de ferro. Para o preparo de soluções tampão, utilizou-se um medidor de pH (Hanna). Uma balança analítica (Shimadzu AX200) com precisão de quatro casas decimais foi utilizada para medidas de massa dos reagentes e compostos utilizados no preparo das soluções. Micropipetas de 10 a 100 μL e de 100 a 1000 μL (LabMate Soft) foram utilizadas para o preparo de soluções as quais necessitavam de pequenas alíquotas para diluição. Para propulsão dos fluídos no interior do microssistema, uma bomba peristáltica (Ismatec-Reglo Analog) foi utilizada. O direcionamento do fluxo foi realizado por válvulas solenoides (NRResearch Incorporated – NJ 07006 USA 1-800-424-7853), as quais foram controladas com o auxílio de uma interface eletrônica (National Instruments USB - 6009) ligada a um microcomputador. Um sistema de análise em fluxo convencional (FIALab®) com um detector de arranjo de diodos (Ocean Optics – USB 2000) foi utilizado para aquisição do espectro para o efeito Schlieren.

3.4 Reagentes e soluções

Água desionizada e reagentes de grau analítico, com ao menos 99% de pureza, foram utilizados para o preparo de todas as soluções.

3.4.1 Soluções para os ensaios de correção do efeito Schlieren

3.4.1.1 Soluções para ensaios com diferentes concentrações salinas

Preparou-se uma solução 0,50 mol L⁻¹ de NaCl, dissolvendo-se 2,922 g do respectivo sal (Dinâmica) em 100 mL de água destilada, sendo soluções diluídas a 0,10 mol L⁻¹ e 0,25 mol L⁻¹ preparadas a partir da solução de 0,50 mol L⁻¹.

3.4.1.2 Soluções para ensaios de determinação de nitrito

Soluções estoque contendo 1,00 e 0,05 g L⁻¹ em nitrito foram preparadas, dissolvendo-se 0,15 g de NaNO₂ (Vetec) em 100 mL e diluindo-se a alíquota necessária a partir da primeira solução, respectivamente. Solução padrão de 1,0 mg L⁻¹ foi preparada a partir da diluição da alíquota correspondente.

Uma solução do reagente cromóforo contendo 1-n-naftil-etilenodiamina e sulfanilamida (NED/SAM) foi preparada dissolvendo-se 0,02 g de sulfanilamida (Synth) em solução contendo 0,5 mL de ácido clorídrico (CHEMCO) em 20 mL de água destilada. A esta solução foram então adicionados 0,05 g de 1-n-naftil-etilenodiamina (Vetec), em um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água destilada. Esta solução reagente foi armazenada em frasco âmbar para evitar sua degradação pela luz.

3.4.1.3 Soluções para ensaios de determinação de crômio

Uma solução de difenilcarbazida (DFC) foi preparada a partir da dissolução de 0,05 g do composto (Synth) em 3,00 mL de acetona (Dinâmica), procedendo com a total dissolução em banho ultrassônico. Posteriormente, diluiu-se a solução resultante com água destilada em um balão volumétrico de 100 mL. Utilizou-se também uma solução diluída de 6,25 · 10⁻³ % m/m a partir da solução de DFC preparada. Soluções com concentrações de 0,05; 0,1; 0,3 e 0,8 mol L⁻¹ de H₂SO₄ (Vetec) foram preparadas a partir da diluição necessária do ácido. Uma solução estoque com 500 mg L⁻¹ em Cr (VI) foi preparada, dissolvendo-se a massa apropriada de K₂CrO₇ (Synth) em solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. A partir desta solução foram preparadas soluções padrão com concentrações de Cr (VI) variando de 0,8 a 3,2 mg L⁻¹ e 0,6 a 3,0 mg L⁻¹.

3.4.1.4 Soluções para ensaios de determinação de cobre

Para a determinação de Cu (II), uma solução de cuprizona – bis(ciclohexanona)oxaldihidrazona – foi preparada a partir da dissolução de 0,5 g do composto (Sigma) em cerca de 50 mL de uma solução água/etanol 50% v/v. Em seguida, procedeu-se com um delicado aquecimento (até 50 °C) e leve agitação da mistura por cerca de 15 minutos, até que a solução se tornasse

transparente. Por fim, completou-se o volume para 100 mL com a solução água/etanol 50% v/v. Uma solução tampão de fosfato de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fosfórico e de pH igual a 8 foi preparada a partir da diluição da alíquota necessária do respectivo ácido (Vetec) em cerca de 400 mL de água. O pH foi ajustado com sucessivas adições de uma solução $8,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH (Cinética), utilizando-se o medidor de pH. Por fim, completou-se o volume para 500 mL. A solução carregadora foi preparada a partir da adição de 15 mL da solução de cuprizona em um balão de 25 mL, completando o volume com a solução tampão de fosfato. Uma solução estoque de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de Cu (II) foi preparada pela dissolução da massa apropriada de CuCl_2 (Sigma) em 100 mL de água. Soluções padrão com concentrações de 3,0 a 12 mg L^{-1} foram preparadas a partir da diluição das alíquotas correspondentes.

3.4.1.5 Soluções para ensaios de determinação de ferro

Uma solução tampão de acetato/ácido acético de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético (HAc) de pH igual a 4,5 foi preparada a partir da diluição da alíquota necessária do respectivo ácido (CHEMCO) em cerca de 400 mL de água. O pH foi ajustado com sucessivas adições de uma solução $8,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH (Cinética). Por fim, completou-se o volume para 500 mL. Preparou-se também uma solução de ortofenantrolina (Sigma) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, dissolvendo-se a massa correspondente do composto para 100 mL com a solução tampão de acetato/ácido acético. Uma solução de cloreto de hidroxilamina (Sigma) de 5% m/v foi preparada pela dissolução da massa correspondente em 100 mL de água. Prepararam-se soluções de H_2SO_4 (Vetec) de 0,05 e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a partir da devida diluição do ácido. Também foi preparada uma solução estoque de ferro, dissolvendo-se 0,3511 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) com a solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 , até completar o volume para 100 mL. As soluções padrão, com concentrações de 1,0 a $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe (II), foram preparadas a partir das devidas diluições da solução estoque, com 1,25 mL da solução do cloreto de hidroxilamina e a solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose até completar o volume para 25 mL.

Medicamentos de reposição de ferro (na forma de sulfato ferroso) foram adquiridos no comércio para a determinação do composto em seu conteúdo a

partir da utilização dos microssistemas com correção do efeito Schlieren. Cinco amostras de três marcas diferentes, de diferentes posologias e duas formas de ingestão (comprimidos e gotas) foram utilizadas, sendo elas designadas pelas seguintes siglas e posologias: SG (25 mg/mL), AG (25 mg/mL), SC (40 mg/comprimido), VC (40 mg/comprimido) e AC (60 mg/comprimido). Para as amostras em gotas, diluiu-se 1 mL do medicamento para 100 mL de água sem posterior tratamento da amostra. Em seguida, uma alíquota de 250 μL da solução anterior foi adicionada em um balão de 25 mL, juntamente com 1,25 mL da solução de hidroxilamina. Por fim, completou-se o volume com a solução 0,05 mol L^{-1} de sacarose. Para as amostras em comprimidos, pesaram-se três comprimidos de cada amostra em uma balança analítica e estes foram dissolvidos em cerca de 50 mL de solução 0,05 mol L^{-1} de H_2SO_4 . Filtrou-se o excipiente com papel de filtro e funil e, em seguida, completou-se o volume para 100 mL com a solução de sacarose. Alíquotas de 50 μL das soluções de amostras que continham 40 mg de ferro por comprimido foram adicionadas em um balão de 25 mL, no qual também se adicionou 1,25 mL da solução de cloreto de hidroxilamina. Completaram-se os volumes com a solução 0,05 mol L^{-1} de sacarose (Sigma). O mesmo procedimento foi feito para a amostra que continha 60 mg de ferro por comprimido, porém com a mudança da alíquota da solução de amostra para 30 μL .

Para realizar a avaliação de eficiência da correção de efeito matriz com a curva obtida com padrões em sacarose 0,05 mol L^{-1} , as soluções padrão foram preparadas novamente, da mesma forma indicada no parágrafo anterior, porém com os volumes completados com solução 0,05 mol L^{-1} de H_2SO_4 , a fim de correlacioná-las com as amostras em solução de sacarose.

3.4.2 Soluções para ensaios com a coluna de troca iônica

Uma solução do reagente Griess foi preparada com concentrações de 1,0 g L^{-1} de 1-n-naftil-etilenodiamina (Vetec), 7,0 g L^{-1} de sulfanilamida (Synth) e 0,10 mol L^{-1} de HCl (CHEMCO) a partir das devidas dissoluções diluições, seguindo o mesmo procedimento de preparo descrito na seção 3.4.1.2. A solução eluente de HCl (CHEMCO) a 1,0 mol L^{-1} foi preparada a partir da devida diluição do ácido em água. Soluções teste de nitrito (2,0 e 10 mg L^{-1}) foram preparadas a partir da

diluição das alíquotas da solução estoque de $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Soluções padrão ($0,20$ a $0,80 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,05$ a $0,20 \text{ mg L}^{-1}$) foram preparadas utilizando as alíquotas necessárias solução estoque de $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de nitrito da seção 3.4.1.2 com posterior diluição para 100 mL com água.

3.4.2.1 Preparo das amostras empregadas para ensaios com a coluna de troca iônica

Amostras de águas naturais foram recolhidas em três pontos do Lago Paranoá, localizado em Brasília – DF. Todas as amostras foram filtradas ($0,45 \mu\text{m}$, Unifil) anteriormente à injeção no microssistema. Estas também foram fortificadas com $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito, a partir da devida diluição das alíquotas da solução estoque de 50 mg L^{-1} com a solução de amostra, para ensaios de recuperação.

3.5 Estudos preliminares para Avaliação do Sistema de Detecção Fotométrica para Correção do Efeito Schlieren

3.5.1 Injeções de soluções concentradas de NaCl em fluxo de água destilada

O sistema de detecção fotométrica com correção para o efeito Schlieren foi inicialmente avaliado para a injeção de soluções de NaCl em fluxo de água destilada empregando um sistema de linha única [59]. Para isto, a bomba peristáltica, as válvulas solenoides e o microssistema com célula fotométrica foram interconectados e dispostos de acordo com a configuração de fluxo apresentada na Figura 17. Quando todas as válvulas eram ligadas simultaneamente, as soluções de NaCl eram aspiradas através das válvulas V2 e V3, com auxílio da bomba peristáltica, preenchendo o *plug* de amostragem (Am) com cerca de $2,7 \mu\text{L}$ de volume. Em seguida, com o desligamento de todas as válvulas (situação ilustrada nas válvulas da configuração da Figura 17), o *plug* contendo a amostra era carregado com água destilada pela bobina de reação (BR) até a célula de fluxo (CF) para a detecção. É importante salientar que os comprimentos de onda utilizados neste teste foram 530 e 625 nm .

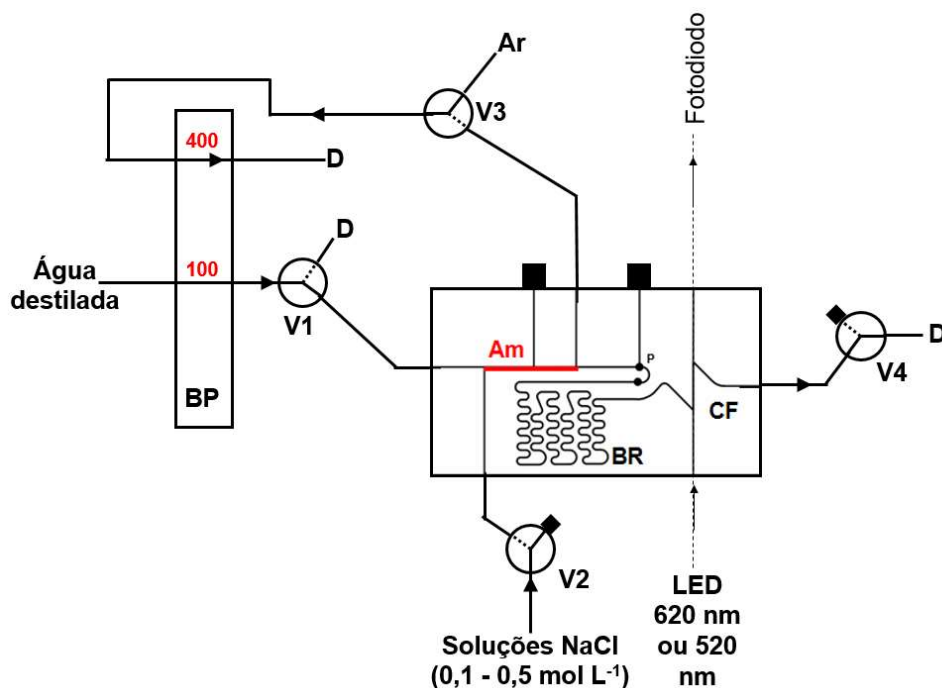


Figura 17. Configuração de fluxo utilizada para correção do efeito Schlieren, com injeções de soluções de NaCl em fluxo carregador de água, utilizando um LED com dois comprimentos de onda diferentes no sistema de detecção. BP: Bomba peristáltica (com indicações das vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$); V1 a V4: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem ($2,7 \mu\text{L}$); BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte.

3.5.2 Determinação de íons nitrito em solução concentrada de NaCl

A fim de se avaliar a capacidade do detector em diferenciar os sinais referentes ao efeito Schlieren e ao analito, um segundo teste foi efetuado envolvendo a detecção de íons nitrito em meio com alta concentração salina. Os estudos foram realizados com a configuração de fluxo apresentada na Figura 18, utilizando a solução de NED/SAM (de concentração descrita na seção 3.4.1.2) como solução carregadora e a solução de nitrito $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como solução injetada.

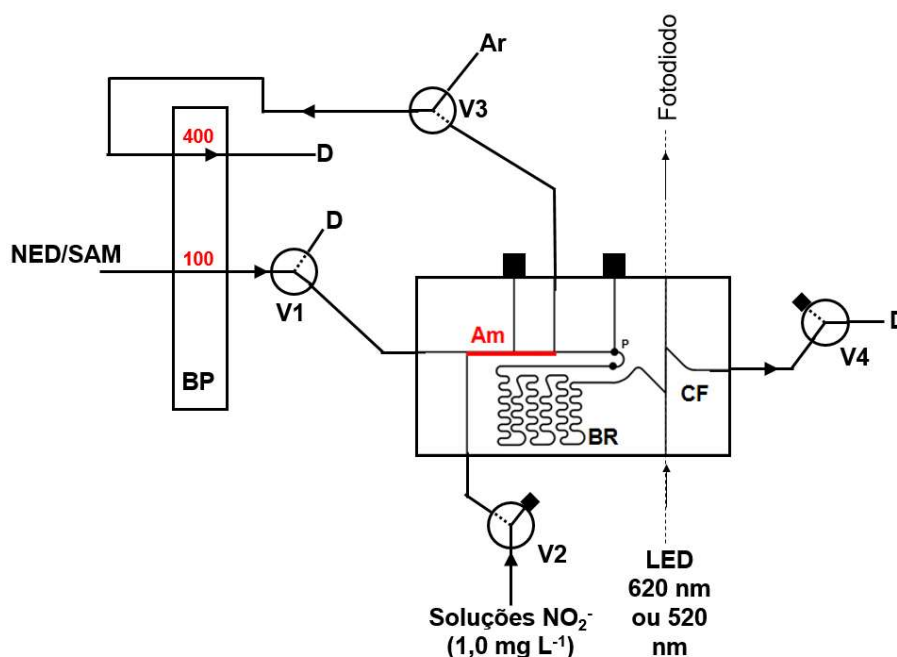


Figura 18. Configuração de fluxo utilizada para correção do efeito Schlieren, com injeções de soluções $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NO_2^- em NaCl no fluxo carregador de NED/SAM, utilizando um LED com dois comprimentos de onda diferentes no sistema de detecção. BP: Bomba peristáltica (com indicações das vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$); V1 a V4: Válvulas solenóides; Am: Alça de amostragem ($2,7 \mu\text{L}$); BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte.

Após a injeção, o *plug* de amostra foi carregado pela solução de NED/SAM para a bobina de reação, onde se desenvolveu a reação colorimétrica de Griess [27] com formação de um azo composto com elevada absorvidade molar em 530 nm (verde), a qual é ilustrada na Figura 19.

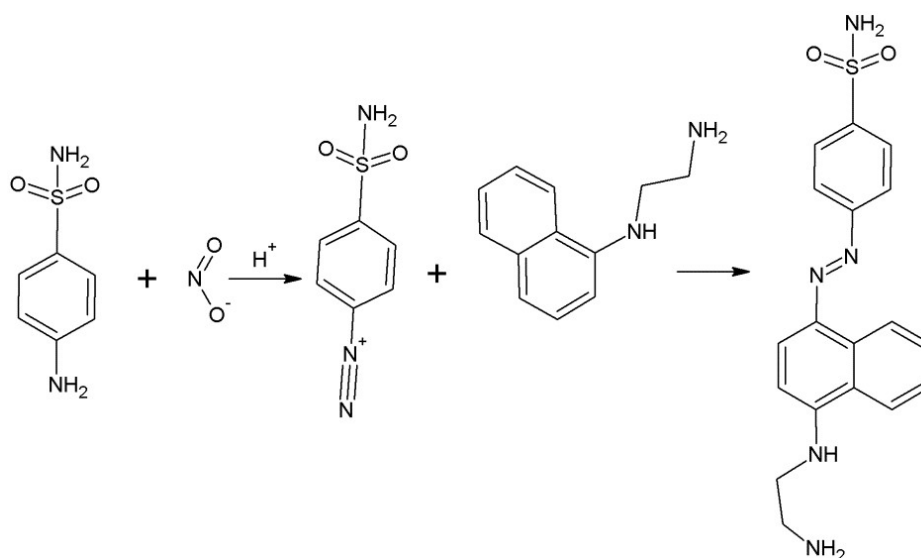


Figura 19. Reação de Griess para formação do azo composto cromóforo, o qual absorve fortemente em 530 nm .

Os comprimentos de onda utilizados neste teste foram 530 e 625 nm, e, como pode ser observado na Figura 20, a emissão do LED de 530 nm tem uma intensidade máxima no comprimento de onda de absorção do composto cromóforo formado. Além disso, a radiação do LED de 625 nm é fracamente absorvido pelo cromóforo, permitindo a correção adequada do efeito Schlieren.

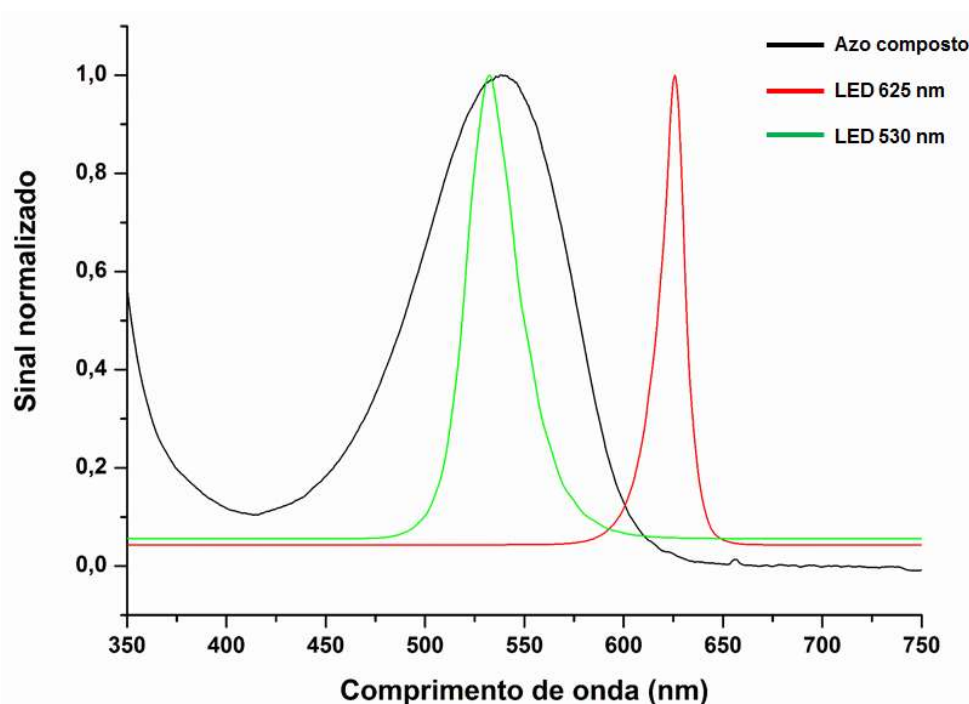


Figura 20. Espectros de absorção do azo composto e emissão dos LED em 530 e 625 nm.

3.5.3 Determinação de íons Cr (VI) em meios com diferentes níveis de acidez

Os estudos sobre a correção do efeito Schlieren envolveram também a determinação de Crômio (VI) em diferentes meios, empregando-se a reação colorimétrica com a difenilcarbazida (DFC) em meio ácido. A configuração de fluxo da Figura 21 foi utilizada para esta determinação, a qual é bastante similar à utilizada nos ensaios para a determinação de nitrito, considerando-se agora uma confluência de H_2SO_4 na solução carregadora de DFC anteriormente à passagem pela válvula V1. Portanto, uma conexão em “T” foi utilizada para promover a confluência do reagente cromogênico, a difenilcarbazida, com uma solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ou $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ externamente ao microsistema. Isto

foi necessário, pois a difenilcarbazida pode ser degradada em poucas horas se mantida continuamente em um meio ácido.

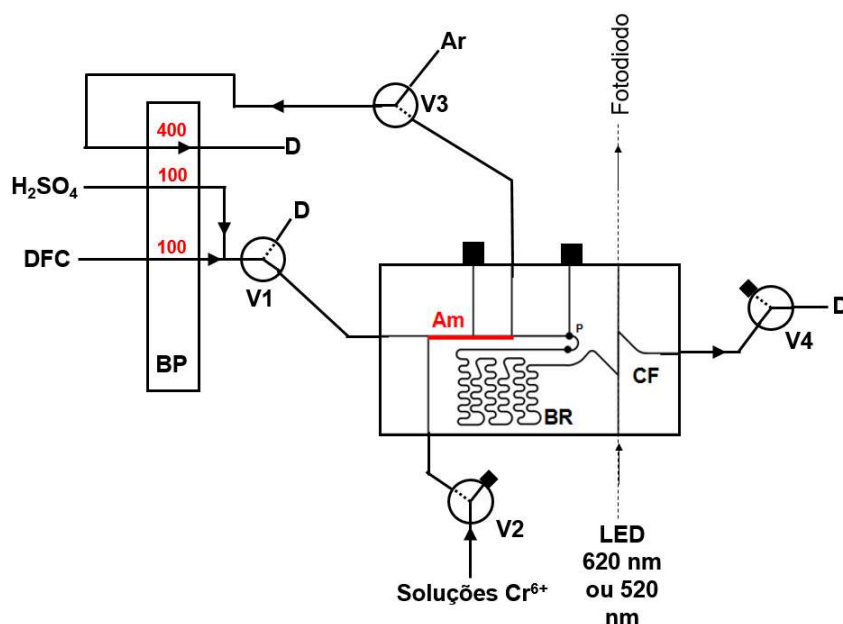


Figura 21. Configuração de fluxo utilizada para correção do efeito Schlieren, com injeções de soluções de Cr^{6+} em fluxo carregador de DFC e H_2SO_4 , utilizando um LED com dois comprimentos de onda diferentes no sistema de detecção. BP: Bomba peristáltica (com indicações das vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$); V1 a V4: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem (2,7 μL); BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte.

