



UnB

Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uso de imagens digitais para detecção de luminescência em sistemas
microfluídicos de análise.

Aluna: Hadassa de Souza Ramos Pontes Moura
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília, DF
2016



Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

USO DE IMAGENS DIGITAIS PARA DETECÇÃO DE
LUMINESCÊNCIA EM SISTEMAS MICROFLUÍDICOS DE ANÁLISE.

HADASSA DE SOUZA RAMOS PONTES MOURA

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília, DF
2016

Folha de aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Hadassa de Souza Ramos Pontes Moura**, matrícula nº **14/0194452**, intitulada “*Uso de imagens digitais para detecção de luminescência em sistemas microfluídicos de análise*”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 6 de julho de 2016.

Prof. Dr. Alexandre

Fonseca

Presidente de Banca

(IQ/UnB)

Profª Drª Ana Cristi Basile

Dias

Membro Titular (IQ/UnB)

Dr. Márcio Talhavini

Membro Titular (INC/PF)

Prof. Dr. Jez Willian

Batista Braga

Membro Suplente

(IQ/UnB)

Em 6 de julho de 2016.

Dedicatória

Porque Dele e por Ele
Para Ele são todas as coisas.

Agradecimento

Em primeiro lugar, agradeço à Deus. Sem Ele, nada é possível

Agradeço à minha família, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos

Agradeço ao Prof. Dr. Alexandre Fonseca, pela sua orientação, amizade, cuidado e compreensão

Agradeço aos professores Ana Cristi, Valéria, Fernanda, Marly, Jez e Fernando e, pela amável convivência e suporte.

Agradeço aos meus amigos, Camila, Laiz, Fabiana, Gerson, Vitória, Alan, Dudu, Enoc, Damiana, Victor Hugo, Thiago, Jacqueline, Bruno (se eu esqueci alguém...foi mal ") pela amizade, carinho e doces momentos de alegrias!

Agradeço aos servidores da secretaria, e a todos que contribuíram comigo nessa jornada.

Agradeço à CAPES pelo fornecimento das bases para pesquisa e apoio financeiro.

A todos vocês, o meu abraço!

Resumo

Este trabalho descreve o desenvolvimento de microssistemas fluídicos construídos a base de uretano-acrilato com células de detecção fluorimétricas e quimiluminescentes integradas. Os fenômenos luminescentes são bastante interessantes para a determinação de diversos analitos, entretanto, as estratégias utilizadas para realizar a detecção destas emissões apresentam dificuldades para serem adaptadas às instrumentações do tipo *lab-made*, não somente por serem de alto custo, mas também devido a sua complexidade. A literatura carece de aplicações para realizar determinações luminescentes com detectores de custo reduzido e de fácil operação. Partindo desta demanda, este projeto se propôs a utilizar como detector alternativo uma *webcam* comercial para realizar determinações envolvendo medidas de fluorescência e quimiluminescência. A detecção foi baseada em imagens digitais produzidas pela *webcam* durante o monitoramento contínuo da célula de fluxo do sistema miniaturizado. Para gravar os microcanais no substrato, foi empregada a fotolitografia profunda no UV. As dimensões dos canais são de aproximadamente 450 μm de largura e 550 μm , de profundidade. Para a realização de medidas de quimiluminescência, inicialmente, foi utilizada uma mini fotomultiplicadora (Hamamatsu -H7468-03), para a determinação de paracetamol em amostras de medicamentos. Nesta determinação, foram empregadas as estratégias de injeção hidrodinâmica e multicomutação. Em um segundo momento, a estratégia de injeção de zonas de misturas foi utilizada para realizar esta determinação, empregando a *webcam* como detector. Para todas as estratégias foram obtidas boas correlações lineares ($R^2 > 0,99$). Os LD obtidos com a PMT foram da ordem de 0,33 mg L^{-1} e 0,26 mg L^{-1} , enquanto com a *webcam*, foi obtido um LD de 31 mg L^{-1} . Já para a detecção da fluorescência, a *webcam* foi utilizada para discriminar diferentes concentrações do fluoróforo fluoresceína e realizar a determinação da dureza da água em amostras de águas minerais, utilizando o fluoróforo calceína. Para ambas as determinações fluorimétricas, foi utilizado um LED com emissão máxima em 470 nm. Em ambos os casos, foram obtidas boas correlações lineares ($R^2 > 0,99$), os LD foram da ordem de 0,02 mg L^{-1} para a discriminação de fluoresceína e de 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a determinação de Ca^{2+} com calceína.

Palavras chave: microdispositivos, luminescência, imagens digitais.

