



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

Lorrana Nara Naves Nóbrega

Dissertação de Mestrado

Orientador: Dr. Alexandre Fonseca

Brasília, DF
Junho de 2013



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós Graduação em Química

**Integração de uma Coluna Redutora à um
Microdispositivo Fluídico e Avaliação de Sistemas
Miniaturizados na Determinação de Nitrito, Nitrato e
Fosfato em Águas Naturais.**

Lorrana Nara Naves Nóbrega

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

Orientador: Dr. Alexandre Fonseca

Área de Concentração: Química Analítica

Brasília, DF

Junho de 2013

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todo o amparo e bênçãos em minha vida.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Fonseca, que me aceitou como sua aluna de maneira generosa, e que me serve de inspiração como profissional ético, prestativo e sábio. Agradeço ainda pelos momentos de confraternização no laboratório que me trouxeram alegria durante todo esse trabalho.

À aluna de Iniciação Científica Laiz, que muito mais do que uma amiga, se mostrou uma profissional empenhada e competente. Agradeço muito por toda a sua contribuição neste trabalho, que foi essencial para o alcance de bons resultados.

Ao meu noivo Wesley, que além de meu grande amor, é um companheiro que sempre me incentivou ao aperfeiçoamento profissional e me apoiou em todos os momentos de dificuldade.

À minha mãe Janet e as minhas irmãs Kellen e Petra, pela defesa dos meus sonhos e da minha integridade. Ao meu pai e minha avó, que mesmo não estando presentes fisicamente em minha vida, apoiaram o meu desenvolvimento profissional.

À minha amiga Verônica e o seu companheiro Eduardo, pelos bons conselhos e a assistência prestada. Agradeço também por compartilharem comigo diversas experiências profissionais.

Ao Professor Jez Willian, pelo auxílio e orientação no Grupo Tutorial de Cálculo I. À sua esposa Lilian, pela amizade e companheirismo em nossa intensa rotina laboratorial.

À José e sua esposa Marlene, meus primos, que disponibilizaram a sua residência para a minha estadia de forma tão amável e generosa.

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

A FAP-DF pelo financiamento do 5º Congresso Ibero-Americano de Química Analítica.

E a CAPES- Reuni pelo fornecimento da bolsa.

Muito obrigada!

Resumo

Este trabalho descreve o desenvolvimento e a avaliação de microssistemas de análise por injeção em fluxo (μ FIA) para as determinações de nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), e fosfato (PO_4^{3-}) em águas doces. Para todos os μ FIA, a fotolitografia profunda no ultravioleta foi empregada para fabricação dos dispositivos a partir de um fotorresista a base de uretana-acrilato (UA). Todos os dispositivos apresentaram dimensões tão pequenas quanto a de um cartão de crédito (7,0 cm x 4,0 cm x 0,5 cm) e canais de formato em “U” com até 390 μm de profundidade. Um procedimento simples e de baixo custo foi utilizado para a integração de uma coluna redutora de cádmio ao μ FIA de NO_3^- , por meio da inserção manual de grânulos de cádmio selecionados (0,5 a 1,0 mm) à um reservatório dedicado (1,00 mm x 0,65 mm x 20 mm). A coluna demonstrou bom desempenho com 97,5% de eficiência de redução (NO_3^- para NO_2^-) e ausência de vazamentos para vazões superiores a 2,0 mL min^{-1} . Os sinais analíticos transientes obtidos com os microssistemas propostos apresentaram razões sinal/ruído satisfatórias e permitiram ajustes lineares ($R > 0,99$) para as faixas de concentração estudadas (0,06 a 0,37 mg N L^{-1} (NO_2^-); 0,23 a 2,26 mg N L^{-1} (NO_3^-) e 1,0 a 8,0 mg P L^{-1} (PO_4^{3-})) sendo estimados os limites de detecção de 0,15 mg N L^{-1} (NO_3^-), 0,03 mg N L^{-1} (NO_2^-) e 0,54 mg P L^{-1} (PO_4^{3-}). Para as determinações de NO_3^- e NO_2^- as figuras de mérito estimadas demonstraram adequação a regulamentação brasileira para águas doces. Empregando-se amostras de águas doces superficiais e/ou amostras de águas comerciais, recuperações de 90,4 % a 114,7 % foram obtidas e não foram observadas diferenças significativas (95% de confiança) entre os valores determinados com os microssistemas e aqueles determinados a partir de métodos de referência, demonstrando uma boa exatidão dos procedimentos. Para todas as determinações, reduções significativas no consumo de reagentes e na geração de resíduos foram observadas em relação aos sistemas de análise por injeção em fluxo usuais, demonstrando que os dispositivos propostos atendem aos preceitos da química verde.

Abstract

This work describes the development and evaluation of flow injection analysis (μ FIA) microsystems for nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-), and phosphate (PO_4^{3-}) determinations in fresh waters. For all μ FIA, deep ultraviolet photolithography was used for fabrication of the devices using a photoresist based on urethane acrylate (UA) photoresist. All devices present dimensions as small as a credit card (7.0 cm x 4.0 cm x 0.5 cm) and "U" shape channels with up to 390 μm deep. A simple and inexpensive procedure was used for the integration of a cadmium reduction column to the μ FIA applied for NO_3^- determination by using manual insertion of selected cadmium particles (0.5 to 1.0 mm) into a dedicated reservoir (1.00 mm x 0.65 mm x 20 mm). The column presented a good performance with an efficiency of reduction of 97,5% (NO_3^- to NO_2^-) and no leaks for flow rates higher than 2.0 mL min^{-1} . The proposed microsystem showed adequate signal to noise ratios and provided linear relationships ($R > 0,99$) for the concentration range studied (0.06 to 0.37 mg L^{-1} N (NO_2^-), 0.23 to 2.26 mg L^{-1} N (NO_3^-) and 1.0 to 8.0 mg L^{-1} P (PO_4^{3-})) with estimated detection limits of 0.15 mg L^{-1} N (NO_3^-), 0.03 mg L^{-1} N (NO_2^-) and 0.54 mg L^{-1} P PO_4^{3-}). For the determination of NO_3^- and NO_2^- , the estimated figures of merit were adequate to Brazilian regulations for freshwater. By employing the proposed devices to fresh superficial water samples and/or commercial water samples, recoveries of 90.4% to 114.7% were obtained and no significant differences were observed (95% confidence) between the values determined with microsystems and those determined from reference methods, demonstrating good accuracy of the procedures. For all determinations, significant reductions in reagent consumption and waste generation were observed when compared to usual flow injection analysis systems demonstrating that the proposed devices are appropriate to the principles of green chemistry.

Sumário

1.Introdução.....	1
1.1.Estratégias de automação analítica	1
1.2.Técnicas de fabricação de microssistemas de análise em fluxo (μFA).....	4
1.2.1.Técnicas de gravação dos microcanais	4
1.2.1.1.Fotolitografia com corrosão por via úmida ou seca	4
1.2.1.2.Moldagem por pressão a quente.....	7
1.2.1.3.Ablação à laser	8
1.2.1.4.Outras alternativas	10
1.2.2.Técnicas de selagem para microssistemas.....	11
1.2.2.1.Selagem térmica	12
1.2.2.2.Selagem anódica	12
1.2.2.3.Selagem por ativação da superfície	12
1.2.2.4.Selagem por tratamento com camada intermediária	13
1.3.Microssistemas de análise em fluxo.....	13
1.4.Preparo de amostra em microssistemas de análise em fluxo.....	17
2.Objetivos.....	21
3.Parte experimental.....	22
3.1.Microfabricação por Fotolitografia profunda no UV	22
3.1.1.Integração de uma coluna redutora à um microdispositivo fluídico de análise ...	30
3.2.Determinação de Nitrato e Nitrito	32
3.2.1.Instrumentação	32
3.2.2.Reagentes e soluções.....	32
3.2.3.Procedimentos	34
3.2.4.Método de referência	37
3.3.Determinação de Fosfato.....	40
3.3.1.Instrumentação	40
3.3.2.Reagentes e Soluções	40
3.3.3.Procedimentos	41
3.3.4.Método de referência	42
4.Resultados e Discussão	43
4.1.Integração da coluna de cádmio ao microssistema.....	43
4.2.Caracterização dos microanalisadores em fluxo empregados nas determinações de nitrato e nitrito	50

4.2.1.Determinação de nitrogênio total (nitrato + nitrito) e nitrito em amostras de água doce.....	52
4.3.Caracterização do microanalisador em fluxo empregado na determinação de fosfato.....	61
4.3.1.Determinação de fosfato em amostras de água doce.	62
5.Conclusões e Perspectivas.....	68
6.Referências bibliográficas	69

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

- μFA** – *Micro flow analysis systems* (Microsistema de análise em fluxo)
- μFBA** – *Micro flow batch analyzer* (Microanalisador em fluxo-batelada)
- μFIA** – *Micro flow injection analysis system* (Microsistema de análise por injeção em fluxo)
- μTAS** – *Microsystem total analysis* (Microsistema de análise total)
- AM** – Água mineral
- Am**–Amostragem
- BP** – Bomba peristáltica
- CFF** – Célula de fluxo fotométrica
- COC** – Copolímero de olefina cíclica
- CR** – Coluna redutora
- D** – Descarte
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DQO** – Demanda química de oxigênio
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- EE2** – Hormônio etinilestradiol
- FIA** – *Flow injection analysis* (Análise por injeção em fluxo)
- LED** – *Light emitting diode* (Diodo emissor de luz)
- LIF** – *Laser induced fluorescence* (Fluorescência induzida à Laser)
- LNLS** – Laboratório nacional de luz síncroton
- LOD** – *Limit of detection* (Limite de detecção)
- LTCC** – *Low temperature co-fired ceramica* (Cerâmica de baixa temperatura de sinterização)
- MCFS** – Sistema de análise por multicomutação
- NED** – N-(1-naftil) etilenodiamina
- P** – Ponto de confluência
- PC** – Poli(carbonato)
- PDMS** – Poli(dimetilsiloxisano)
- PEEK** – Poli(etercetona)
- PE** – Poli(etileno)
- PMMA** – Poli(metilmetacrilato)

PTFE – Poli(tetrafluoretileno)

PU – Poli(uretana acrilato)

RIE – *Reactive Ion Etching* (Corrosão por íon reativo)

SA – Sistema de amostragem

SAM – Sulfanilamida

SIA – Análise por injeção sequencial

UA – Uretana acrilato

UV – Radiação ultravioleta

UV-A – Radiação ultravioleta do tipo A

V – Válvula solenóide

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema de um Sistema de Análise por Injeção em Fluxo. Soluções de amostra (A), transporte (T) e reagente (R), bomba peristáltica (BP), injetor comutador (I), sistema de amostragem (Am), confluência (C), bobina de reação (BR), detector (Dc) e descarte (D).	1
Figura 2. Fotografia dos componentes principais do sistema FIA. Bomba peristáltica (A), injetor comutador (B), válvula solenóide (C) e célula de fluxo (D).	2
Figura 3. Etapas principais do processo de fotolitografia por corrosão via úmida (a) e via seca (b).	6
Figura 4. Etapas principais do processo de moldagem por pressão a quente.	8
Figura 5. Ilustração do processo de ablação à laser por máscara metálica (a) e plotagem bidimensional (b). As setas em azul indicam os possíveis sentidos de rotação dos cilindros.	9
Figura 6. Exemplo de uma máscara fotolitográfica empregada no processo de microfabricação.	23
Figura 7. Construção do molde fotolitográfico empregado no processo de microfabricação.	24
Figura 8. Etapas do processo de gravação por fotolitografia profunda no ultravioleta.	25
Figura 9. Fotografia de uma fotoexpositora <i>home-made</i> . Foto: Fonseca ⁶²	26
Figura 10. Esquema da formação da camada de filme adesivo sobre a superfície das placas com os canais e a sua cobertura.	28
Figura 11. Processo de selagem do microsistema de análise em fluxo.	28
Figura 12. “Layouts” dos microdispositivos utilizados na determinação de NO_2^- (A) e NO_3^- (B). Os valores indicados expressam a largura das linhas em milímetros.	29
Figura 13. “Layout” do microdispositivo utilizado na determinação do PO_4^{3-} . Os valores indicados expressam a largura das linhas em milímetros.	30
Figura 14. “Layout” da estrutura microfluídica contendo o canal (destacado em vermelho) dedicado ao empacotamento de grânulos de cádmio.	31
Figura 15. Fotografia apresentando todos os componentes empregados nos procedimentos analíticos a partir do μFIA	34

Figura 16. Diagrama de fluxo empregado para a avaliação do dispositivo sem coluna na determinação de NO_2^- em soluções aquosas: sistema de amostragem (SA), bomba peristáltica com as respectivas vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$ (BP), válvulas solenóides (V), ponto de confluência (P), bobina de reação (BR), célula de fluxo fotométrica (CFF), descarte (D).....	35
Figura 17. Diagrama de fluxo empregado para a avaliação do dispositivo com coluna redutora integrada na determinação de NO_3^- em soluções aquosas: sistema de amostragem (SA), bomba peristáltica com as respectivas vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$ (BP), válvulas solenóides (V), ponto de confluência (P), bobina de reação (BR), célula de fluxo fotométrica (CFF), descarte (D).....	37
Figura 18. Fotografia do sistema em fluxo com coluna redutora de cádmio empregado nas determinações a partir do método padrão.	39
Figura 19. Diagrama de fluxo empregado para a avaliação do dispositivo na determinação de PO_4^{3-} em soluções aquosas: sistema de amostragem (SA), bomba peristáltica com as respectivas vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$ (BP), válvulas solenóides (V), ponto de confluência (P), bobina de reação (BR), célula de fluxo fotométrica (CFF), descarte (D).....	41
Figura 20. Fotografia do microsistema com coluna redutora integrada apresentando configuração mais simples utilizado na determinação fotométrica de NO_3^-	43
Figura 21. Micrografia óptica da seção transversal da coluna redutora de cádmio. Visualização expandida da junção coluna/microcanal (A) e visualização expandida da extensão da coluna (B).	45
Figura 22. Diagrama obtido na determinação de NO_3^- (a) e NO_2^- (b) em concentrações equimolares ($0,9 \text{ mmol L}^{-1}$) a partir do microdispositivo de configuração mais simples com coluna redutora integrada. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza... 46	46
Figura 23. Sinais transientes obtidos para injeções das soluções padrão de $1,13 - 4,52 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_3^-) no microdispositivo de configuração mais simples com coluna redutora integrada. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.....	47
Figura 24. Microsistema com coluna redutora integrada apresentando nova configuração.	47
Figura 25. Diagrama obtido na determinação de NO_3^- (a) e NO_2^- (b) em concentrações equimolares ($130 \mu\text{mol L}^{-1}$) a partir do microdispositivo com coluna redutora integrada apresentando nova configuração. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.	48

Figura 26. Microsistema sem a coluna (A) e com coluna redutora de cádmio integrada (B): sistema de amostragem (SA) com duas opções de volume: AB e AC, ponto de confluência (P), bobina de reação (BR), coluna redutora (CR) e célula de fluxo fotométrica (CFF).	50
Figura 27. Micrografia eletrônica da seção transversal de um microcanal.....	51
Figura 28. Fiagrama obtido a partir das determinações de soluções padrão na faixa linear de 0,23 – 2,26 mg N L ⁻¹ (NO ₃ ⁻). Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.	53
Figura 29. Curva analítica obtida para as soluções padrão na faixa linear de 0,23 – 2,26 mg N L ⁻¹ (NO ₃ ⁻).	53
Figura 30. Fiagrama obtido a partir das determinações de soluções padrão na faixa linear de 0,06 – 0,37 mg N L ⁻¹ (NO ₂ ⁻). Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.	54
Figura 31. Curva analítica obtida para as soluções padrão na faixa linear de 0,06 – 0,37 mg N L ⁻¹ (NO ₂ ⁻).	55
Figura 32. Um fiagrama típico obtido nas determinações de nitrogênio total (NO ₃ ⁻ e NO ₂ ⁻) em amostras de água doce a partir do microsistema com coluna redutora integrada. Os valores indicados expressam a concentração em mg N L ⁻¹ (NO ₃ ⁻). Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.	57
Figura 33. Um fiagrama típico obtido nas determinações individuais de NO ₂ ⁻ em amostras de água doce a partir do microsistema sem coluna. Os valores indicados expressam a concentração em mg N L ⁻¹ (NO ₂ ⁻). Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.	57
Figura 34. Microsistema empregado na determinação de PO ₄ ⁻³ : sistema de amostragem (SA) com duas opções de volume (AB e AC), ponto de confluência (P), bobina de reação (BR) e célula de fluxo fotométrica (CFF).....	61
Figura 35. Fiagrama obtido na determinação de PO ₄ ⁻³ em amostras de água doce sem e com a fortificação de 1,0 (a) e 4,0 mg P L ⁻¹ (PO ₄ ⁻³) (b). Os valores indicados são expressos em mg N L ⁻¹ (PO ₄ ⁻³). Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza...	63
Figura 36. Curva analítica obtida nas determinações de soluções padrão na faixa de 1,0 – 8,0 mg P L ⁻¹ (PO ₄ ⁻³).....	64

Lista de Tabelas

Tabela 1. Volumes estimados para os componentes analíticos dos microanalisadores propostos.....	51
Tabela 2. Teores de recuperação estimados para nitrito e nitrogênio total a partir dos microssistemas propostos.....	58
Tabela 3. Resultados para a determinação de nitrogênio total em seis amostras de água doce.....	59
Tabela 4. Recuperações para as amostras de água superficial fortificadas com PO_4^{-3}	66
Tabela 5. Resultados para a determinação de PO_4^{-3} em quatro amostras de água.	66

Lista de Equações

Equação 1. Mecanismo da reação de Griess utilizado na determinação espectrofotométrica de NO_2^-	36
Equação 2. Etapa de formação do ácido fosfomolibdico	42

1. Introdução

1.1. Estratégias de automação analítica

A automação dos procedimentos analíticos tem demonstrado grande potencial de aplicação à análises ambientais¹, clínicas² e farmacêuticas³, pois ao gerenciar as diversas etapas do processo de análise de modo reproduzível, permite que as amostras sejam analisadas com boa precisão, exatidão e economia de reagentes. Adicionalmente, a redução na manipulação de soluções de amostra e reagentes pelo analista, minimiza a ocorrência de erros sistemáticos associados a possíveis contaminações, e também os riscos pela exposição à substâncias tóxicas e perigosas.

Dentre as estratégias de automação mais utilizadas, destaca-se o sistema de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*)⁴. O seu princípio de funcionamento é bastante simples e baseia-se no gerenciamento de fluidos no interior de tubos de pequeno diâmetro. Nesse processo, a injeção de uma alíquota definida de uma solução de amostra é introduzida em um percurso analítico, no qual sofre dispersão controlada ao ser conduzida por meio de um fluxo contínuo de solução de transporte até um sistema de detecção adequado. Um esquema de um sistema FIA é ilustrado na Figura 1.

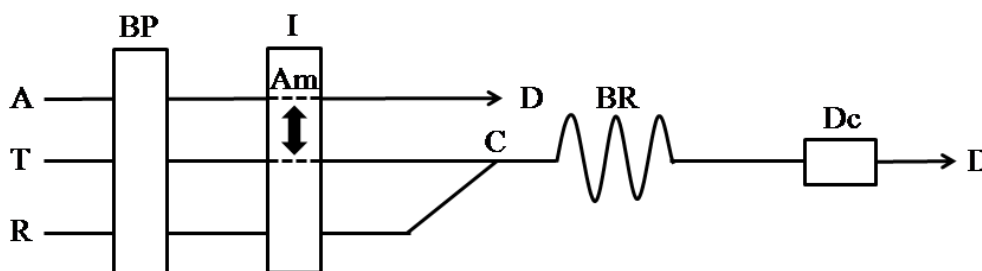


Figura 1. Esquema de um Sistema de Análise por Injeção em Fluxo. Soluções de amostra (A), transporte (T) e reagente (R), bomba peristáltica (BP), injetor comutador (I), sistema de amostragem (Am), confluência (C), bobina de reação (BR), detector (Dc) e descarte (D).

Os sistemas FIA são constituídos basicamente de um dispositivo de propulsão, que permite o transporte de soluções, um injetor para a introdução da amostra no fluxo transportador, um percurso analítico composto por bobinas de reação e confluências para a mistura de reagentes e amostra, válvulas direcionais e um sistema de detecção em linha (*on line*) que permite a medida de alguma propriedade física ou química de interesse. De maneira complementar, módulos dedicados ao preparo de amostra podem ser adicionados, entre eles, mini-colunas para extração em fase sólida (SPE), unidades de difusão gasosa, digestores em microondas, ultrassom, outros.

Para a propulsão de fluidos em regime laminar e contínuo, usualmente é utilizada uma bomba peristáltica ou uma bomba seringa, que opera em vazões na faixa de 0,05 a 45 mL min⁻¹ ⁵. O direcionamento do fluxo no percurso analítico é realizado por válvulas solenóides de três vias e, no injetor comutador, um volume preciso de amostra é definido pelas dimensões em comprimento e diâmetro de um tubo de amostragem. Um dispositivo de transdução para o sinal analítico, tal como um fotodiodo ou um eletrodo, é empregado para a detecção do analito, permitindo o registro contínuo do sinal transiente gerado para determinações fotométricas⁶ e eletroquímicas⁷. Alguns desses componentes são ilustrados na Figura 2.

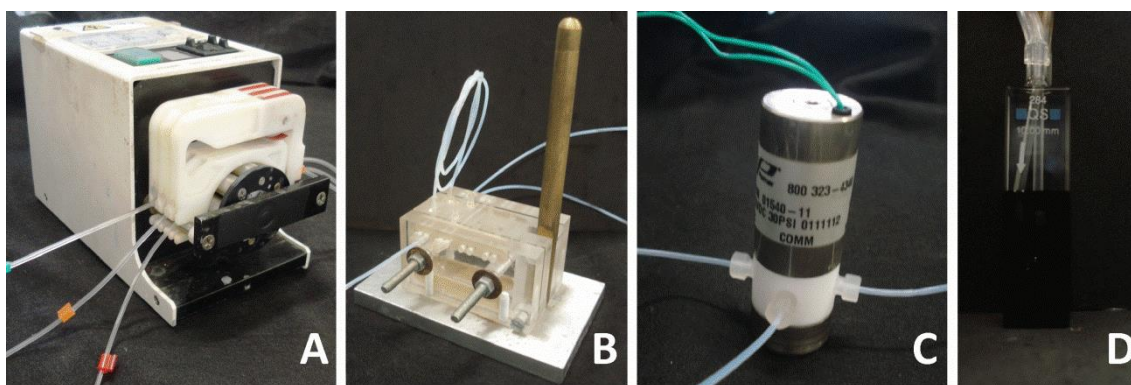


Figura 2. Fotografia dos componentes principais do sistema FIA. Bomba peristáltica (A), injetor comutador (B), válvula solenóide (C) e célula de fluxo (D).

O excelente desempenho para as análises realizadas em sistemas FIA é demonstrado por meio de resultados analíticos com boa precisão e exatidão, e características como a simplicidade de operação, a alta frequência analítica, que pode chegar a 100 amostras h⁻¹ ⁸, e uma redução considerável no

consumo de amostra e reagentes, o que também permite a minimização no volume de resíduos gerados. Além do mais, os equilíbrios químicos e a reação podem não ter sido completados quando a zona de amostra, formada por um gradiente de concentração, é quantificada⁹ o que amplia a sua adaptação a diversas metodologias.

Em função das potencialidades demonstradas, nas décadas posteriores ao desenvolvimento do FIA, outras versões de sistemas de análise em fluxo surgiram com diferentes configurações de mistura das soluções, entre eles, o sistema de análise por injeção sequencial (SIA)¹⁰ e o sistema de análise por multicomutação (MCFS)¹¹, permitindo uma maior flexibilidade de aplicações. A partir de 1990, entretanto, o rápido crescimento da indústria microeletrônica, com a redução cada vez mais expressiva no tamanho dos componentes de automação, possibilitou o desenvolvimento de sistemas de análise miniaturizados¹², visando à melhoria das características já alcançadas.

Embora os sistemas de análise em fluxo convencionais compreendam características requeridas para uma análise rápida e confiável, pesquisadores têm demonstrado que a redução no tamanho dos sistemas fluídicos possibilita uma melhora em seu desempenho no que se refere principalmente ao consumo de amostra e reagentes. Em virtude do tamanho significativamente menor, inerente à esses dispositivos, outras qualidades são também observadas como a portabilidade, que facilita as aplicações em campo para determinações *in situ* e a manipulação ainda mais restrita de reagentes¹³.