Com a configuração proposta, os íons Cr(VI) injetados no microsistema são impelidos pela solução carregadora para a bobina de reação (BR) onde ocorre a reação de formação da difenilcarbazona e posterior formação de um complexo com o íon metálico de coloração rosa que absorve fortemente em 530 nm (verde) [27], como é apresentado na Figura 22.

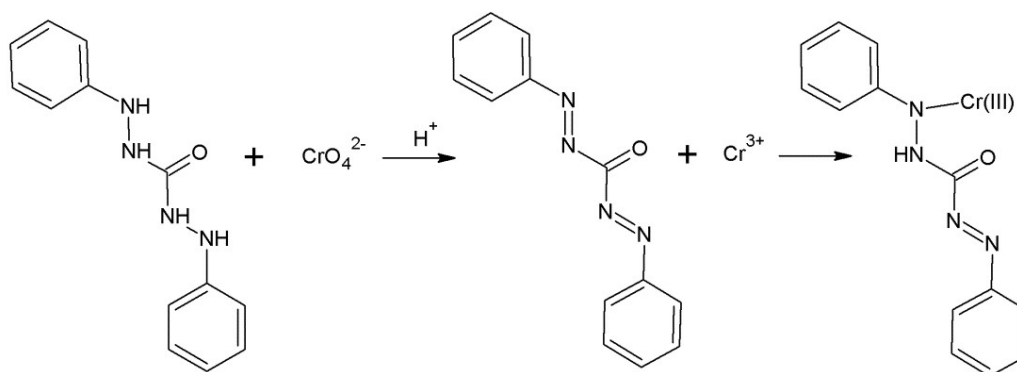


Figura 22. Reação entre o Cr(VI) e a difenilcarbazida para formação do complexo, o qual absorve fortemente em 530 nm.

Os comprimentos de onda utilizados neste teste foram 530 e 625 nm, e, como pode ser observado na Figura 23, a emissão do LED de 530 nm tem uma intensidade máxima no comprimento de onda de absorção do composto cromóforo formado. Além disso, a radiação do LED de 625 nm é fracamente absorvido pelo cromóforo, permitindo a correção adequada do efeito Schlieren.

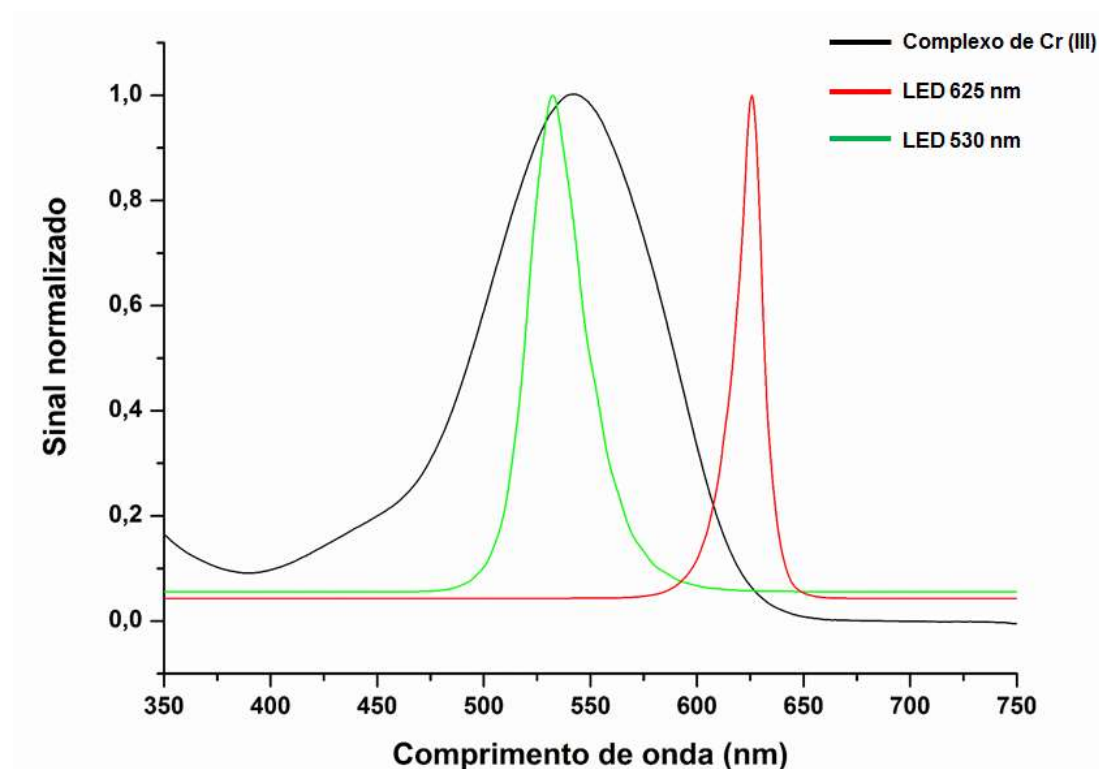


Figura 23. Espectros de absorção do complexo de Cr (III) formado e emissão dos LED em 530 e 625 nm

Soluções contendo 0,8 a 3,2 mg L⁻¹ em Cr (VI) foram preparadas em solução de H₂SO₄ 0,05 mol L⁻¹ (concentração final da solução carregadora após a confluência) ou em H₂SO₄ 0,30 mol L⁻¹ (seis vezes mais concentrada que a solução carregadora). Soluções padrão de Cr (VI) com concentrações de 0,6 a 3,0 mg L⁻¹ em água foram injetadas no microsistema para ensaios nos quais a concentração de H₂SO₄ da confluência era de 0,8 mol L⁻¹.

3.5.4 Determinação de íons Cu (II)

Para comprovar a eficiência de correção do efeito Schlieren pela utilização do sistema de detecção proposto com dois LED, um comprimento de onda distinto dos utilizados até o momento foi implementado. A reação de íons

cobre com o reagente cuprizona (bis(ciclohexanona)oxaldihidrazona) gera um complexo que absorve fortemente na região de 625 nm, como é apresentado na Figura 24.

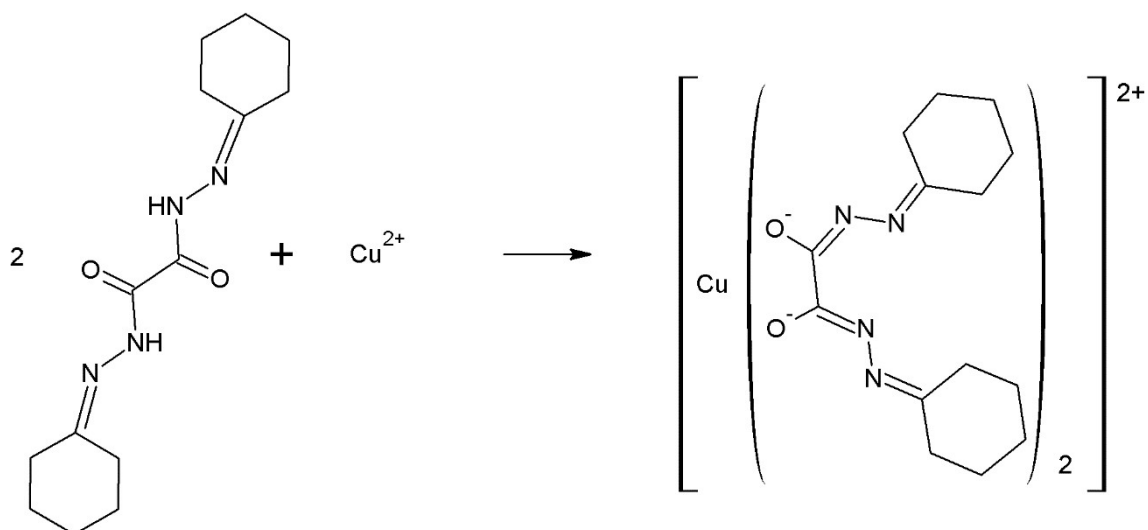


Figura 24. Reação entre a cuprizona e o Cu (II) para formação do complexo, o qual absorve fortemente em 625 nm.

Considerando este aspecto, foi necessário utilizar uma fonte de radiação diferente das utilizadas até o momento. Portanto, o LED que emitia em 530 nm foi substituído por um LED de cor azul, o qual emitia em 470 nm. Além disso, a equação matemática foi invertida, uma vez que o LED que responde para o complexo formado e o efeito Schlieren passou a ser o de comprimento de onda de 625 nm, sendo a fórmula matemática de correção utilizada para a aquisição do sinal corrigido igual a $S_{625 \text{ nm}} - S_{470 \text{ nm}}$, onde S é o sinal.

Os comprimentos de onda utilizados neste teste foram 470 e 625 nm, e, como pode ser observado na Figura 25, a emissão do LED de 625 nm tem uma intensidade máxima no comprimento de onda de absorção do composto cromóforo formado. Além disso, a radiação do LED de 470 nm é fracamente absorvido pelo cromóforo, permitindo a correção adequada do efeito Schlieren.

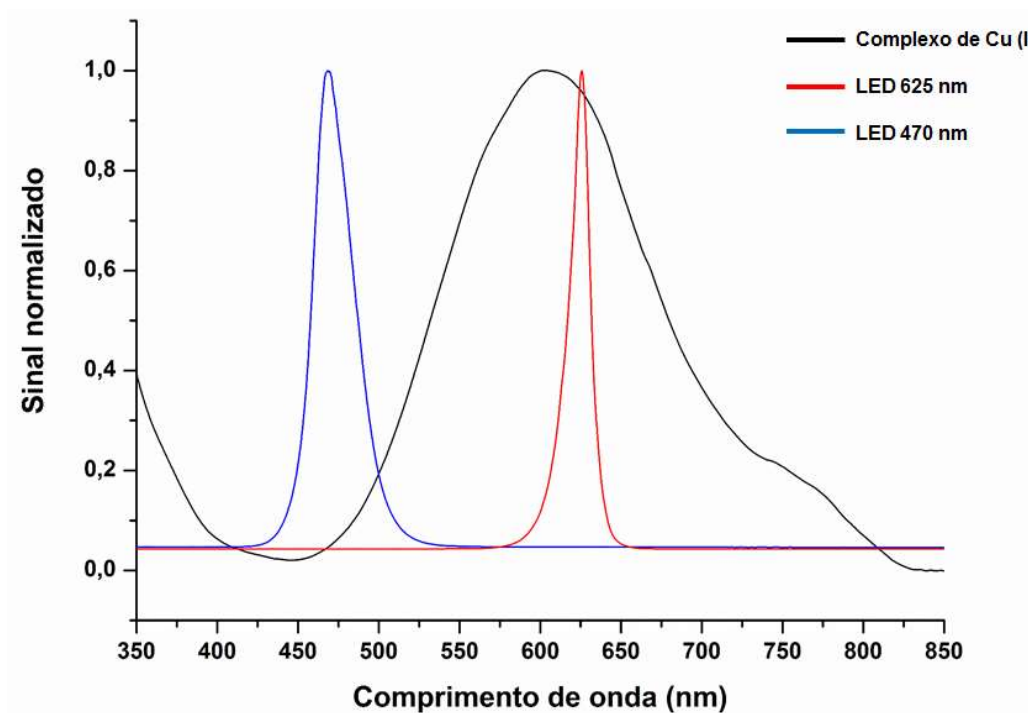


Figura 25. Espectros de absorção do complexo de Cu (II) formado e emissão dos LED em 470 e 625 nm.

Utilizando a configuração de fluxo da Figura 26, soluções padrão de cobre de 3,0 a 12 mg L⁻¹ foram injetadas no microssistema, e, após isso, o *plug* de amostragem era carregado pela solução de cuprizona em tampão de fosfato, para posterior detecção na célula de fluxo (CF), utilizando os comprimentos de onda citados no parágrafo anterior.

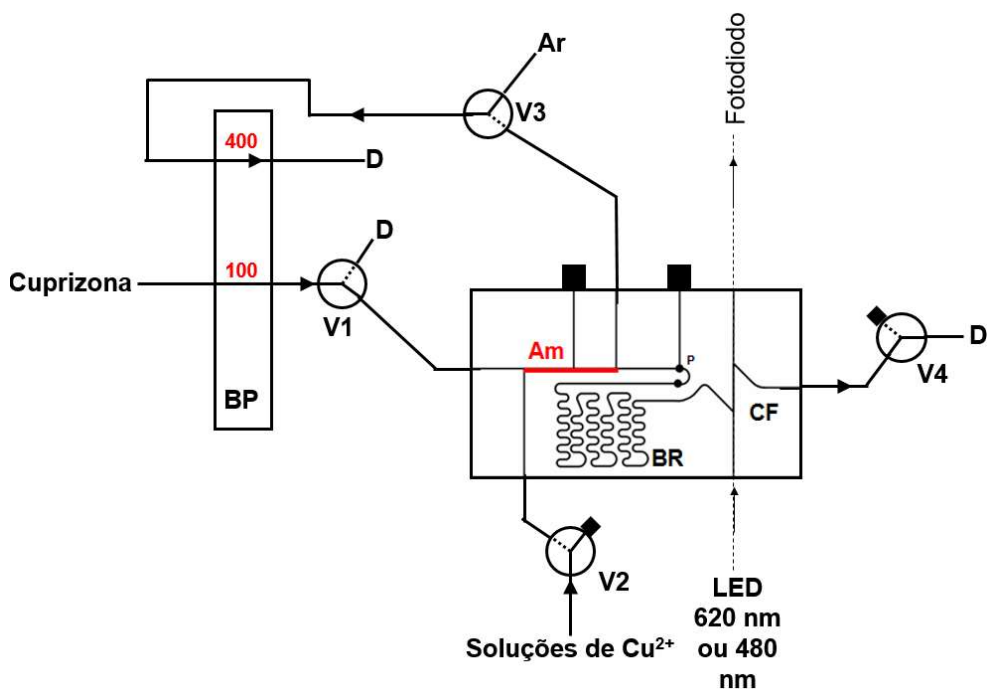


Figura 26. Configuração de fluxo utilizada para correção do efeito Schlieren, com injeções de soluções de Cu^{2+} em fluxo carregador de cuprizona, utilizando um LED com dois comprimentos de onda diferentes no sistema de detecção. BP: Bomba peristáltica (com indicações das vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$); V1 a V4: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem ($2,7 \mu\text{L}$); BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte.

3.5.5 Determinação de íons Fe (II) em medicamentos

A fim de se comprovar a eficiência de correção do efeito Schlieren na determinação de um analito em uma amostra, utilizou-se a configuração de fluxo da Figura 27. As soluções padrão com concentrações de $1,0$ a $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe (II) e as soluções de amostras, ambas em sacarose $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ou H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, as quais também foram preparadas em solução de cloreto de hidroxilamina para total conversão do ferro a Fe (II), foram injetadas no microsistema e posteriormente carregadas com a solução de ortofenantrolina em tampão de acetato/ácido acético para detecção na célula de fluxo (CF).

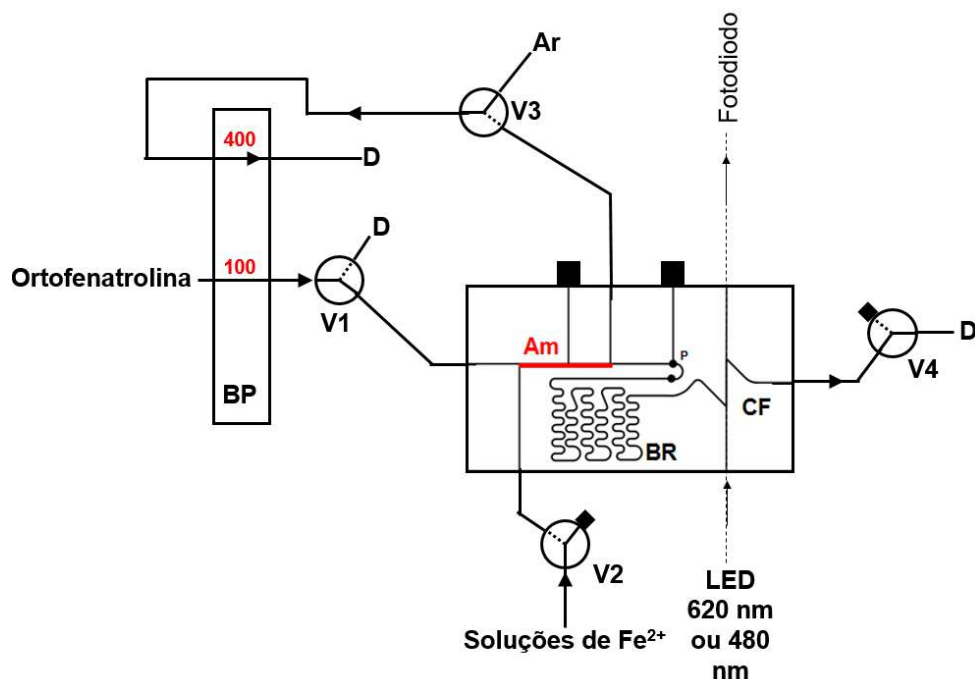


Figura 27. Configuração de fluxo utilizada para correção do efeito Schlieren, com injeções de soluções de Fe^{2+} em sacarose ou H_2SO_4 no fluxo carregador de ortofenantrolina, utilizando um LED com dois comprimentos de onda diferentes no sistema de detecção. BP: Bomba peristáltica (com indicações das vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$); V1 a V4: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem (2,7 μL); BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte.

O complexo formado absorve fortemente no azul e a reação é apresentada na Figura 28. Os comprimentos de onda utilizados nessa determinação foram 470 e 625 nm.

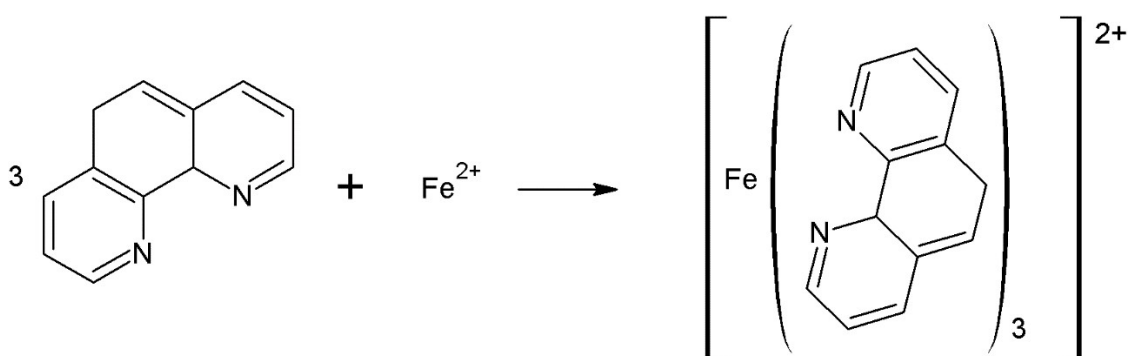


Figura 28. Reação entre o Fe (II) e a ortofenantrolina para formação do complexo cromóforo, o qual absorve fortemente em 470 nm.

Os comprimentos de onda utilizados neste teste foram 470 e 625 nm, e, como pode ser observado na Figura 29, a emissão do LED de 470 nm tem uma intensidade máxima próxima no comprimento de onda de absorção do composto

cromóforo formado. Além disso, a radiação do LED de 625 nm é fracamente absorvido pelo cromóforo, permitindo a correção adequada do efeito Schlieren.

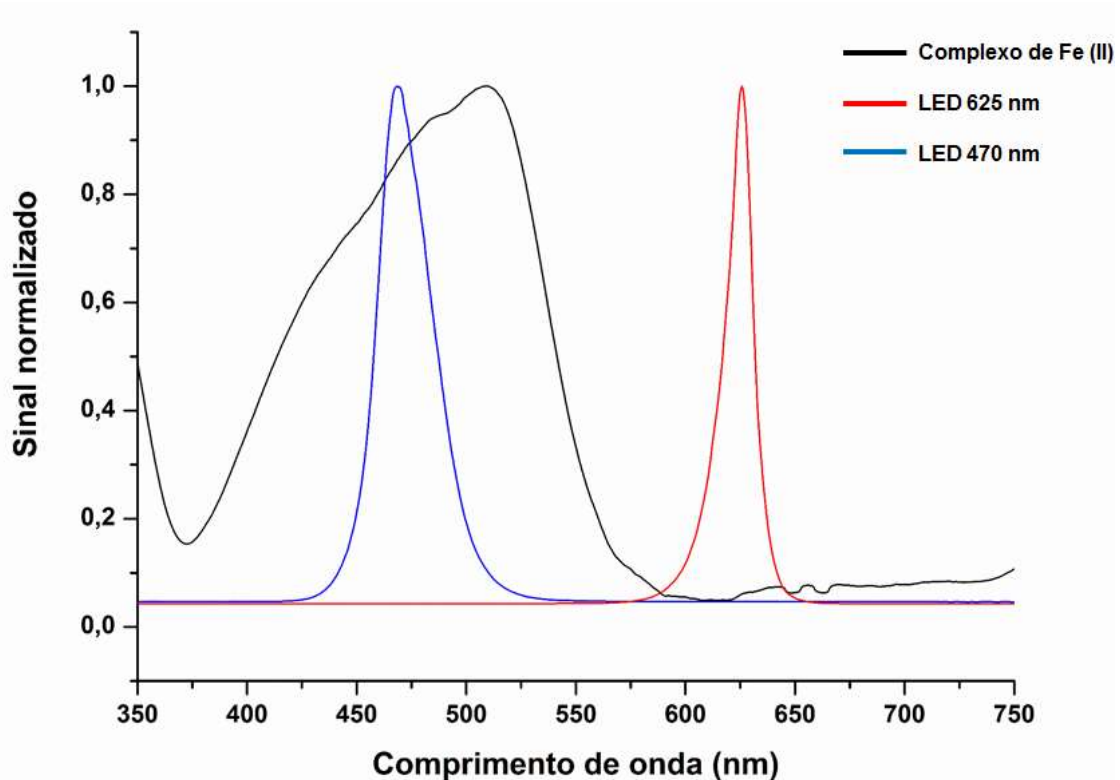


Figura 29. Espectros de absorção do complexo de Fe (II) formado e emissão dos LED em 470 e 625 nm.

3.6 Avaliação dos protótipos com colunas para SPE integradas

Após os ensaios de correção do efeito Schlieren, iniciaram-se os estudos para verificação da possibilidade da integração de colunas extratoras com materiais sólidos aos microdispositivos, a partir de procedimentos simples. A literatura mostra que a integração de fases extratoras sólidas em sistemas microfluídicos é normalmente realizada com materiais monolíticos, os quais são sintetizados no interior dos canais já selados [24], porém, alguns materiais, já consagrados para procedimentos de extração, não podem ser integrados desta maneira, o que pode limitar as aplicações destes dispositivos. Considerando este aspecto, foi avaliado de forma preliminar o empacotamento de colunas utilizando carvão ativado em pó finamente dividido e a integração de uma coluna fluidizada [56] com microesferas (beads) de uma resina não iônica (XAD-4).

3.6.1 Estudos preliminares

3.6.1.1 Microsistema com coluna de carvão ativo

Os testes realizados para avaliar a capacidade de extração dos microsistemas com coluna extratora se iniciaram com a coluna de carvão ativado. Uma avaliação preliminar do procedimento de extração com a coluna integrada foi realizada bombeando-se uma solução de corante alimentício através da mesma e comparando-se visualmente a cor desta solução antes e depois da extração, conforme a configuração de fluxo da Figura 30.

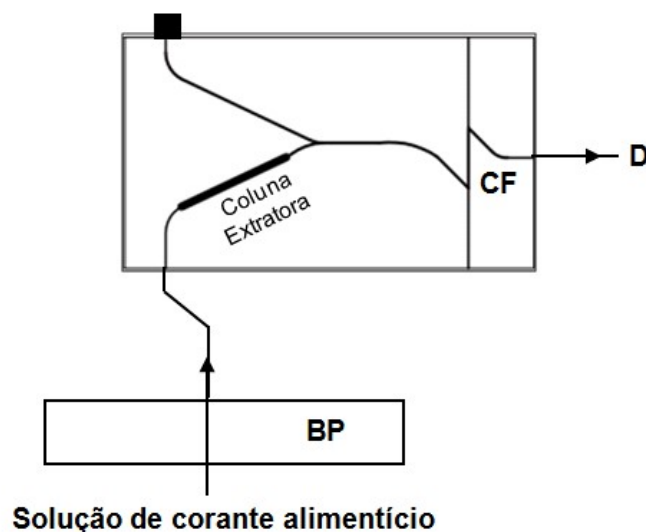


Figura 30. Configuração de fluxo para testes iniciais de extração com microsistemas fluídicos protótipos com coluna integrada. (BP: Bomba peristáltica; CF: Célula de fluxo E D: Descarte).

3.6.1.2 Microsistema com coluna de resina não-iônica XAD-4

A mesma configuração de fluxo da Figura 30 foi utilizada para avaliação da extração utilizando a coluna de microesferas de resina não iônica Amberlite XAD-4. A microfabricação do sistema com essa coluna foi realizada para observação da possibilidade de integração de uma fase sólida comercial no microsistema. A solução de corante alimentício foi bombeada para coluna a fim de se observar mudança na cor da solução.

3.6.1.3 Microsistema de troca iônica utilizando a resina Dowex 1X8

Após a integração da coluna de resina aniônica Dowex 1X8 no microdispositivo, iniciaram-se os testes para avaliação da troca iônica e detecção do analito na célula de fluxo, utilizando a configuração de fluxo da Figura 31. Para tanto, soluções teste de nitrito ($2,0$ e 10 mg L^{-1}) eram aspiradas através das válvulas 2 e 3, com o auxílio da bomba peristáltica, por meio do acionamento de todas as válvulas por um tempo determinado (90 segundos), a fim de se preencher a coluna Dowex 1X8 (CD) com estas soluções para ocorrência da extração. Quando todas as válvulas eram desligadas, permitia-se a passagem da solução de HCl para o interior do microdispositivo, a fim de que esta pudesse eluir o nitrito presente na coluna e, posteriormente, houvesse a confluência com a solução NED/SAM para aquisição do sinal analítico na célula de fluxo (CF).

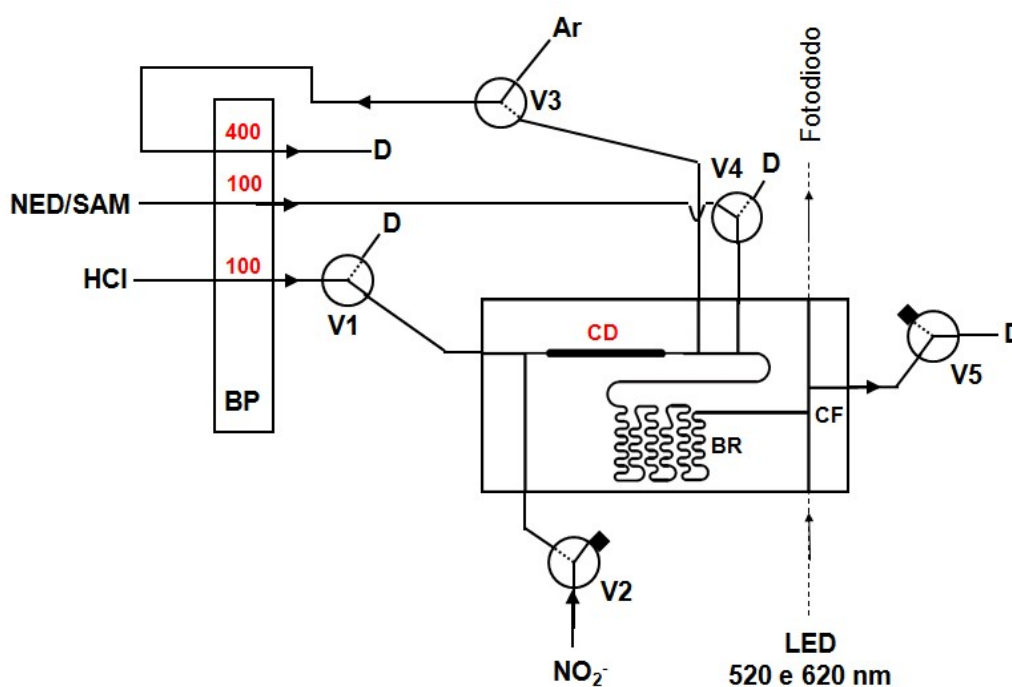


Figura 31. Configuração de fluxo utilizada para realização dos primeiros testes de pré-concentração de nitrito. (BP: Bomba peristáltica; V1 a V5: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem; BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo; CD: Coluna Dowex 1X8 e D: Descarte. Valores em vermelho determinam a vazão em $\mu\text{L min}^{-1}$).

Devido a problemas com bolhas, os quais serão discutidos na seção de resultados e discussão, a configuração de fluxo apresentada na Figura 31 teve de ser substituída a fim de que pudessem ser realizadas as medidas posteriormente à pré-concentração de nitrito, situação abordada a seguir.

3.7 Ensaios de extração e pré-concentração de nitrito utilizando microssistema com coluna Dowex 1X8 integrada

Utilizando a configuração de fluxo apresentada na Figura 32, a qual torna o sistema de fluxo multicomutado [9], realizou-se a determinação de nitrito posteriormente a sua pré-concentração na coluna Dowex 1X8. Antes das determinações, a coluna era percolada com água destilada por 100 segundos, e também pela solução 1,0 mol L⁻¹ de HCl, pelo mesmo tempo. As soluções padrão e de amostras eram introduzidas no microdispositivo através da válvula 2 por 200 segundos, a fim de se realizar a pré-concentração, enquanto as outras válvulas se mantinham desligadas. É importante observar que essas soluções percorriam todo o interior do microdispositivo até ser descartada em D. Em seguida, a válvula 2 era desligada e a 3 era acionada por 100 segundos para limpeza da coluna e eliminação de qualquer espécie que não interagisse com a coluna aniônica.

Para a eluição do nitrito da coluna e posterior detecção na célula de fluxo, a válvula 3 era desligada e as válvulas 1 e 4 eram acionadas, permitindo a passagem da solução de HCl pela coluna e confluência da solução NED/SAM (com concentrações descritas na seção 3.4.2) e aquisição do sinal transiente. Para uma nova medida, o procedimento era repetido a partir da injeção de soluções de nitrito pela válvula 2.

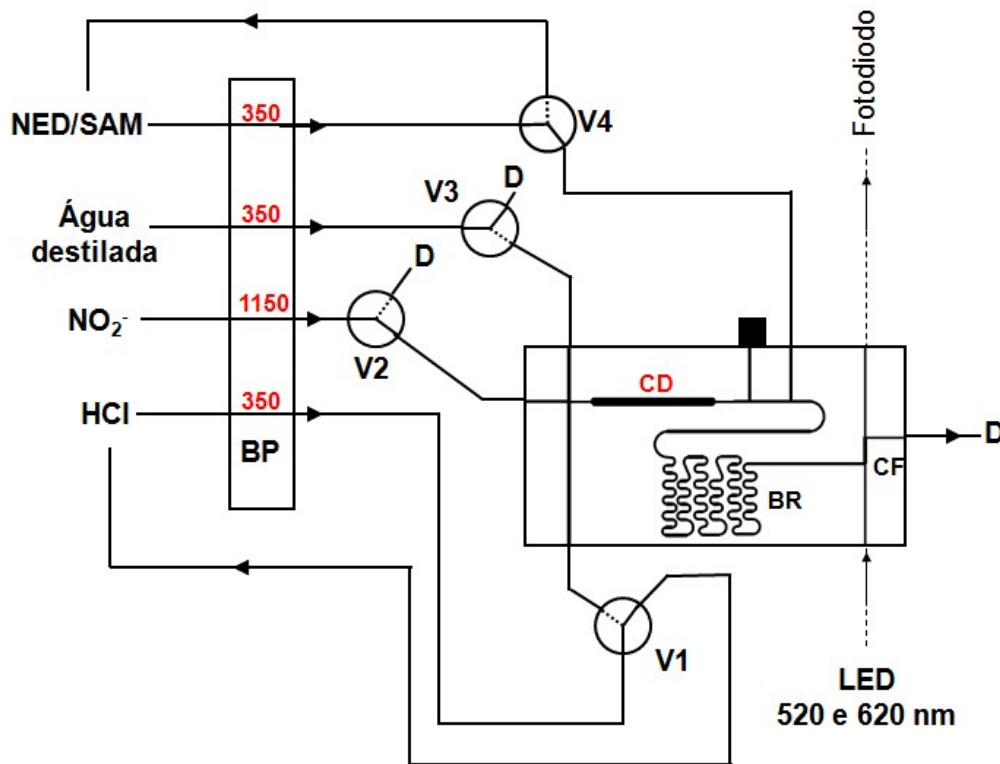


Figura 32. Configuração de fluxo utilizada (sistema multicomutado) para realização dos ensaios de pré-concentração de nitrito. (BP: Bomba peristáltica; V1 a V4: Válvulas solenoides; Am: Alça de amostragem; BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo e D: Descarte. Valores em vermelho determinam a vazão em $\mu\text{L min}^{-1}$).

Na Tabela 2 são apresentadas configurações utilizadas para as válvulas solenoides durante os processos de amostragem, limpeza e eluição.

Tabela 2. Configurações de acionamento de válvulas utilizadas para amostragem, limpeza e eluição.

Processo	V1	V2	V3	V4	Tempo de acionamento (s)
Amostragem	Off	On	Off	Off	200
Limpeza	Off	Off	On	Off	100
Eluição	On	Off	Off	On	Tempo das medidas

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos preliminares para correção do Efeito Schlieren

Conforme citado na introdução, o efeito Schlieren é causado por gradientes de concentração em um meio, os quais levam a variações do sinal espectrofotométrico, não relacionadas ao analito. Considerando estes aspectos, os ensaios realizados neste trabalho, no que diz respeito à correção do efeito Schlieren, foram baseados em sistemas de injeção em linha única [59], onde um segmento de solução é injetado em um fluxo carregador (Figura 33), estando ambos com concentrações diferentes em soluto. É importante salientar que, em sistemas desse tipo, a dispersão das espécies em fluxo é menor, quando comparada a sistemas com confluência, devido a um baixo nível de turbulência nos canais [59]. Desta forma, o efeito Schlieren seria observado de forma mais pronunciada, e, havendo correção neste caso, a sua eficiência já seria comprovada.

Nas próximas seções são discutidos os ensaios realizados variando-se a composição da solução injetada ou da solução carregadora.

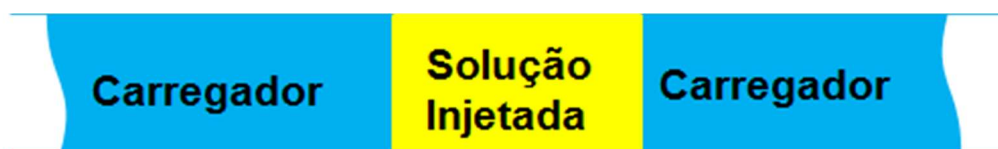


Figura 33. Ilustração para a injeção em linha única, na qual se formam segmentos de solução carregadora e solução injetada.

4.1.1 Injeções de soluções concentradas de NaCl em fluxo de água destilada

Inicialmente, os testes foram realizados ajustando-se as intensidades luminosas para os dois comprimentos de onda (LED) em um mesmo patamar de sinal, pois, imaginava-se que ambos os comprimentos de onda responderiam igualmente ao efeito Schlieren sob esta condição. Deste modo, a resposta resultante da subtração do sinal para um comprimento de onda pelo outro proporcionaria a correção total do efeito, com sinal aproximadamente igual a zero.

Conforme mostra a Figura 34, as respostas obtidas para injeções de uma solução de NaCl $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ em fluxo carregador de água destilada, foram diferentes para cada comprimento de onda, observando-se um efeito Schlieren mais pronunciado para o LED verde (530 nm) do que para o LED vermelho (625 nm). Assim, o sinal resultante da subtração das respostas para os LED, mostrado como uma linha negra na Figura 34, evidencia que a correção proposta não foi eficiente.

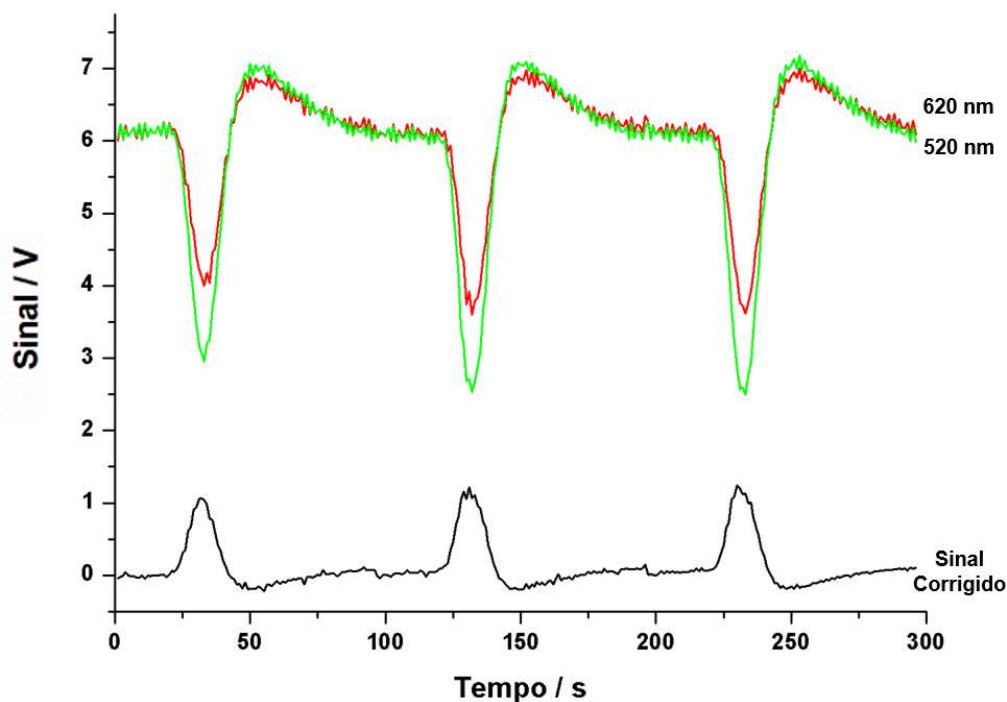


Figura 34. Sinais transientes para o efeito Schlieren. (Em vermelho: sinal de absorção para o comprimento de onda do vermelho (625 nm); Em verde: sinal de absorção para o comprimento de onda do verde (530 nm); Em preto: sinal proveniente da subtração do sinal vermelho pelo verde).

A partir do observado nesse teste preliminar, supôs-se que a resposta ao efeito Schlieren poderia variar, dependendo do comprimento de onda utilizado bem como do meio no qual é realizada a análise. Para a confirmação desta hipótese, procedeu-se com a obtenção de espectros na região do visível para a injeção de uma solução de NaCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ em fluxo de água destilada, realizando-se os ensaios em um sistema de análise em fluxo comercial (FIALab®) equipado com um espectrofotômetro de arranjo de diodos (Ocean Optics – USB 2000) acoplado a uma célula de fluxo com caminho óptico de 10 mm. É importante destacar que a concentração de NaCl injetada durante este

procedimento foi significativamente maior do que aquela injetada no microsistema para que fosse possível visualizar o efeito em um sistema com maior dispersão.

A Figura 35A mostra o diagrama obtido para a injeção de NaCl no sistema comercial empregando-se os comprimentos de onda do espectrofotômetro correspondentes aos máximos de emissão dos LED. Assim como no ensaio com o microdispositivo, o efeito Schlieren foi mais pronunciado para o comprimento de onda menor (verde), mostrando a variação do efeito com o λ . De fato, como mostra a Figura 35B, os espectros obtidos em diferentes pontos (1 a 5 na Figura 35A) durante a aquisição do diagrama apresentam grande variação, principalmente na região onde o efeito de “lente” é mais pronunciado, diferenciando grandemente a resposta para os comprimentos de onda referentes aos LED empregados.

Segundo a lei de Snell [60], isso se deve ao fato de que o índice de refração tem uma dependência tanto com o comprimento de onda como do meio no qual a luz se propaga. Dessa forma, é possível compreender que existem diferentes índices de refração para diferentes frequências de luz, quando esta atravessa meios distintos, como aqueles que surgem na baixa dispersão das soluções em fluxo. É importante relatar que a literatura já relata este comportamento para os diferentes comprimentos de onda em sistemas de análise em fluxo não miniaturizados [40], porém, o mesmo se mostra bem menos pronunciado, sendo sugerida uma compensação matemática além da subtração dos sinais para ambos os λ .

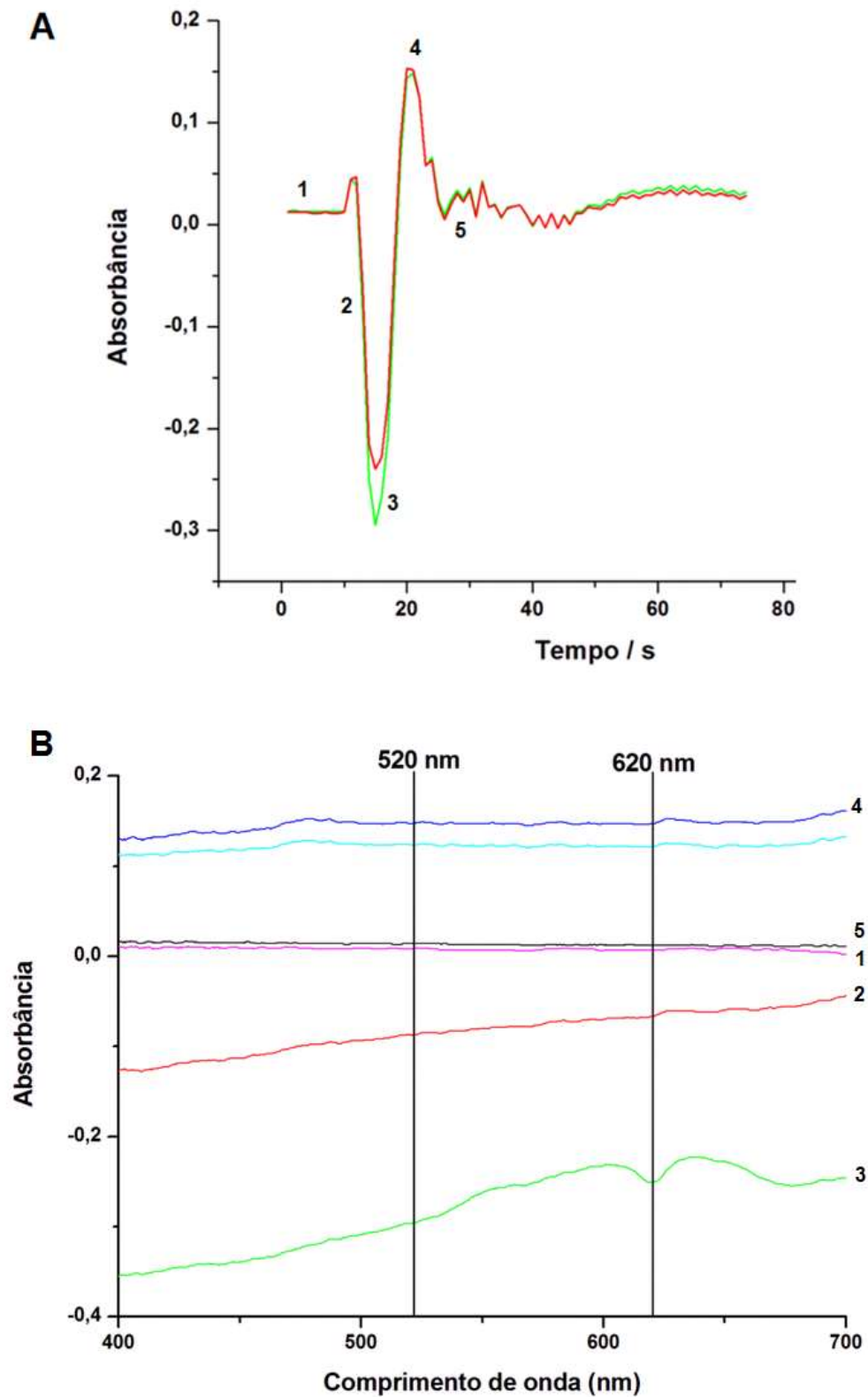


Figura 35. Sinal transiente para o efeito Schlieren, medido no FIALab® (A) e seu espectro (B). (Os números de 1 a 5 indicam os momentos referentes a cada espectro tirado para ambos os comprimentos de onda, sendo que o número 3 indica o máximo efeito de lente).