A miniaturização dos sistemas de análise em fluxo é guiada pelos conceitos de “*Lab on a chip*”¹⁴ e, mais especificamente pelos chamados microssistemas de análise total (μ TAS, do inglês “*Micro Total Analysis Systems*”)¹⁵. A ideia fundamental é que esses dispositivos sejam capazes de efetuar distintas etapas de um procedimento analítico como amostragem, pré-tratamento de amostra, reação e detecção, em um único “chip” que deve operar com volumes da ordem de dezenas a centenas de nanolitros utilizando um procedimento rápido e totalmente automatizado. Esse conceito foi inicialmente proposto por Manz *et. al.* em 1990 e ganhou força nos últimos anos pelo atendimento aos requisitos da chamada Química Verde¹⁶. Desde então, esforços tem sido realizados para a construção de dispositivos microfluídicos que atendam ao menos em parte, esses requisitos.

1.2. Técnicas de fabricação de microssistemas de análise em fluxo (μ FA)

Os microssistemas de análise em fluxo (μ FA) são caracterizados pelo gerenciamento de soluções no interior de microcanais gravados sobre uma estrutura sólida, a qual é selada para permitir o transporte apropriado de fluidos em seu interior. Desse modo, duas etapas principais são observadas para o processo de fabricação desses dispositivos: a gravação de microcanais sobre o substrato sólido, e a selagem, que é realizada pela união da superfície do substrato que contém os canais com uma placa de cobertura, que pode ou não apresentar a composição do substrato com os canais.

1.2.1. Técnicas de gravação dos microcanais

Considerando que os dispositivos miniaturizados apresentam dimensões bastante reduzidas, o primeiro desafio estabelecido na confecção dos μ FA foi a obtenção de canais com pequeno diâmetro (na ordem de μm) ao longo de um determinado substrato. Por isso, os primeiros métodos empregados com esse objetivo surgiram a partir de técnicas bem estabelecidas pela indústria microeletrônica, a partir de materiais como silício, vidro e quartzo¹⁷.

1.2.1.1. Fotolitografia com corrosão por via úmida ou seca

Dentre as técnicas clássicas de microfabricação, destacam-se a fotolitografia com corrosão por via úmida^{17, 18} e via seca¹⁹. Na primeira, a transferência dos microcanais para um substrato sólido ocorre através do ataque químico com soluções ácidas (HF/HNO_3) de regiões desprotegidas, previamente delimitadas por um molde metálico, na superfície do substrato. Já na Corrosão por Íon Reativo (RIE, do inglês "*Reactive Ion Etching*")²⁰, uma das técnicas usuais por via seca, um processo similar acontece pela interação de um plasma com a superfície do material de interesse. De maneira geral, espécies reativas (CF_3^+ , CF_3 e F) são formadas no impacto provocado pela

aceleração de elétrons sobre as moléculas do plasma (CF_4), e posteriormente reagem com a superfície do substrato promovendo a sua degradação através da dessorção de produtos gasosos.

As principais etapas do processo fotolitográfico são ilustradas na Figura 3. Inicialmente, uma fina camada metálica (Cr/Au), da ordem de nanômetros, é depositada através da técnica de *sputtering*²¹ ou evaporação térmica²², sobre o substrato devidamente limpo, para servir de molde durante o processo de corrosão por via úmida ou seca (I). Em seguida, uma camada de um fotorresiste (polímero fotossensível líquido), da ordem de micrometros, é suportada sobre a primeira (camada metálica) através da técnica de recobrimento por *spin coating*²³, para a fotogração da imagem, que guiará a moldagem dos canais na camada metálica (II). Uma máscara contendo o delineamento das estruturas microfluídicas, desenvolvida pela mesma técnica, é então posicionada entre uma fonte de radiação ultravioleta (UV) ou raios-x e o fotorresiste (III), de modo que as regiões expostas sofram interação (IV), que pode ocorrer de dois modos diferentes de acordo com a natureza do polímero. Caso o fotorresiste seja do tipo negativo, as regiões expostas sofrem um processo de reticulação, tornando-se mais rígidas, e a estrutura revelada é idêntica à imagem das regiões protegidas pela máscara. Porém, caso o fotorresiste seja do tipo positivo, as regiões expostas tornam-se solúveis, e a estrutura revelada é idêntica as regiões translúcidas da máscara. Na Figura 3, o fotorresiste ilustrado é do tipo positivo. Após a etapa fotolitográfica, a camada metálica desprotegida é então removida (V) através de soluções oxidantes (HCl/HNO_3), de modo a disponibilizar as regiões delimitadas do substrato ao ataque químico ou a corrosão por um plasma(VI), onde finalmente obtém-se as estruturas microfluídicas gravadas (VII).

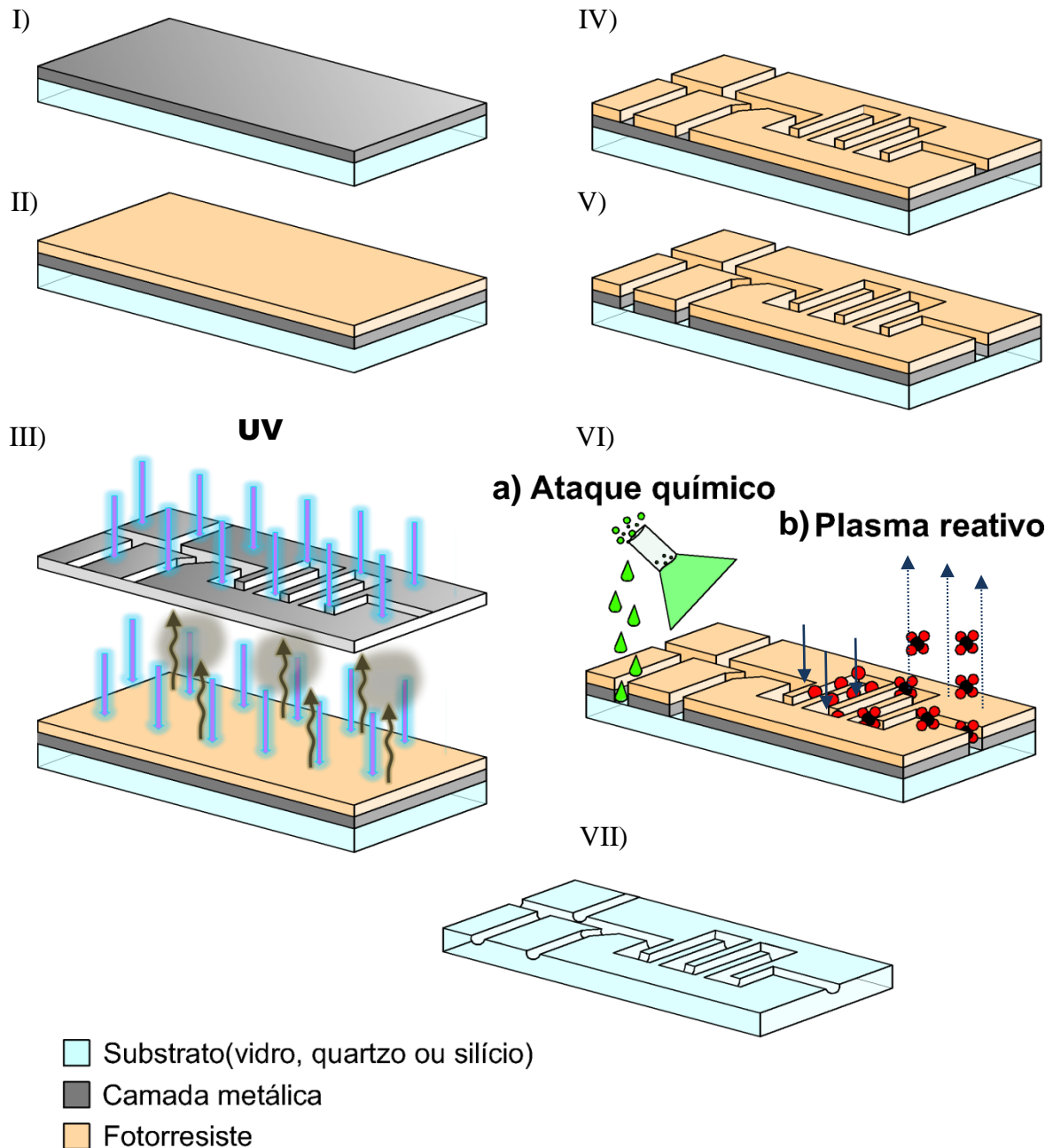


Figura 3. Etapas principais do processo de fotolitografia por corrosão via úmida (a) e via seca (b).

Apesar da obtenção de microcanais com excelente resolução e pequeno diâmetro, da ordem de décimos de micrômetros, a complexidade de fabricação em virtude da alta tecnologia requerida e o alto custo tem dificultado a implementação destas técnicas em laboratórios de química convencionais. No Brasil, um dos poucos laboratórios totalmente equipados para a realização das etapas descritas anteriormente é o Laboratório de Microfabricação, localizado no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS)²⁴ em Campinas/SP. Neste

contexto, procedimentos de microfabricação alternativos, que oferecem maior simplicidade e menor custo, têm sido propostos pelo emprego de substratos poliméricos, destacando-se a moldagem por pressão à quente²⁵ e ablação à laser²⁶.

1.2.1.2. Moldagem por pressão a quente

No processo de moldagem por pressão à quente, um molde rígido contendo o “*layout*” dos canais em relevo é pressionado sobre a superfície do substrato e o conjunto submetido à aquecimento até a temperatura próxima da transição vítrea (T_g) do material. A aplicação de calor possibilita que o substrato antes rígido torne-se flexível, e o material adquira o formato do padrão (molde). Ao fim, o conjunto é resfriado e desmoldado. A ilustração do processo pode ser visualizada na Figura 4.

O molde normalmente empregado é fabricado em vidro, silício ou metal, utilizando-se as técnicas clássicas de fotolitografia. Em virtude da maior resistência mecânica e durabilidade destes moldes, é possível a modelagem do substrato por meio do uso de maior pressão e baixas temperaturas, uma vez que o calor pode ocasionar pequenas deformações no perfil dos canais. Uma alternativa simples e de baixo custo é o emprego de fio metálico, com poucos micrometros de diâmetro. Neste caso, a prensagem ocorre posicionando-se o molde entre o substrato e uma placa de vidro, em uma configuração “sanduíche”.

Algumas limitações para o processo de moldagem à quente são observadas, especialmente quanto à replicação dos canais gravados. Pequenas variações na pressão e temperatura aplicadas de um processo a outro promovem alterações no perfil dos canais, ainda que uma melhoria possa ser observada pelo emprego de moldes desenvolvidos a partir das técnicas fotolitográficas. A aplicação de calor ainda restringe a técnica ao emprego de substratos poliméricos rígidos, como por exemplo, o poli(metilmetacrilato) (PMMA) e o poli(carbonato) (PC). Apesar disto, o menor custo e a simplicidade do processo tornam esta técnica adequada a reprodução de sistemas em larga escala.

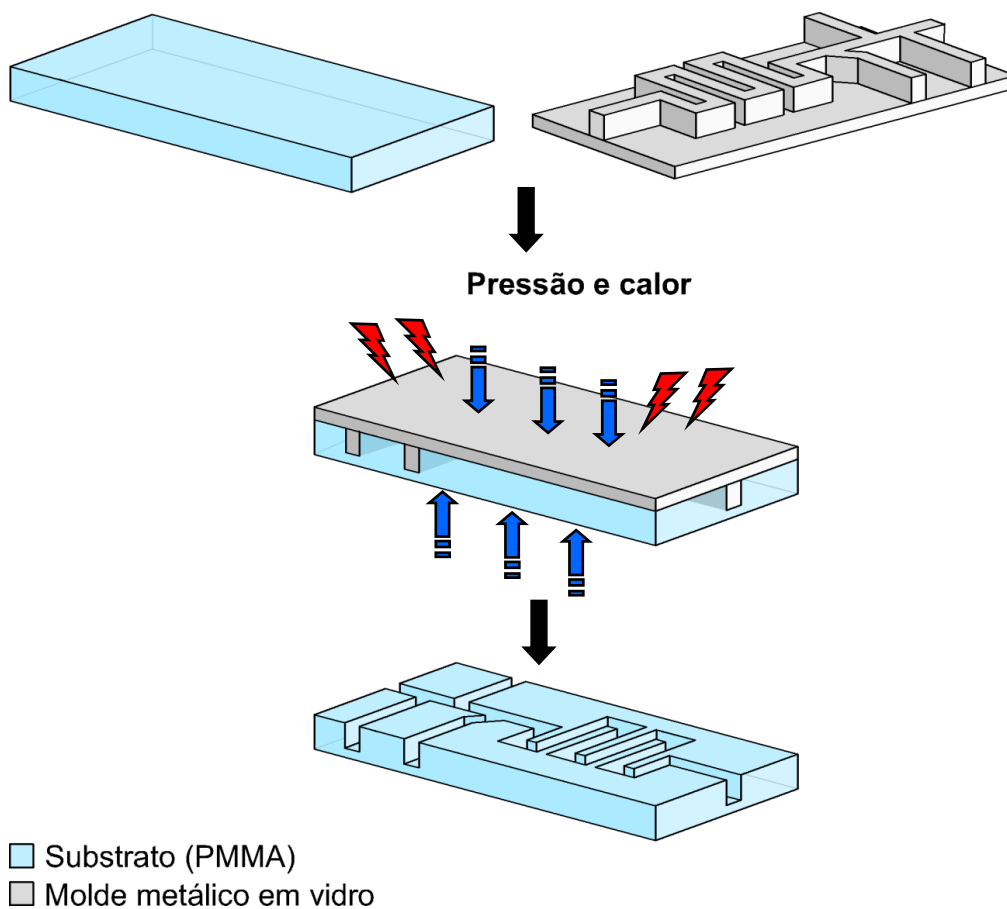


Figura 4. Etapas principais do processo de moldagem por pressão a quente.

1.2.1.3. Ablação à laser

No processo desenvolvido por ablação à laser, a gravação dos microcanais sobre a superfície de um substrato polimérico é realizada pela incidência da radiação de um laser pulsado em regiões específicas do material. A alta energia incidente promove o aumento das temperaturas locais e a geração de ondas de choque, que causam pequenas explosões na superfície do material e a liberação de produtos gasosos (CO_2 , CO), provenientes da degradação do polímero. Conforme mostrado na Figura 5, duas estratégias podem ser utilizadas nesse processo, o primeiro com o uso de uma máscara metálica²⁷, também desenvolvida por processos fotolitográficos, e a segunda pela substituição da máscara por uma plataforma móvel computadorizada. Neste caso, a gravação dos canais é conduzida pelo movimento bidimensional (x/y) da plataforma sob a incidência de um laser fixo pulsado na superfície do

material. Esta estratégia é a mais utilizada para esta técnica, pois a eliminação da máscara torna o processo menos oneroso e complexo.

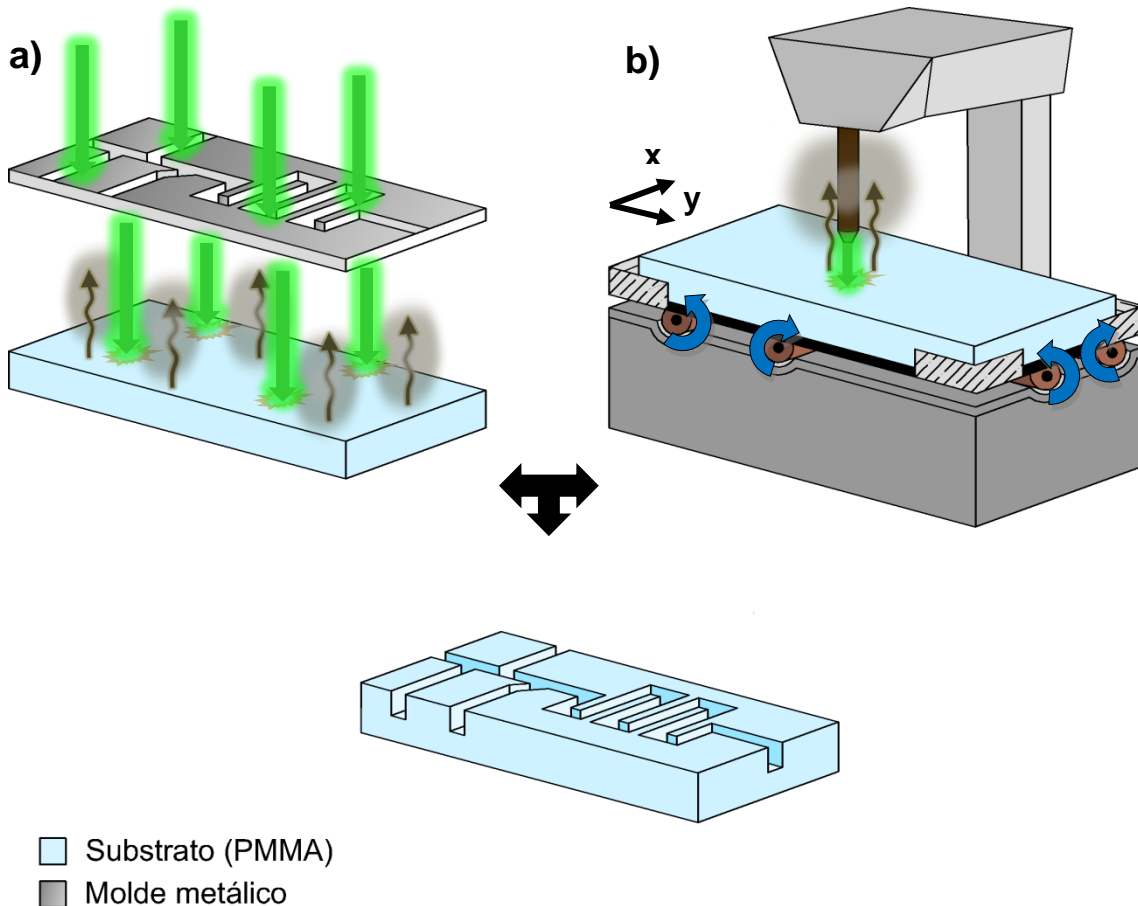


Figura 5. Ilustração do processo de ablação à laser por máscara metálica (a) e plotagem bidimensional (b). As setas em azul indicam os possíveis sentidos de rotação dos cilindros.

A profundidade dos canais obtidos em geral é da ordem de micrometros e é definida por parâmetros como a potência da radiação, o tempo de exposição, a taxa de pulsos e a absorvância do material. O rigoroso controle destas propriedades é necessário para a obtenção de canais com boa resolução, pois o aumento excessivo das temperaturas em regiões do substrato próximas ao laser incidido promovem alterações químicas na superfície do material e dificuldades no processo de selagem. A principal vantagem desta técnica é que pode ser aplicada à diversos substratos poliméricos, como por exemplo o PMMA, o poli(etileno) (PE), o PC, e o poli(tetrafluoretileno) (PTFE).

1.2.1.4. Outras alternativas

Embora as técnicas mencionadas sejam aplicadas com sucesso na obtenção de estruturas microfluídicas com alta definição a partir de diversos substratos poliméricos, o emprego de moldes e máscaras confeccionados a partir da fotolitografia com corrosão por via úmida ou seca ainda encarece a produção em pequena escala e é um fator limitante quanto à sua implementação por pesquisadores de todo o país. Os custos para a instalação de um Laboratório de Microfabricação para a produção de μ FA pode ser excessivamente elevado. Desse modo, algumas tecnologias economicamente mais atrativas têm sido sugeridas na literatura. Uma delas é a utilização de *toners* para impressão à laser no desenvolvimento de microsistemas fluídicos destinados à separações eletroforéticas. Jesus *et. al.*²⁸ utilizaram a transferência térmica pela aplicação de decalques impressos em uma lâmina de papel encerado (*wax*) na superfície de um substrato de vidro para o delineamento de microcanais. Liu *et. al.*²⁹ empregaram a impressão direta pela deposição seletiva de camadas de *toner* em folhas de poliéster (transparência de retroprojeção) com imagens especulares posteriormente laminadas.

A tecnologia LTCC³⁰, do inglês “*Low Temperature Co-Fired Ceramics*”, tem sido utilizada no desenvolvimento de estruturas microfluídicas tridimensionais em cerâmica verde. Isso é especialmente interessante quando é desejada a integração de componentes eletrônicos em um único dispositivo. Nesse processo em multicamadas, os canais são obtidos por meio de cortes precisos através de um laser de infravermelho em placas do substrato flexível. Após o alinhamento das camadas, o conjunto é serigrafado (rampa temperatura até 1000°) tornando-se rígido e permitindo a selagem das estruturas.

A litografia macia³¹ e a fotolitografia profunda no ultravioleta também são opções viáveis para a microfabricação de dispositivos que suportam o bombeamento de soluções. Na primeira, um molde negativo é confeccionado pela exposição da radiação UV sobre um fotorresiste por intermédio de uma máscara contendo a imagem da estrutura microfluídica. Ao fim, o substrato líquido é despejado sobre o molde formado, termo curado e desmoldado. Esse

processo foi utilizado por Park, Fujita e Kim³² sob o resiste de SU-8, empregando-se um molde flexível de poli(dimetilsiloxano) PDMS e como máscara uma lâmina de Cr/Au. Apesar de similaridades entre esta técnica e o processo de moldagem à quente, no presente método são utilizados moldes poliméricos de baixo custo, ao contrário, daqueles obtidos por processo fotolitográficos convencionais. Além disso, são utilizados pré-polímeros líquidos como substrato. No Brasil, a fotolitografia profunda no UV é também uma alternativa que vem sendo explorada por alguns autores no desenvolvimento de μ FA³³⁻³⁵. Por meio desta técnica, Monte-Filho³⁶ *et. al.* desenvolveram um μ FBA (micro-flow-batch analyzer) a partir do substrato de poli(uretana acrilato) (PU) para a determinação fotométrica de Fe^{+2} em amostras de suplementos oral. Os autores destacaram a rapidez, simplicidade e baixo custo do processo empregado na gravação dos canais. Considerando estes aspectos dentre outros vantajosos (boa reprodutibilidade, canais pequeno tamanho), a fotolitografia profunda no UV foi a técnica selecionada no presente trabalho para a fabricação de todos os μ FIA utilizados na determinação dos íons nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), e fosfato (PO_4^{-3}).

1.2.2. Técnicas de selagem para microssistemas

Por meio das técnicas anteriormente descritas, observa-se que a gravação de microcanais ao longo de um substrato de interesse pode ser obtida por diferentes métodos e materiais, que variam em custo e complexidade. Contudo, para garantir a adequada movimentação de fluidos ao longo desses sistemas, é necessário que a selagem da placa que contém os canais e a sua cobertura possibilite a perfeita aderência das superfícies e a não deformidade no aspecto dos canais. Para isso, a região de união das lâminas deve ser plana, pouco rugosa, e isenta de qualquer material particulado, o que requer a limpeza rigorosa da superfície das estruturas. No mais, o processo idealmente deve ser realizado à baixas temperaturas. Por esses fatores, esta é uma etapa crítica no processo de microfabricação. Algumas das técnicas mais usuais são descritas a seguir.

1.2.2.1. Selagem térmica

A selagem térmica³⁷ é uma técnica normalmente empregada para a vedação de dispositivos microfluídicos obtidos pelas técnicas de fotolitografia, a partir de substratos de vidro, silício e quartzo, podendo ainda ser empregada à substratos poliméricos termoplásticos como o PMMA. Nesse processo, as placas contendo as microestruturas gravadas e a sua cobertura são colocadas em contato e submetidas a altas temperaturas (acima de 500 °C para o vidro, por exemplo) o que ocasiona na formação de ligações covalentes entre as lâminas. Apesar do processo simples, o emprego de temperaturas tão elevadas pode ocasionar deformações no perfil dos canais e ainda danificar de forma irreversível elementos sensores e outras unidades físicas integradas ao dispositivo.

1.2.2.2. Selagem anódica

Um processo alternativo que se utiliza de menores temperaturas é selagem anódica³⁸. A partir desta técnica, temperaturas não tão elevadas (150 °C a 500 °C) são aplicadas simultaneamente a uma grande diferença de potencial (200 a 1500 V) entre as placas. Apesar de uma menor deformação dos microcanais gravados no substrato, a aplicação desta técnica é limitada aos substratos de vidro, quartzo e silício.

1.2.2.3. Selagem por ativação da superfície

Em substratos poliméricos, outros métodos podem ser utilizados como a selagem por ativação da superfície³⁹ muito empregada em microssistemas à base de PDMS e o PE. Nesse processo, a superfície das lâminas do substrato é tratada quimicamente, empregando-se usualmente o plasma de oxigênio, para aumentar a sua reatividade, e posteriormente, colocadas em contato. O emprego desta técnica possibilita que as estruturas e componentes microfluídicos sejam preservadas, entretanto, o custo elevado para o tratamento com plasma é um fator limitante. Outro inconveniente é que esse

processo requer o rápido contato entre as placas, de modo que o alinhamento das estruturas e a integração de outros elementos (detectores e unidades de preparo de amostra) são mais laboriosos.