Considerando este primeiro resultado em que as mesmas intensidades de sinal para a emissão dos LED não levam a uma correção completa do efeito Schlieren, as intensidades foram ajustadas empiricamente, com o objetivo de se compensar, de forma eletrônica, as diferenças nas respostas ao efeito para os dois LED. Controlando-se a corrente que chega aos LED com os potenciômetros (RV_1 e RV_2 na Figura 13), a intensidade luminosa do LED com comprimento de onda que sofreu maior influência do efeito foi diminuída até que o efeito Schlieren não pudesse mais ser observado no sinal relativo à correção por subtração após uma injeção de solução concentrada de NaCl.

Conforme apresentado na Figura 36, com o ajuste prévio das intensidades relativas dos LED foi possível minimizar de forma significativa o efeito Schlieren para injeções de soluções de NaCl com concentrações de 0,10; 0,25 e 0,50 mol L⁻¹. Vale destacar que esta última concentração se aproxima da concentração de sais na água do mar [61], indicando a possibilidade de se realizar determinações em amostras com elevado teor de íons dissolvidos, sem necessidade de sua prévia eliminação/separação. Entretanto, estudos adicionais seriam necessários para se avaliar esta possibilidade, os quais estão além do escopo deste trabalho.

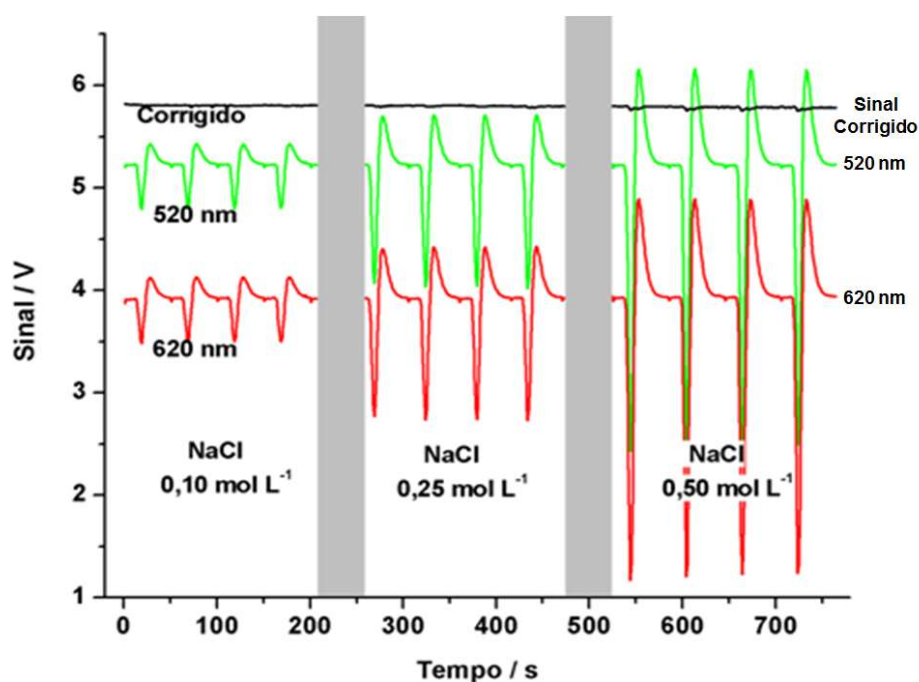


Figura 36. Sinais transientes para o efeito Schlieren e sua correção em diferentes concentrações de NaCl.

É importante destacar que este ajuste individual da intensidade luminosa dos LED foi uma alternativa eficiente para a correção matemática do efeito Schlieren. Este tipo de ajuste individual não pode ser realizado em um espectrofotômetro comercial, uma vez que a fonte utilizada é uma lâmpada, a qual emite em vários comprimentos de onda [62], cujas intensidades não podem ser ajustadas individualmente.

4.1.2 Determinação de íons nitrito em solução concentrada de NaCl

Embora os resultados apresentados na seção anterior possam ser considerados promissores, os mesmos não indicaram a possibilidade de se detectar o sinal referente apenas ao analito em uma situação na qual o sinal para o efeito Schlieren seja significativamente maior. Para avaliar o desempenho do sistema nesta situação, simulou-se a determinação de íons nitrito a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ em uma solução de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

De acordo com o apresentado na Figura 37, as diferenças entre os sinais transientes do branco ($\text{NaCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$) e do padrão (Branco + $\text{NO}_2^- 1,0 \text{ mg L}^{-1}$), adquiridos apenas a 530 nm (comprimento absorvido pelo cromóforo, linha em verde na figura), são muito pequenas, sendo estas insuficientes para identificação do analito. Entretanto, ao se observar a resposta para a diferença entre os sinais obtidos com o LED de 530 nm e o LED de 625 nm , indicado por uma linha negra na Figura 37, é possível se identificar com maior nitidez o sinal que se refere ao analito em relação ao sinal do branco. Este resultado indica que é perfeitamente possível realizar a detecção do analito em um meio que gera o efeito indesejável de Schlieren, possibilitando a interpretação do sinal analítico. Por outro lado, foi observado que a resposta obtida após a correção não apresentou uma elevada razão sinal/ruído, o que pode ter sido causada pela elevada força iônica do meio que diminui a atividade do íon de interesse e o rendimento da reação colorimétrica.

No meio sem a presença de NaCl, isto é, somente com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NO_2^- , o sinal para o analito é mais facilmente interpretado, como pode ser observado na linha verde. Porém, é possível perceber que este sinal é muito semelhante ao sinal do efeito Schlieren, observado na linha vermelha. Este fato

indica que, mesmo sem estar num meio com uma concentração alta de sais, o efeito Schlieren ocorre, pela mínima diferença de concentração no meio.

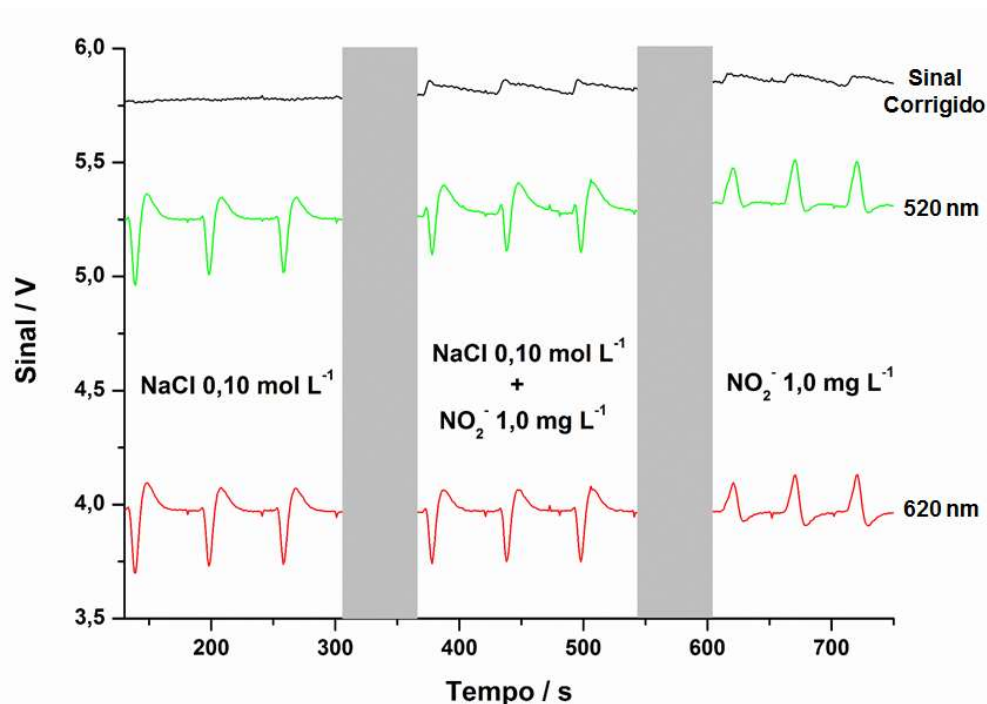


Figura 37. Sinais transientes para uma solução 0,10 mol L⁻¹ de NaCl (branco), outra solução contendo 0,10 mol L⁻¹ de NaCl e 1,0 mg L⁻¹ de NO₂⁻, e para solução contendo somente 1,0 mg L⁻¹ de NO₂⁻, com sua devida correção.

4.1.3 Determinação de íons Cr (VI) em meios com diferentes níveis de acidez

Uma situação comum que pode ocorrer em determinações analíticas é obter-se uma solução com baixa concentração do analito, mas com elevado teor residual de ácido proveniente do preparo/abertura da amostra. Neste caso, ao injetar-se a solução extremamente ácida, sem uma prévia diluição da mesma, em um sistema microfluídico de linha única, será detectado o efeito indesejável de Schlieren, o qual poderá comprometer seriamente a detecção fotométrica.

Considerando este aspecto, realizou-se um estudo para a determinação de íons Cr (VI) em soluções com diferentes níveis de acidez empregando-se o método fotométrico com difenilcarbazida (DFC). Inicialmente, fez-se uma avaliação prévia ajustando-se a concentração de ácido sulfúrico dos padrões injetados de forma a ficarem com a mesma concentração da solução carregadora na Figura 21 (0,05 mol L⁻¹). É importante observar que esta

concentração se refere à mistura de H_2SO_4 com DFC que foi efetuada por confluência na configuração da Figura 21.

Conforme apresentado no diagrama da Figura 38, mesmo equilibrando-se a acidez das soluções injetadas e da solução carregadora, o efeito Schlieren foi significativo, o que pode ser atribuído à presença de DFC na solução carregadora, que não foi corrigida para os padrões, ou mesmo a uma mistura pouco eficiente da DFC com o H_2SO_4 após a confluência, o que levaria a um gradiente de concentração no meio, proporcionando o efeito Schlieren. Esta mistura ineficiente ocorre com frequência em micro sistemas fluídicos, devido ao diâmetro dos canais. Apesar disto, o sinal foi corrigido de forma satisfatória (linha negra na Figura 38), permitindo a construção de uma curva analítica ($y = -0,00882 + 0,27587x$) com linearidade adequada ($R = 0,996$) e com limite de detecção de $0,20 \text{ mg L}^{-1}$.

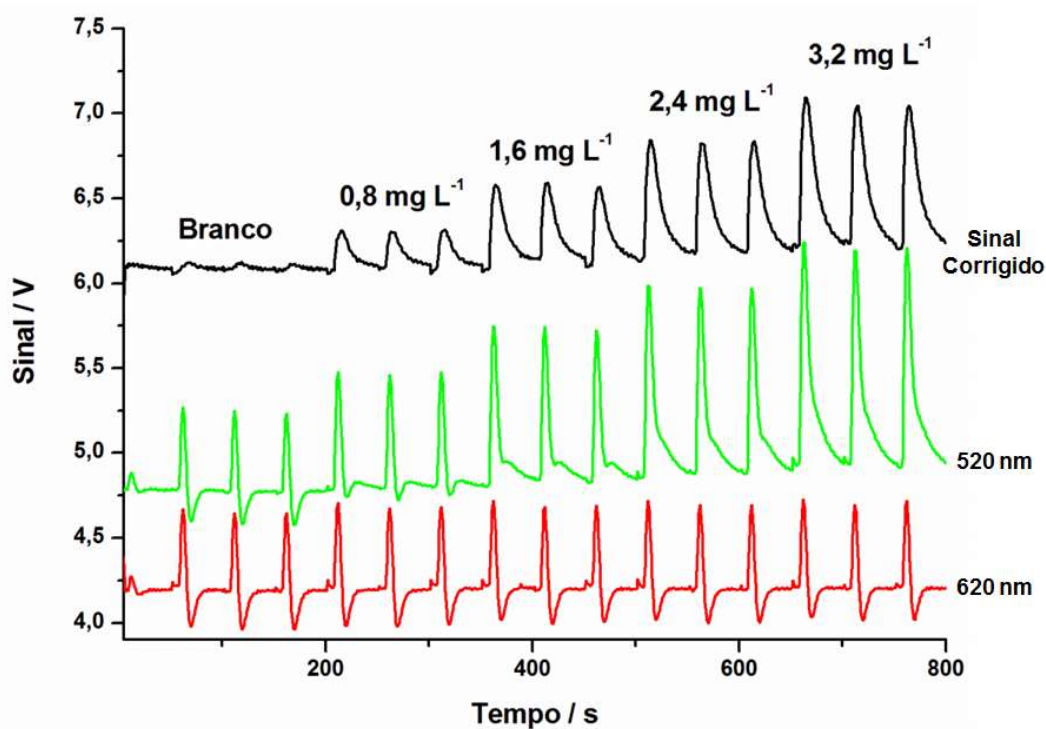


Figura 38. Diagramas, com os sinais para os dois comprimentos de onda e o sinal corrigido, para determinação de cromo, obtidos com os padrões em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 .

Em um segundo estudo, preparou-se os padrões de Cr (VI) com concentrações de H_2SO_4 em $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se as concentrações de DFC e de H_2SO_4 , no carregador, inalteradas. Esta condição simulou a situação na qual o analito está presente em uma solução com elevado teor de resíduos

ácidos, como, por exemplo, na abertura de ligas metálicas ou tecidos vegetais e animais [63].

O diagrama obtido nesta condição é apresentado na Figura 39, o qual indica um efeito Schlieren pronunciado (linha em vermelho), mas uma correção bastante eficiente do mesmo (linha negra). Nesta condição, foi observada também uma melhor razão sinal/ruído para as respostas instrumentais, o que é atribuída à maior acidez do meio que contribui para um melhor desenvolvimento da reação colorimétrica. Apesar disto, a curva analítica ($y = 0,16602 + 0,6801x$) para a faixa estudada, a qual foi obtida medindo-se a altura média dos picos e correlacionando-os com as concentrações, apresentou uma menor linearidade ($R = 0,986$), com limite de detecção de $0,65 \text{ mg L}^{-1}$. Este resultado é possivelmente uma consequência do desvio da lei de Beer [37], uma vez que a maior concentração de ácido favoreceu uma maior formação da espécie cromófora, o que não seria observado para soluções menos concentradas em H_2SO_4 .

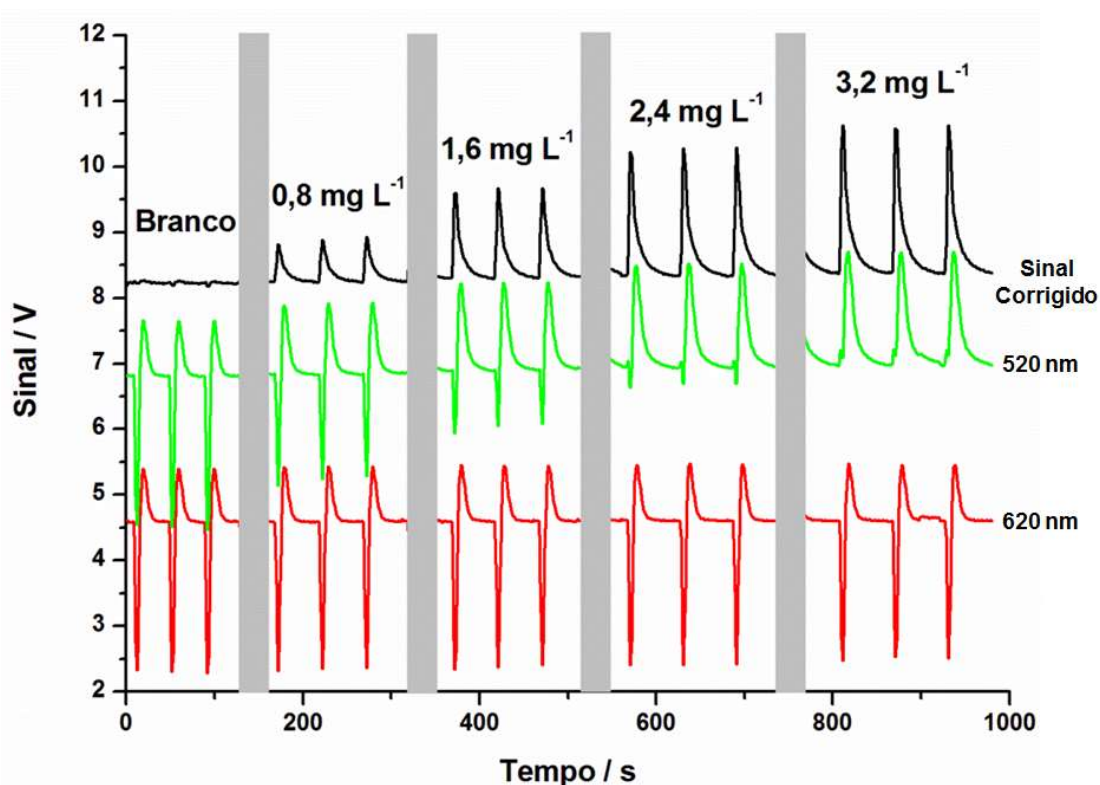


Figura 39. Diagramas, com os sinais para os dois comprimentos de onda e o sinal corrigido, para determinação de cromo, obtidos com os padrões em $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 .

A fim de se avaliar a linearidade da curva para a determinação de cromo com concentrações mais altas de DFC (0,05% m/m) e ácido sulfúrico (0,8 mol L⁻¹), outro diagrama foi obtido, com concentrações de cromo variando de 0,6 a 3,0 mg L⁻¹. Para esta determinação, os padrões foram preparados em água destilada, gerando maior gradiente de concentração no interior do microsistema. O diagrama obtido (curva corrigida) pode ser visto na Figura 40, o qual apresentou boa razão sinal/ruído, proporcionado à curva analítica apresentada na Figura 41 com boa linearidade ($R = 0,998$), com limite de detecção de 0,05 mg L⁻¹. É importante destacar, que esta situação simulou a injeção de amostras nas quais as concentrações de outros solutos, além do analito, são relativamente pequenas e um ajuste de força iônica seria necessário para corrigir o efeito Schlieren. Um exemplo desta situação pode ser ilustrado pela determinação de cromo em águas subterrâneas, como o realizado por Lutfullah e colaboradores, no qual o Cr (III) presente nessas águas foi adsorvido em uma fase sólida modificada à base de cascas de amendoim e determinado por absorção atômica [64].

Sob as condições descritas neste último ensaio, foram realizados testes para avaliar a exatidão do método com o microdispositivo, injetando-se soluções com concentrações conhecidas de Cr (VI) (0,7; 1,4 e 2,8 mg L⁻¹), determinando-se, em seguida, a concentração pelo método proposto com base na curva analítica. A Tabela 3 lista os resultados obtidos para a determinação de cromo nessas três soluções, mostrando uma boa exatidão para o procedimento, uma vez que as recuperações associadas são próximas de 100%, variando entre valores maiores e menores que este, fato que sinaliza a ausência de erros sistemáticos.

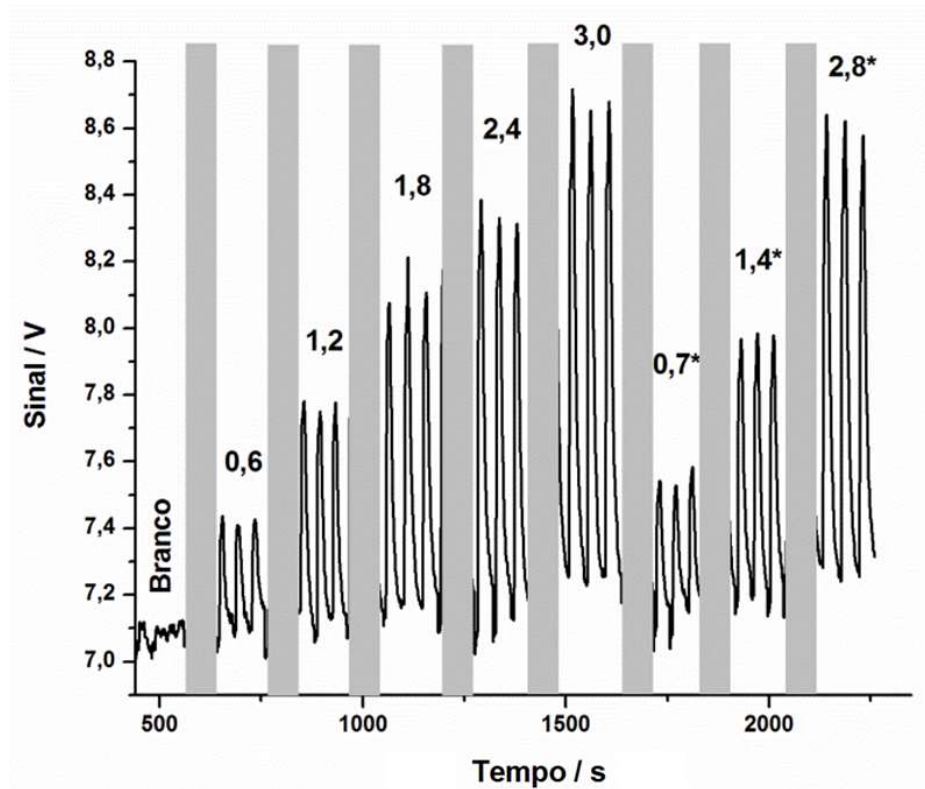


Figura 40. Diagrama (sinal corrigido) para determinação de cromo com os padrões em água destilada, carregador $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 e difenilcarbazida a $0,05\% \text{ m/m}$. Valores indicam a concentração de cromo em mg L^{-1} . O asterisco indica as soluções de concentração conhecida.

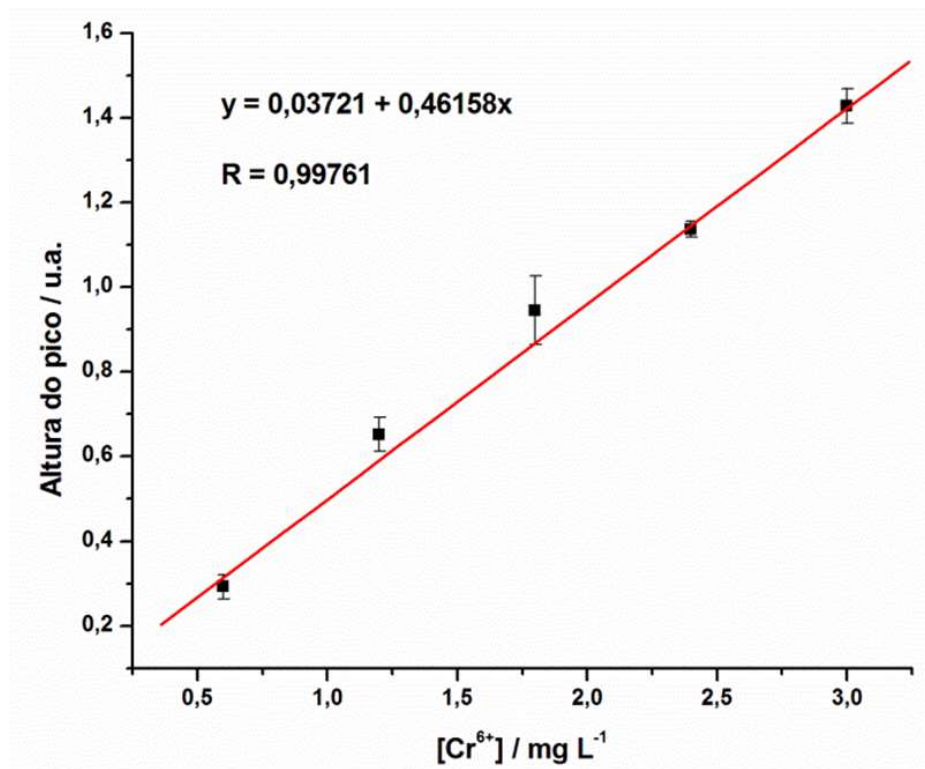


Figura 41. Curva analítica para a determinação de cromo apresentada na Figura 40.