1.2.2.4. Selagem por tratamento com camada intermediária

Na selagem por tratamento com camada intermediária⁴⁰, uma camada fina de um adesivo líquido é aplicada na superfície de uma das lâminas, que em seguida é alinhada com a outra placa. A aplicação de uma pequena pressão é suficiente para a união das superfícies. Esse processo pode ser aplicado à maioria dos substratos poliméricos e o processo é realizado à temperatura ambiente, o que assegura a integridade das estruturas microfluídicas. O inconveniente desta técnica, porém, é que a camada de adesivo residual pode ocasionar a obstrução dos canais.

1.3. Microssistemas de análise em fluxo

Os μ FA têm sido empregados com sucesso em diversas áreas da química analítica, demonstrando um excelente desempenho por meio de determinações com boa frequência analítica, rápido resposta sensorial (detecção) e um pequeno consumo (da ordem de nanolitros à microlitros) de soluções, o que se apresenta ideal na análise de amostras que dispõe de um pequeno volume⁴¹. Adicionalmente, a portabilidade desses dispositivos pode ampliar o seu uso na realização de determinações *in situ* destinadas ao monitoramento, avaliação e investigação de espécies orgânicas e inorgânicas. Todas estas características representam um ganho significativo desses sistemas em relação aos seus antecessores.

Dentre as diversas aplicações desses sistemas, alguns trabalhos descrevem o desenvolvimento de μ FA para a determinação de analitos de interesse ambiental. Em uma publicação recente, Ibarlucea *et. al.*⁴² utilizaram um microssistema fluídico confeccionado em PDMS-vidro pela técnica de litografia macia para a determinação fotométrica de Hg^{+2} e Pb^{+2} em amostras de água. O dispositivo foi selado por ativação da superfície com plasma de CO_2

e os canais resultantes apresentaram um volume total de 5,34 μL . Para a maior sensibilidade do método, os autores utilizaram uma célula de fluxo fotométrica composta por múltiplos anéis refletores dispostos em formato pentagonal que apresentou um caminho óptico 14,2 mm. Com esse sistema, o tamanho reduzido do dispositivo não foi comprometido e limites de detecção (LOD, do inglês “*limit of detection*”) de 0,49 mg L^{-1} e 0,87 mg L^{-1} foram obtidos para Hg^{+2} e Pb^{+2} , respectivamente.

Lefèvre *et. al.*⁴³ empregaram a mesma técnica de fabricação e substratos no desenvolvimento de um μFA para a determinação do herbicida Diuron (*Chlamydomonas reinhardtii*) por fluorescência induzida à laser (LIF, do inglês “*Laser Induced Fluorescence*”) em amostras de algas verdes. O dispositivo foi constituído por 16 reservatórios dedicados as amostras (3 x 4 mm) e apresentou canais com 1 mm de profundidade. Com o objetivo de permitir a determinação simultânea do analito nos diferentes compartimentos das amostras, dois conjuntos de componentes ópticos constituídos por diodos emissores de luz (LED, do inglês “*Light Emitting Diode*”) e fotodiodos (detector), foram confeccionados cada um, sobre uma lâmina de vidro (100 μm de espessura). Ao final, a estrutura em PDMS contendo os canais foi alinhada entre o arranjo de componentes eletrônicos, de maneira semelhante à um “sanduíche” (vidro-PDMS-vidro). O conjunto total apresentou 4 mm de espessura e uma área de aproximadamente 5 cm^2 . De acordo com os autores, o sensor desenvolvido possibilitou rápidas determinações (1,2 s) e os resultados demonstraram uma boa sensibilidade do método para a determinação do analito em concentrações inferiores a 7,5 nmol L^{-1} .

Um dispositivo em PMMA⁴⁴ obtido a partir da técnica de ablação à laser foi ainda utilizado na determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em amostras de água por quimiluminescência. Os canais microfluídicos apresentaram 100 μm de profundidade e 200 μm de largura, o que possibilitou um consumo bastante reduzido das soluções de reagentes (33 μL). Com este sistema, os autores realizaram rápidas determinações (40 s) com resultados analíticos precisos (desvios menores que 3%) e baixos erros relativos. O LOD de 100 mg L^{-1} foi estimado para concentrações na faixa linear de 270 a 1×10^3 mg L^{-1} .

A utilização dos μFA em determinações multielementares para análises

clínicas, farmacêuticas e proteômicas é bastante promissora e tem sido ampliada por meio do emprego de separações eletroforéticas em microdispositivos de análise. Como exemplo, Li *et. al.*⁴⁵ realizaram a determinação simultânea de cinco aminas aromáticas cíclicas (benzidina, p-cloroanilina, 4,4-diaminodifenilmetano, 2,4-dimetilanilinaeo-toluidina) em amostras de água residual de indústria têxtil por LIF. O microchip empregado foi confeccionado por meio da técnica de moldagem por pressão à quente e um material alternativo foi utilizado como substrato a partir do copolímero de olefina cíclica (COC). Os canais gravados sobre a superfície do material apresentaram um “*layout*” em cruz com 80 μm de diâmetro interno. Os autores demonstraram a separação eficiente de todos os compostos em apenas 90 s para uma faixa de concentração com valores de 0,003 até 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A separação e a determinação por LIF de cinco β -casomorfina em amostras de queijo foi ainda realizada por um microdispositivo fluídico em vidro. A técnica de fabricação utilizada foi a corrosão por via úmida e os canais em “*layout*” cruzado apresentaram 100 μm de largura e 25 μm de profundidade. A separação eletroforética dos analitos foi realizada em 30 minutos e os resultados analíticos demonstraram a boa precisão (desvios menores que 6%) e exatidão (recuperações entre 89 –109%) do método e um LOD estimado na faixa 18,7 – 75,1 nmol L^{-1} .

Reschke *et. al.*⁴⁶ desenvolveram um microdispositivo para a separação eletroforética de uma mistura contendo proteínas e peptídeos aniônicos e catiônicos por LIF. A técnica de fabricação empregada foi a fotolitografia por corrosão úmida sob um substrato de vidro e os canais resultantes apresentaram 100 μm de profundidade e 50 μm de largura. Como o objetivo de reduzir o fluxo e permitir a extração dos analitos, foi confeccionado no interior do canal de separação um anteparo composto por dez estruturas retangulares com 5 μm de largura e 40 μm de profundidade cada uma, dispostas de forma paralela e separadas por 10 μm de distância. Segundo os autores, esta estratégia possibilitou a extração eficiente (87%) dos analitos em menos de um minuto.

Uma nova proposta foi apresentada por Viefhues, Regtmeier e Anselmetti⁴⁷ para a separação. dielectroforética de complexos de ácido desoxirribonucleico (DNA) por LIF. A litografia macia foi utilizada na fabricação

do dispositivo em PDMS e os canais resultantes apresentaram 200 μm de largura e 5,5 μm de altura. Um anteparo em formato topológico semicircular de 100 μm de largura e 180 nm de altura foi posicionado no interior do canal de separação para a redução no fluxo das soluções. A aplicação de um campo elétrico nessa região possibilitou a separação das diferentes moléculas por deflecção. Com este método, os autores relataram a separação de até quatro fragmentos de DNA em menos de 1 minuto com boa sensibilidade e resolução satisfatória.

1.4. Preparo de amostra em microssistemas de análise em fluxo.

Atualmente, um dos principais desafios no desenvolvimento de microssistemas é a integração de unidades físicas de preparo de amostra baseadas em membranas, colunas, câmaras em gel e filtros, que é dificultado tanto pelo tamanho reduzido dos μ FA, quanto pela afinidade química do substrato com outros materiais de diferente composição. A realização de procedimentos de extração, pré-concentração, redução e separação de analitos adicionalmente aqueles usuais (etapas de reação e detecção), amplia a aplicação desses dispositivos miniaturizados aproximando o seu desempenho ao conceito de μ TAS.

Na literatura, algumas estratégias têm sido apresentadas pelo uso de membranas poliméricas em sistemas miniaturizados. Um microdispositivo fluídico apresentando uma unidade de difusão gasosa foi proposto por Zhu *et al.*⁴⁸ na separação em linha de compostos orgânicos voláteis (metanol, tolueno e 1,2 dicloroetano) dissolvidos em água. A moldagem por pressão à quente foi empregada para a gravação dos microcanais em duas placas separadas de PC através de um molde rígido de silício e os canais resultantes apresentaram 100 μ m de profundidade. Um segundo canal em forma de “U” foi ainda gravado no centro do substrato para permitir a integração da unidade de difusão gasosa. Para isso, uma membrana hidrofóbica de PTFE com 50 μ m de espessura e tamanho de poros médio de 0,22 μ m foi fixada termicamente entre as duas placas justapostas de PC, tendo-se o cuidado de manter os canais alinhados. A selagem do conjunto foi obtida por aplicação de solvente e finalizada por altas temperaturas. A integração da membrana ao μ FA e a extração dos analitos foram realizadas com sucesso, embora, a determinação dos compostos voláteis orgânicos em concentrações na faixa de 10 a 100 mg L⁻¹ tenham demonstrado altos erros relativos e baixa sensibilidade do detector. De acordo com os autores, essa limitação está relacionada a rápidas variações de temperatura e massa no filme sensor.

O uso de gel na purificação de proteomas tem sido também relatado em microdispositivos que empregam o fluxo eletrosmótico. Lin *et al.*⁴⁹ realizaram a

extração, digestão e separação de onze fragmentos de DNA por meio de um chip microfluídico apresentando plataformas individuais dedicadas ao tratamento da amostra e a separação dos analitos. Para isso, os autores construíram um módulo miniaturizado em vidro equipado com bobina reacional e câmaras preenchidas com gel. Este primeiro módulo foi acoplado à um segundo, também miniaturizado, fabricado em PMMA, no qual o procedimento de separação por eletroforese e detecção por LIF foram realizados. A gravação dos microcanais nos substratos de vidro e PMMA foram obtidos pelas técnicas de corrosão por via úmida e moldagem à quente, e as estruturas resultantes apresentaram 40 μm e 100 μm de profundidade, respectivamente. Ao final, as plataformas foram devidamente alinhadas e seladas por aplicação térmica. A separação de todos os fragmentos de DNA foi obtida em menos de 2,0 minutos com resolução satisfatória, posteriormente a digestão enzimática da molécula por 22 minutos.

O emprego de colunas de extração em microdispositivos fluídicos de análise tem sido aplicado em análises clínicas e ambientais. Uma das estratégias usuais é a imobilização de microbeads (nanopartículas esféricas) com superfície ativada no interior de um canal microfluídico através de um anteparo sólido (por exemplo, um filtro) ou ímã, a fim de que estas partículas possam interagir com o analito e reagentes *in column*. Esse método permite que com a redução na eficiência de extração dos analitos pela coluna, esta possa ser substituída ou ainda, reativada. Como exemplo, Martínez *et. al.*⁵⁰ utilizaram nanopartículas magnéticas (microbeads) com superfície modificada para a pré-concentração e determinação do hormônio etinilestradiol (EE2) por meio de um microdispositivo confeccionado em Plexiglass. As microesferas foram colocadas em contato com as amostras externamente ao microssistema e em seguida imobilizadas no interior do canal central do microdispositivo, onde foram procedidas etapas de reação para a detecção do analito. Segundo os autores, a determinação do hormônio em seis amostras de água superficial apresentou ainda uma boa correlação ($R = 0,998$) para a faixa linear de 0,01 – 0,06 ng L^{-1} com LOD estimado em 5 ng L^{-1} e precisão de 4,1%. A frequência analítica foi de aproximadamente 2 amostras h^{-1} e a boa exatidão dos resultados foi confirmada pela comparação àqueles obtidos por um método de referência.

Chen *et. al.*⁵¹ realizaram ainda a determinação do metabólito 7-aminoclonazepam em amostras de urina. Processos fotolitográficos foram empregados na confecção do dispositivo de PMMA e os canais em cruz apresentaram 200 μm de profundidade e 100 μm de largura. Neste trabalho, os autores realizaram a etapa de pré-concentração do analito por meio de nanopartículas de CdTe com superfície modificada, previamente à sua injeção no sistema. A detecção por LIF do analito imobilizado nas microesferas foi realizada em apenas 1 minuto apresentando boa resolução e sensibilidade. Os resultados demonstraram ainda uma boa precisão (desvios menores que 8 %) e exatidão por meio de recuperações entre 90 e 101%. O LOD de 0,021 ng mL^{-1} foi obtido para a faixa linear de 1,1 ng mL^{-1} a 60,1 ng mL^{-1} .

A separação e pré-concentração de compostos em micro sistemas pode ainda ser obtida por meio de colunas monolíticas. Neste caso, o preparo da fase sólida é realizado em linha no próprio dispositivo, o que implica na inutilização de todo o sistema no caso da perda irreversível da fase estacionária. Cakal *et. al.*⁵² desenvolveram um microdispositivo de análise para a extração, separação e determinação de catecolaminas (dopamina, epinefrina, norepinefrina) por LIF. A técnica de fotolitografia por corrosão via úmida foi empregada em um substrato de borossilicato e os canais em “*layout*” cruzado apresentaram 50 μm de profundidade e 150 μm de largura. Um disco (2,1 mm de diâmetro e 0,05 de profundidade) contendo fase sólida monolítica preparada a partir de uma mistura dos monômeros dimetacrilato de etilenoglicol e ácido 4-vinil fenilborônico foi acoplado entre os canais de amostragem e separação para a pré-concentração dos analitos. A extração dos analitos em concentrações 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não foi tão eficiente para a noreprina e a frequência analítica obtida foi de aproximadamente 2 amostras h^{-1} .

Uma coluna monolítica foi também utilizada para a separação em linha de aminoácidos e proteínas em um μFA por detecção fluorimétrica⁵³. O microdispositivo foi fabricado empregando-se a técnica híbrida de fotolitografia e moldagem por pressão à quente sob um substrato de COC. A selagem das estruturas foi realizada por aplicação térmica e os canais apresentaram 15 μm de profundidade e 50 μm de largura. A fase monolítica de butilmetacrilato foi preparada no interior do canal de extração e apresentou 2 mm de comprimento. Os resultados para a eluição dos analitos demonstrou ser pouco

eficiente para os aminoácidos (ácido aspártico, glicina e fenilalanina) em concentrações de 100 ng mL^{-1} , entretanto, melhores resultados foram obtidos para as proteínas, o que possibilitou a construção de uma curva de calibração na faixa linear de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ a 100 ng mL^{-1} .

O uso de colunas empacotadas na derivatização em linha de cátions e ânions em μFA tem sido pouco relatado na literatura. Essa estratégia é especialmente importante para a determinação fotométrica de espécies de interesse ambiental tal como o NO_3^- . Como exemplo, Petsul, Greenway e Haswel⁵⁴ utilizaram uma coluna de cádmio integrada à um microssistema de análise por injeção em fluxo (μFIA) para a redução da espécie NO_3^- à NO_2^- previamente a sua confluência com um reagente cromogênico. Para a integração dessa coluna, partículas de cádmio coperizadas foram misturadas a uma suspensão de sílica microporosa e a solução resultante despejada no interior do canal de injeção da amostra. A polimerização deste líquido foi obtida submetendo o sistema à aquecimento em uma estufa a 100°C por 1 h.

No presente trabalho, uma estratégia alternativa mais simples, rápida e de baixo custo é apresentada para a integração de uma coluna redutora de cádmio à um μFIA , utilizada na derivatização em linha de NO_3^- à NO_2^- . Considerando ainda a importância de compostos iônicos nitrogenados⁵⁵ e fosfatados⁵⁶ como indicadores de poluição ambiental em águas doces, uma vez que estas espécies estão diretamente relacionadas ao processo de eutrofização de aquíferos, outros dois μFIA sem coluna foram empregados na determinação dos NO_2^- e PO_4^{3-} . Nesse ponto, deve ser enfatizado que o mesmo método espectrofotométrico é utilizado na determinação de NO_2^- e NO_3^- , todavia este último devendo sofrer prévia redução uma coluna de cádmio. Considerando amostras de água doce que apresentam as duas espécies, a determinação individual de NO_2^- somente é possível por um μFIA sem coluna, enquanto, que um μFIA com coluna redutora de cádmio será utilizado na determinação nitrogênio total (NO_3^- na sua forma reduzida e NO_2^- originalmente presente na amostra). A avaliação desses microssistemas quanto à sua aplicação em amostras de águas superficiais serão apresentadas e discutidas nas próximas seções.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um μ FIA à base de Uretana-Acrilato com coluna redutora integrada para a determinação de NO_3^- , além de outros dois dispositivos para a determinação de NO_2^- e PO_4^{3-} . Foi também objetivo do trabalho avaliar o desempenho analítico dos dispositivos propostos na determinação destas espécies químicas em amostras de água *in natura* empregando-se a detecção fotométrica.

3. Parte experimental

3.1. Microfabricação por Fotolitografia profunda no UV

O processo de microfabricação empregado neste trabalho para o desenvolvimento dos μ FIA foi a fotolitografia profunda no UV³³. Nesta técnica, uma resina fotopolimerizável (fotorresiste) à base de Uretana-Acrilato (UA) foi empregada como substrato e um procedimento simples foi utilizado para a gravação dos canais e a sua selagem.

No mercado há uma grande variedade de resinas à base de UA que apresentam diferentes teores de solventes e monômeros, o que afeta o tempo de polimerização e o aspecto do produto final. Neste sentido, optou-se por um fotorresiste comercial G-50 LBS, o qual é fornecido pela empresa Carimbo Medeiros LTDA⁵⁷ e que foi utilizada com sucesso no trabalho de Silva⁵⁸. É importante destacar que a composição química dos resistes é uma informação de sigilo industrial e por isso, não é informado pela empresa fornecedora, entretanto, o processo genérico de produção do oligômero de poliuretana acrilato é descrito por alguns trabalhos na literatura^{59, 60}.

Dentre as qualidades dos substratos desenvolvidos a partir dos polímeros de UA, destacam-se o seu baixo custo aliado às características físicas do material como o seu aspecto translúcido, a sua capacidade elastomérica (maleabilidade), a boa resistência à choque mecânicos e ao ataque de substâncias químicas⁶¹, atributos que proporcionam uma maior vida útil aos microdispositivos.

Considerando todos estes aspectos, a utilização de fotorresistes à base de UA como substrato apresenta-se como uma alternativa promissora no desenvolvimento de μ FIA de baixo custo e fácil construção. O processo de fotolitografia profunda no UV utilizada para a fabricação dos μ FIA objetos deste trabalho é apresentado a seguir. Esta técnica já foi extensivamente descrita em trabalhos precedentes³³⁻³⁵ onde um maior detalhamento sobre o seu desenvolvimento pode ser encontrado. Apesar disto, para facilitar o entendimento do leitor, serão descritas brevemente algumas das etapas desse processo por meio de tópicos:

- 1ª) Construção dos moldes fotolitográficos.
- 2ª) Gravação e revelação dos canais.
- 3ª) Selagem das estruturas.

1ª Etapa: Construção dos moldes fotolitográficos

Primeiramente, um “*layout*” bidimensional da estrutura microfluídica desejada foi projetada a partir do software gráfico AutoCAD 2002 (Autodesk®). Este desenho definia o tamanho dos canais e o arranjo de todos os componentes efetivamente empregados no microssistema como o “*plug*” de amostragem, bobina de reação, confluência e sistema de detecção. Em seguida, a máscara fotolitográfica foi obtida pela impressão deste desenho em uma transparência (PLTA4-Abezeta), utilizando uma impressora à laser (P2055dn - HP LaserJet), com resolução de 1200 pontos polegadas. Na Figura 6, é mostrado o exemplo de um “*layout*” impresso (máscara) empregado para a fabricação de um microssistema fluídico.

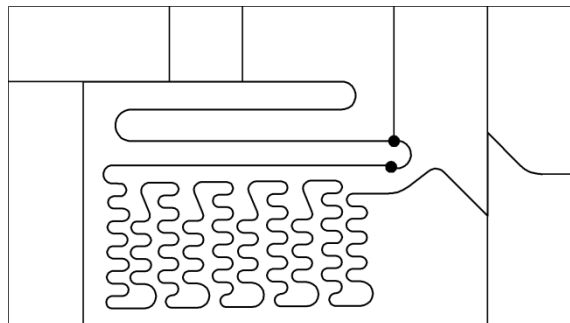


Figura 6. Exemplo de uma máscara fotolitográfica empregada no processo de microfabricação.

Para finalizar a construção do molde, a máscara (transparência) foi devidamente unida com auxílio de fita adesiva dupla face, à uma placa de acrílico e à uma moldura de borracha (Figura 7), ambas com 2,0 mm de espessura, permitindo o depósito do fotorresiste (líquido) previamente à polimerização. Ressalta-se que na montagem do molde, a face impressa da

máscara ficou voltada para a placa de acrílico, de modo a garantir a integridade do “layout” e a reutilização do molde após a sua limpeza.

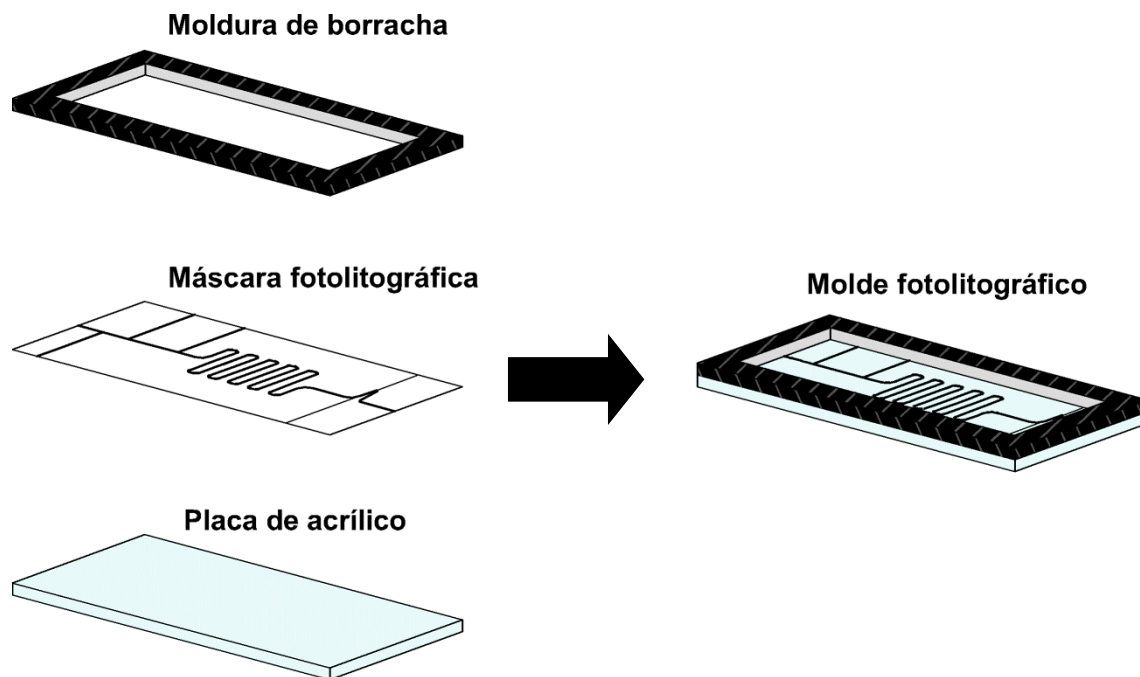


Figura 7. Construção do molde fotolitográfico empregado no processo de microfabricação.

2ª. Etapa: Gravação e Revelação dos Canais

As principais etapas do processo de microgravação das estruturas microfluídicas sobre o substrato é ilustrado na Figura 8. Primeiramente, o resiste líquido foi depositado de maneira contínua e uniforme sobre o molde fotolitográfico até o preenchimento do volume definido pela moldura de borracha (I). Esse cuidado é importante para prevenir a formação de bolhas que poderiam interferir na formação dos canais e na polimerização uniforme do substrato. Para o fechamento dessa estrutura, uma segunda placa de acrílico, com as mesmas dimensões da primeira, foi colocada lentamente sobre o resiste para o fechamento do conjunto (II). Em seguida, as extremidades da estrutura foram fixadas com grampos apropriados, sendo eliminados eventuais excessos de resiste das extremidades com auxílio de papel absorvente.

Para efetuar a gravação dos canais, o resiste que preenche o molde fotolitográfico foi exposto à radiação UV-A (radiação ultravioleta do tipo A) em

duas etapas. Na primeira etapa (III), utilizada para a formação da base dos canais, a parte inferior do conjunto foi exposta a radiação UV-A por 120 s. Em seguida, a superfície oposta ao da primeira etapa foi exposta por 20 segundos (IV), permitindo que apenas as regiões não protegidas pela máscara fotolitográfica fossem polimerizadas, resultando na gravação dos microcanais sobre o substrato(V).