Tabela 3. Resultados obtidos para a determinação de cromo nas três soluções de simulação.

Concentração adicionada (mg L ⁻¹)	Concentração obtida (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
0,70	0,72 ± 0,01	103,4
1,40	1,51 ± 0,06	107,7
2,80	2,77 ± 0,11	99,07

Estes resultados demonstram a viabilidade de utilização dos micro sistemas fluídicos para determinações em que o efeito Schlieren é significativo, indicando a possível realização de procedimentos em linha para a extração e pré-concentração de analitos baseadas em colunas de extração. Nestes procedimentos, as concentrações das soluções para a pré-concentração ou eluição do analito, assim como para as soluções carregadoras, costumam ser significativamente diferentes causando um elevado efeito Schlieren, o qual pode ser corrigido empregando-se a proposta discutida neste trabalho.

4.1.4 Determinação de íons Cu (II)

A fim de avaliar a eficiência de correção do efeito Schlieren em determinações fotométricas utilizando um comprimento de onda diferente dos utilizados até o presente momento, foi realizada a determinação de cobre, a partir da reação colorimétrica com o reagente cuprizona. A cinética desta reação colorimétrica é um pouco mais lenta em comparação as outras reações realizadas neste trabalho. Apesar disso, não houve prejuízo na determinação do analito, uma vez que, em análise em fluxo, não há a necessidade de se alcançar o equilíbrio da reação para realizar as medidas. Estas são feitas em um mesmo momento da reação para cada replicada, e a lentidão da reação pode somente afetar na sensibilidade da determinação [65].

Na Figura 42 é apresentado o diagrama para as concentrações de 3,0 a 12 mg L⁻¹ de Cu (II). É possível observar que a resposta obtida para o efeito Schlieren (linha em azul) teve uma magnitude de cerca de 2,0 V na escala do sinal. Este é um valor consideravelmente alto, o qual pôde ser eficientemente eliminado, por meio da correção utilizando dois comprimentos de onda (linha negra). Além dessa observação, é possível perceber visualmente a melhora da sensibilidade com a correção do efeito Schlieren. A linha em vermelho representa as respostas de absorção do composto colorido somado à resposta

para o efeito Schlieren, a qual apresenta uma variação de sinal menor, em relação à linha negra, com o incremento de concentração de Cu (II).

O ensaio demonstrou que a eficiência da correção deste efeito também é obtida para diferentes comprimentos de onda em diferentes determinações. Na Figura 43 é apresentada a curva analítica para esta determinação, a qual apresentou uma linearidade adequada ($R = 0,999$) na faixa de concentração estudada, bem como um limite de detecção de $1,78 \text{ mg L}^{-1}$.

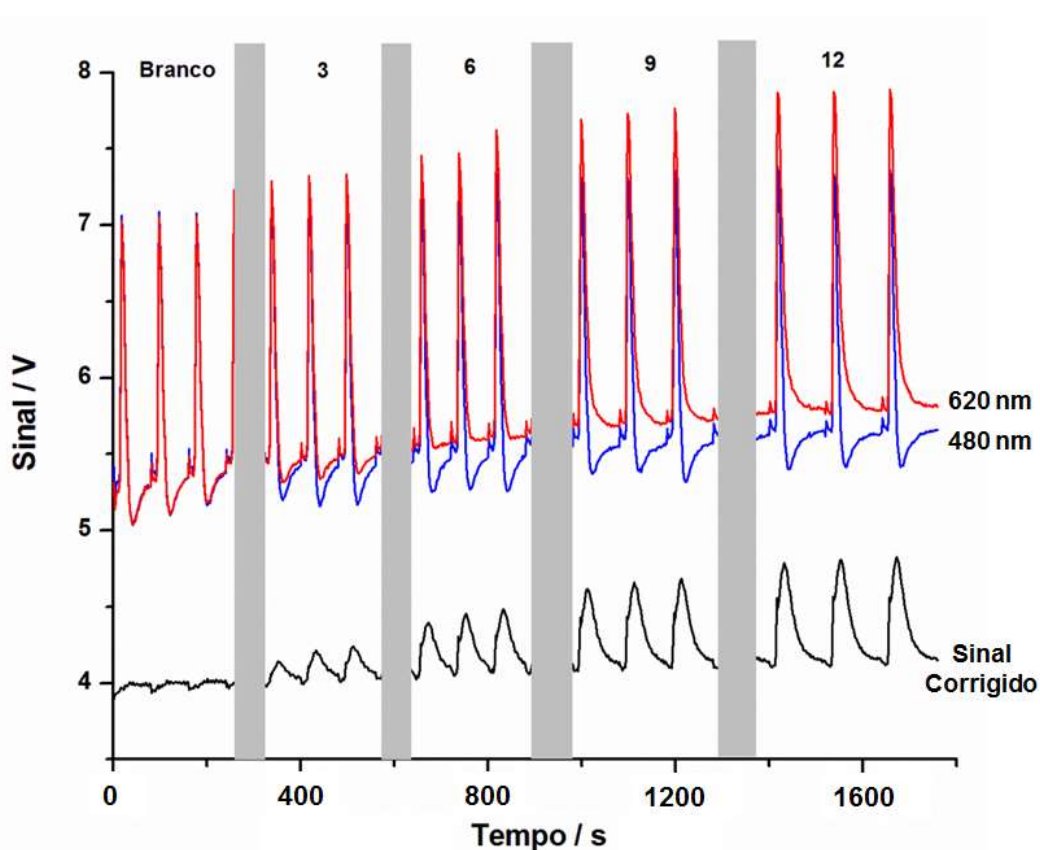


Figura 42. Diagramas (sinais para os dois comprimentos de onda e sinal corrigido) para determinação de Cu (II). Valores indicam a concentração de cobre em mg L^{-1} .

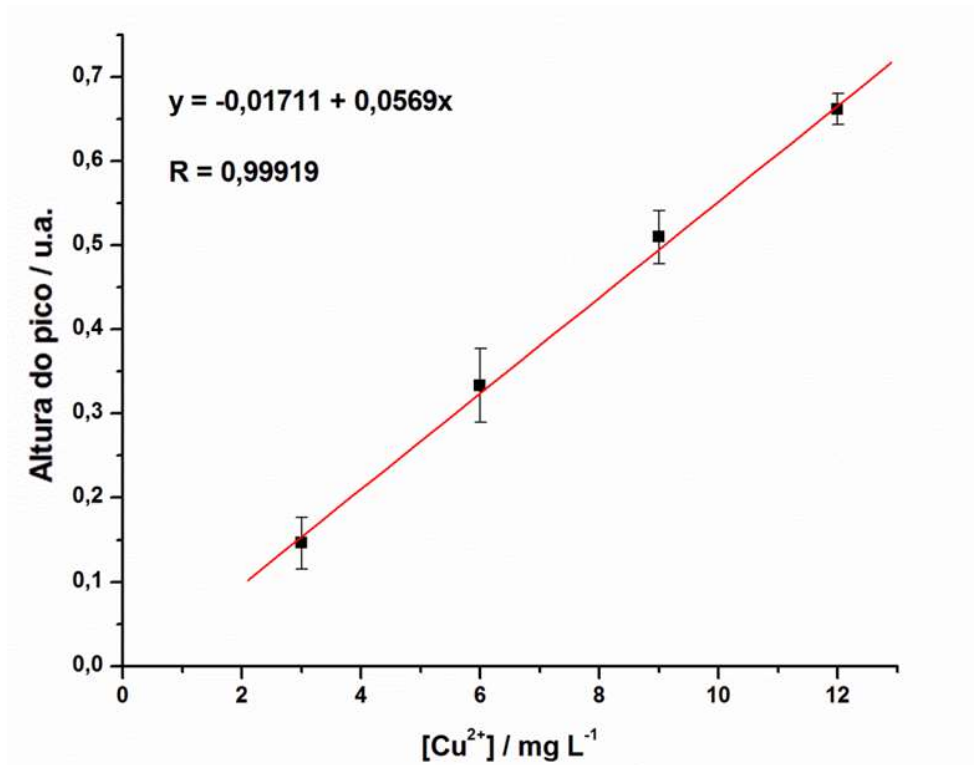


Figura 43. Curva analítica para a determinação de Cu (II).

4.1.5 Determinação de íons Fe (II) em medicamentos

A determinação de ferro em medicamentos de reposição deste mineral (de diferentes marcas, aqui designadas como SG, SC, AG, AC e VC) foi realizada de forma que pudesse ser avaliada a eficiência de correção do efeito Schlieren quando da injeção de amostras reais no sistema. As amostras adquiridas, além de ferro, apresentavam outros compostos em sua composição, como corantes e excipientes, proporcionando uma situação mais real do que as avaliadas anteriormente. Em todas as amostras diluídas para a injeção e também nos padrões, foram adicionadas alíquotas de uma solução concentrada de sacarose, proporcionando a concentração final de 0,05 mol L⁻¹ desta substância nas soluções finais. Este procedimento foi realizado a fim de pudesse ser observado o efeito Schlieren na presença de outra espécie diferente de um eletrólito, a qual também propicia a observação do efeito.

Na Figura 44 é apresentado o diagrama com os sinais em 470 nm (linha azul e absorvido pelo analito), 625 nm (linha vermelha) e o sinal corrigido (linha negra). É possível observar que a correção realizada pela subtração de sinal dos

dois LED aumentou a razão sinal/ruído na determinação, o que pode ser comprovado pela comparação da mudança de sinal que ocorreu entre o branco e o primeiro padrão (1,0 mg L⁻¹) para a linha azul (não corrigida) e a linha negra corrigida.

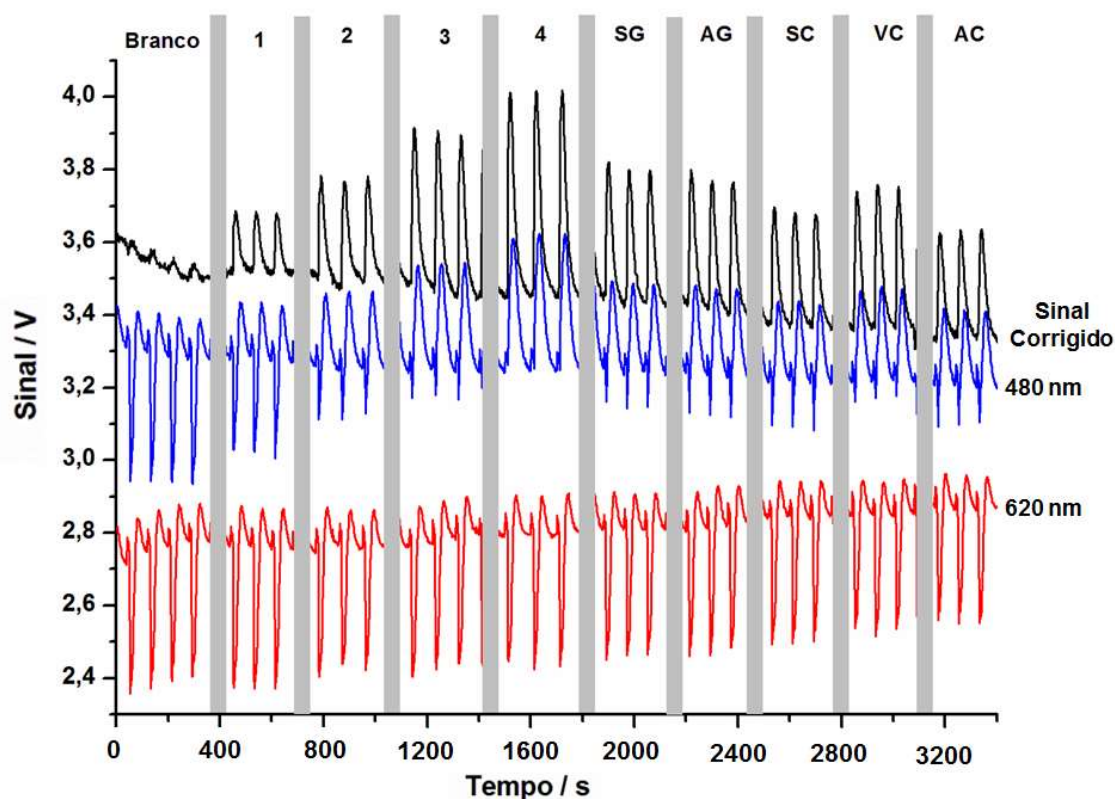


Figura 44. Diagramas (sinais para os dois comprimentos de onda e sinal corrigido) para determinação de ferro com os padrões e amostras (SG, SC, AG, VC e AC) em solução de sacarose. Valores indicam a concentração de ferro em mg L⁻¹.

Na Figura 45 são apresentadas duas curvas analíticas para a determinação de ferro em amostras de medicamentos. A curva analítica com correção (observar a legenda na Figura 45) foi obtida com a altura dos picos do diagrama com correção do efeito Schlieren (linha negra na Figura 44). Enquanto a curva sem correção (observar a legenda na Figura 45) foi obtida através do diagrama em 470 nm, isto é, o diagrama sem correção para o efeito (linha azul na Figura 44). É possível perceber que a correção do efeito Schlieren praticamente dobra a sensibilidade da determinação, sendo esta dada pelo coeficiente angular nas equações obtidas pelas curvas. Adicionalmente, a linearidade da curva com correção do efeito foi um pouco mais elevada em comparação com a curva sem

correção e o intercepto para a curva com correção se aproxima mais do valor “zero” do que a curva sem correção.

Os resultados obtidos indicam que a correção do efeito Schlieren na forma proposta foi bem sucedida, gerando não só uma resposta de mais fácil interpretação como também produzindo uma melhora significativa na sensibilidade da determinação.

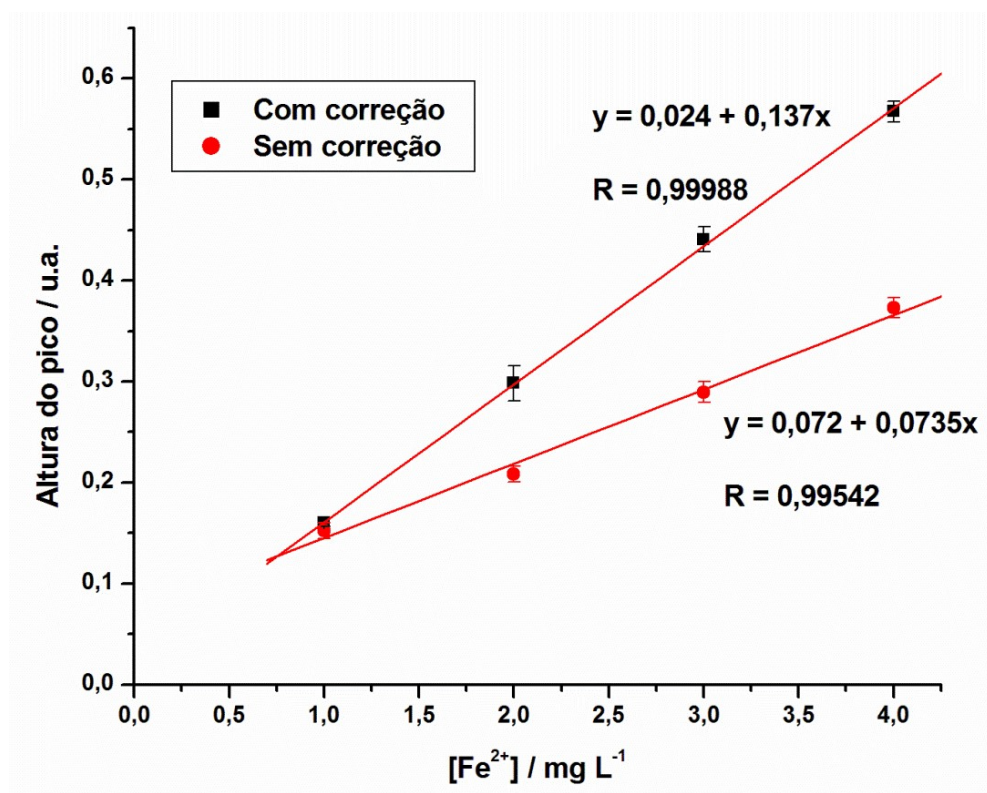


Figura 45. Curvas analíticas para os diagramas sem correção (marcado em vermelho) e para o com correção (marcado em preto) na determinação de ferro. As equações das retas e os coeficientes de correlação são apresentados na imagem.

Além desses resultados apresentados, outro fator que comprova a melhora causada pela correção do efeito Schlieren é a diminuição do limite de detecção quando a eliminação do efeito é realizada, uma vez que para se estimar o limite de detecção, é necessária a quantificação do ruído do branco ($S_{LOD} = S_B + 3DP_B$, onde S_{LOD} é o sinal para o limite de detecção, S_B é a média do sinal do branco e DP_B é o desvio padrão do sinal do branco). Na curva sem correção, o limite de detecção obtido foi de $0,85 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto na curva com correção, este limite foi de $0,30 \text{ mg L}^{-1}$.

Na Tabela 4 são apresentadas concentrações obtidas para as amostras com a utilização do microdispositivo e correção do efeito Schlieren na determinação de Fe (II), bem como as concentrações pela determinação com o método padrão (UV-Vis) e os valores de erro relativo entre as determinações. Os erros relativos apresentados não foram maiores que 6,0%, sendo eles considerados aceitáveis em um método de determinação proposto. Além disso, estes variaram entre valores positivos e negativos, sinalizando a ausência de erros sistemáticos. O teste de correlação entre os dois métodos utilizados foi realizado, no qual é feita uma regressão entre os valores médios de um método em relação aos valores médios do outro método, obtendo-se a curva apresentada na Figura 46.

Tabela 4. Resultados obtidos para a determinação de ferro a partir da curva corrigida.

Amostras	[Fe ²⁺] μFIA	[Fe ²⁺] UV-Vis	Erro relativo (%)
SG	25,95 ± 1,30 *	24,63 ± 0,06 *	5,36
AG	25,39 ± 0,05 *	25,29 ± 0,15 *	0,40
SC	36,27 ± 1,00 **	37,03 ± 0,35 **	-2,07
VC	43,45 ± 1,50 **	46,00 ± 0,22 **	-5,54
AC	55,75 ± 2,78 **	53,67 ± 1,25 **	3,88

*Concentração em mg mL⁻¹

**Concentração em mg comprimido⁻¹

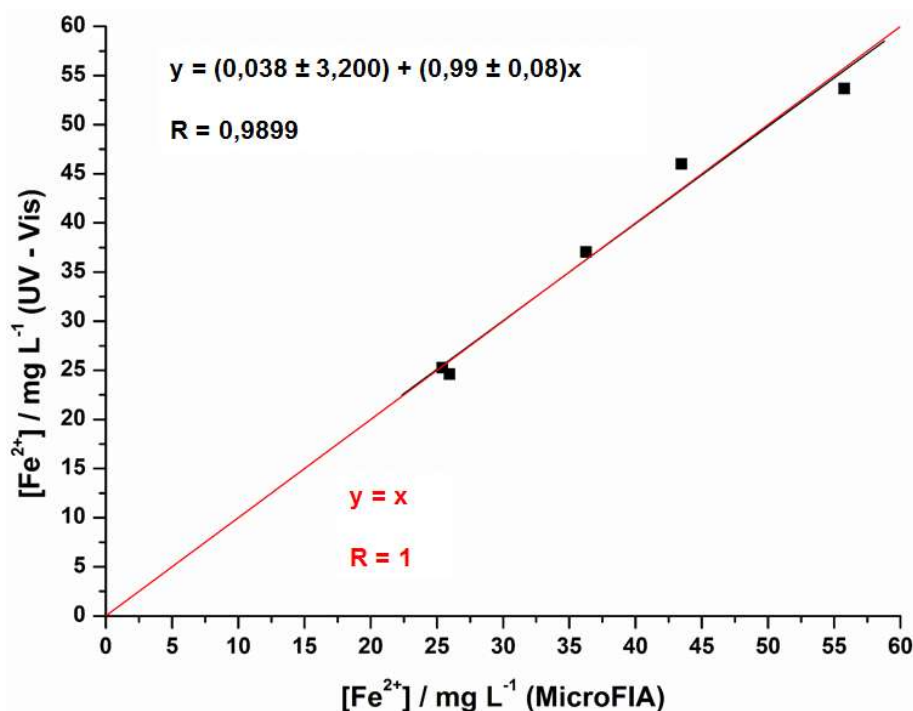


Figura 46. Teste de correlação dos resultados obtidos para a determinação de Fe (II) com o μFIA e o método de referência (Uv-Vis). A reta em vermelho é a reta de referência, onde os valores de y equivalem aos de x (y = x).

O teste de correlação deve apresentar coeficiente linear próximo de zero, coeficiente angular próximo de 1 e valor de R também próximo de 1, para que se conclua que os dados são significativamente semelhantes. Esses parâmetros são apresentados na Figura 46, e, considerando que o coeficiente linear teve um desvio padrão de 3,20 e o coeficiente angular um desvio padrão de 0,08, ambos se enquadram no valor esperado.

É importante destacar que, apesar do resultado do teste estatístico F, os erros relativos das amostras são menores que 6%, considerando que todo o processo analítico é realizado em linha no microssistema. Adicionalmente, a determinação de Fe (II) pelo método de referência (Uv-Vis) foi realizada com padrões e amostras não diluídos em solução de sacarose, uma condição diferente da aplicada para a determinação no microssistema. Mesmo assim, os erros apresentados estão dentro de uma faixa considerada como aceitável.

A Tabela 5 lista os resultados obtidos quando considerado somente o diagrama e a curva analítica para o sinal não corrigido (470 nm). Os erros apresentados alcançam valores de até -11% estando todos abaixo do valor de referência, fato que pode indicar uma tendência, isto é, a presença de erros sistemáticos quando o efeito Schlieren não é eliminado.

Tabela 5. Resultados obtidos para a determinação de ferro a partir da curva para o sinal não corrigido (470 nm).