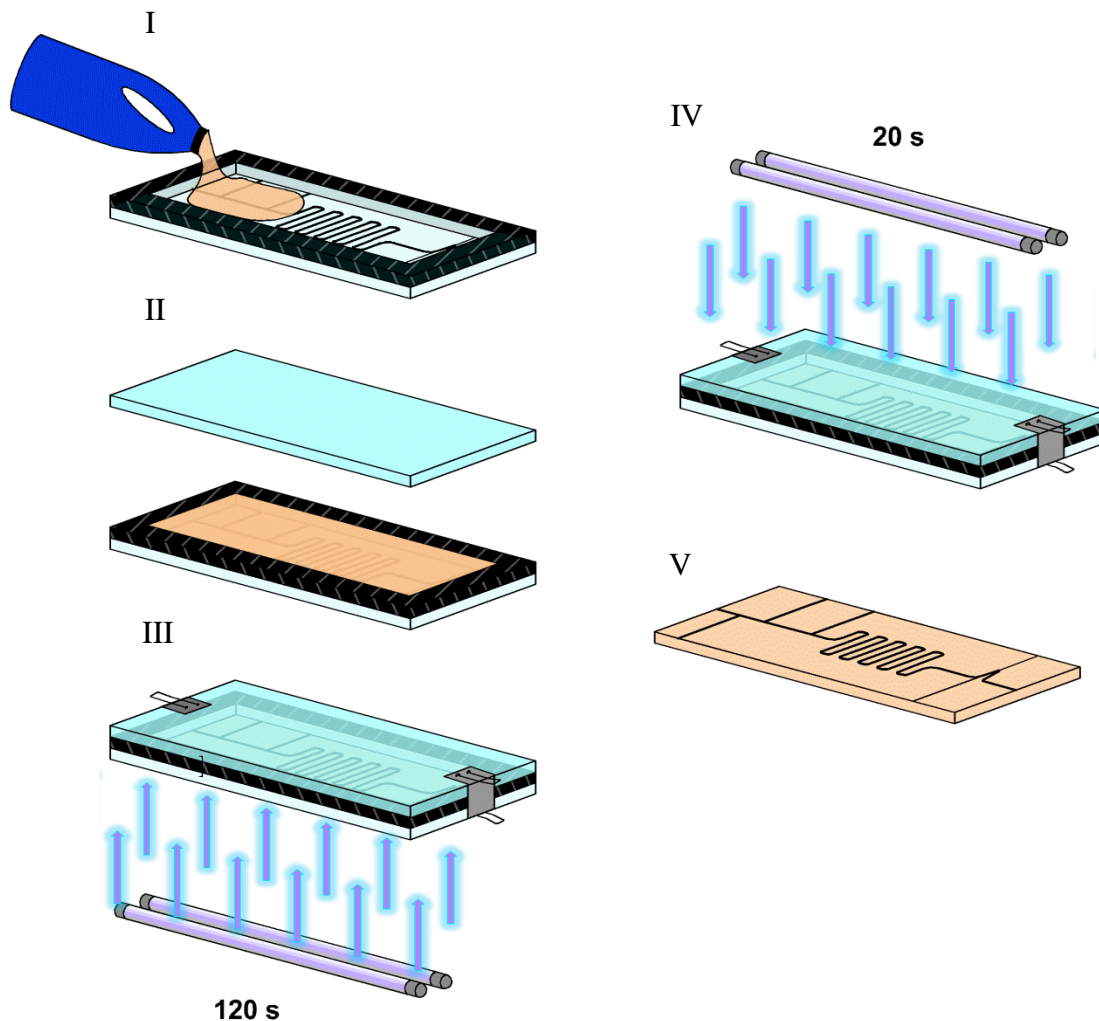


Figura 8. Etapas do processo de gravação por fotolitografia profunda no ultravioleta.

Esse processo de microfabricação foi realizado a partir de uma expositora ultravioleta construída no próprio laboratório. Para isso, duas lâmpadas da marca Philips modelo TL-D 15 W Actinic BL foram utilizadas como fonte de radiação UV-A ($\lambda_{\text{Max}} = 380 \text{ nm}$) e um suporte vazado de madeira foi empregado para fixar o molde fotolitográfico à 10 cm das lâmpadas. Uma fotografia desta expositora é mostrada na Figura 9 e maiores detalhes sobre a sua montagem

está descrito na literatura⁶².

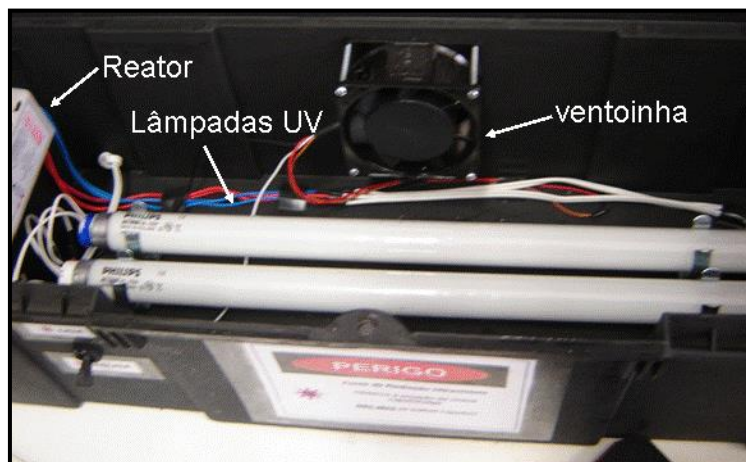


Figura 9. Fotografia de uma fotoexpositora *home-made*. Foto: Fonseca⁶².

Após a etapa de exposição, foi realizada a revelação dos canais gravados, por meio da eliminação do resiste não polimerizado das regiões que foram protegidas pela máscara. Para isto, a placa polimérica recém-gravada foi retirada cuidadosamente do molde e sonicada por 10 minutos em um banho ultrassônico (USC 1400, Unique) com solução aquosa de detergente comercial 25 % (v/v). Ao término desta etapa, o resiste residual ainda presente sobre a placa polimerizada foi removida com o auxílio de um pincel de cerdas macias e lavada com água de torneira seguida de etanol comercial em abundância. Um secador de cabelos foi utilizado para a secagem da estrutura, que foi em seguida acondicionada em um reservatório de plástico fechado para que partículas de poeira não fossem agregadas a sua superfície. Neste ponto, a estrutura estava pronta para a realização do procedimento de selagem.

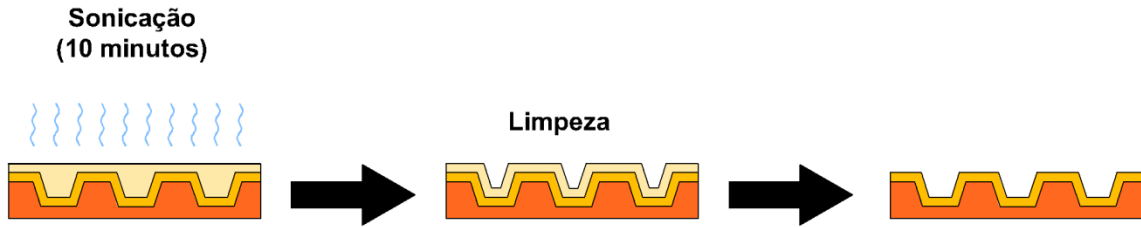
3ª. Etapa: Procedimento de selagem das estruturas:

A etapa de selagem utilizada neste trabalho consiste inicialmente no fechamento das estruturas microfluídicas do substrato com uma cobertura do próprio resiste. Para isso, uma placa polimérica plana foi desenvolvida seguindo as etapas descritas pela Figura 8, com algumas modificações. Neste procedimento, o molde sem a máscara fotolitográfica foi utilizado para a deposição do fotorresiste, o qual foi exposto à radiação UV-A por apenas um de seus lados por 3 minutos. Em seguida, a superfície não exposta da cobertura formada foi lavada diretamente com detergente, seguida de água e etanol comercial em abundância. Ao fim, a placa de cobertura foi seca e acondicionada em um recipiente fechado para prevenir a aglomeração de partículas sólidas (poeira).

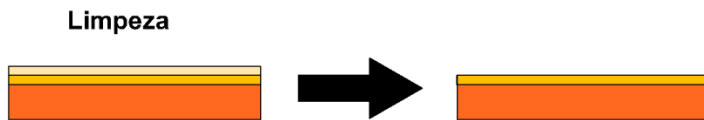
Para a união das estruturas formadas pelos processos descritos anteriormente, uma fina camada adesiva do resiste não polimerizado é necessária para garantir a perfeita adesão das superfícies colocadas em contato. Para isso, os tempos de exposição utilizados neste trabalho foram otimizados de modo a permitir a formação de um filme adesivo com consistência apropriada sobre a superfície das placas do substrato. As principais etapas desse processo são mostradas na Figura 10.

Finalizadas estas etapas, a placa contendo os canais gravados e a sua cobertura foram cuidadosamente unidas manualmente, e o conjunto final exposto à radiação UV-A por 10 minutos, garantindo a selagem irreversível das estruturas. As etapas empregadas na selagem das estruturas podem ser visualizadas na Figura 11.

Placa com canais gravados



Placa de cobertura



- Fotorresiste líquido
- Camada de filme adesivo
- Polímero de UA

Figura 10. Esquema da formação da camada de filme adesivo sobre a superfície das placas com os canais e a sua cobertura.

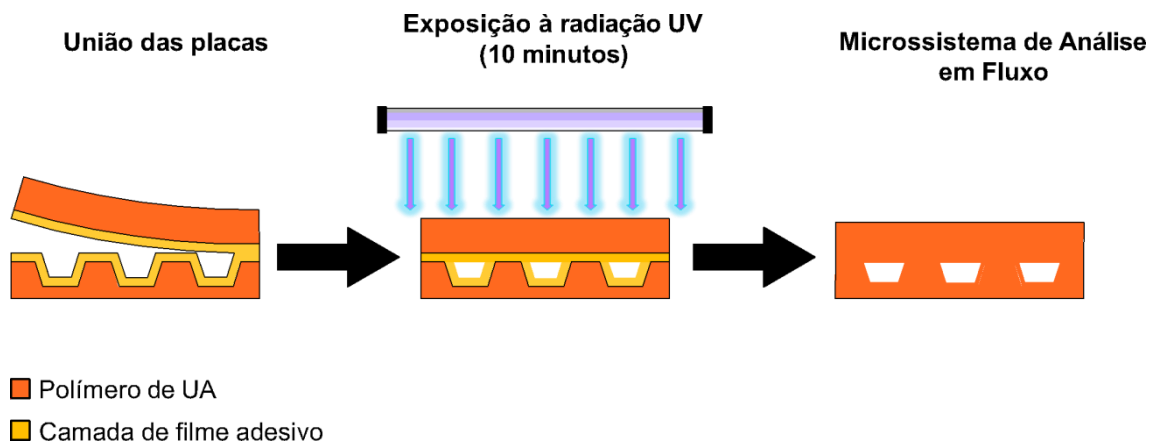


Figura 11. Processo de selagem do microsistema de análise em fluxo.

A partir dos procedimentos descritos anteriormente foram desenvolvidos os μ FIA para a determinação de NO_2^- e NO_3^- em amostras de água. Um primeiro microdispositivo foi construído para permitir a detecção fotométrica de NO_2^- após a sua reação com um reagente cromogênico. De fato, esta reação é bastante sensível e seletiva apenas para NO_2^- , de modo que, para a determinação de NO_3^- , este deve ser convertido a NO_2^- realizando-se a sua redução em uma coluna preenchida com cádmio metálico, previamente à detecção. Nesse sentido, um microdispositivo de configuração microfluídica similar ao anterior, apresentando uma coluna redutora integrada, foi desenvolvido. Este procedimento é descrito no tópico a seguir (3.1.1). Os “layouts” dos microdispositivos empregados neste trabalho são mostrados na Figura 12 com a indicação das larguras das linhas impressas na máscara fotolitográfica em milímetros.



Figura 12. “Layouts” dos microdispositivos utilizados na determinação de NO_2^- (A) e NO_3^- (B). Os valores indicados expressam a largura das linhas em milímetros.

Além destes microssistemas, foi construído um terceiro dispositivo para a determinação de PO_4^{3-} também por detecção espectrofotométrica. O “layout” apresentado na Figura 13 foi utilizado na construção desse μ FIA, o qual possibilitou a reação química de formação do complexo azul de molibdênio e a determinação fotométrica do PO_4^{3-} . De fato, testes preliminares demonstraram que para a detecção do sinal analítico por este método era necessário um maior tempo de reação da amostra e reagentes ao longo do percurso analítico. Desse modo, a bobina de reação empregada para este dispositivo apresentou um volume aproximadamente duas vezes maior (82 μL) do que os demais μ FIA (NO_3^- e NO_2^-).

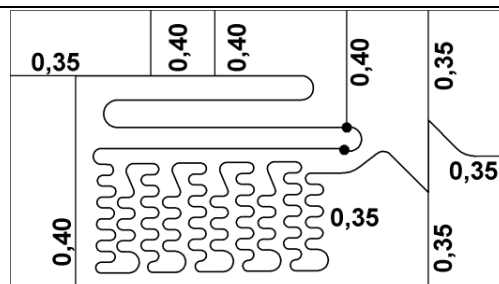


Figura 13. “Layout” do microdispositivo utilizado na determinação do PO_4^{3-} . Os valores indicados expressam a largura das linhas em milímetros.

Aos microdispositivos fluídicos construídos, foram acoplados diretamente aos canais laterais, agulhas hipodérmicas (305111-BDTM) com diâmetro externo de 0,45 mm, permitindo a introdução das soluções de trabalho e reagentes ao microanalisador em fluxo. De um modo semelhante, fibras ópticas plásticas (Toray Europe) com 250 μm de diâmetro foram acoplados nas extremidades da célula integrada de fluxo em formato Z com caminho óptico de 10 mm, utilizada para as determinações fotométricas.

3.1.1. Integração de uma coluna redutora à um microdispositivo fluídico de análise

Este trabalho teve como principal objetivo a integração de uma coluna redutora de cádmio à um μFIA de UA a fim de possibilitar a redução em linha de NO_3^- à NO_2^- e a determinação fotométrica deste íon obtida pela reação de Griess.⁶³ Os procedimentos empregados no seu desenvolvimento serão descritos a seguir.

Inicialmente, grânulos de cádmio (Merck) foram peneirados para a seleção mais fina com tamanhos de 0,5 a 1,0 mm. Cerca de 2,0 g deste material foi transferido para um funil com papel qualitativo e tratado (coperizado) por lavagens sucessivas com 10 mL da solução de ácido clorídrico 10% (v/v) e 10 mL de uma solução de sulfato de cobre 5% (m/v). Este procedimento foi realizado para garantir a eficiência analítica da coluna na redução do NO_3^- , apresentando o cobre um papel importante como catalisador desta reação. Após a secagem à temperatura ambiente, os grânulos coperizados foram armazenados em um recipiente fechado até a sua

integração ao μ FIA.

Um canal dedicado ao empacotamento da coluna de cádmio (1,00 mm x 0,65 mm x 20 mm) foi então construído sobre o substrato a partir de um “*layout*” impresso (máscara fotolitográfica) como mostrado na Figura 14 pelo processo descrito na seção 3.1. Previamente à selagem e com o auxílio de uma pinça metálica, as partículas (grânulos) de cádmio tratadas foram compactadas manualmente neste canal. Alguns fragmentos metálicos (cádmio) residuais aderidos à superfície da placa durante esse processo foram removidos com o auxílio de algodão embebido em álcool comercial para se evitar falhas no processo de selagem. Uma placa de cobertura (plana) desenvolvida pelo mesmo processo descrito na seção 3.1 foi utilizada para o fechamento manual do substrato, e o conjunto foi exposto à radiação UV-A por 10 minutos, garantindo a selagem irreversível da estrutura.

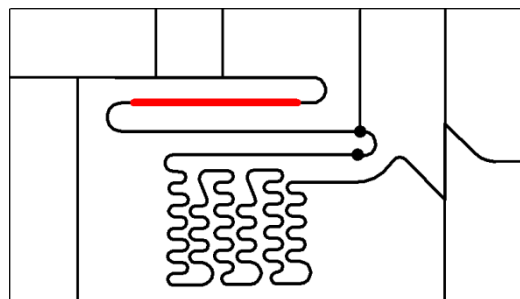


Figura 14. “*Layout*” da estrutura microfluídica contendo o canal (destacado em vermelho) dedicado ao empacotamento de grânulos de cádmio.

3.2. Determinação de Nitrato e Nitrito

3.2.1. Instrumentação

Uma bomba peristáltica (Ismatec-RegloAnalog), equipada com tubos Tygon TM (0,19 mm de diâmetro interno (d.i.) para as soluções de reagentes e 0,38 mm d.i. para a solução de amostra/padrões) foi usada para impulsionar as soluções de reagentes e para permitir a amostragem hidrodinâmica das soluções dos padrões e amostras. Para o direcionamento do fluxo nos microssistemas foram utilizadas válvulas solenóides de três portas (Cole Parmer, NR-225T031). Um software desenvolvido em Microsoft Visual Basic 6.0 foi utilizado para gerenciar todas as operações do microanalisador e a aquisição de dados através de uma interface eletrônica com conversor analógico/digital de 14 bits (National Instruments - NI-USB 6009 A). Um LED ultra brilhante verde (LZ4-00G110 LedEngin, λ max = 545 nm) e um fotodiodo (OPT-101) foram utilizados para realizar as medições fotométricas, empregando um par de fibras ópticas plásticas (250 μ m de diâmetro, Toray Europa) para guiar a radiação da fonte (LED) à CFF (microssistema) e dessa última até o transdutor (fotodiodo).

3.2.2. Reagentes e soluções

Para o preparo de todas as soluções, foram utilizadas água desionizada e reagentes de grau analítico. Uma solução estoque, com concentração de 2000 mg (NO_2^-) L^{-1} (609 mg N L^{-1}), foi preparada pela dissolução de 0,300 g de nitrito de sódio (Vetec), previamente seco na estufa a 150 °C, em cerca de 50 mL de água, completando-se o volume a 100 mL com água. Da mesma maneira, uma solução estoque de 2000 mg (NO_3^-) L^{-1} (452 mg N L^{-1}) foi preparada pela dissolução de 0,326 g de nitrato de potássio (Synth) empregando-se o mesmo volume de água.

Uma solução estoque contendo 5,4 g L^{-1} de cloreto de amônio (NH_4Cl) e 0,4 g L^{-1} de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), foi preparada pela dissolução de 1,34 g de NH_4Cl (Vetec) e 0,100 g de EDTA dissódico (BDH

Chemicals) em 250 mL de água. A solução carregadora foi preparada diluindo-se 50 mL da solução estoque de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ em 50 mL de água destilada.

Soluções padrão contendo $0,23 - 2,26 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_3^-) e $0,06 - 0,37 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_2^-) foram preparadas pela diluição de alíquotas apropriadas das suas respectivas soluções estoque em 50 mL da solução estoque de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ presente em um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água. A solução do reagente colorimétrico contendo $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) e $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de sulfanilamida (SAM) foi preparado dissolvendo-se $0,02 \text{ g}$ de SAM (Synth) em aproximadamente $50,0 \text{ mL}$ de água contido em um béquer de 100 mL , seguido da adição de $0,50 \text{ mL}$ de ácido clorídrico (HCl) concentrado em estoque (Vetec). A solução resultante foi, então, transferida à um balão volumétrico de 100 mL , onde foi adicionado $0,05 \text{ g}$ de NED (Vetec), completando-se o volume com as águas de lavagem do béquer onde foi dissolvido o SAM.

Amostras de águas superficiais do lago Paranoá foram coletadas em três pontos distintos (Píer, Asa Norte e Pontão) e filtradas por gravidade com papel qualitativo. As soluções das amostras foram preparadas pela diluição de 50 mL das amostras de água em 50 mL da solução estoque de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$. Da mesma maneira, outras três amostras de águas minerais comerciais (Nossa Senhora Aparecida, Santa Paula e Perrier) foram preparadas para estudos complementares.

Adicionalmente, estudos de recuperação foram realizados pela fortificação das amostras de águas superficiais com $2,26 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_3^-) e $0,365 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_2^-). Após a transferência de 50 mL dessas soluções para um balão volumétrico de 100 mL , completou-se o volume com a solução estoque de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$, de modo que as concentrações das amostras fortificadas efetivamente lidas no μFIA apresentassem a metade dessas concentrações.

3.2.3. Procedimentos

Uma fotografia com todos os componentes empregados nas determinações realizadas neste trabalho é mostrada na Figura 15. Na imagem, uma bomba peristáltica propulsionava simultaneamente todas as soluções de amostra/padrões e reagentes que eram direcionados por meio de válvulas solenóides de três vias até a célula de fluxo fotométrica do microssistema. Duas fibras ópticas plásticas guiavam a radiação da fonte até a célula de fluxo fotométrica, e deste último ao detector. O sinal analítico obtido para as medições de absorvância realizadas era então transmitido por meio de uma interface eletrônica à um computador dedicado para a aquisição de dados.

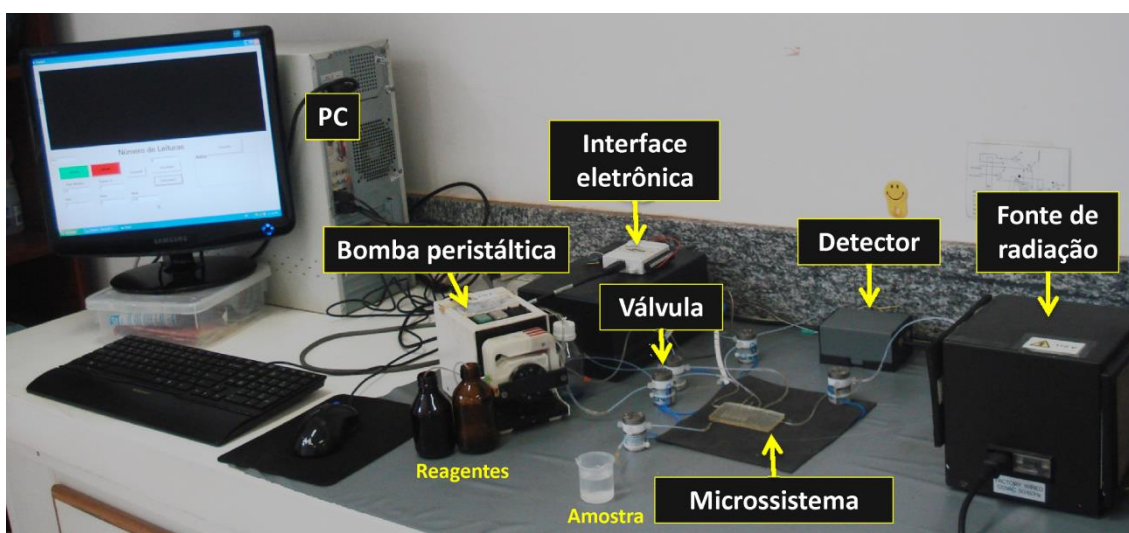


Figura 15. Fotografia apresentando todos os componentes empregados nos procedimentos analíticos a partir do μ FIA.

Para a determinação de NO_2^- , um microssistema sem coluna foi utilizado empregando-se a configuração de fluxo apresentada na Figura 16. Neste procedimento, o acionamento por computador permitia a abertura das válvulas V2 e V3 e o fechamento de V1, V4 e V5. A desativação das válvulas, contudo, permitia o procedimento inverso por meio do fechamento de V2 e V3 e a abertura de V1, V4 e V5.