Amostras	[Fe ²⁺] μFIA	[Fe ²⁺] UV-Vis	Erro relativo (%)
SG	24,19 ± 0,92 *	24,63 ± 0,06 *	-1,79
AG	23,79 ± 0,29 *	25,29 ± 0,15 *	-5,93
SC	33,43 ± 0,90 **	37,03 ± 0,35 **	-9,72
VC	41,12 ± 1,28 **	46,00 ± 0,22 **	-10,62
AC	53,14 ± 0,06 **	53,67 ± 1,25 **	-0,98

*Concentração em mg mL⁻¹

**Concentração em mg comprimido⁻¹

4.1.5.1 Determinação de Ferro (II) a partir de padrões sem sacarose

Outro ensaio realizado no presente estudo consistiu em injetar soluções dos padrões de forma distinta da utilizada para as amostras diluídas. Neste caso, alíquotas das soluções dos padrões foram diluídas em solução de H₂SO₄ com concentração de 0,05 mol L⁻¹, enquanto as alíquotas de amostras brutas foram diluídas em solução de sacarose 0,05 mol L⁻¹. O objetivo deste ensaio foi avaliar

se a correção para o efeito Schlieren seria capaz de corrigir um possível efeito de matriz que não foi previamente corrigido no preparo dos padrões.

Conforme apresentado nas curvas analíticas da Figura 47, as respostas corrigidas para as injeções dos padrões na ausência de sacarose são significativamente diferentes daquelas para os padrões que foram diluídos em sacarose, de forma similar às amostras, o que mostra que a correção proposta não é capaz de eliminar o efeito proporcionado pela alteração no meio. De fato, como mostra a Tabela 6, é possível perceber que, quando a determinação do analito em amostras é realizada em uma matriz muito diferente da matriz dos padrões, os erros relativos obtidos são muito maiores e tendenciosos, pois não variam entre valores positivos e negativos. Isto quer dizer, que a correção do efeito Schlieren, por meio da subtração de sinal de dois LED, não é suficiente para corrigir o efeito de matriz, podendo até mesmo intensificar os valores dos erros, uma vez que a radiação pode interagir de formas distintas com as diferentes soluções, sendo esta interação menor para as amostras, as quais são ricas em outros compostos além do analito.

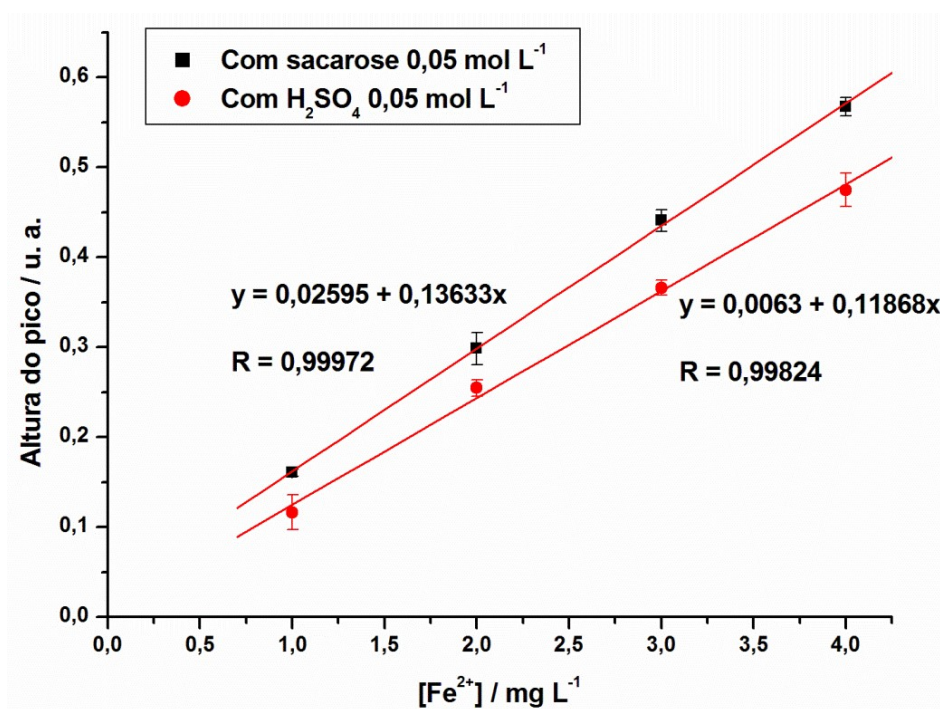


Figura 47. Curvas analíticas para determinação de ferro. A curva marcada em preto teve padrões preparados em sacarose 0,05 mol L⁻¹ e a curva marcada em vermelho teve padrões preparados em H₂SO₄ 0,05 mol L⁻¹.

Apesar disto, este problema é bem contornado, como mostrado anteriormente, quando se utiliza os padrões com a mesma concentração de sacarose das amostras, o que se assemelha a uma adição de padrão para a eliminação de efeitos de matriz.

Tabela 6. Resultados obtidos para determinação de ferro em solução de sacarose 0,05 mol L⁻¹ a partir da curva com padrões em H₂SO₄ 0,05 mol L⁻¹.

Amostras	[Fe ²⁺] μFIA	[Fe ²⁺] UV-Vis	Erro relativo (%)
SG	31,20 ± 1,56 *	24,63 ± 0,06 *	26,7
AG	30,50 ± 0,64 *	25,29 ± 0,15 *	20,6
SC	43,50 ± 11,10 **	37,03 ± 0,35 **	17,5
VC	52,17 ± 1,72 **	46,00 ± 0,22 **	13,4
AC	66,67 ± 3,28 **	53,67 ± 1,25 **	24,2

*Concentração em mg mL⁻¹

**Concentração em mg comprimido⁻¹

4.2 Microssistemas com coluna integrada

4.2.1 Avaliações preliminares

4.2.1.1 Integração de coluna com carvão ativado finamente dividido

Devido à fina granulometria do carvão ativado utilizado, a integração da coluna com este material foi bastante dificultada. Considerando que a largura do reservatório (coluna) previamente gravado na resina (UA) foi de apenas 2,0 mm, parte do fino pó se espalhava sobre a superfície do resiste, não se restringindo apenas à região desejada. Apesar desse problema, a selagem do dispositivo não foi prejudicada, uma vez que o excesso de carvão foi eliminado com auxílio de um algodão embebido em etanol, livrando a superfície a ser selada de material particulado.

O protótipo desenvolvido apresentou um desempenho adequado com relação a entupimentos, o que foi conseguido ao se utilizar pequenas porções de algodão nas extremidades do reservatório, evitando-se o carregamento de material particulado para os canais adjacentes à coluna. Além disso, um fluxo contínuo foi observado ao se bombear água através da coluna, porém, uma investigação mais criteriosa seria necessária para avaliar se caminhos preferenciais não foram criados no interior da fase sólida, minimizando possíveis efeitos de pressão e a área de contato efetiva da solução com o material sólido.

Uma avaliação preliminar do procedimento de extração com a coluna integrada foi realizada bombeando-se uma solução de corante alimentício através da mesma (sem que houvesse diluição) e comparando-se visualmente a cor desta solução antes e depois da extração. Conforme apresentado na Figura 48, foi possível se observar uma pequena diferença de tonalidade das soluções, o que fornece um indício de funcionamento adequado da extração do corante. Entretanto, uma avaliação mais criteriosa poderia ter sido realizada empregando-se a detecção fotométrica no próprio dispositivo, a fim de se mensurar a eficiência de extração, o que não foi realizado, pois o objetivo principal do estudo era o de apenas observar a possibilidade de microfabricação de um microsistema fluídico com coluna empacotada com material finamente dividido.



Figura 48. Diferença entre as colorações da solução de entrada (à esquerda) no microsistema com coluna carvão ativo e da solução de saída (à direita) do mesmo microsistema.

4.2.1.2 Integração de coluna com microesferas (beads) de uma resina não iônica (XAD-4)

A resina Amberlite XAD-4 apresenta-se em microesferas de coloração branca com diâmetros que variam de 250 a 840 μm (60 a 20 *mesh*), sendo estas mais simples de serem integradas aos dispositivos do que o carvão ativo, devido ao maior tamanho de partícula. Estas microesferas foram depositadas no reservatório de forma a não ficarem compactadas, o que permitiria a sua movimentação quando da passagem de um fluido através da coluna (coluna fluidizada). Entretanto, foi observado que o material sólido adere fortemente às paredes do reservatório, mesmo após a selagem do dispositivo, não fornecendo uma coluna fluidizada, mas sim uma coluna com o material sólido estático. Para contornar este problema, seriam necessárias estratégias para se recobrir as paredes do reservatório microfluídico previamente à selagem, com um filme de

PVC, por exemplo, de forma a eliminar a aderência do material sólido com as paredes da coluna.

Apesar desta constatação, ensaios preliminares envolvendo a passagem de uma solução de corante alimentício através da coluna foram realizados a fim de se observar alguma resposta visual com relação ao funcionamento da extração. Neste caso, não foi observada uma descoloração significativa da solução de corante, porém, as microesferas apresentaram superfícies levemente avermelhadas (cor do corante), indicando uma pequena extração da substância colorida.

É importante enfatizar que estes ensaios visaram apenas observar a possibilidade de integração das colunas extratoras. Apesar disso, foi possível constatar com os testes realizados nesses microssistemas protótipos que a quantidade de material extrator bem como sua área de contato e também sua mobilidade no interior do dispositivo microfluídico apresentam grande importância para uma extração efetiva. Estes fatores tornam a integração da coluna extratora uma ação mais desafiadora, porque os microssistemas limitam o tamanho da coluna de extração, sua área de contato e mobilidade do material utilizado.

4.2.2 Microssistema com coluna Dowex 1X8

A deposição das microesferas de resina Dowex 1X8 foi realizada manualmente, de forma que a movimentação destas pudesse ocorrer com o contínuo bombeamento de líquidos para o interior da coluna. De fato, diferentemente do ocorrido para o microdispositivo com coluna Amberlite XAD-4, as microesferas de resina Dowex 1X8 não se aderiram tão fortemente às paredes da coluna do microssistema, possibilitando sua movimentação (coluna fluidizada). A literatura evidencia que a movimentação da fase sólida no interior da coluna favorece a sua ação extratora, por evitar caminhos preferenciais, disponibilizando mais sítios de extração [56].

Inicialmente, a fabricação dos microssistemas com coluna de troca iônica Dowex 1X8 foi realizada sem a introdução de uma pequena porção de esponja de poliuretano em uma das extremidades da coluna. Neste caso, para se evitar a saída das partículas, os canais adjacentes ao reservatório foram projetados e

fotolitografados de forma a apresentarem dimensões menores que o tamanho médio das partículas (225 μm de diâmetro) e também menores que os demais canais do microsistema. Assim, o canal indicado pela letra A na Figura 49 apresentou um perfil em “V” (mostrado no detalhe da Figura 49A) com profundidade de 640 μm e largura máxima de 215 μm , enquanto o canal indicado pela letra B apresentava o mesmo perfil com profundidade de 1000 μm e largura máxima de 470 μm (mostrado no detalhe da Figura 49B).

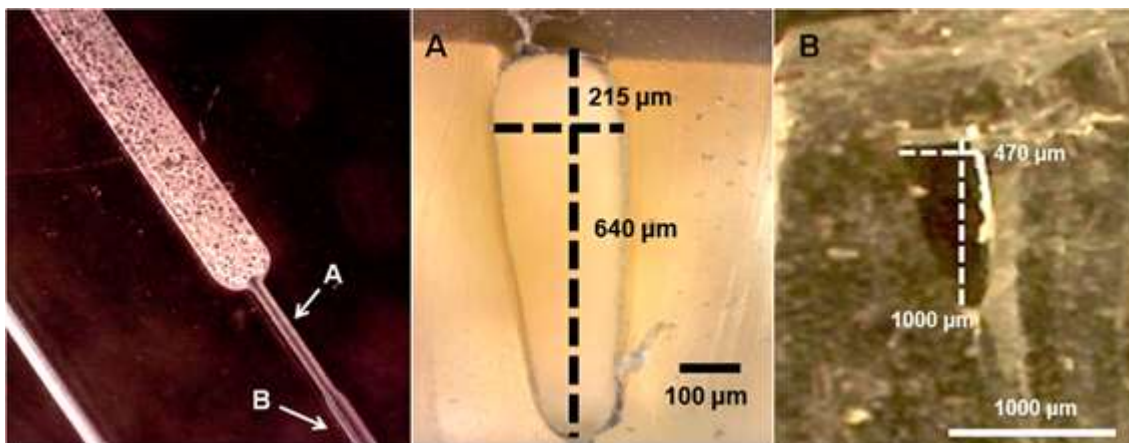


Figura 49. Micrografia da coluna com a resina Dowex 1X8 previamente à selagem do dispositivo (esquerda). Em A, seção transversal do canal adjacente à coluna (indicado em A na imagem da coluna). Em B, seção transversal do canal seguinte ao canal adjacente à coluna (indicado em B na imagem da coluna).

Conforme apresentado na micrografia óptica na Figura 50, obtida para uma das extremidades da coluna empacotada previamente à selagem, a maioria das partículas possuía realmente um tamanho maior que a maior largura do canal adjacente (topo do canal em “V”), o que impediria a passagem das partículas. Além disso, deve-se ressaltar que a imagem foi obtida para as partículas não hidratadas, devendo-se considerar que o aumento de diâmetro das mesmas pode ser significativo devido ao inchaço comum do polímero quando do bombeamento de soluções através da coluna, diminuindo o risco de saída de partículas do reservatório.

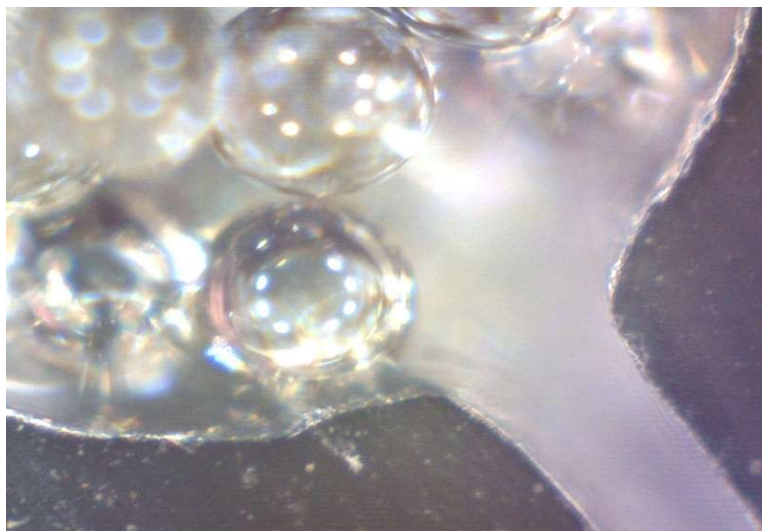


Figura 50. Micrografia óptica da extremidade da coluna previamente à selagem do microdispositivo.

Com relação a um possível entupimento dos canais adjacentes pelas partículas, observou-se que o perfil em “V” dos canais impede um acoplamento perfeito das partículas esféricas, de modo que se uma partícula menor se prender na parte superior do canal, ainda assim haveria uma passagem estreita pela base do mesmo, permitindo o fluxo de solução.

De fato, testes realizados ao se bombear água através da coluna não indicaram entupimento ou vazamentos na estrutura desenvolvida e as partículas permaneceram empacotadas no reservatório. Entretanto, para a retirada de bolhas de ar que costumam ficar retidas na coluna, principalmente nos usos iniciais, era necessária a aplicação de leves golpes na região do reservatório, os quais deformavam momentaneamente os canais adjacentes permitindo a passagem das esferas para outras regiões do microdispositivo, como a célula de detecção fotométrica, tornando inviável o seu uso. É importante relatar que o substrato utilizado na fabricação é um elastômero e, portanto, bastante flexível aos golpes, o que contribuiu para este resultado negativo.

Para contornar este problema, uma pequena porção de esponja de poliuretano foi adaptada na saída da coluna conforme mostra a micrografia óptica na Figura 51. Testes demonstraram que a presença da esponja não prejudicou a fluidez das soluções no interior do microsistema, não causando um aumento atípico da pressão hidrodinâmica ou entupimento da estrutura. Testes

com vazões maiores que $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ foram realizados sem se constatar o deslocamento das microesferas para fora da coluna de troca iônica, demonstrando um bom desempenho para a estratégia proposta. Adicionalmente, o material se mostrou resistente ao uso de soluções concentradas em ácido ($\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$), indicando a possibilidade de uso para aplicações em extrações baseadas em trocas iônicas, nas quais altas concentrações de ácidos são quase sempre indispensáveis.



Figura 51. Micrografia óptica da extremidade da coluna na qual foi inserida uma porção de esponja de poliuretano.

A fotografia apresentada na Figura 52 mostra o dispositivo selado com a coluna empacotada, com as agulhas de acesso para as soluções e com as fibras ópticas adaptadas para a detecção fotométrica. Conforme indicado, o dispositivo apresenta além da coluna para a resina Dowex 1X8 (CD), um arranjo de canais em cruz para a comutação das soluções de trabalho (indicado pela seta), uma bobina de reação (BR) com cerca de 22 cm de comprimento, um canal para eventual amostragem hidrodinâmica (CH), um canal para confluência de solução de reagente colorimétrico (CR) e uma célula de detecção fotométrica (CF) com caminho óptico de 5,00 mm.

Baseado nas dimensões dos canais fotolitografados, determinadas por micrografia óptica, estimou-se o volume de diferentes regiões deste microssistema, as quais são listadas na Tabela 7. Como pode ser observado, os volumes são bastante reduzidos, sendo o volume total do dispositivo de apenas

80 μL . Diversos dispositivos com esta mesma configuração foram construídos para os ensaios quantitativos descritos nas próximas seções.

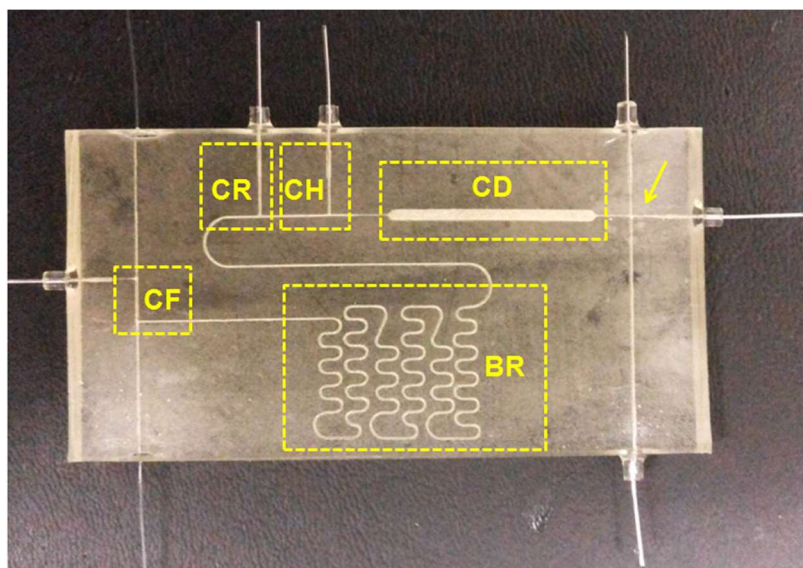


Figura 52. Fotografia do dispositivo microfluídico com coluna de troca aniônica Dowex 1X8. (CD: Coluna Dowex; BR: Bobina reacional; CF: Célula de fluxo; CR: Confluência do reagente; CH: Canal de amostragem hidrodinâmica; Seta: Canais em cruz para comutação das soluções de trabalho).

Tabela 7. Tamanhos dos segmentos do microdispositivo com coluna Dowex 1X8, seus respectivos volumes e volume total do dispositivo.

Segmento	Tamanho (mm)	Diâmetro do canal (μm)	Volume (μL)
CD	25	2000	50,0
BR	215	360	22,0
CF	5	270	0,30
CH	10	360	1,02
CR	10	360	1,02
Dispositivo completo	350	-	80,0*

*Desconsiderando o volume ocupado pelas microesferas da resina Dowex 1X8.

Segundo os fabricantes da resina Dowex 1X8 [66], a sua capacidade de troca é de $1,7 \text{ meq g}^{-1}$. Considerando que a massa de resina inserida na coluna do microssistema foi de 35 mg, a capacidade de troca de nitrito desta é de cerca de 28 mg. Isto significa que, dentro da faixa de trabalho deste estudo, a coluna Dowex 1X8 não atingiu saturação de íons nitrito, fato que poderia prejudicar extrações posteriores.

4.3 Avaliação da coluna de troca iônica integrada

Inicialmente, havia o intuito de utilizar microssistemas com coluna Dowex 1X8 para pré-concentrar íons metálicos e posteriormente detectá-los por fotometria molecular como forma de provar o conceito de SPE em sistemas microfluídicos de UA. Como os íons metálicos apresentam carga positiva e a coluna é de troca aniônica, costuma-se proceder com a complexação destes íons com ligantes negativos, como o cloreto (Cl^-), formando espécies também negativas que são facilmente retidas na coluna. Um exemplo de uso desta estratégia é descrita por Ribeiro e colaboradores [56], os quais utilizaram a resina Dowex 1X8 na forma clorada para separação de zinco em amostras de plantas, como já citado. Para tanto, o zinco livre foi derivatizado, formando-se a espécie $[\text{ZnCl}_4]^{2-}$ para propiciar a interação com os grupos trocadores da resina.

Baseado neste trabalho, os estudos iniciais foram direcionados para se pré-concentrar íons Zinco (II) na forma de clorocomplexo na resina, utilizando-se para isto a percolação de soluções de Zn (II) em HCl 2,0 mol L^{-1} , seguida da eluição com solução de NaOH com 0,1 mol L^{-1} e reação por confluência com o reagente colorimétrico Zincon (Aldrich), o qual forma um complexo com íon metálico que absorve fortemente em 625 nm. Embora esta estratégia já tenha sido aplicada com sucesso em um sistema de análise em fluxo convencional, a sua adaptação para o dispositivo microfluídico não foi levada adiante devido ao comportamento espectral peculiar observado para o complexo de Zn/Zincon. Como pode ser observado no espectro da Figura 53, para as concentrações de 2,0 mg L^{-1} (linha preta) e 1,0 mg L^{-1} (linha vermelha) de zinco, há um aumento proporcional da absorbância em 625 nm com o aumento da concentração do íon metálico acompanhado de um decréscimo do sinal em comprimentos de onda menores que 470 nm, o que levaria a uma correção ineficiente do efeito Schlieren, pois tanto a resposta no comprimento de onda de absorção do complexo (625 nm), quanto o comprimento de onda para correção do efeito (470 nm) responderiam ao efeito Schlieren e ao aumento da concentração do analito, impossibilitando a correção do efeito com dois comprimentos de onda.