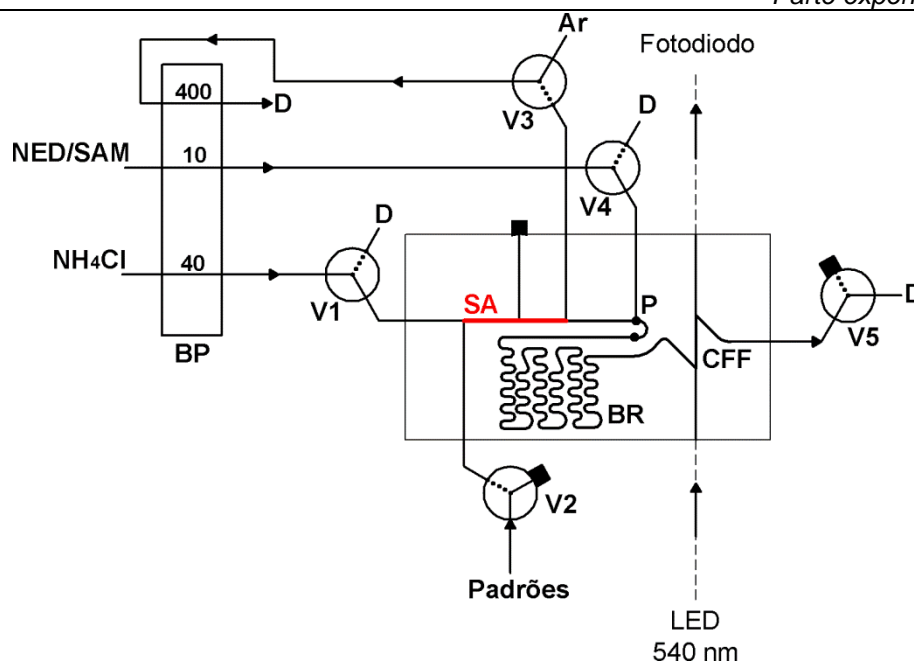
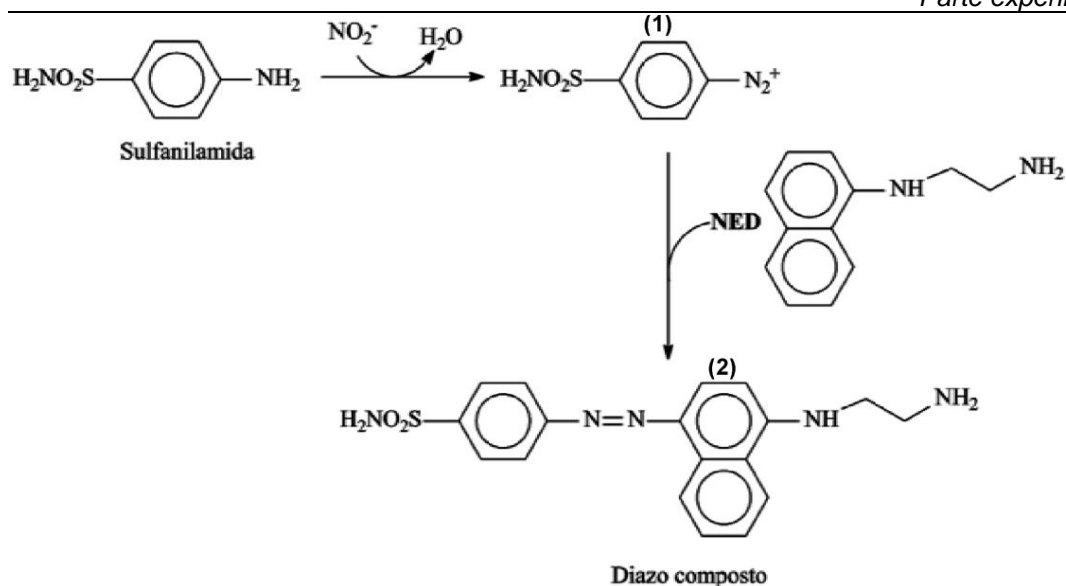


Figura 16. Diagrama de fluxo empregado para a avaliação do dispositivo sem coluna na determinação de NO_2^- em soluções aquosas: sistema de amostragem (SA), bomba peristáltica com as respectivas vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$ (BP), válvulas solenóides (V), ponto de confluência (P), bobina de reação (BR), célula de fluxo fotométrica (CFF), descarte (D).

Deste modo, quando todas as válvulas solenóides eram acionadas, a solução da amostra/padrão era aspirada preenchendo o sistema de amostragem (SA) com volume de aproximadamente $1,4 \mu\text{L}$. Ao se desativarem todas as válvulas, o “plug” (alíquota) de amostra era transportado pelo fluxo contínuo da solução de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ até a confluência (P) com a solução do reagente cromogênico NED/SAM, misturando-se com este último na bobina de reação (BR). Neste ponto, a reação de Griess⁶³ era desenvolvida de acordo com o mecanismo de reação descrito na Equação 1. Nesta reação, o NO_2^- em meio ácido promove a diazotização de SAM(1). O produto formado reage com o NED, produzindo um composto de coloração vermelha intensa (2). A absorvância do produto resultante era então medida na célula de fluxo fotométrica (CFF) integrada ao dispositivo.



Equação 1. Mecanismo da reação de Griess utilizado na determinação espectrofotométrica de NO_2^- . Adaptada de Ramos, Cavalheiro e Cavalheiro⁶³

Um procedimento similar ao descrito para a determinação de NO_2^- foi aplicado para a determinação de NO_3^- a partir da configuração de fluxo apresentada na Figura 17.

A alíquota da amostra/padrão injetado hidrodinamicamente era transportado até a coluna redutora de cádmio (CR) por meio do fluxo contínuo da solução $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$. Na coluna, as espécies NO_3^- eram reduzidos à NO_2^- , os quais reagem, em seguida, com a solução do reagente cromogênico NED/SAM de acordo com o mecanismo de reação descrito na Equação 1 antes da detecção fotométrica do produto formado.

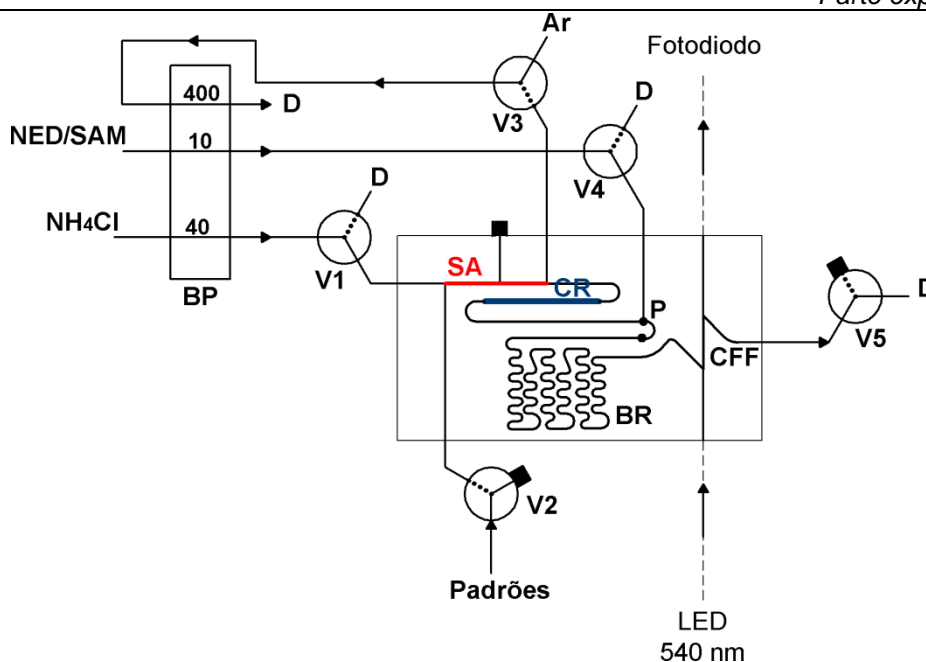


Figura 17. Diagrama de fluxo empregado para a avaliação do dispositivo com coluna redutora integrada na determinação de NO_3^- em soluções aquosas: sistema de amostragem (SA), bomba peristáltica com as respectivas vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$ (BP), válvulas solenóides (V), ponto de confluência (P), bobina de reação (BR), célula de fluxo fotométrica (CFF), descarte (D).

3.2.4. Método de referência

Os resultados obtidos com os microsistemas propostos foram comparados com aqueles obtidos através do método padrão⁶⁴, o qual se baseia na reação de Griess⁶³ em batelada. Para isso, uma coluna de cádmio necessária à redução do NO_3^- à NO_2^- foi construída no próprio laboratório, a partir de uma adaptação da referência. É importante destacar que as partículas de cádmio utilizadas na construção desta coluna não foram adquiridas comercialmente em virtude do seu alto custo.

Para a obtenção dos grânulos (partículas) com pequeno tamanho, uma barra do metal puro (cádmio) fornecida pela Comissão de Resíduos da UnB, foi limada em uma grossa (Tramontina, tamanho “12”), e cerca de 10 g do material particulado foi reservado. Estas partículas foram transferidas para um funil com papel qualitativo e tratadas (coperizadas) com lavagens sequenciais de 50 mL da solução de ácido clorídrico (Vetec) 20% (v/v) e 50 mL da solução de sulfato de cobre (Vetec) 5% (m/v). Após tratados os grânulos foram imediatamente

aconicionados em uma solução contendo 13 g L^{-1} de NH_4Cl e $1,7 \text{ g L}^{-1}$ de EDTA. Esse procedimento foi realizado no sentido de prevenir a oxidação das partículas de cádmio pelo oxigênio do ar e também permitir a complexação com EDTA de possíveis óxidos metálicos residuais formados na superfície dos grânulos de cádmio.

Um suporte de vidro apresentando 18 cm de comprimento e 0,8 cm de diâmetro interno foi obtido removendo-se as extremidades de uma pipeta volumétrica de 25 mL com o auxílio de uma mini retífica (Western). Uma ponteira de plástico (1 mL) foi então acoplada com fita veda rosca à uma das extremidades desse suporte, formando a base da coluna. Para a retenção das partículas de cádmio, um tampão de lã de vidro foi compactado ao fundo dessa estrutura (base da coluna) por meio de um bastão de vidro. Em posição vertical, este suporte foi preenchido com a solução de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ até uma altura próxima da abertura superior. As partículas de cádmio metálico foram então adicionadas em pequenas porções com uma espátula até o preenchimento quase completo do volume disponível. Esse procedimento garantiu a distribuição uniforme dos grânulos do metal ao longo da coluna.

Para o fechamento da parte superior da estrutura, uma ponteira de plástico idêntica a primeira foi acoplada como auxílio de uma fita veda rosca. Tubos Tygon (2,06 mm de diâmetro interno) foram conectados às extremidades das ponteiros para permitir a propulsão de soluções da amostra/padrões através da coluna por meio de uma bomba peristáltica (Ismatec-Reglo Analog). A vazão utilizada foi estabelecida de acordo com o fluxo sugerido na referência. Uma fotografia do sistema em fluxo com a coluna redutora de cádmio utilizada nas determinações a partir do método padrão é mostrado na Figura 18. Ao final, os NO_2^- presentes na amostra/padrões e aqueles resultantes da redução na coluna de cádmio foram tratados com o reagente NED/SAM e determinados através de um espectrofotômetro UV-VIS (Agilent 8453, $\lambda=543\text{nm}$).

É importante destacar que o bombeamento das soluções foi realizado no sentido oposto ao da força gravitacional (de baixo para cima), de modo a prevenir a formação de caminhos preferências do fluxo garantindo uma maior eficiência na redução do analito. Além disso, o preenchimento da coluna redutora de cádmio com a solução de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$ durante o intervalo das determinações realizadas impossibilitou a oxidação dos grânulos de cádmio

pelo oxigênio presente no ar, aumentando o seu tempo de vida útil.

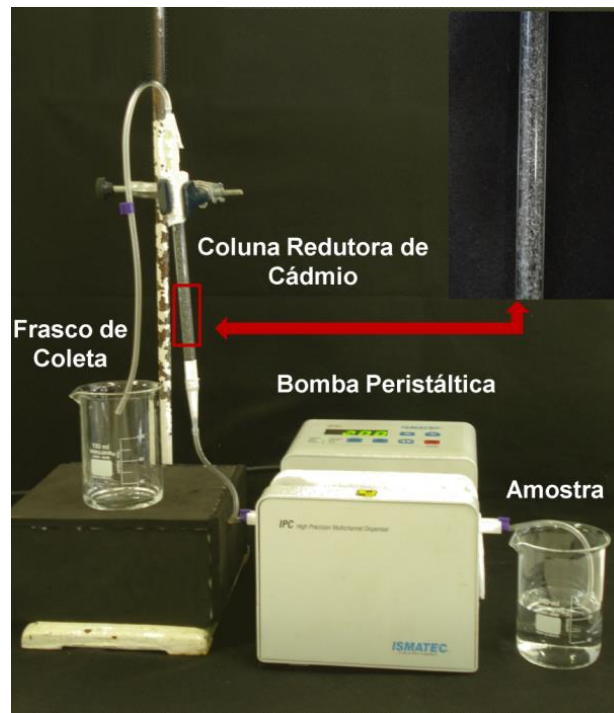


Figura 18. Fotografia do sistema em fluxo com coluna redutora de cádmio empregado nas determinações a partir do método padrão.

3.3.Determinação de Fosfato

3.3.1. Instrumentação

Os equipamentos (válvulas, bomba peristáltica, fibras ópticas e fotodiodo) utilizados para a operação do microssistema empregado na determinação de PO_4^{-3} foram os mesmos empregados para a determinação de NO_3^- e NO_2^- descritos na seção 3.2.1. Uma exceção foi a utilização de um LED vermelho ultra brilhante (LZ4-00G110 Led Engin, λ max = 660 nm) como fonte de radiação.

3.3.2. Reagentes e Soluções

Água desionizada e reagentes de grau analítico foram utilizadas no preparo de todas as soluções. Uma solução estoque contendo 2,20 g L^{-1} de molibdato de amônio tetrahidratado ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) e 0,04 mol L^{-1} de ácido nítrico concentrado (HNO_3) foi preparada pela dissolução de 0,55 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (Vetec) à um volume apropriado de água seguido pela adição de 625 μL de HNO_3 (Quimex) completando-se o volume a 250 mL com água. Uma solução estoque contendo 3076,9 mg $\text{PO}_4^{-3} \text{L}^{-1}$ (1000 mg P L^{-1}), foi preparada pela dissolução de 0,459 g fosfato de potássio anidro (Merck) em cerca de 50 mL, completando-se o volume a 100 mL com as águas de lavagem.

A solução carregadora empregada nos ensaios foi preparada pela diluição de 50 mL da solução estoque $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}/\text{HNO}_3$ em 50 mL de água destilada. Soluções de referência contendo 0,5 – 4,0 mg P L^{-1} (PO_4^{-3}) foram preparadas pela diluição de alíquotas apropriadas da solução estoque de PO_4^{-3} em 25 mL da solução estoque de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}/\text{HNO}_3$, completando-se o volume de um balão volumétrico de 50 mL com água.

Uma solução contendo o reagente ácido L- ascórbico 1,25 g L^{-1} e HCl 20 mmol L^{-1} foi preparada pela dissolução de 0,125 g do sal (Fmaia) em cerca de 50 mL de água, seguida pela adição de 166 μL do ácido concentrado (Vetec), completando-se o volume a 100 mL com água.

Amostras de águas superficiais do lago Paranoá foram coletadas em

quatro pontos distintos (Pier, Asa Norte, Lago Sul e Parque) e filtradas por gravidade com papel de filtro. A adição de 25 mL da amostra foi realizada à um balão de 50 mL e o volume completado com a solução estoque de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}/\text{HNO}_3$. Estudos de recuperação foram realizados com estas mesmas quatro amostras pela fortificação com $1,0 \text{ mg P L}^{-1}$ (PO_4^{-3}) e $4,0 \text{ mg P L}^{-1}$ (PO_4^{-3}). As amostras fortificadas foram diluídas à metade destas concentrações com solução estoque de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}/\text{HNO}_3$ antes das injeções no microssistema.

Ressalta-se que todas as soluções do padrão e amostra foram preparadas a cerca de 30 minutos antes de cada injeção.

3.3.3. Procedimentos

O dispositivo proposto foi avaliado na determinação de PO_4^{-3} por meio do diagrama de fluxo apresentado na Figura 19.

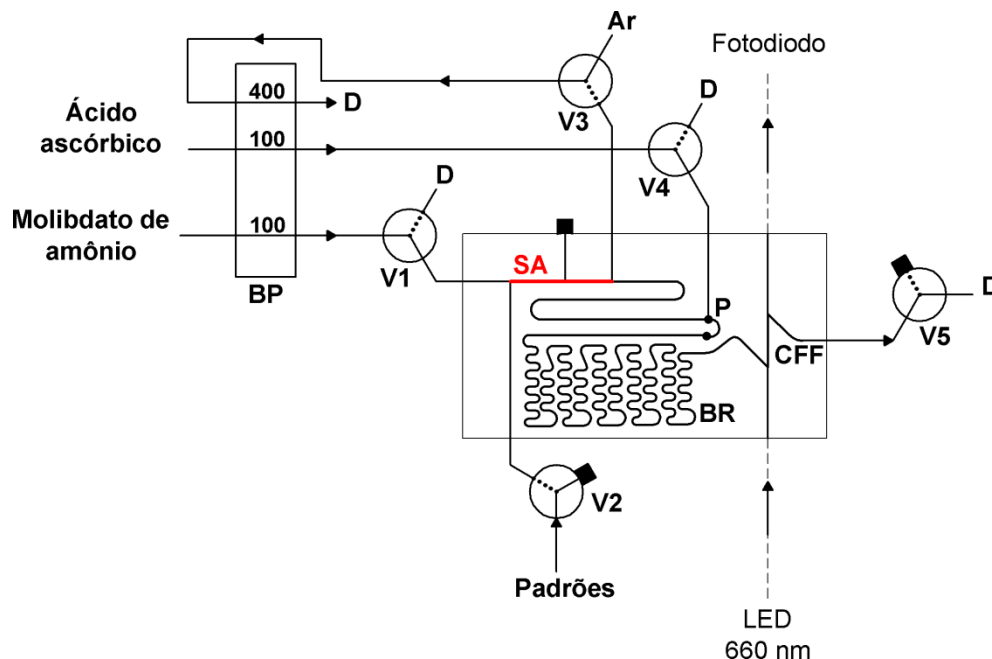
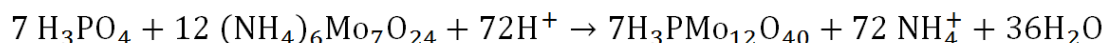


Figura 19. Diagrama de fluxo empregado para a avaliação do dispositivo na determinação de PO_4^{-3} em soluções aquosas: sistema de amostragem (SA), bomba peristáltica com as respectivas vazões em $\mu\text{L min}^{-1}$ (BP), válvulas solenóides (V), ponto de confluência (P), bobina de reação (BR), célula de fluxo fotométrica (CFF), descarte (D).

De acordo com este diagrama, quando a solução da amostra/padrão era aspirada pela abertura das válvulas V2 e V3, o “*plug*” (alíquota) de amostra com cerca de 1,4 µL preenchia o SA. Ao fechamento destas válvulas e o acionamento das demais, este “*plug*” era então transportado por meio do fluxo da solução carregadora de (NH₄)₆Mo₇O₂₄/HNO₃ até a confluência em P com o reagente ácido L-ascórbico na formação do complexo azul de molibdênio⁶⁵.



Equação 2. Etapa de formação do ácido fosfomolibdico

Em uma primeira etapa mostrada na Equação 2, o ácido fosfomolibdico era produzido pela reação entre o PO₄⁻³ e o molibdato em meio ácido externamente ao microsistema. Este composto de coloração amarela apresenta baixa absorvidade molar, de modo que um agente redutor, o ácido ascórbico, foi necessário para a redução em linha do Mo favorecendo formação do complexo azul de molibdênio, que por sua vez apresenta elevada absorvidade molar. Ao final, a medida de absorbância deste produto era realizada na CFF integrada ao dispositivo.

3.3.4. Método de referência

Os resultados obtidos com o microsistema proposto foram comparados com o método padrão⁶⁴, o qual se baseia na reação de formação do complexo azul de Molibdênio em batelada. Um espectrofotômetro UV-VIS (Agilent 8453, λ=880nm) foi utilizado nas determinações do analito.

4. Resultados e Discussão

4.1. Integração da coluna de cádmio ao microssistema

Um microdispositivo com configuração mais simples foi inicialmente construído para que fosse avaliado o procedimento de integração da coluna de cádmio. Uma fotografia deste microssistema é apresentada na Figura 20.

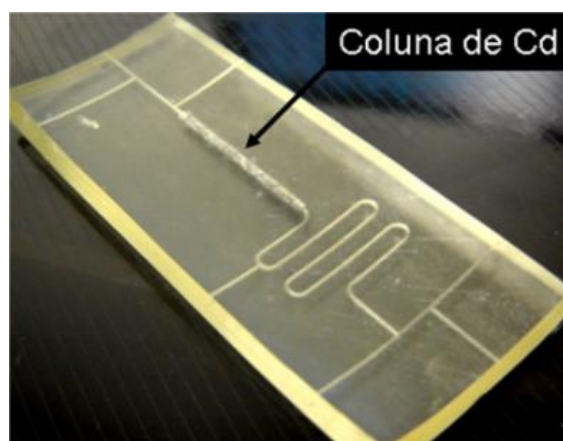


Figura 20. Fotografia do microssistema com coluna redutora integrada apresentando configuração mais simples utilizado na determinação fotométrica de NO_3^- .

Em um primeiro momento, partículas de cádmio com tamanhos menores (0,25 a 0,4 mm) foram inseridas manualmente no reservatório e pequenos filtros (chumaços) de lã de vidro foram colocados nas extremidades da coluna para impedir que as partículas fossem carregadas pelas soluções de trabalho para os canais fluídicos. Esta estratégia foi utilizada por se assemelhar àquelas normalmente empregadas em sistemas FIA. De fato, a compactação de pequenos filtros de lã de vidro foi necessária para garantir o seu adequado ajuste às pequenas dimensões do reservatório, contudo, esse procedimento ocasionou na obstrução dos canais e no vazamento das conexões externas.

Para contornar este problema, um procedimento alternativo para o empacotamento da coluna que não utiliza filtros (lã de vidro) e que emprega um maior controle no tamanho dos grânulos foi avaliado para o microdispositivo proposto. Neste sentido, partículas maiores (0,5 a 1,0 mm) do que os canais de fluidos (adjacentes à coluna) e menores do que o reservatório foram

empacotadas manualmente no interior da câmara (reservatório). Esta estratégia demonstrou ser eficiente ao permitir a diminuição da pressão interna, e com isso o fluxo contínuo das soluções através da coluna. Adicionalmente, a transferência das partículas de cádmio do reservatório para os canais microfluídicos não foi observada, o que garantiu a funcionalidade do dispositivo na redução do NO_3^- à NO_2^- em um fluxo contínuo de soluções em linha.

A eficiência da selagem deste dispositivo na região da coluna empacotada foi também avaliada com relação a possíveis entupimentos dos microcanais causados pelo material particulado. Para isto, um volume de água destilada foi bombeado através dos dispositivos, a vazões de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, enquanto o monitoramento visual era realizado. Esses ensaios indicaram que a selagem do microssistema foi bem sucedida, visto que não foram observados vazamentos ou entupimento dos canais com as partículas de cádmio da coluna. Este resultado mostra que outros tipos de colunas, como aquelas empregadas para extração/pré-concentração do analito, poderão ser facilmente integradas a dispositivos microfluídicos empregando o procedimento proposto.

O bom desempenho do procedimento proposto para a integração da coluna de cádmio ao dispositivo (seção 3.1.1) foi confirmado por micrografias ópticas, as quais são apresentadas na Figura 21. Conforme mostrado na Figura 21 (A), a selagem da estrutura não foi comprometida quando partículas de cádmio apresentaram tamanhos que excederam o limite da altura do reservatório. Nesse caso, a placa de UA empregada na cobertura dos canais foi perfeitamente moldada às regiões proeminentes do reservatório em virtude da sua propriedade elastomérica, permitindo a selagem eficiente de toda a extensão da coluna.

Na Figura 21 (B), é possível observar que os grânulos de cádmio apresentaram formatos irregulares, que produziram lacunas entre as paredes do reservatório e as partículas. Esses espaços vazios impediram o entupimento do canal, e dessa forma, possibilitaram o uso analítico da coluna. Foi verificado que os sistemas com coluna integrada, construídos a partir deste procedimento, suportaram vazões maiores que $2,0 \text{ mL L}^{-1}$ sem que fossem observados vazamentos ou entupimentos. Ao longo do trabalho cerca de 10 dispositivos diferentes foram construídos e apresentaram desempenhos semelhantes.

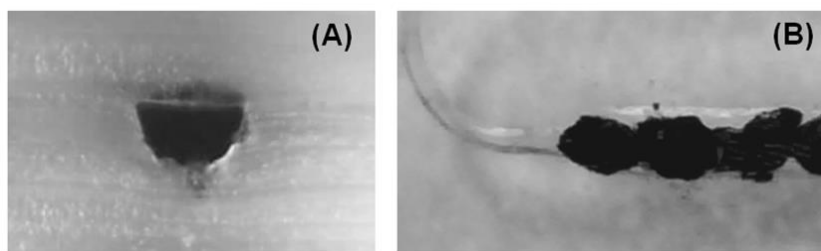


Figura 21. Micrografia óptica da seção transversal da coluna redutora de cádmio. Visualização expandida da junção coluna/microcanal (A) e visualização expandida da extensão da coluna (B).

Apesar deste bom desempenho, uma restrição esperada para esta estratégia é o tempo de vida limitado do microanalisador causado pela corrosão das partículas de cádmio. Verificou-se que o uso contínuo da coluna na redução de NO_3^- produz algumas partículas finas que são arrastadas para a bobina de reação ou para o detector fotométrico, tornando o dispositivo inutilizável. No entanto, deve ser ressaltado que o microanalisador proposto foi concebido para funcionar com baixos volumes de soluções de amostra/referência (menores que $2,0 \mu\text{L}$), contendo concentrações relativamente baixas de NO_3^- ($0,23 - 2,26 \text{ mg N L}^{-1}$), de modo que o desenvolvimento de grânulos finos de cádmio é pouco significativo, mesmo depois de um considerável número de operações (cerca de 300 injeções), o que permite a aplicação do μFIA proposto para as determinações analíticas.