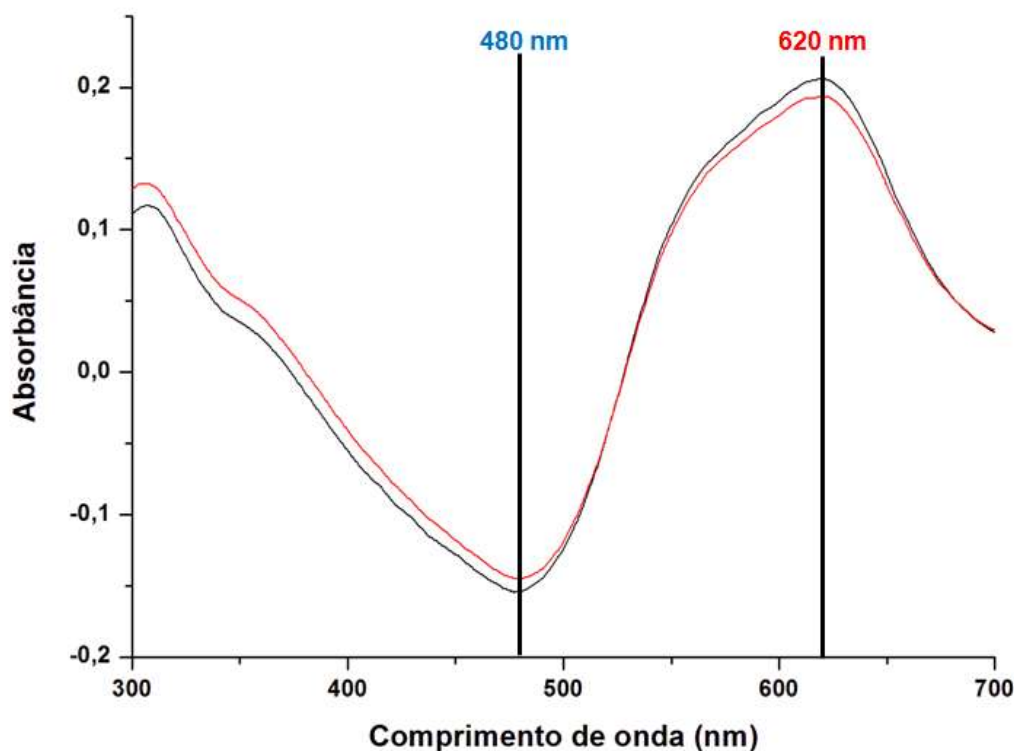


Figura 53. Espectro de absorção do complexo Zinco/Zincon. A linha vermelha é referente à concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ do analito e a linha preta é referente à $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ do analito.

Uma segunda possibilidade brevemente avaliada foi a de proceder com a pré-concentração de íons Cu (II) , também na forma de cloro-complexos formados em um meio com alta concentração de HCl , seguida da eluição com solução mais diluída do ácido ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e detecção fotométrica baseada no complexo do analito com amônia [67] ou cuprizona [68]. Para este caso, o procedimento com o micro-sistema foi dificultado pela grande diferença de pH existente entre a solução de eluição ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 1,0) e a solução do reagente cromogênico (tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8). Foi observado que, embora os íons cobre pudessem ser pré-concentrados na coluna e posteriormente eluídos, nenhum sinal analítico era observado mesmo para concentrações relativamente grandes do analito (40 mg L^{-1}), o que possivelmente foi causado pela ineficiência do tampão em manter o meio levemente básico quando da mistura com igual volume de ácido clorídrico da eluição. De fato, mesmo concentrando-se mais o tampão não foi possível observar a resposta em absorbância para o sistema, levando-se a acreditar que o aumento das concentrações também dificultava a mistura e complexação dos íons do analito, impossibilitando a detecção fotométrica.

Neste ponto, deve-se salientar que a determinação de analitos metálicos por fotometria molecular, após o procedimento de extração/pré-concentração em fase sólida não é costumeiramente utilizado, possivelmente devido às dificuldades relatadas nos parágrafos acima. A literatura mostra que a detecção é mais comum através de métodos de espectroscopia atômica que, em muitos casos, pode tolerar maiores concentrações de ácidos [69] e também devido a vantagens como melhores limites de detecção e melhores sensibilidades.

Considerando mais uma vez que o projeto visava provar o conceito de realização de SPE em um microsistema fluídico e que a detecção fotométrica deveria ser utilizada para avaliação dos procedimentos, uma vez que a integração/acoplamento de outras formas de detecção ao dispositivo se constitui em um outro desafio a ser superado em microsistemas de análise, propôs-se a avaliação dos dispositivos para a extração e pré-concentração de íons nitrito em águas acompanhada da sua detecção fotométrica com o método de Griess on-line [27], a qual será discutida na próxima seção.

4.4 Pré-concentração de nitrito utilizando microsistema com coluna integrada de resina Dowex 1X8

Os primeiros testes de pré-concentração de nitrito com o microsistema de coluna Dowex 1X8 foram realizados com a configuração de fluxo apresentada na Figura 31 em que um segmento de amostra (*plug*) era injetado empregando-se o procedimento de injeção hidrodinâmica, no qual a amostra ou padrão era aspirado através da coluna permitindo a extração do analito. A fim de possibilitar a pré-concentração da espécie, o tempo de amostragem poderia ser alterado pelo programa de controle, permitindo a avaliação da extração/pré-concentração para diferentes volumes de amostra, favorecendo o contato de mais espécies com a resina, elevando o nível de pré-concentração.

Utilizando esta configuração de fluxo, realizaram-se alguns ensaios nos quais uma solução aquosa de NO_2^- com concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ era percolada pela coluna à uma vazão de $0,20 \text{ mL min}^{-1}$, durante 90 s, sendo o analito eluído, posteriormente, com a própria solução carregadora ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e confluído com a solução do reagente cromogênico (NED/SAM) antes da

detecção fotométrica. Infelizmente, nestes estudos não foi possível avaliar se o sistema de extração estava efetivamente funcionando, pois a aspiração dos padrões através da coluna levava à formação contínua de bolhas no sistema que dificultaram grandemente a reação e a detecção colorimétrica no interior do dispositivo inviabilizando o procedimento.

Para contornar este problema, foi necessário mudar a configuração de fluxo, tornando o sistema multicomutado como foi apresentado na Figura 32. Nesse sistema, a amostra não é aspirada através da coluna, e sim impelida através dela, minimizando os efeitos de pressão negativa no interior do microsistema e a conseqüente formação de bolhas. Com essa montagem, foi então possível obter as primeiras respostas analíticas empregando-se a SPE online seguida da detecção fotométrica.

A Figura 54 mostra o fiograma obtido para injeções de solução de nitrito com concentrações de 10,0 ou 2,0 mg L⁻¹, utilizando-se diferentes vazões para a solução da amostra (variação do volume percolado pela coluna e do tempo de interação entre analito e coluna). A primeira solução de NO₂⁻ injetada foi a de 10 mg L⁻¹, pelo tempo de 400 segundos, a uma vazão de 0,20 mL min⁻¹. O sinal obtido, com a devida correção do efeito Schlieren é dado no pico A da curva de linha negra da Figura 54. Em seguida, injetou-se a solução de 2,0 mg L⁻¹ de NO₂⁻ com o mesmo tempo de amostragem e mesma vazão que o teste anterior. O sinal obtido foi bem menor (pico B na Figura 54), o que já era esperado devido à mudança somente da concentração.

No teste seguinte, utilizou-se a injeção com a mesma concentração (2,0 mg L⁻¹), alterando-se apenas a vazão para 1,15 mL min⁻¹ (cerca de cinco vezes maior) durante a amostragem, retornando a vazão de 0,20 mL min⁻¹ durante as medidas. O sinal obtido (pico C na Figura 54) respondeu ao aumento da vazão, confirmando o fato de que um maior volume de amostra que percola pela coluna no mesmo tempo de injeção proporciona uma maior pré-concentração. De fato, foi observado que o aumento de vazão propiciou um aumento de aproximadamente 3 vezes no sinal analítico em relação ao pico obtido com a menor vazão.

Estes resultados indicaram que haveria a possibilidade de se proceder com a pré-concentração de íons nitrito no microssistema empregando-se a coluna de troca iônica e realizar a detecção fotométrica em um único procedimento em linha e miniaturizado. Com isto, novos estudos foram realizados com o intuito de se determinar concentrações mais baixas de nitrito permitindo que o sistema fosse aplicado a determinações de interesse ambiental.

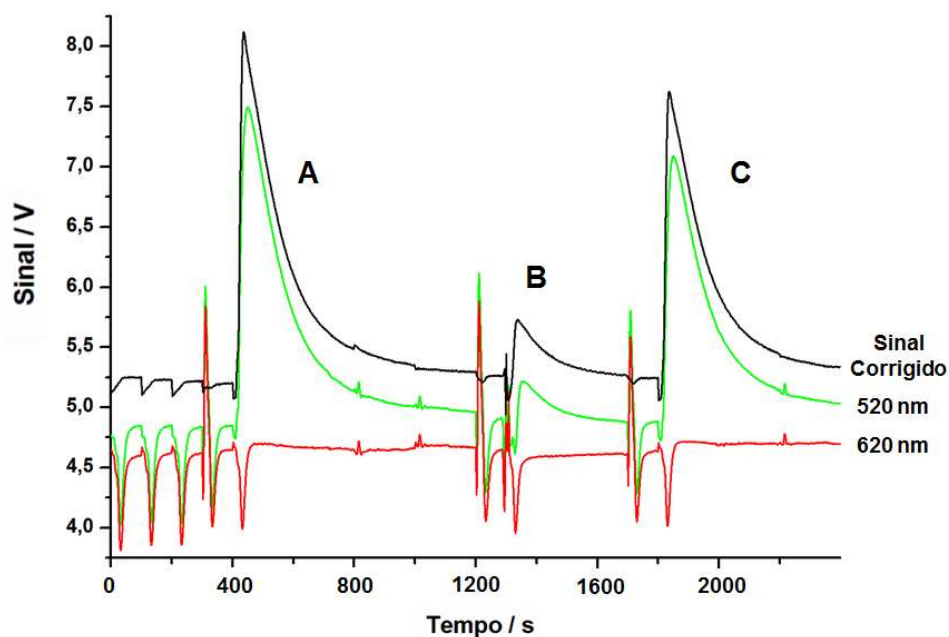


Figura 54. Diagrama com sinais transientes para a injeção de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito a uma vazão de $0,20 \text{ mL min}^{-1}$ (A), injeção de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito a uma vazão de $0,20 \text{ mL min}^{-1}$ (B) e injeção de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito a uma vazão de $1,15 \text{ mL min}^{-1}$ (C). O tempo de injeção da solução de nitrito para todos os picos foi de 400 segundos.

Utilizando-se os procedimentos descritos na seção 3.7, inclusive com as vazões ali definidas, realizou-se a construção de um diagrama para a faixa de concentração de $0,2$ a $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ do analito, o qual é apresentado na Figura 55. Observa-se que a linha de base apresentou um *drift* considerável e que a razão sinal/ruído, principalmente para os sinais não corrigidos (linhas em verde e vermelho), foi relativamente baixa. Estas observações podem estar relacionadas ao uso contínuo do microssistema por várias semanas, em níveis altos de concentração do analito, que levaram ao acúmulo de material colorido na região da célula para detecção fotométrica e à presença de bolhas na célula de fluxo.

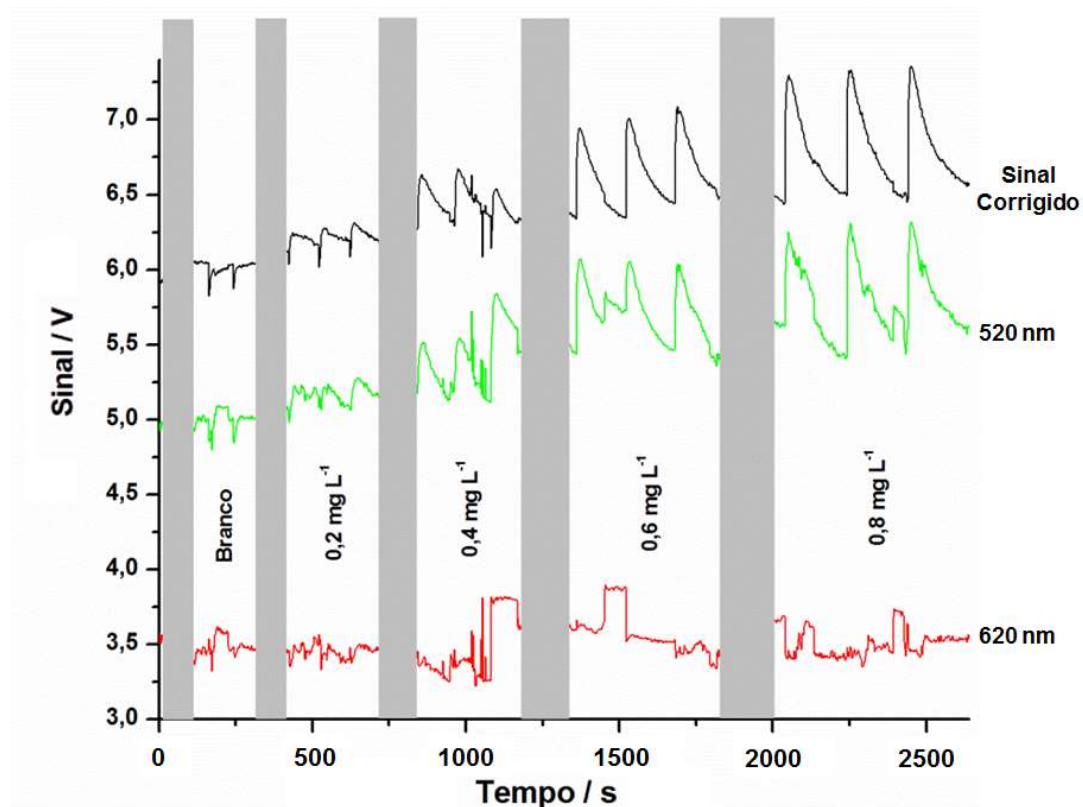


Figura 55. Diagramas (sinais para os dois comprimentos de onda e sinal corrigido) para determinação de nitrito com o microsistema com coluna integrada de troca aniônica Dowex 1X8, com concentrações de NED/SAM de 0,5 e 0,2 g L⁻¹, respectivamente.

Apesar disso, a curva analítica (Figura 56) para o sinal corrigido apresentou boa linearidade ($R = 0,993$), mostrando a possibilidade de uso para concentrações menores do analito. Deve-se observar também que o tempo de injeção utilizado para a construção desta curva diferiu daquele utilizado para o pico C da Figura 54. De fato, empregou-se metade do tempo de injeção (200 s) com o objetivo de tornar o processo mais rápido, contribuindo para o aumento da frequência analítica.

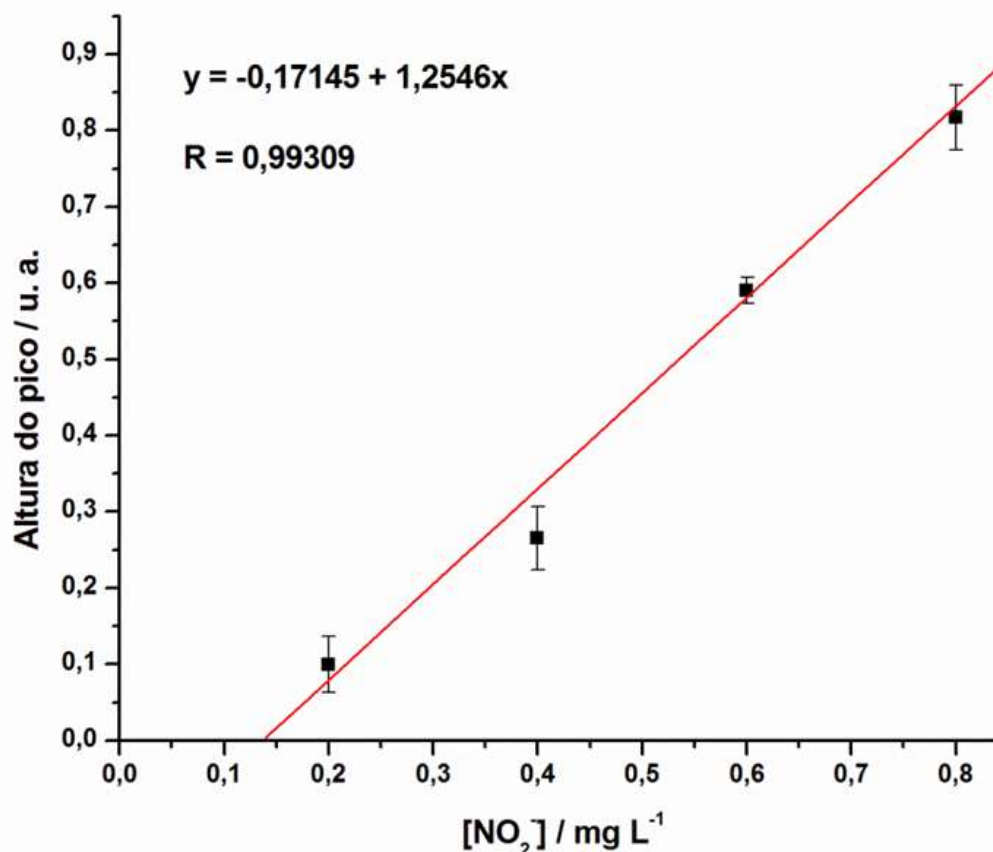


Figura 56. Curva analítica para a determinação de nitrito na faixa de 0,20 a 0,80 mg L⁻¹, utilizando o microdispositivo com coluna Dowex 1X8 integrada e concentrações de NED/SAM de 0,5 e 0,2 g L⁻¹, respectivamente.

Após este estudo, pensou-se em formas de tornar a determinação mais sensível sem aumentar demasiadamente o tempo ou a vazão de injeção, de modo a continuar com um consumo relativamente baixo de amostra e com uma frequência analítica razoável. Assim, propôs-se o aumento da concentração do reagente cromogênico (NED/SAM) de forma a aumentar a velocidade de reação com o analito e obter um sinal mais próximo da condição de equilíbrio no detector fotométrico. Com isto as concentrações de NED e SAM foram aumentadas de 0,5 g L⁻¹ para 1,0 g L⁻¹ e de 0,2 g L⁻¹ para 7,0 g L⁻¹, respectivamente, e as medidas realizadas a partir do procedimento descrito na seção 3.7. Deve-se destacar que embora o aumento das concentrações de reagentes pudesse aumentar o efeito Schlieren, a correção proposta com os dois comprimentos de onda deveria ser suficiente para minimizá-lo.

Utilizando os reagentes mais concentrados e também um microsistema recém-construído foi possível se obter os fiagramas apresentados na Figura 57 (com detalhe do fiagrama corrigido na Figura 58) para concentrações mais baixas de nitrito ($0,05$ a $0,20$ mg L^{-1}). Como pode ser observado, a linha de base ainda apresentou um *drift* considerável, mas as razões sinal/ruído aumentaram em relação ao estudo anterior, o que permitiu a detecção com maior sensibilidade.

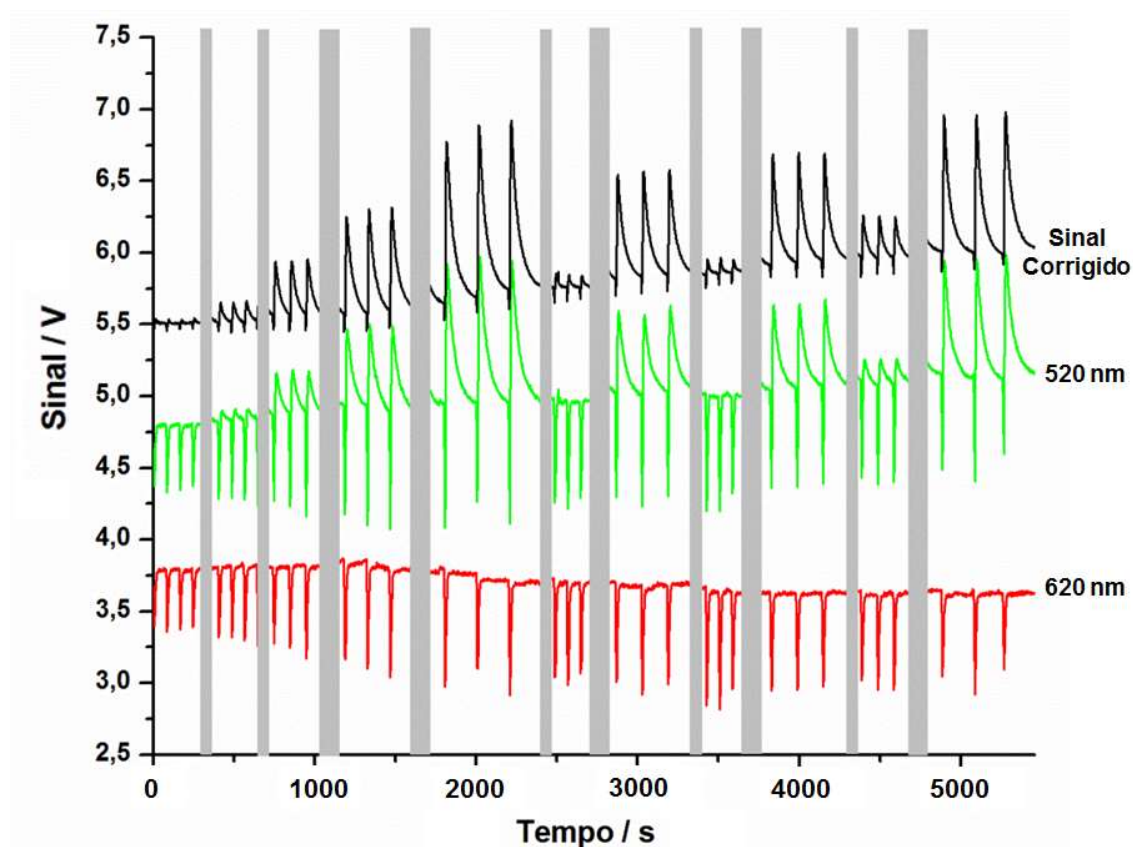


Figura 57. Fiagramas (sinais para os dois comprimentos de onda e sinal corrigido) para determinação de nitrito com o microsistema com coluna integrada de troca aniônica Dowex 1X8, com concentrações de NED/SAM de $1,0$ e $7,0$ g L^{-1} , respectivamente.