É importante destacar também que existe uma boa reprodutibilidade para a fabricação dos microssistemas com coluna integrada (aproximadamente 20%), e que o baixo custo dos materiais e procedimentos utilizados (R\$ 40,00 por unidade) corroboram para a utilização do μFIA proposto como um dispositivo descartável. Utilizando-se o microssistema mais simples apresentado na Figura 20, o qual apresentava um caminho óptico de 0,5 cm e uma bobina reacional com menor comprimento, foi possível obter os sinais transientes apresentados na Figura 22 para injeções sucessivas de soluções padrão de NO_3^- e NO_2^- com concentrações equimolares ($0,9 \text{ mmol L}^{-1}$). Com base na altura dos picos, foi possível estimar uma eficiência de redução próxima a 100 %, a qual foi confirmada pela inexistência de diferenças significativa entre os valores ao nível de 95 % de confiança.

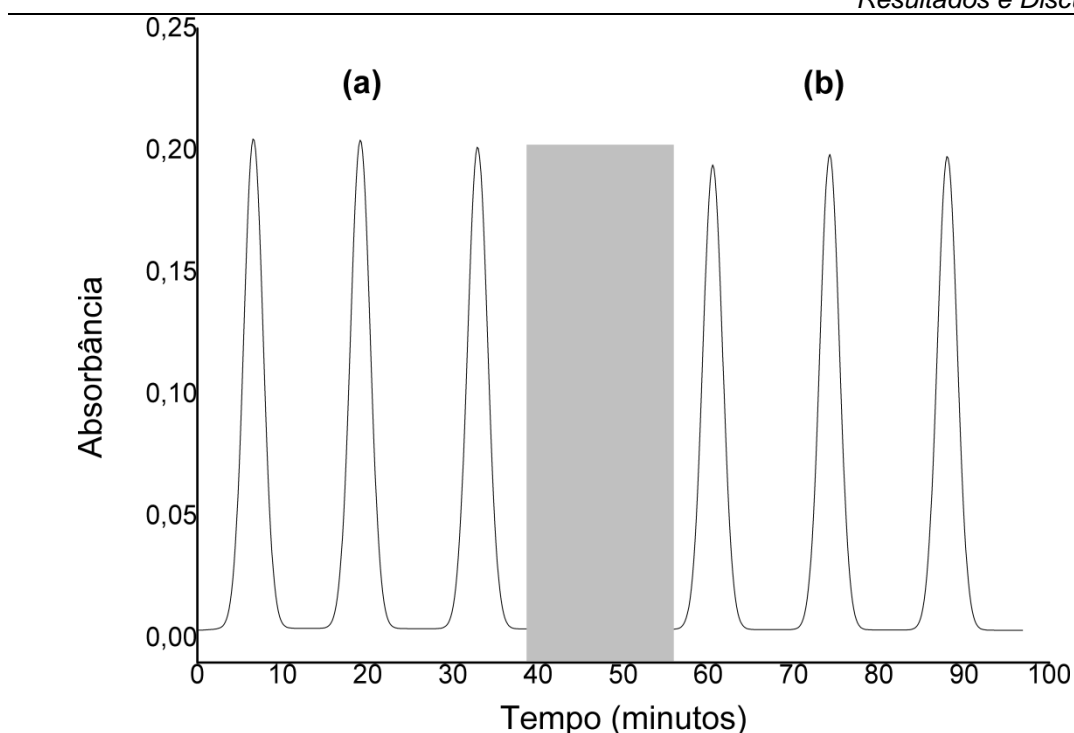


Figura 22. Fiagrama obtido na determinação de NO_3^- (a) e NO_2^- (b) em concentrações equimolares ($0,9 \text{ mmol L}^{-1}$) a partir do microdispositivo de configuração mais simples com coluna redutora integrada. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

Ainda com o microssistema da Figura 20 obteve-se um fiagrama para as injeções das soluções padrão na faixa de concentração de $1,13 - 4,53 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_3^-), o qual é apresentado na Figura 23. Conforme pode ser observado, um comportamento adequado do sinal analítico foi obtido durante as medidas, não sendo observados desvios significativos da linha de base e razões sinal/ruído elevadas. A curva analítica construída com base na altura média desses picos apresentou boa linearidade ($R= 0,998$), sendo estimado um LOD de $0,27 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_3^-) a partir do valor médio dos sinais transientes do branco (B) somado a três vezes o desvio padrão (Sb). Além disso, uma repetibilidade dos sinais analíticos de 5% foi calculado para injeções sucessivas de um padrão intermediário de $3,39 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_3^-) ($n = 5$).

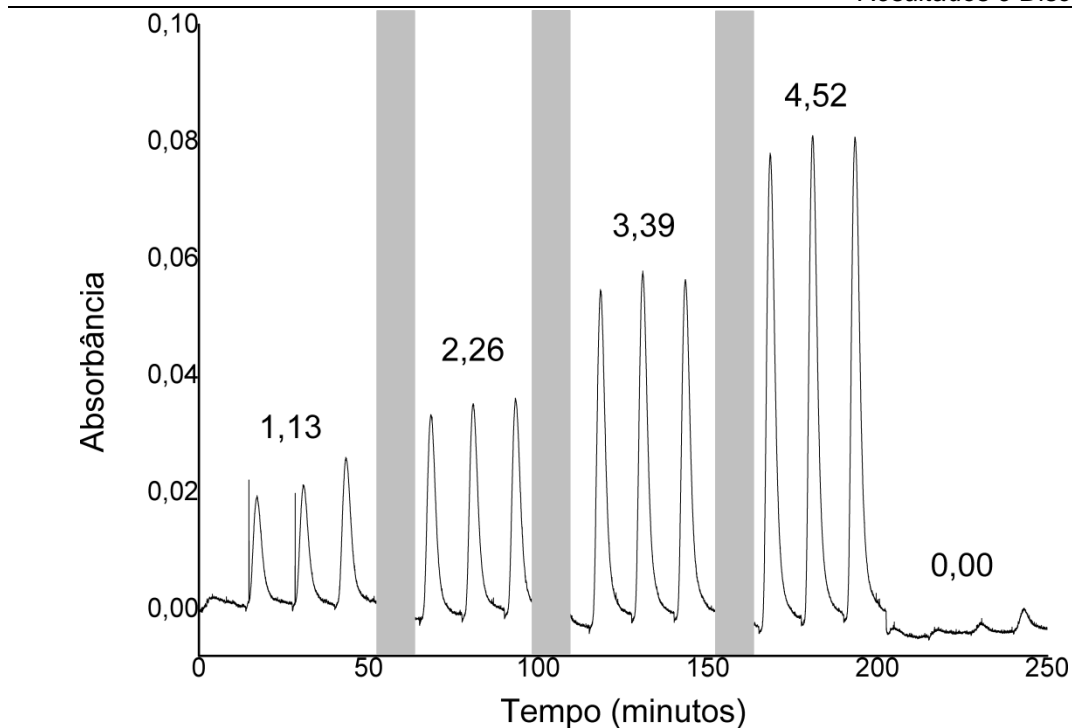


Figura 23. Sinais transientes obtidos para injeções das soluções padrão de 1,13 – 4,52 mg N L⁻¹ (NO₃⁻) no microdispositivo de configuração mais simples com coluna redutora integrada. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

Tendo-se estabelecido um procedimento adequado à integração da coluna, uma nova configuração para o microsistema foi proposta para a realização de estudos posteriores. Substancialmente, foram alterados o tamanho da bobina reacional e o caminho óptico para as medidas fotométricas. Essas alterações foram realizadas no intuito de melhorar a cinética de reação e a sensibilidade do método para uma ampla faixa de concentrações. Um maior detalhamento sobre este novo dispositivo pode ser visto na seção 4.2 e uma fotografia do mesmo é apresentada na Figura 24.

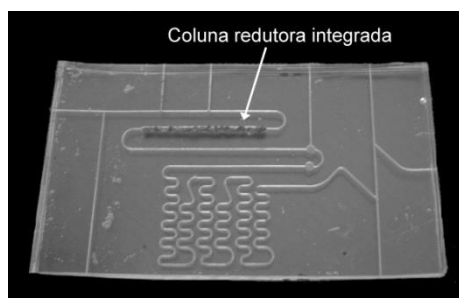


Figura 24. Microsistema com coluna redutora integrada apresentando nova configuração.

Com este novo dispositivo, os sinais transientes apresentados na Figura 25 foram adquiridos após as injeções de NO_2^- (a) e NO_3^- (b), contendo concentrações equimolares dos íons ($130 \mu\text{mol L}^{-1}$). Essa concentração (equivalente à 8 mg N L^{-1} (NO_3^-)) foi utilizada na avaliação da ER por se aproximar daquela máxima estabelecida pela resolução do Conama⁶⁶ ($10,0 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_3^-)). Com base na altura dos picos, a eficiência de redução (ER) de 97,5% foi determinada pela redução em linha de NO_3^- a NO_2^- , demonstrando um desempenho que é comparável aos sistemas em fluxo de tamanho usual⁶⁷. Verificou-se também que este desempenho é mantido em no mínimo 200 injeções para as soluções de trabalho estudadas. Após um maior número de injeções (200 a 500), ER maiores que 90% continuaram a ser observadas até que partículas finas de cádmio fossem desprendidas da coluna inviabilizando o uso do dispositivo.

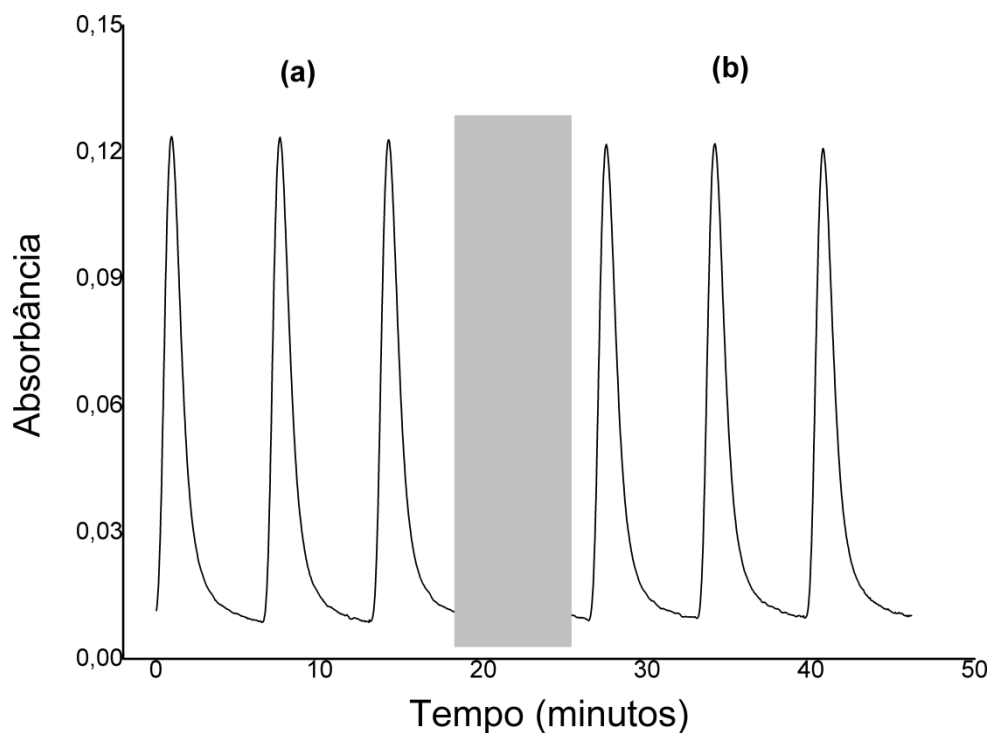


Figura 25. Diagrama obtido na determinação de NO_3^- (a) e NO_2^- (b) em concentrações equimolares ($130 \mu\text{mol L}^{-1}$) a partir do microdispositivo com coluna redutora integrada apresentando nova configuração. Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

A reativação em linha da coluna também foi avaliada bombeando sequencialmente uma solução de ácido clorídrico 10% (v/v), solução de sulfato de cobre (Vetec) 15% (m/v) e uma solução de NH_4Cl , $2,7 \text{ g L}^{-1}$ e EDTA $0,2 \text{ g L}^{-1}$ através das partículas de cádmio. Embora tenha sido verificada um aumento da ER para valores próximos aos iniciais (97,5%) após este tratamento, a concentração das soluções, vazões e a extensão da corrosão das partículas antes do tratamento, devem ser devidamente considerados para se evitar a degradação excessiva de partículas ou a acumulação de depósitos de cobre durante os procedimentos. Considerando as dificuldades para encontrar os parâmetros apropriados para microdispositivos individuais, a reativação em linha não é indicada para os dispositivos propostos e, portanto não foi utilizada para a determinação de nitrogênio total descrita neste trabalho.

4.2. Caracterização dos microanalisadores em fluxo empregados nas determinações de nitrato e nitrito

As fotografias dos microdispositivos efetivamente avaliados neste trabalho nas determinações de NO_3^- e NO_2^- em amostras de água superficial são mostradas na Figura 26. Todos os componentes necessários à análise como sistema de amostragem (SA) com duas opções de volume (AB e AC), ponto de confluência (P), coluna redutora (CR), bobina de reação (BR) e célula de fluxo fotométrica (CFF) foram integrados em uma plataforma com dimensões de 7,0 cm x 4,0 cm x 0,5 cm, ocupando uma área menor que a de um cartão de crédito. É importante destacar que a integração da coluna redutora de cádmio a um dos dispositivos não afetou o seu tamanho reduzido, e que as configurações microfluídicas propostas foram baseadas nos sistemas de análise em fluxo convencionais, os quais foram escolhidos por permitirem um procedimento simples e rápido para a redução de NO_3^- à NO_2^- em linha e a detecção fotométrica do produto formado na reação de Griess⁶³.

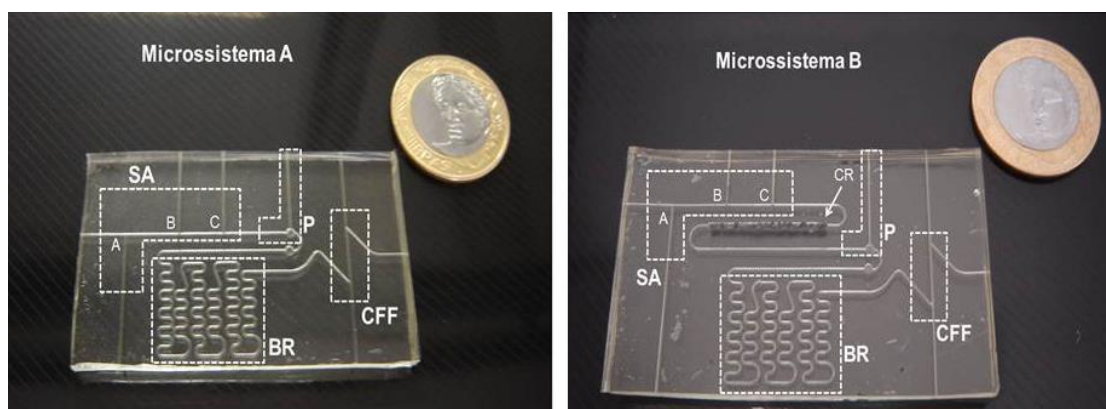


Figura 26. Microsistema sem a coluna (A) e com coluna redutora de cádmio integrada (B): sistema de amostragem (SA) com duas opções de volume: AB e AC, ponto de confluência (P), bobina de reação (BR), coluna redutora (CR) e célula de fluxo fotométrica (CFF).

Os microcanais gravados a partir da técnica de fotolitografia apresentaram seções transversais em formato de “U” cujas dimensões (largura e profundidade) foram obtidas por imagens de micrografia eletrônica de varredura como mostrado na Figura 27, o que permitiu estimar o volume de

regiões específicas dos microsistemas. O tamanho das larguras determinadas variou entre 410 a 1100 μm enquanto a profundidade variou entre 240 a 390 μm .

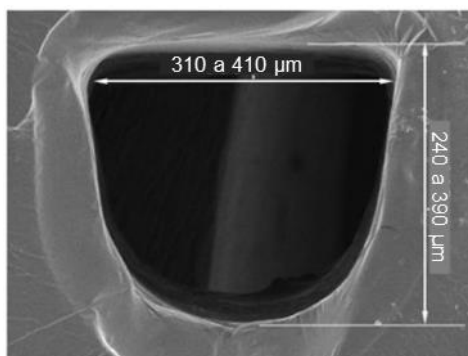


Figura 27. Micrografia eletrônica da seção transversal de um microcanal.

Os volumes estimados para os componentes analíticos dos sistemas propostos e para o reservatório da coluna redutora são mostrados na Tabela 1. Esses valores foram obtidos por meio da área calculada a partir das medidas da altura e profundidade dos canais e o seu comprimento.

Tabela 1. Volumes estimados para os componentes analíticos dos microanalisadores propostos.

Regiões do microsistema	Largura μm	Profundidade μm	Comprimento mm	Volume μL
Sistema de amostragem (AB)	410	390	10	1,4
Sistema de amostragem (AC)	410	390	19	2,7
Bobina de reação (BR)	310 a 410	240 a 390	286	40
Célula de fluxo fotométrica (CFF)	310	240	10	0,6
Coluna redutora (CR)	1100	650	20	10*
Dispositivo completo	-	-	513	54**

*Volume da coluna redutora não preenchida com os grânulos de cádmio.

**Volume total do dispositivo com coluna redutora.

Conforme indicado na Tabela 1, apesar de comprimentos idênticos para o sistema de amostragem AB e a célula de fluxo fotométrica (CFF), os volumes para os dois componentes analíticos foram diferentes em virtude de variações na dimensão das seções transversais dos canais. Isso ocorreu devido à

posição (vertical ou horizontal) das linhas impressas na máscara fotolitográfica em relação às lâmpadas fluorescentes de UV-A durante o processo de polimerização dos canais, o que afetou na largura e na profundidade dos mesmos. Um estudo mais detalhado a esse respeito é apresentado na literatura⁶⁸.

4.2.1. Determinação de nitrogênio total (nitrato + nitrito) e nitrito em amostras de água doce.

Estudos preliminares demonstraram que a injeção hidrodinâmica das soluções de amostra e padrões preparadas diretamente em água destilada (sem a diluição com a solução estoque de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$), ocasionava em um elevado efeito Schlieren⁶⁹ nos sinais analíticos, impossibilitando a determinação de NO_2^- e NO_3^- pelo método com o μFIA na faixa de concentração desejada. Para a eliminação desse efeito, as soluções de amostra e padrão foram então preparadas pela diluição em soluções estoque de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$, de maneira que a sua concentração final fosse idêntica àquela empregada como solução de transporte ($2,7 \text{ g L}^{-1}$ de NH_4Cl e $0,2 \text{ g L}^{-1}$ EDTA). Com esta condição, foram obtidos os fiagramas que serão discutidos a seguir.

A fim de avaliar as figuras de mérito para as determinações de NO_3^- baseadas no μFIA com coluna redutora integrada, uma curva analítica foi obtida a partir do fiagrama mostrado na Figura 28 para as determinações das soluções padrão apresentando uma maior faixa de concentrações de $0,23 - 2,26 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_3^-). Foi observado uma boa razão sinal/ruído (maior que 14 unidades para a solução padrão com concentração mais baixa) e uma linha de base relativamente estável (*drift* de $4,4 \times 10^{-3}$ unidades de absorvância h^{-1}).

Os sinais analíticos calculados a partir das médias obtidas para as alturas dos picos propiciaram uma resposta linear ($R = 0,994$) para a faixa de concentração estudada ($\text{Sinal} = - 0,0075 + 0,060 \text{ mg N L}^{-1} (\text{NO}_3^-)$) como mostra a Figura 29, e um LOD de $0,15 \text{ mg N L}^{-1} (\text{NO}_3^-)$ foi estimado ($\text{LOD} = B + 3\text{Sb}$). Além disso, a reprodutibilidade de 0,9% foi calculada para injeções sucessivas ($n = 5$) da solução padrão com concentração intermediária de $1,35 \text{ mg N L}^{-1} (\text{NO}_3^-)$.

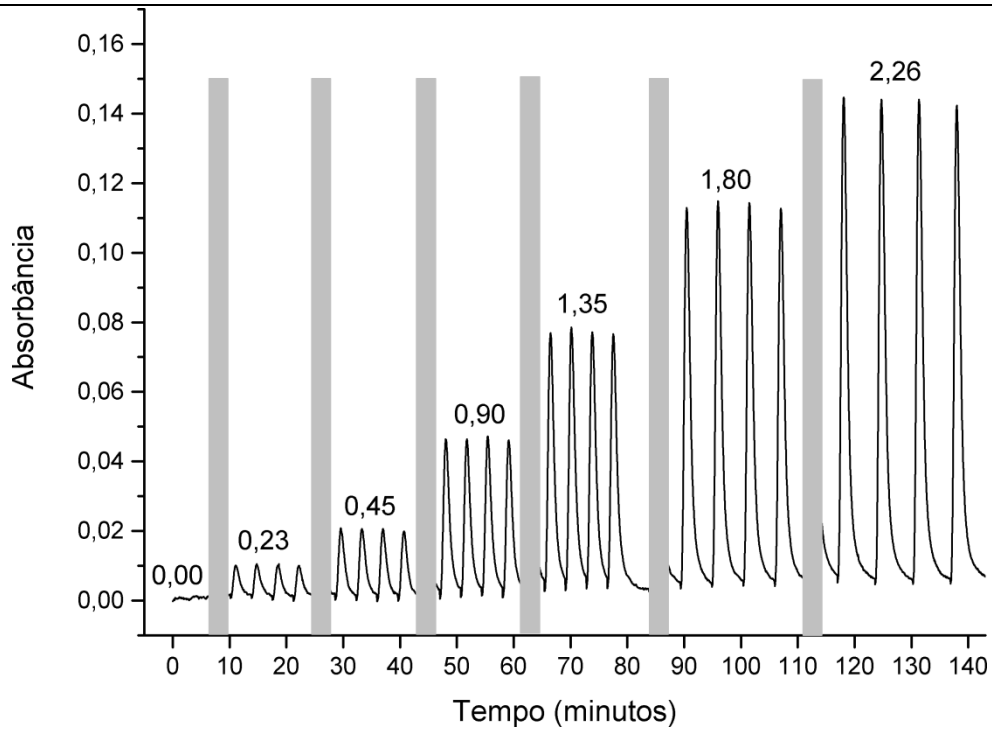


Figura 28. Diagrama obtido a partir das determinações de soluções padrão na faixa linear de 0,23 – 2,26 mg N L⁻¹ (NO₃⁻). Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

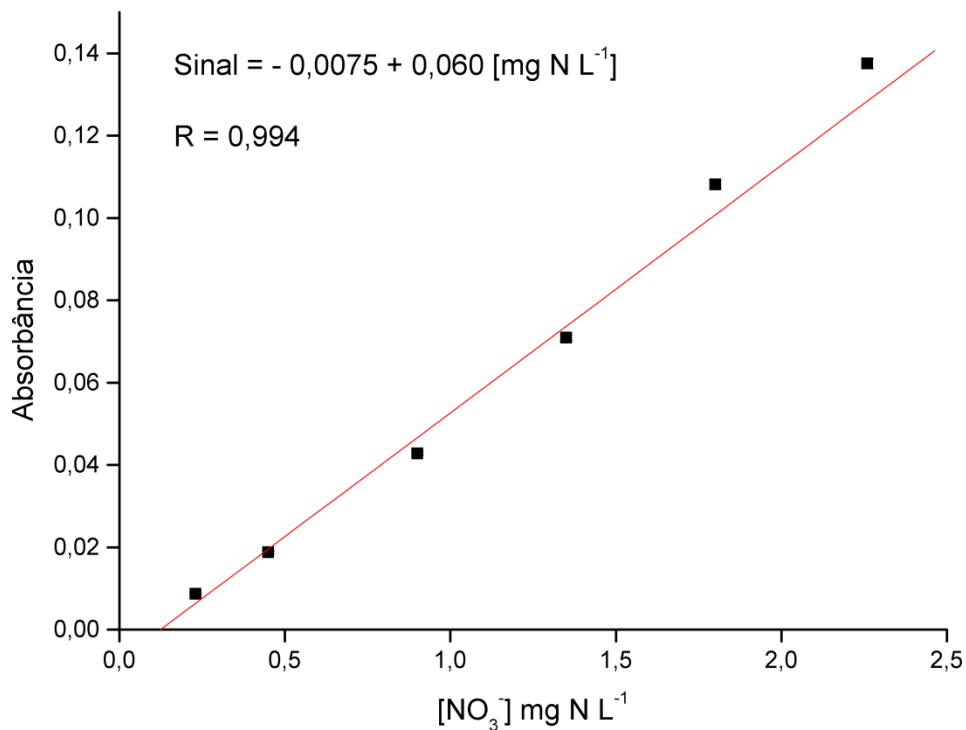


Figura 29. Curva analítica obtida para as soluções padrão na faixa linear de 0,23 – 2,26 mg N L⁻¹ (NO₃⁻).

Considerando que o nível máximo de NO_3^- em águas doces, permitido pela Resolução nº 357 do CONAMA⁶⁶ é de $10,0 \text{ mg N L}^{-1}$, pode ser afirmado que o μFIA proposto com coluna redutora integrada apresenta as figuras de mérito apropriadas para esta determinação.

De maneira similar, as figuras de mérito para as determinações de NO_2^- baseadas no μFIA foram estimadas a partir do fiagrama mostrado na Figura 30. Ressalta-se que a determinação de NO_2^- foi realizada por outro microssistema, fabricado com configuração similar àquela utilizada para o NO_3^- , apenas substituindo a coluna redutora de cádmio integrada por um canal microfluídico. Como indicado, os sinais analíticos de absorvância adquiridos apresentaram um baixo *drift* ($2,0 \times 10^{-3}$ unidades de absorvância h^{-1}) e boa razão sinal/ruído (maior que 9,0 unidades para a solução padrão com concentração mais baixa).

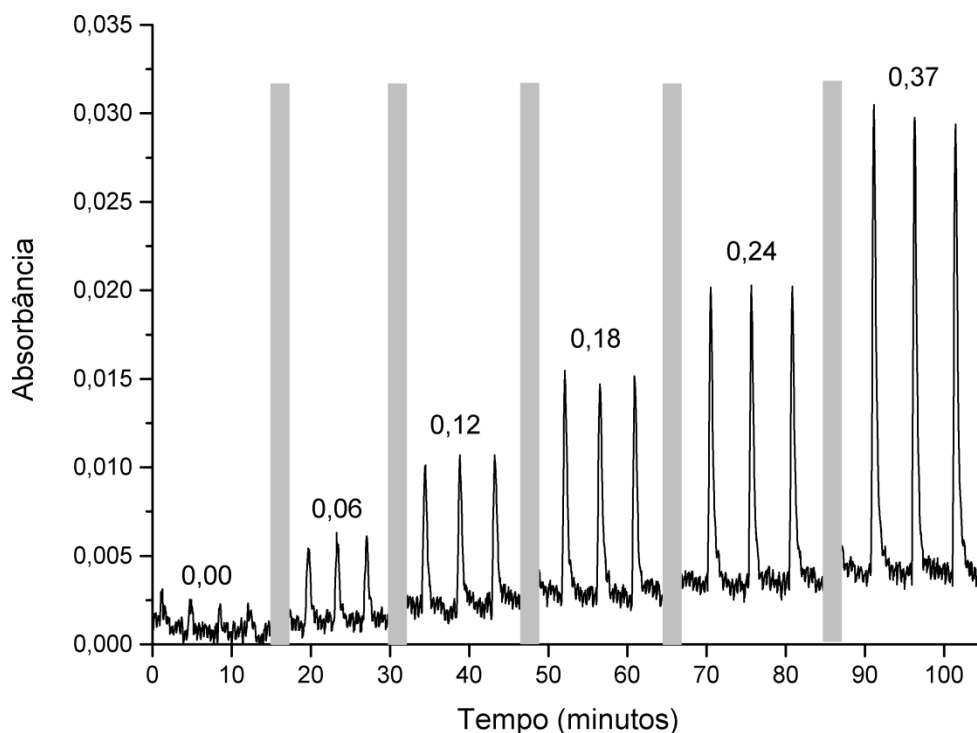


Figura 30. Fiagrama obtido a partir das determinações de soluções padrão na faixa linear de $0,06 - 0,37 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_2^-). Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

Além disso, uma resposta linear foi observada ($R = 0,999$) para a faixa de concentração estudada ($\text{Sinal} = - 8,3 \times 10^{-5} + 0,070 \text{ mg N L}^{-1} (\text{NO}_2^-)$) mostrada na Figura 31 e um LOD de $0,03 \text{ mg N L}^{-1}$ foi estimado ($\text{Sinal} = B + 3 S_b$). Além disso, a reprodutibilidade de 2,50 % ($n = 5$) foi calculada para a injeção de uma

solução padrão de 0,18 mg N L⁻¹ (NO₂⁻).

É importante destacar que esta curva de calibração foi construída a partir de soluções padrões de NO₂⁻ cuja faixa de concentração apresentou o seu limite máximo (0,37 mg N L⁻¹) abaixo do valor permitido pela legislação brasileira vigente (CONAMA)⁶⁶ para águas doces (1,0 mg N L⁻¹), evidenciando a aplicação do microdispositivo em análises ambientais.

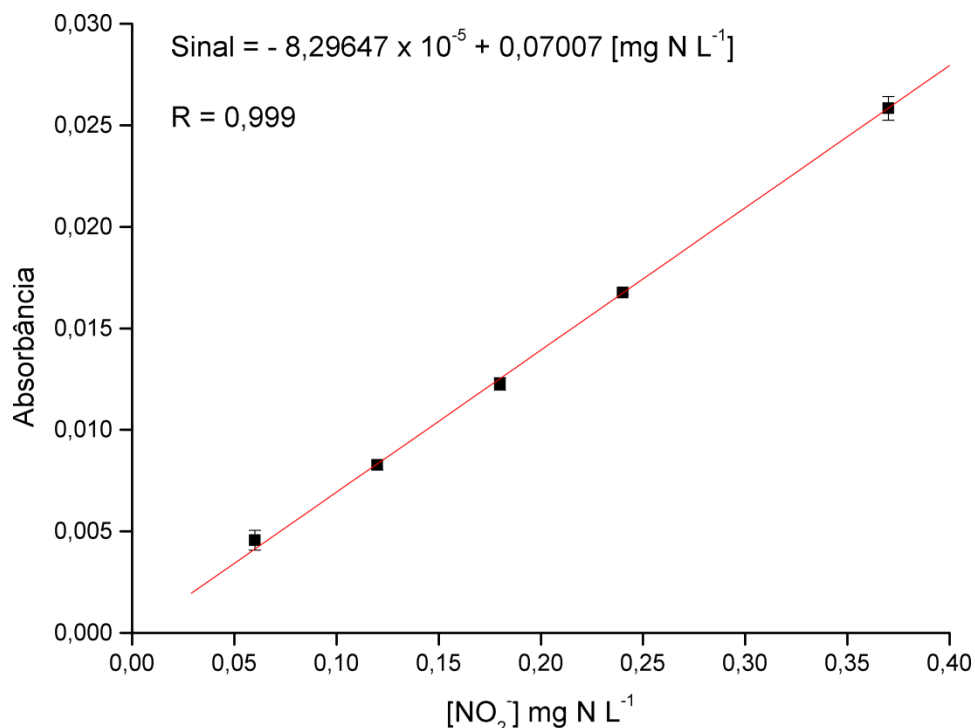


Figura 31. Curva analítica obtida para as soluções padrão na faixa linear de 0,06 – 0,37 mg N L⁻¹ (NO₂⁻).

Considerando as boas figuras de mérito obtidas nas determinações de NO₃⁻ e NO₂⁻ em soluções padrão a partir dos microssistemas propostos, foi também avaliada a exatidão dos métodos (com coluna redutora e sem coluna) a partir das determinações dessas espécies em amostras de água doce superficial e a comparação desses resultados com aqueles obtidos por um método de referência. Adicionalmente, testes de recuperação dos íons de interesse foram avaliadas por meio das mesmas amostras fortificadas.

Neste ponto, deve ser enfatizado que o método de Griess⁶³ permite apenas a determinação de NO₂⁻, de modo que para a determinação de NO₃⁻ é necessária a sua prévia redução por uma coluna de cádmio. Em amostras de

águas “reais” que contém as duas espécies, essa determinação deve ser realizada em duas etapas, quantificando-se o teor de nitrogênio total ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) e a concentração individual de NO_2^- . Desse modo, os sinais adquiridos para as determinações realizadas nas amostras de águas doces a partir do microdispositivo fluídico com coluna redutora integrada referem-se ao teor de nitrogênio total disponível na forma das espécies reduzidas a nitrito (NO_3^-) e o NO_2^- originalmente presente na amostra. A determinação individual de NO_2^- foi realizada por outro microdispositivo sem coluna.

Embora tenham sido utilizados dois microssistemas diferentes para as determinações, os estudos aqui realizados indicam que um único dispositivo pode ser utilizado para a determinação multi-parâmetro desde que uma válvula seja integrada ao dispositivo para direcionar ou não um fluxo de amostra através da coluna.

Um fiograma típico obtido para as determinações de nitrogênio total a partir do microssistema com coluna redutora integrada é mostrado na Figura 32 para as amostras de água superficial P1 (Asa Norte), P2 (Pontão), P3 (Pier) e comercial C1 (Santa Paula), C2 (Perrier) e C3 (Nossa Senhora Aparecida). Outro fiograma usual utilizado nas determinações diretas de NO_2^- nas mesmas amostras avaliadas é mostrado na Figura 33 empregando-se microssistema sem a coluna. Nessa figura, as amostras indicadas (a) foram fortificadas com $0,18 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_2^-).

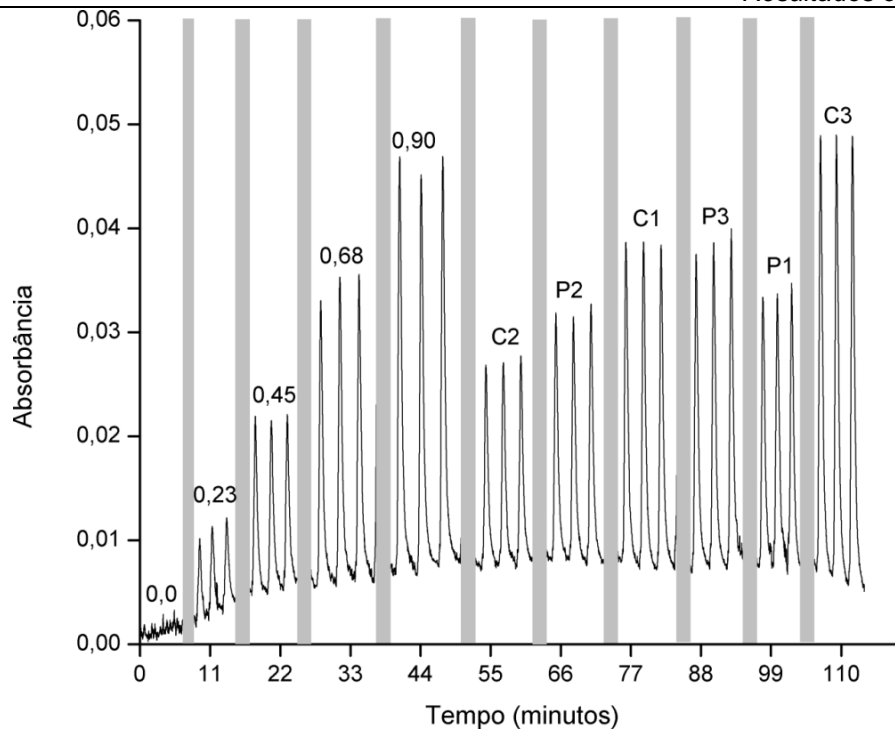


Figura 32. Um diagrama típico obtido nas determinações de nitrogênio total (NO_3^- e NO_2^-) em amostras de água doce a partir do microsistema com coluna redutora integrada. Os valores indicados expressam a concentração em mg N L^{-1} (NO_3^-). Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

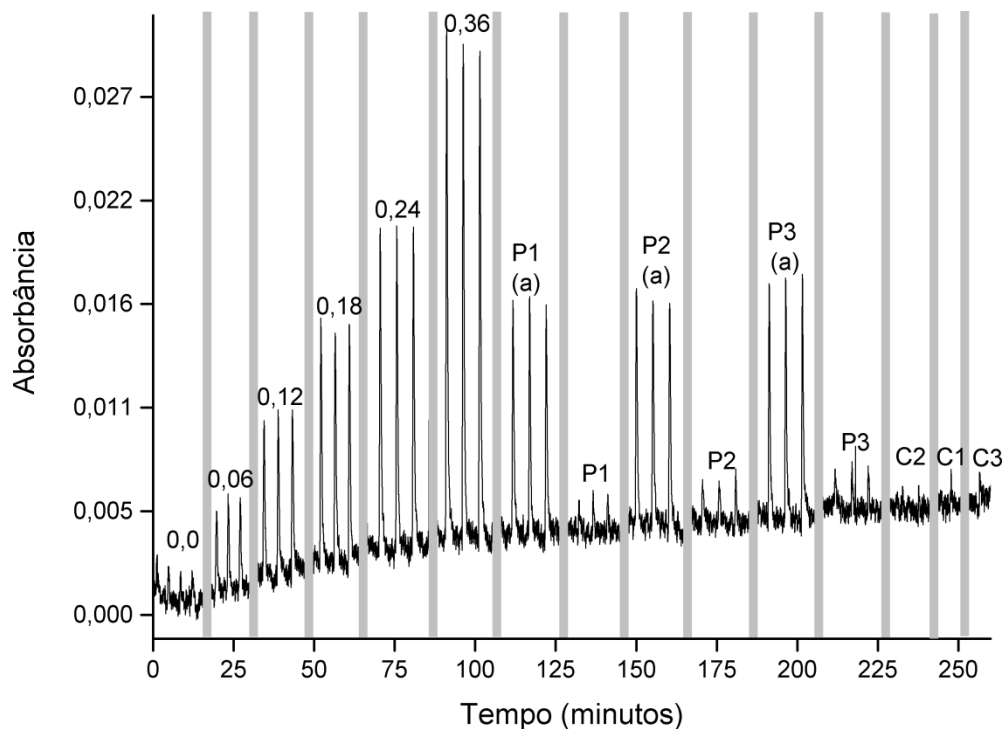


Figura 33. Um diagrama típico obtido nas determinações individuais de NO_2^- em amostras de água doce a partir do microsistema sem coluna. Os valores indicados expressam a concentração em mg N L^{-1} (NO_2^-). Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

Para os testes de recuperação, diagramas similares àqueles mostrados nas Figuras 32 e 33 foram obtidos para as três amostras de águas superficiais fortificadas com $0,37 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_2^-) e $2,26 \text{ mg N L}^{-1}$ (NO_3^-). Os valores estimados para NO_2^- e nitrogênio total ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Teores de recuperação estimados para nitrito e nitrogênio total a partir dos microssistemas propostos.

Amostras	Microssistema sem coluna			Microssistema com coluna redutora		
	Nitrito			Nitrogênio total (Nitrito + Nitrato)		
	μFIA (mg N L^{-1})	Adicionado (mg N L^{-1})	Recuperações (%)	μFIA (mg N L^{-1})	Adicionado (mg N L^{-1})	Recuperações (%)
P1 ^a	$0,35 \pm 0,07$	0,37	94,6	$2,94 \pm 0,02$	2,63	111,8
P2 ^b	$0,36 \pm 0,02$	0,37	97,3	$2,71 \pm 0,02$	2,63	103,0
P3 ^c	$0,35 \pm 0,06$	0,37	94,6	$2,89 \pm 0,01$	2,63	109,9

^aAsa Norte, ^bPier, ^c Pontão

As recuperações obtidas para a determinação de NO_2^- variaram entre 94,6% a 97,3% demonstrando uma boa exatidão para o método baseado no μFIA . Apesar disto, as concentrações encontradas para todas as amostras foram menores do que as concentrações de referência (adicionada), o que pode ter sido ocasionado pela oxidação parcial do NO_2^- adicionado à NO_3^- dentro da matriz da amostra, reduzindo os sinais de absorvância e as concentrações estimadas para as soluções testadas.

Já as recuperações obtidas para a determinação do nitrogênio total nas amostras de água estudadas apresentaram valores de 103,0 % a 111,8 %. Considerando que estas as medidas estimadas foram obtidas pela diferença entre as concentrações das amostras fortificadas e não fortificadas, de modo que duas determinações foram necessárias para estimar esses valores, pode ser afirmado que o μFIA apresentou um desempenho satisfatório. Foi observado ainda que todas as concentrações quantificadas pelo método proposto apresentaram valores acima das concentrações de referência (adicionadas), indicando um efeito na matriz da amostra, que poderia ter influenciado nas quantificações realizadas. Essa hipótese, no entanto, não foi

avaliada no presente trabalho.

Apesar disto, a confirmação de uma boa exatidão para os métodos baseados no μ FIA e a inexistência de efeitos de matriz foi evidenciada pela determinação de NO_2^- e nitrogênio total nas amostras de águas doce não fortificadas e pela comparação dos resultados com aqueles obtidos a partir do método de referência.

Para as determinações de nitrogênio total, conforme mostrado na Tabela 3, erros relativos positivos e negativos foram observados, indicando a ausência de erros sistemáticos. Adicionalmente, um teste de confiança (teste t) confirmou a inexistência de diferenças significativas entre os resultados ao nível de 95% de confiança, comprovando estatisticamente o bom desempenho do sistema proposto.

Tabela 3. Resultados para a determinação de nitrogênio total em seis amostras de água doce.

Amostra	μ FIA (mg N L ⁻¹)	Método de referência (mg N L ⁻¹)	Erro relativo (%)
P1 ^a	1,32 ± 0,01	1,26 ± 0,02	4,8
P2 ^b	1,21 ± 0,01	1,23 ± 0,02	-1,9
P3 ^c	1,50 ± 0,01	1,45 ± 0,01	3,5
C1 ^d	3,06 ± 0,03	3,13 ± 0,01	-2,2
C2 ^e	1,58 ± 0,02	1,57 ± 0,02	0,6
C3 ^f	4,21 ± 0,02	4,11 ± 0,02	2,4

^aAsa Norte, ^bPier, ^cPontão, ^dSanta Paula, ^ePerrier, ^fNossa Senhora Aparecida

É importante destacar que não foram encontradas concentrações de NO_2^- em níveis detectáveis nas amostras de água avaliadas a partir método baseado no μ FIA e que concentrações máximas de 0,5 $\mu\text{g N L}^{-1}$ (NO_2^-) foram determinadas pelo método de referência, o que representa cerca de 1/60 do LD estimado para o método proposto (μ FIA). Desse modo, os valores estimados para as determinações de nitrogênio total neste caso, referem-se na verdade, apenas ao teor de NO_3^- .

O desempenho dos dispositivos foi ainda avaliado quanto ao consumo de reagentes e na geração de resíduos. Em virtude das baixas vazões utilizadas para a solução de transporte ($40 \mu\text{L min}^{-1}$) e para a solução do reagente ($10 \mu\text{L min}^{-1}$) necessárias para redução quantitativa (97,5%) do NO_3^- a NO_2^- , o método proposto apresenta uma frequência analítica de 12 injeções h^{-1} produzindo 25 mL de resíduos após 100 injeções. Em um procedimento similar utilizando um sistema FIA convencional⁷⁰ com a coluna redutora de cádmio, a frequência analítica é aproximadamente de 20 injeções h^{-1} e o volume de resíduos gerados após 100 injeções é cerca de 600 mL. De acordo com esses dados, apesar da redução de aproximadamente 40% na frequência analítica observada para as análises realizadas no μFIA em relação ao sistema FIA convencional, a miniaturização dos procedimentos proporcionou uma redução próxima a 24 vezes na geração de resíduos, demonstrando um bom desempenho desse dispositivo aos preceitos da Química Verde. Adicionalmente, o consumo do reagente NED/SAM foi drasticamente reduzido a cerca de 1,7% do volume normalmente consumido empregando-se um sistema FIA convencional.

4.3. Caracterização do microanalisador em fluxo empregado na determinação de fosfato.

Uma fotografia do microdispositivo avaliado para determinação de PO_4^{-3} neste trabalho é mostrada na Figura 34. Assim como realizado nos sistemas para a determinação de NO_3^- e NO_2^- , todos os componentes analíticos (SA, P, BR, CFF) foram integrados em um monólito com as mesmas dimensões dos microssistemas já mencionados (7,0 cm x 4,0 cm x 0,5 cm).

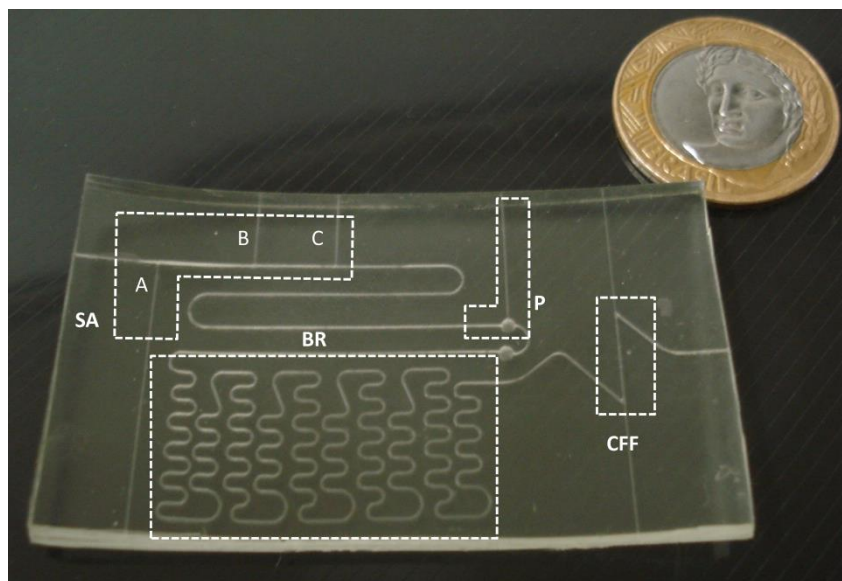


Figura 34. Microssistema empregado na determinação de PO_4^{-3} : sistema de amostragem (SA) com duas opções de volume (AB e AC), ponto de confluência (P), bobina de reação (BR) e célula de fluxo fotométrica (CFF).

É importante observar que este dispositivo é bastante similar àquele empregado para a determinação de NO_2^- (sem coluna) sendo que, para este caso, o comprimento da bobina reacional foi aumentado para 586 mm de forma a proporcionar um maior tempo de residência da mistura reacional no interior do sistema. Com o aumento da bobina de reação, o volume desta estrutura específica se tornou cerca de duas vezes maior (82 μL) que aqueles encontrados para os outros dispositivos avaliados neste trabalho (40 μL).

4.3.1. Determinação de fosfato em amostras de água doce.

A avaliação do dispositivo para a determinação de PO_4^{-3} foi inicialmente realizada empregando-se soluções de molibdato e de ácido ascórbico com concentrações semelhantes às utilizadas em sistemas de análise em fluxo convencionais⁷¹. Além disso, as amostras e os padrões não haviam sido preparados em soluções de molibdato de amônio, de modo que a reação de molibdato com o PO_4^{-3} para a formação do ácido fosfomolibdico (Equação 2) foi, de fato, realizada em linha nestes estudos iniciais.

Ao se utilizar estas condições, um elevado efeito Schlieren⁶⁹ foi observado, impossibilitando a correlação dos sinais analíticos com as concentrações das soluções padrão avaliadas.

Para contornar este problema, as concentrações das soluções de molibdato de amônio e de ácido ascórbico foram reduzidas para a aplicação no microsistema proposto, sendo observado que diluições de até 5 vezes nas soluções originais eram necessárias para proporcionarem sinais analíticos satisfatórios. Pode-se atribuir este problema à difícil mistura das soluções reagentes no microsistema, onde um fluxo altamente laminar dificulta o transporte de massa por convecção e, conseqüentemente, a homogeneização de soluções mais concentradas⁷².

É importante salientar que mesmo com a alteração das concentrações da solução carregadora (molibdato) e da solução de confluência (ácido ascórbico), as injeções de padrões preparados apenas em água destilada ainda proporcionaram um efeito de Schlieren⁶⁹ considerável, o qual se tornava imperceptível apenas para soluções mais concentradas em PO_4^{-3} (maiores que $5,0 \text{ mg P L}^{-1}$). A minimização deste efeito foi apenas possível após a diluição apropriada das soluções avaliadas, previamente à sua injeção no μFIA , em uma solução estoque de molibdato de amônio, de maneira a obter uma concentração final idêntica a da solução carregadora. Essa solução obtida a partir da formação do ácido fosfomolibdico se apresentou estável por até duas horas. Neste ponto, é preciso considerar que existe uma limitação do sistema proposto na determinação de PO_4^{-3} , uma vez que uma das etapas reacionais não pôde ser realizada em linha, diminuindo o grau de automação do

procedimento. Apesar disto, os estudos realizados neste trabalho, servirão de base para o estabelecimento de condições ótimas para a realização mais eficiente deste procedimento em microssistemas de UA.

Empregando-se as condições descritas na seção 3.3, definidas após o estudo inicial sobre as concentrações das soluções, foi possível obter o fiograma apresentado na Figura 35 a partir da determinação de PO_4^{-3} nas amostras de água doce: P1 (Pier), P2 (Asa Norte), P3 (Lago Sul) e no P4 (Parque). Como pode ser observado, os sinais transientes indicaram uma razão sinal/ruído satisfatória (maior que 5 unidades para a menor concentração), porém a linha de base se mostrou dependente da concentração dos analitos.