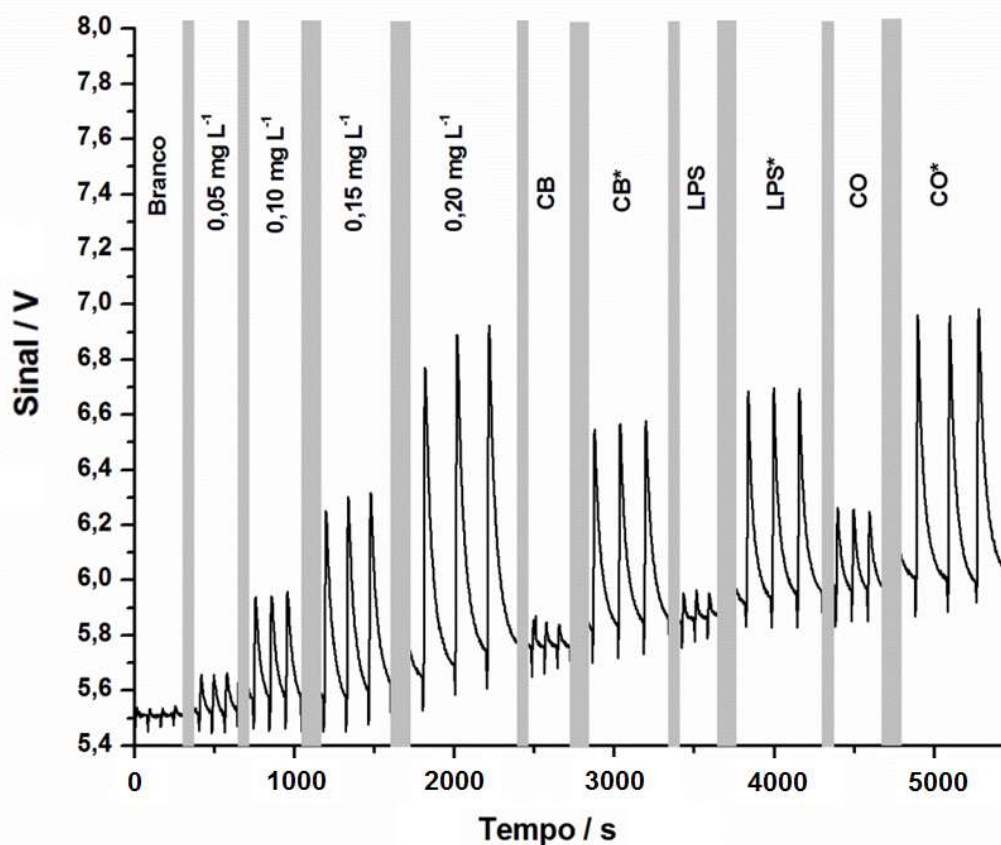


Figura 58. Diagrama (sinal corrigido) para determinação de nitrito em águas naturais com o microsistema com coluna Dowex 1X8 integrada, com concentrações de NED/SAM de 1,0 e 7,0 g L⁻¹, respectivamente. (CB: Córrego Bananal; LPS: Lago Paranoá – Próximo à Estação de Tratamento de Águas Sul e CO: Centro Olímpico da UnB). O asterisco indica os sinais para as amostras fortificadas.

A curva analítica para esta determinação, dada na Figura 59, apresentou uma boa linearidade ($R = 0,994$) sendo estimado um limite de detecção de 0,04 mg L⁻¹ (0,01 mg L⁻¹ N), o qual está bem abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira [70] para a concentração do íon em águas naturais (1,0 mg L⁻¹ N). Deve-se relatar, entretanto, que o ponto da curva referente ao último padrão de nitrito (0,20 mg L⁻¹) ficou relativamente afastado do ajuste da curva. Isto pode ter ocorrido devido a vários fatores como efeito de memória, desvios na lei de Beer [37], entrada de microbolhas na célula de fluxo que aumentam a absorvância ou até mesmo o preparo equivocado da solução. É importante observar também que a variação das medidas, identificada pela barra de erro deste último ponto, foi maior, fato que pode corroborar com estes prováveis fatores, os quais prejudicaram o ajuste do último ponto da curva. Apesar do grande desvio apresentado pelo último ponto, percebe-se que não houve uma

tendência da regressão linear acompanhar o ponto mais distante, mantendo o melhor ajuste possível, com boa linearidade. De fato, a curva analítica construída excluindo-se o último ponto apresenta a equação $y = -0,154 + 5,313x$ com R de 0,997, confirmando uma influência pouco significativa do referido ponto no ajuste linear da curva analítica.

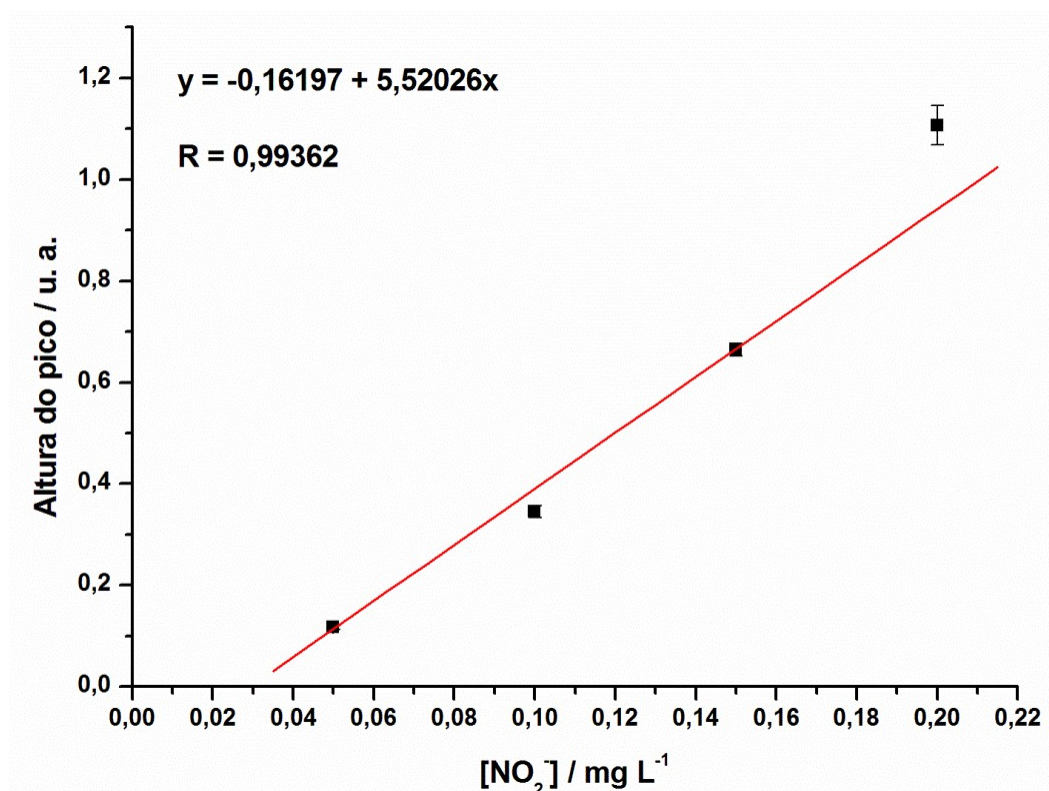


Figura 59. Curva analítica para a determinação de nitrito em amostras de águas naturais após a pré-concentração do analito na coluna de troca iônica Dowex 1X8, com concentrações de NED/SAM de 1,0 e 7,0 g L⁻¹, respectivamente.

A precisão das medidas para quatro injeções do padrão de 0,10 mg L⁻¹ foi estimada em 5,36%, a qual pode ser considerada aceitável para o nível de concentração medido e devido ao fato de todo o procedimento, da extração até a detecção ter sido realizado em linha em um procedimento miniaturizado.

A exatidão do procedimento foi avaliada por testes de recuperação realizados com três amostras de águas naturais – Córrego do Bananal (CB), Lago Paranoá Estação de Tratamento de Águas Sul (LPS) e Centro Olímpico da UnB (CO) – cujos resultados são apresentados no diagrama da Figura 59 e na Tabela 8. Observa-se que as recuperações médias se mantiveram entre os níveis de 95,8 a 100,8 %, mostrando um desempenho adequado do dispositivo

se considerado que as amostras foram fortificadas em um nível de concentração razoavelmente baixo ($0,12 \text{ mg L}^{-1}$).

Tabela 8. Recuperações médias para amostras de águas naturais fortificadas com $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito.

Amostra	$[\text{NO}_2^-] / (\text{mg L}^{-1})$ Não fortificadas	$[\text{NO}_2^-] / (\text{mg L}^{-1})$ Fortificadas	$[\text{NO}_2^-] / (\text{mg L}^{-1})$ Diferença	Recuperação (%)
CB	$0,041 \pm 0,006$	$0,156 \pm 0,001$	0,115	95,8
LPS	$0,042 \pm 0,032$	$0,160 \pm 0,002$	0,118	98,3
CO	$0,078 \pm 0,021$	$0,199 \pm 0,002$	0,121	100,8

Considerando que as amostras foram injetadas no dispositivo logo após a injeção dos padrões, pode-se afirmar que o efeito de memória foi bastante reduzido ou inexistente, uma vez que os valores de recuperação obtidos nos ensaios se aproximaram muito de 100%.

Para a estimativa do fator de pré-concentração, sucessivas injeções do padrão com $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito foram realizadas e somente o eluído, sem reagir com a solução de Griess, era recolhido na saída do sistema. Após recolher 2,0 mL da solução eluída, procedeu-se com a mistura desse volume com 600 μL do reagente de Griess na concentração supracitada e realizou-se a medida espectrofotométrica em batelada. Da mesma forma, 2,0 mL de solução padrão $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ (solução não pré-concentrada) foram adicionadas a 600 μL do reagente de Griess e a medida de absorvância realizada em batelada.

O fator de pré-concentração foi então calculado pela razão da absorvância obtida para a solução pré-concentrada no microsistema em relação à absorvância da solução não pré-concentrada, chegando-se a um valor de aproximadamente 4 vezes. Este fator de concentração pode ser considerado bastante elevado uma vez que o volume de amostra que efetivamente percola a coluna durante o procedimento é de apenas 3,8 mL, enquanto em outros procedimentos não miniaturizados este volume é consideravelmente maior (da ordem de centenas de mililitros).

Este resultado abre ainda a possibilidade de se aumentar a pré-concentração do analito, utilizando-se volumes maiores de amostra. Entretanto, deve-se considerar que neste caso haverá uma limitação pela própria

capacidade da coluna (saturação da fase sólida) e que também a frequência analítica deverá ser diminuída para se alcançar tais objetivos.

É importante considerar também as características mais atraentes dos sistemas miniaturizados. A Tabela 9 lista algumas características do último microsistema fabricado em relação a sistemas de análise em fluxo convencionais. É possível perceber que, devido ao tamanho miniaturizado, nos sistemas μ FIA, a vazão costuma ser bem mais baixa, o que propicia um gasto de reagente 68% menor em relação aos sistemas FIA. Isto é essencial quando se manipula reagentes tais como NED/SAM, os quais apresentam elevada toxicidade, com efeitos carcinogênicos [71]. Apesar disso, a frequência analítica nos sistemas convencionais apresenta valores muito maiores, fato que ainda torna as análises realizadas pelos sistemas miniaturizados deste trabalho demoradas.

Tabela 9. Comparação entre algumas características dos sistemas FIA convencionais e dos microdispositivos construídos neste trabalho.

Característica	FIA [59]	μFIA*
Vazão	1,5 mL min ⁻¹	350 μ L min ⁻¹
Frequência Analítica	125 h ⁻¹	22 h ⁻¹
Gasto de NED/SAM para 100 injeções	72 mL	23 mL
Redução do volume gasto em %	-	68%

*Sem considerar o tempo gasto para a pré-concentração.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a viabilidade de utilização de um microdispositivo fluídico à base de uretano-acrilato para determinações fotométricas de analitos, utilizando um LED com dois comprimentos de onda para correção do efeito Schlieren. Deve-se destacar que a correção proposta foi inovadora e que a mesma não pode ser realizada empregando-se as absorbâncias medidas em um espectrofotômetro comercial, ao menos que ajustes matemáticos sejam realizados para se igualar o sinal do efeito Schlieren nos dois comprimentos de onda.

É possível concluir também que os resultados obtidos para o microsistema com coluna de troca iônica Dowex 1X8 foram promissores, indicando a possibilidade de integração de colunas para extração em fase sólida a partir de um procedimento simples e eficiente. A viabilidade de utilização de microdispositivos com coluna de troca iônica para a extração em fase sólida de espécies com posterior detecção fotométrica foi demonstrada, obtendo-se um fator de pré-concentração adequado para a determinação de íons nitrito, a partir de um volume reduzido de amostragem em relação à pré-concentração convencional.

A proposta apresentada neste trabalho indica a possibilidade de elevar a sensibilidade de determinações analíticas em microsistemas fluídicos, diminuindo o consumo de reagente e amostras, bem como a geração de resíduos. Adicionalmente, o sistema proposto é uma alternativa no que diz respeito à utilização de grandes volumes de solução para pré-concentrar o analito, uma vez que o volume utilizado neste trabalho é de unidades de mililitros.

Com o objetivo de ampliar a aplicação dos microsistemas propostos, estudos deverão ser realizados para se otimizar as condições operacionais no que se refere a determinação fotométrica de íons metálicos. Alternativamente, outras formas de detecção como as de espectroscopia atômica poderão ser utilizadas em conjunto com os microsistemas fluídicos com colunas de troca iônica, proporcionando sensibilidades e seletividades ainda maiores.

6. REFERÊNCIAS

1. W. K. T. Coltro, E. Piccin, E. Carrilho, D. P. Jesus, J. A. F. Silva, H. D. T. Silva and C. L. Lago, *Química Nova*, 2007, vol. 30, n. 8, 1986.
2. K. Sharma, *Technological Forecasting and Social Change*, 2006, 73, 83.
3. H. F. Li and J. M. Lin, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393, 555.
4. B. Horstkotte, A. T. Sánchez, C. M. Duarte and V. Cerdà, *Analytica Chimica Acta* 2010, 658, 147.
5. N. M. Summa, D. Eshar, B. L. Chow, S. Larrat and D. C. Brown, *Canadian Veterinary Journal*, 2014, 55, 865.
6. W. R. Melchert, B. F. Reis and F. R. P. Rocha, *Analytica Chimica Acta*, 2012, 714, 8.
7. J. Ruzicka and G. D. Marshall, *Analytica Chimica Acta*, 1990, 237, 329.
8. M. A. Z. Arruda and C. H. Collins, *Química Nova*, 2005, vol. 28, n. 4, 739.
9. B. F. Reis, M. F. Giné, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima and R. A. Lapa, *Analytica Chimica Acta*, 1994, 293, 129.
10. A. Manz, N. Graber and H. M. Widmer, *Sensors and Actuators B*, 1990, 1, 244.
11. M. J. Madou, in *Fundamentals of Microfabrication*, Boca Raton, 1st. ed., CRC Press, 1997.
12. B. M. Simonet and M. Valcárcel, *Microchimica Acta*, 2006, 153, 1.
13. J. M. Whitesides, *Nature*, 2006, 442, 368.
14. T. R. Sampaio and A. Fonseca, *Sensors and Actuators B*, 2015, 213, 215.
15. W. K. T. Coltro, R. S. Neves, A. J. Motheo, J. A. F. Silva and E. Carrilho, *Sensors and Actuators B*, 2014, 192, 239.
16. G. Lee, S. Chen, G. Huang, W. Sung and Y. Lin, *Sensors and Actuators B*, 2001, 75, 142.
17. P. T. Garcia, T. M. G. Cardoso, C. D. Garcia, E. Carrilho and W. K. T. Coltro, *Royal Society of Chemistry*, 2014, 4, 37637.
18. G. R. M. Duarte, C. W. Price, B. H. Augustine, E. Carrilho and J. P. Landers, *Analytical Chemistry*, 2011, 83, 5182.
19. F. Lapierre, N. R. Cameron and Y. Zhu, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2015, 25, 1.
20. H. Becker and L. E. Locascio, *Talanta*, 2002, 56, 267.

-
21. M. Yamada and M. Seki, *Analytical Chemistry*, 2004, 76, 895.
 22. A. Fonseca, I. M. Raimundo Jr, L. O. S. Ferreira and J. J. R. Rohwedder. *Analytical Chimica Acta*, 2007, 603, 159.
 23. E. T. S. G. Silva, M. Santhiago, F. R. Souza, W. K. T. Coltro and L. T. Kubota, *Lab on a Chip*, 2015, 15, 1651.
 24. P. N. Nge, J. V. Pagaduan, M. Yu and A. T. Woolley, *Journal of Chromatography A*, 2012, 1261, 129.
 25. P. Grodzinski, J. Yang, R. H Liu and M. D. Ward. *Biomedical Microdevices*, 2003, 5:4, 303.
 26. L. N. N. Nóbrega, L. O. Magalhães and A. Fonseca. *Microchemical Journal*, 2013, 110, 553.
 27. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. APHA, AWWA, and WPCF, Washington, 18th Ed., 1975.
 28. L. A. Legendre, J. M. Blenvenue, M. G. Roper, J. P. Ferrance and J. P. Landers. *Analytica. Chemistry*, 2006, 78, 1444.
 29. A. Fonseca and J. C. B. Silva, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2013, vol. 24, n. 1, 5.
 30. H. Zhai, J. Li, Z. Chen, Z. Su, Z. Liu and X. Yu, *Microchemical Journal*, 2014, 114, 223.
 31. S. Chen, N. Li, X. Zhang, D. Yang and H. Jiang, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 138, 375.
 32. G. S. Settles, *Schlieren and shadowgraph techniques: visualizing phenomena in transparent media*, *Experimental Fluid Mechanics*, 1st. ed., Springer, 2001.
 33. P. K. Pangrahi and K. Muralidhar, *Schlieren and shadowgraph methods in heat and mass transfer*, 1st. ed., Springer, 2012.
 34. V. L. R. G. Abreu, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Food Analytical Methods*, 2012, 5, 867.
 35. I. D. McKelvie, D. M. W. Peat, G. P. Matthews and P. J. Worsfold, *Analytica Chimica Acta*, 1997, 351, 265.
 36. A. B. Vishnikin, M. K. E. A. Al-Shwaiyat, G. A. Petrushina, L. P. Tsiganok, V. Andruch, Y. R. Bazel, H. Sklenářová and P. Solich, *Talanta*, 2012, 96, 230.

-
37. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler and S. R. Crouch, Fundamentos de Química Analítica, 8th Ed., Cengage Learning, 2006.
38. R. L. Carneiro, J. W. B. Braga, R. J. Poppi and R. Tauler, Analyst, 2008, 133, 774.
39. E. A. G. Zagatto, M. A. Z. Arruda, A. O. Jacintho and I. L. Mattos, Analytica Chimica Acta, 1990, 234, 153.
40. A. C. B. Dias, E. P. Borges, E. A. G. Zagatto and P. J. Worsfold. Talanta, 2006, 68, 1076.
41. I. C. S. F. Jardim. Princípios de extração em fase sólida. In: K. B. Borges, E. C. Figueiredo and M. E. C. Queiroz. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1st ed., LTC, 2015.
42. F. Kitagawa and K. Otsuka, Journal of Chromatography A, 2014, 1335, 43.
43. F. F. Sodré, M. A. F. Locatelli and W. F. Jardim, Química Nova, 2010, vol. 33, n. 1, 216.
44. M. G. Santos and E. C. Figueiredo, Preparo de amostras impregando polímeros de impressão molecular. In: K. B. Borges, E. C. Figueiredo and M. E. C. Queiroz. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1st ed., LTC, 2015.
45. J. Mendham, R. C. Denney, J. D. Barnes and M. J. K. Thomas. Vogel – Análise Química Quantitativa. 6th ed., LTC, 2002.
46. C. H. Collins, G. L. Braga and P. S. Bonato. Fundamentos de Cromatografia, 1st Ed, Editora Unicamp, 2007.
47. O. N. Khokhlova, Russian Journal of Physical Chemistry A, 2014, vol. 88, n. 8, 1423.
48. D. C. Harris. Análise Química Quantitativa. 5th ed., LTC, 2001.
49. Dow Water Solutions. Disponível em: <
http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_006f/0901b8038006f232.pdf?filepath=liquidseps/pdfs/noreg/177-01509.pdf&fromPage=GetDoc>, acessado em julho de 2015.
50. L. Barron and E. Gilchrist, Analytica Chimica Acta, 2014, 806, 27.
51. B. Horstkotte, K. M. Duarte and V. Cerd a, Trends in Analytical Chemistry, 2010, vol. 19, n. 10, 1224.
52. A. C. B. Dias, A. Fonseca and F. F. Sodré. Automa o do prepare de amostras em sistemas de análise em fluxo. In: K. B. Borges, E. C.
-

- Figueiredo and M. E. C. Queiroz. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1st ed., LTC, 2015.
53. D. Cho, J. H. Choi, M. S. Khurram, S. H. Jo, H. J. Ryu, Y. C. Park, C. K. Yi, *Korean Journal of Chemistry Engineering*, 2015, 32 (2), 284.
54. A. M. Idris and A. O. Alnajjar, *Talanta*, 2008, 77, 522.
55. J. A. Méndez, J. B. García, R. M. P. Crecente, S. G. Martín and C. H. Latorre, *Talanta*, 2011, 85, 2361.
56. M. F. T. Ribeiro, A. C. B. Dias, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima and E. A. G. Zagatto. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2006, 384, 1019.
57. W. Thongchai, B. Liawruangath, S. Liawruangath and G. M. Greenway, *Talanta*, 2010, 82, 560.
58. A. Fonseca, I. M. Raimundo Jr, L. O. S. Ferreira and J. J. R. Rohwedder. *Analytical Chimica Acta*, 2007, 603, 159.
59. J. Ruzicka and E. H. Hansen. *Flow Injection Analysis*, Wiley-Interscience Publication, 1981, v. 62.
60. L. Fassarella. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 2007, 29 (2), 215.
61. E. M. Peixoto. *Química Nova na Escola*, 2003, n. 17.
62. D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, *Princípios de Análise Instrumental*, 5th Ed., Bookman, 2002.
63. E. V. Larionova and K. A. Bulygina, *Materials Science and Engineering*, 2015, 81, 1.
64. L., F. Khan and N. Rahman, *Environmental Monitoring and Assessment*, 2013, 185, 4959.
65. J. F. V. Staden, *Talanta*, 2015, 139, 75.
66. Dow Water and Process Solutions. Disponível em: <http://www.dowwaterandprocess.com/en/Products/D/DOWEX_1X8>, acessado em julho de 2015.
67. G. H. Brown and E. M. Sallee. *Química quantitativa*. 1st ed. Reverté. 1977.
68. S. A. N. Rocha and A. C. S. Costa. *Resumos da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, Brasil, 2006.
69. R. Sánchez, C. Sánchez, C. P. Lienemann and J. L. Todolí, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2015, 30, 64.
70. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 357, 2005.

71. W. R. Melchert, C. M. C. Infante and F. R. P. Rocha, *Microchemical Journal*, 2007, 85, 209.