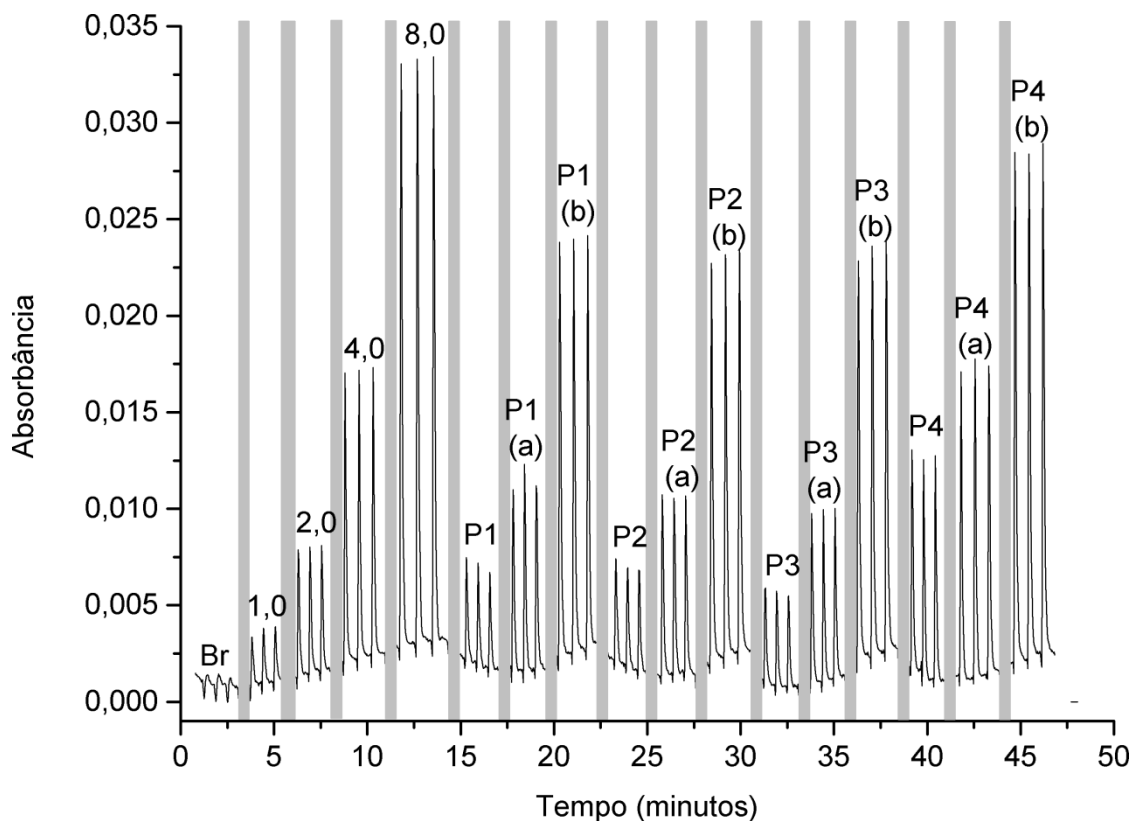


Figura 35. Fiograma obtido na determinação de PO_4^{-3} em amostras de água doce sem e com a fortificação de 1,0 (a) e 4,0 mg P L^{-1} (PO_4^{-3}) (b). Os valores indicados são expressos em mg N L^{-1} (PO_4^{-3}). Os picos ocultos referem-se a injeções de limpeza.

Acredita-se que parte deste problema está relacionada à difícil limpeza do sistema na região da célula fotométrica ocasionada pela impregnação do azul de molibdênio nas paredes dos canais ou mesmo nas extremidades das fibras.

Neste caso, com o aumento das concentrações de PO_4^{-3} , há um maior acúmulo de azul de molibdênio nestas regiões e uma maior atenuação do sinal analítico com conseqüente aumento do sinal da linha de base. Apesar disto, mesmo com instabilidade na linha de base, os sinais analíticos baseados nas alturas dos picos permitiram a construção de uma curva analítica (Figura 36) com boa correlação linear ($R = 0,999$), demonstrando a possibilidade de aplicação do microssistema nesta determinação.

Um LOD estimado de $0,54 \text{ mg P L}^{-1}$ (PO_4^{-3}) para o método com o μFIA . Adicionalmente uma reprodutibilidade de $0,11\%$ foi estimada para injeções sucessivas ($n = 4$) da solução padrão de $4,0 \text{ mg P L}^{-1}$ (PO_4^{-3}), indicando uma boa precisão para os procedimentos de injeção e detecção.

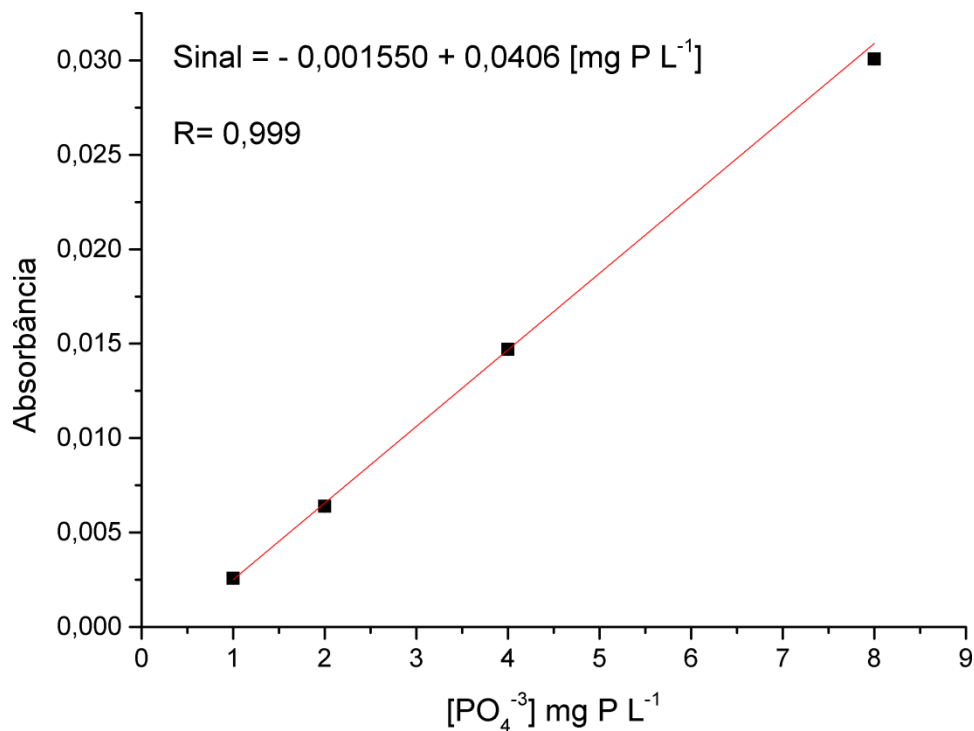


Figura 36. Curva analítica obtida nas determinações de soluções padrão na faixa de $1,0 - 8,0 \text{ mg P L}^{-1}$ (PO_4^{-3}).

É importante destacar que a curva de calibração desenvolvida para esta determinação apresentou o LOD cerca de cinco vezes maior que a concentração máxima permitida pela legislação brasileira vigente para águas doces⁶⁶ ($0,1 \text{ mg P L}^{-1} (\text{PO}_4^{-3})$), o que restringe a sua aplicação na avaliação e no monitoramento da qualidade ambiental. Essa limitação é ocasionada pela dimensão miniaturizada do caminho óptico (1,0 cm), o que afeta no número de espécies absorventes que interagem com o feixe de radiação de acordo com a lei de Lambert-Beer⁷³. Para contornar esta limitação, novos estudos serão necessários com o objetivo de aumentar o caminho óptico no dispositivo ou mesmo propor outras estratégias integradas de detecção.

De fato, a literatura mostra que ao se utilizar um sistema FIA convencional com célula de detecção com o mesmo caminho óptico utilizado no presente trabalho (1,0 cm) não é possível atender a legislação brasileira⁶⁶ para fósforo em águas naturais. Entretanto, a partir do uso de células com caminhos ópticos da ordem de 30 cm a sensibilidade é aumentada em até 30 vezes⁷⁴ possibilitando a adequação do método à legislação.

A frequência analítica para o microssistema proposto foi de aproximadamente $40 \text{ injeções h}^{-1}$, e foram observadas reduções da ordem de 80 % no consumo de reagentes e no volume de resíduos gerados em relação aos sistemas de análise em fluxo convencionais⁷¹.

As recuperações de PO_4^{-3} obtidas para as amostras de água fortificadas ($1,0 \text{ mg P L}^{-1}$ e $4,0 \text{ mg P L}^{-1}$) são mostradas na Tabela 4. Foram observados valores de recuperação na faixa de 90,4% a 114,7%, o que demonstra a boa exatidão do método. Para três das amostras estudadas foram observadas recuperações acima de 100%, o que evidencia a existência de algum efeito na matriz da amostra. Sabe-se que o fósforo é encontrado em ambientes aquáticos sob diferentes formas (fosfatos orgânicos, fosfatos e fosfatos condensados) e o aumento do teor de fosfato em uma amostra real pode levar à um novo equilíbrio químico entre as formas de P presentes.

Tabela 4. Recuperações para as amostras de água superficial fortificadas com PO_4^{-3} .

Amostra	μFIA (mg P L ⁻¹)	Adicionado (mg P L ⁻¹)	Recuperações (%)
P1 ^a	1,15 ± 0,05	1,00	114,7
	3,90 ± 0,05	4,00	97,6
P2 ^b	0,99 ± 0,02	1,00	99,4
	3,85 ± 0,01	4,00	96,3
P3 ^c	0,99 ± 0,01	1,00	99,4
	4,05 ± 0,02	4,00	101,1
P4 ^d	1,12 ± 0,02	1,00	111,6
	3,62 ± 0,01	4,00	90,4

^aPier, ^b Asa Norte, ^c Lago Sul e ^d Parque

A exatidão do método com o microssistema foi também avaliada na determinação de PO_4^{-3} em amostras de água não fortificadas. Os resultados obtidos (Tabela 5) foram comparados à um método de referência, não sendo observadas diferenças significativas, ao nível de 95 % de confiança entre os valores médios. Além disso, desvios relativos positivos e negativos demonstraram a inexistência de erros sistemáticos, comprovando a boa exatidão do método proposto.

Tabela 5. Resultados para a determinação de PO_4^{-3} em quatro amostras de água.

Amostra	μFIA (mg P L ⁻¹)	Método de referência (mg P L ⁻¹)	Erro relativo %
P1 ^a	1,71 ± 0,03	1,67 ± 0,008	1,87
P2 ^b	1,72 ± 0,03	1,73 ± 0,02	-0,52
P3 ^c	1,59 ± 0,02	1,64 ± 0,01	-3,03
P4 ^d	3,32 ± 0,01	3,43 ± 0,01	-3,4

^aPier, ^b Asa Norte, ^c Lago Sul e ^d Parque

Ainda de acordo com a tabela 5, pode ser observado que altos teores de fósforo foram encontrados para todas as amostras de água avaliadas, o que poderia evidenciar a sua contaminação por alguma fonte externa. Sabe-se que o PO_4^{-3} inorgânico (forma livre) é encontrado em maiores quantidades em águas contaminadas por detergentes e esgoto, o que de fato pode ter contribuído para o aumento das concentrações avaliadas. Considerando, entretanto, que estas amostras foram coletadas durante um período de intensas chuvas, uma segunda hipótese a ser avaliada é de que esta alta concentração esteja relacionada com o constante arraste do solo e cobertura vegetal para o lago durante este período⁷⁵. Apesar disto, um estudo mais apurado seria necessário para a confirmação de qualquer uma dessas evidências, o que esteve fora do escopo deste trabalho.

5. Conclusões e Perspectivas

Os resultados obtidos a partir dos estudos reportados nesta dissertação permitem concluir que a integração de uma coluna redutora de cádmio em um microsistema fluídico à base de UA foi realizada de maneira rápida e eficiente. Os ensaios demonstraram que este dispositivo pode ser aplicado à determinação da concentração de nitrogênio total (nas formas de NO_2^- e NO_3^-), atendendo plenamente a legislação brasileira⁶⁶ para a concentração destas espécies em águas doces. O mesmo procedimento utilizado para a integração desta coluna poderá ser utilizado como base para a integração de colunas com outros materiais sólidos, os quais poderão ser utilizados em diferentes procedimentos de preparo de amostra.

Os estudos realizados para a determinação de PO_4^{-3} mostraram que um dispositivo microfluídico à base de UA pode ser utilizado para esta aplicação. Entretanto, modificações no próprio microsistema, como o aumento do caminho óptico, ou mesmo nos procedimentos automatizados e soluções deverão ser realizadas para que o mesmo possa ser utilizado como uma ferramenta mais sensível para monitoramento ambiental.

Para todos os microsistemas foi demonstrado também que a realização das determinações, de maneira miniaturizada, proporciona uma considerável redução no consumo de reagentes e na geração de resíduos, de modo que esta proposta poderá ser utilizada no futuro como forma atender os requisitos da química verde.

6. Referências bibliográficas

1. Mbaye, M.; Seye, M. D. G.; Aaron, J. J.; Coly, A.; Tine, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2011**, 400, 403-410.
2. Zhao, M. X.; Schiro, P. G.; Kuo, J. S.; Koehler, K. M.; Sabath, D. E.; Popov, V.; Feng, Q. H.; Chiu, D. T. *Analytical Chemistry*, **2013**, 85, 2465-2471.
3. Pedrosa, V. A.; Lowinsohn, D.; Bertotti, M. *Electroanalysis*, **2006**, 18, 931-934.
4. Ruzicka, J.; Hansen, E. H. *Analytica Chimica Acta*, **1975**, 78, 145-157.
5. http://www.analiticaweb.com.br/produtos_detalhe.php?an=35972f3a8e6c776446fb93c4fcd27a96&Bid=p3d24b0dad6b. Abril de 2013.
6. Zhai, C.; Sheng, J.; Qiang, W.; Lei, J. P.; Ju, H. X. *Talanta*, **2010**, 82, 67-71.
7. Arribas, A. S.; Martinez-Fernandez, M.; Moreno, M.; Bermejo, E.; Zapardiel, A.; Chicharro, M. *Food Chemistry*, **2013**, 136, 1183-1192.
8. Torres, A. C.; Romero, A. M.; Calatayud, J. M. *Mikrochimica Acta*, **1998**, 128, 187-190.
9. Kronka, E. A. M.; dos Reis, B. F.; Vieira, J. A.; Blanco, T.; Gervasio, A. P. G. *Quimica Nova*, **1997**, 20, 372-376.
10. Masini, J. C. *Quimica Nova*, **2008**, 31, 704-708.
11. Reis, B. F.; Gine, M. F.; Zagatto, E. A. G.; Lima, J. L. F. C.; Lapa, R. A. *Analytica Chimica Acta*, **1994**, 293, 129-138.
12. Aristizabal, S. L. *Desenvolvimento de Sistemas Lab on a Chip para Análises em Biofísica Celular*. **2012**. (Doutorado em Engenharia Elétrica), Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos, Universidade de São Paulo, São Paulo.
13. Arora, A.; Simone, G.; Salieb-Beugelaar, G. B.; Kim, J. T.; Manz, A. *Analytical Chemistry*, **2010**, 82, 4830-4847.
14. Rios, A.; Zougagh, M.; Avila, M. *Analytica Chimica Acta*, **2012**, 740, 1-11.
15. Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. M. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **1990**, 1, 244-248.

-
- 16.Lenardao, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. D. *Quimica Nova*, **2003**, 26, 123-129.
- 17.Grass, B.; Weber, G.; Neyer, A.; Schilling, A.; Hergenroder, R. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, **2002**, 57, 1575-1583.
- 18.Iliescu, C.; Chen, B. T.; Miao, J. *Sensors and Actuators a-Physical*, **2008**, 143, 154-161.
- 19.Thienot, E.; Domingo, F.; Cambil, E.; Gosse, C. *Microelectronic Engineering*, **2006**, 83, 1155-1158.
- 20.Leech, P. W. *Vacuum*, **1999**, 55, 191-196.
- 21.Sigmund, P. *Thin Solid Films*, **2012**, 520, 6031-6049.
- 22.Kuo, D. H.; Cheung, B. Y.; Wu, R. J. *Thin Solid Films*, **2001**, 398, 35-40.
- 23.Liu, F. K.; Chang, Y. C.; Ko, F. H.; Chu, T. C.; Dai, B. T. *Microelectronic Engineering*, **2003**, 67-8, 702-709.
- 24.<http://lnls.cnpem.br/>. Maio de 2013.
- 25.Lee, G. B.; Chen, S. H.; Huang, G. R.; Sung, W. C.; Lin, Y. H. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2001**, 75, 142-148.
- 26.Wang, L. M.; Kodzius, R.; Yi, X.; Li, S. B.; Hui, Y. S.; Wen, W. J. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2012**, 168, 214-222.
- 27.Shin, D. S.; Lee, J. H.; Suh, J.; Kim, T. H. *Optics and Lasers in Engineering*, **2006**, 44, 615-622.
- 28.de Jesus, D. P.; Blanes, L.; do Lago, C. L. *Electrophoresis*, **2006**, 27, 4935-4942.
- 29.Liu, A. L.; He, F. Y.; Hu, Y. L.; Xia, X. H. *Talanta*, **2006**, 68, 1303-1308.
- 30.da Rocha, Z. M.; Martinez-Cisneros, C. S.; Seabra, A. C.; Valdes, F.; Gongora-Rubio, M. R.; Alonso-Chamarro, J. *Lab on a Chip*, **2012**, 12, 109-117.
- 31.Brehmer, M.; Conrad, L.; Funk, L. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **2003**, 24, 291-304.

- 32.Park, J.; Fujita, H.; Kim, B. *Sensors and Actuators a-Physical*, **2011**, 168, 105-111.
- 33.Fonseca, A.; Silva, J. D. B. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2013**, 24, 5-11.
- 34.Fonseca, A.; Raimundo, I. M.; Rokwedder, J. J. R.; Ferreira, L. O. S. *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 603, 159-166.
- 35.Fernandes, J. C. B.; Ferreira, L. O. S. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2006**, 17, 643-647.
- 36.Monte, S. S.; Lima, M. B.; Andrade, S. I. E.; Harding, D. P.; Fagundes, Y. N. M.; Santos, S. R. B.; Lemos, S. G.; Araujo, M. C. U. *Talanta*, **2011**, 86, 208-213.
- 37.Castano-Alvarez, M.; Ayuso, D. F. P.; Granda, M. G.; Fernandez-Abedul, M. T.; Garcia, J. R.; Costa-Garcia, A. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2008**, 130, 436-448.
- 38.Mao, P.; Han, J. Y. *Lab on a Chip*, **2005**, 5, 837-844.
- 39.Kamruzzaman, M.; Alam, A. M.; Kim, K. M.; Lee, S. H.; Kim, Y. H.; Kim, G. M.; Dang, T. D. *Food Chemistry*, **2012**, 135, 57-62.
- 40.Carroll, S.; Crain, M. M.; Naber, J. F.; Keynton, R. S.; Walsh, K. M.; Baldwin, R. P. *Lab on a Chip*, **2008**, 8, 1564-1569.
- 41.Coltro, W. K. T.; Piccin, E.; Carrilho, E.; de Jesus, D. P.; Fracassi da Silva, J. A.; Torres da Silva, H. D.; do Lago, C. L. *Quimica Nova*, **2007**, 30, 1986-2000.
- 42.Ibarlucea, B.; Diez-Gil, C.; Ratera, I.; Veciana, J.; Caballero, A.; Zapata, F.; Tarraga, A.; Molina, P.; Demming, S.; Buttgenbach, S.; Fernandez-Sanchez, C.; Llobera, A. *Analyst*, **2013**, 138, 839-844.
- 43.Lefevre, F.; Chalifour, A.; Yu, L.; Chodavarapu, V.; Juneau, P.; Izquierdo, R. *Lab on a Chip*, **2012**, 12, 787-793.
- 44.Liu, W.; Zhang, Z. J.; Zhang, Y. Y. *Microchimica Acta*, **2008**, 160, 141-146.
- 45.Li, R. N.; Wang, L. L.; Gao, X. T.; Du, G. F.; Zhai, H. L.; Wang, X. Y.; Guo, G. S.; Pu, Q. S. *Journal of Hazardous Materials*, **2013**, 248, 268-275.

46. Reschke, B. R.; Schiffbauer, J.; Edwards, B. F.; Timperman, A. T. *Analyst*, **2010**, 135, 1351-1359.
47. Viefhues, M.; Regtmeier, J.; Anselmetti, D. *Analyst*, **2013**, 138, 186-196.
48. Zhu, L.; Meier, D.; Boger, Z.; Montgomery, C.; Semancik, S.; DeVoe, D. L. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2007**, 121, 679-688.
49. Lin, C. H.; Wang, Y. N.; Fu, L. M. *Biomicrofluidics*, **2012**, 6,
50. Martinez, N. A.; Schneider, R. J.; Messina, G. A.; Raba, J. *Biosensors & Bioelectronics*, **2010**, 25, 1376-1381.
51. Chen, W.; Peng, C. F.; Jin, Z. Y.; Qiao, R. R.; Wang, W. Y.; Zhu, S. F.; Wang, L. B.; Jing, Q. H.; Xu, C. L. *Biosensors & Bioelectronics*, **2009**, 24, 2051-2056.
52. Cakal, C.; Ferrance, J. P.; Landers, J. P.; Caglar, P. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 398, 1909-1917.
53. Nge, P. N.; Pagaduan, J. V.; Yu, M.; Woolley, A. T. *Journal of Chromatography A*, **2012**, 1261, 129-135.
54. Petsul, P. H.; Greenway, G. M.; Haswell, S. J. *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 428, 155-161.
55. Edwards, V. R.; Tett, P.; Jones, K. J. *Continental Shelf Research*, **2003**, 23, 1771-1785.
56. Lambert, S. J.; Davy, A. J. *New Phytologist*, **2011**, 189, 1051-1059.
57. <http://www.medeiros.com.br/m01brgg9.htm>. Maio de 2013.
58. Silva, J. C. B. *Desenvolvimento e avaliação de um microssistema fluídico com unidade de difusão gasosa integrada*. **2012**. (Mestrado), Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília.
59. Swiderski, K. W.; Khudyakov, I. V. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2004**, 43, 6281-6284.
60. da Silva, D. D.; Galhiane, M. S.; Chaar, J. D.; Mouchrek, V. E. *Química Nova*, **2003**, 26, 461-465.

61. Yanilmaz, M.; Kalaoglu, F.; Karakas, H.; Sarac, A. S. *Journal of Applied Polymer Science*, **2012**, 125, 4100-4108.
62. Fonseca, A. *Construção e avaliação de microssistemas para análise em fluxo*. **2008**. (Doutorado em Ciências), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
63. Ramos, L. A.; Cavalheiro, C. C. S.; Cavalheiro, E. T. G. *Quimica Nova*, **2006**, 29, 1114-1120.
64. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (American Public Health Association, Washington, 18th Ed., 1975).
65. Crouch, S. R.; Malmstad, H. *Analytical Chemistry*, **1967**, 39, 1084-&.
66. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. *Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento bem como estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes*. Diário Oficial da União, 18 Março 2005, Brazil, <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.
67. Gal, C.; Frenzel, W.; Moller, J. *Microchimica Acta*, **2004**, 146, 155-164.
68. Silva, J. C. B. *Desenvolvimento e avaliação de um microssistema fluídico com unidade de difusão gasosa integrada*. **2012**. (Mestrado em Química Analítica), Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília.
69. Rocha, F. R. P.; Nobrega, J. A. *Quimica Nova*, **1996**, 19, 636-640.
70. Gabriel, D.; Baeza, J.; Valero, F.; Lafuente, J. *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 359, 173-183.
71. Grudpan, K.; Ampan, P.; Udnan, Y.; Jayasvati, S.; Lapanantnoppakhun, S.; Jakmune, J.; Christian, G. D.; Ruzicka, J. *Talanta*, **2002**, 58, 1319-1326.
72. Dias, A. C. B.; Borges, E. P.; Zagatto, E. A. G.; Worsfold, P. J. *Talanta*, **2006**, 68, 1076-1082.
73. Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*, **2003**, 6th ed., Freeman, W. H.: New York

74.Metchert, W. R.; Rocha, F. R. P.; Raimundo, I. M.; Reis, B. F. *Quimica Nova*, **2008**, 31, 427-429.

75.Gebler, L.; Louzada, J. A. S.; Bertol, I.; Ramos, R. R.; Miquelluti, D. J.; Schrammel, B. M. *Revista Brasileira De Engenharia Agricola E Ambiental*, **2012**, 16, 769-776.