Abstract

The following paper describes the development of fluidic microsystems built on urethane-acrylate with embedded fluorimetric and chemiluminescent detection cells. The luminescent phenomena are much interesting for determination of various analytes. However, the strategy used to carry out detection of such emissions tend to produce difficulties regarding their adaptation to lab-made instrumentation, not only because they are costly, but also because of its complexity. Chemical literature lacks applications to operate luminescent determinations with low cost, easily operable detectors. From that perspective, the following project aims to use as an ordinary, commercial webcam as an alternative detector to operate determinations involving chemiluminescence and fluorescence measurements. The mentioned detection was based on digital images produced by the webcam during continuous monitoring of the miniaturized system flow cell. In order to engrave the micro-channels into the substract, deep photolithography on UV was utilised. The channel dimensions are approximately 450 μm wide and 550 μm deep. For operation of chemiluminescence measurements, a mini photomultiplier (Hamamatsu – H7468-03) was used, in order to determine paracetamol in medication samples.. In the mentioned determination, hydrodynamic injection and multicommutation strategies were applied. Secondly, the merging zones injection strategy was applied to operate such determination, by using the webcam as a detector. For all strategies, good linear correlations have been obtained ($R^2 > 0,99$). LDs obtained with PMT were 0,33 mg L^{-1} and 0,26 mg L^{-1} , as with the webcam the results obtained are a 31 mg L^{-1} LD. As for the fluorescence detection, the webcam was used to differentiate diverse fluorophore fluoresceine concentrations and to operate determination of water hardness in mineral water samples, by using fluorophore calceine. For both fluorimetric determinations, a LED with maximum emission of 470 nm was applied. In both cases, good linear correlations were obtained ($R^2 > 0,99$), LDs were approximately 0,02 mg L^{-1} for fluoresceine differentiation, and 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for determination of Ca^{2+} with calceine.

Key words: microdevice, luminescence, digital image.

Índice

	Folha de Rosto.....	I
	Folha de aprovação.....	II
	Dedicatória.....	III
	Agradecimento.....	IV
	Resumo.....	V
	Abstract.....	VI
	Lista de Abreviaturas e Acrônimos.....	X
	Lista de Figuras	XI
	Lista de Tabelas.....	XV
Capítulo 1-	Introdução, Revisão Bibliográfica e Objetivos.....	16
1.1	Revisão Bibliográfica.....	16
1.1.1	Miniaturização analítica.....	16
1.1.2	Técnicas de fabricação.....	17
1.1.3	Fenômenos Luminescentes.....	18
1.1.3.1	Instrumentação comercial para as detecções de fluorescência e quimiluminescência.....	19
1.1.4	Estratégias de detecção em sistemas miniaturizados.....	20
1.1.4.1	Detecções ópticas.....	20
1.1.5	Imagens digitais.....	22
1.1.5.1	Detecção baseada em imagens digitais.....	22
1.1.6	Determinação de paracetamol.....	24
1.1.7	Determinação de Ca^{2+}	25
1.2	Objetivos.....	27
1.2.1	Objetivos específicos.....	27
Capítulo 2-	inação de paracetamol em formulações farmacêuticas por quimiluminescência, do microsistema com injeção hidrodinâmica.....	28
2.1	Introdução.....	28
2.2	Materiais e Métodos.....	29
2.2.1	Construção dos microdispositivos.....	29
2.2.2	Aparatos.....	32
2.2.3	Reagentes e soluções.....	35
2.2.3.1	Soluções Estoque.....	35
2.2.3.2	Soluções de trabalho.....	35
2.2.3.3	Preparo de amostras.....	36
2.2.4	Procedimento automatizado de análise.....	37
2.3	Resultados e Discussão.....	38
2.4	Conclusões parciais e perspectivas.....	41
Capítulo 3-	Determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas por quimiluminescência em μ FIA e empregando o conceito de multicomutação.....	42
3.1	Introdução.....	42
3.2	Materiais e Métodos.....	42
3.2.1	Construção dos microdispositivos.....	43
3.2.2	Aparatos	43

3.2.3	Reagentes e soluções.....	43
3.2.3.1	Soluções Estoque.....	43
3.2.3.2	Soluções de trabalho.....	44
3.2.3.3	Preparo de amostras.....	44
3.2.4	Método de Referência.....	45
3.2.5	Procedimento automatizado de análise.....	45
3.3	Resultados e Discussão.....	47
3.4	Conclusões parciais e perspectivas.....	51
Capítulo 4-	Detecção óptica baseada em imagens digitais para medidas de	
	quimiluminescência.....	52
4.1	Introdução.....	52
4.2	Materiais e Métodos.....	52
4.2.1	Construção das microcélulas de detecção.....	52
4.2.2	Aparatos.....	54
4.2.3	Reagentes e soluções.....	56
4.2.3.1	Soluções Estoque.....	56
4.2.3.2	Soluções de trabalho.....	56
4.2.4	Procedimento de análise.....	56
4.3	Resultados e Discussão.....	57
4.3.1	Testes iniciais para avaliação de configuração de célula de detecção.....	57
4.3.2	Estudos para discriminação de diferentes concentrações de íon hipoclorito por imagens digitais.....	60
4.4	Conclusões parciais e perspectivas.....	63
Capítulo	Determinação de paracetamol em amostras farmacêutica por quimiluminescência	
5-	e imagens digitais, empregando o conceito de zona de mistura	64
5.1	Introdução.....	64
5.2	Materiais e Métodos.....	64
5.2.1	Construção do microdispositivo.....	65
5.2.2	Aparatos.....	65
5.2.3	Reagentes e Soluções.....	66
5.2.3.1	Soluções estoque.....	67
5.2.3.2	Soluções de trabalho.....	67
5.2.3.3	Preparo de Amostra.....	67
5.2.4	Procedimento automatizado de análise.....	68
5.2.4.1	Otimizações univariadas.....	69
5.2.4.2	Otimizações do sistema de aquisição de imagens.....	70
5.3	Resultados e Discussão.....	71
5.3.1	Condições otimizadas obtidas com o programa na versão VS2013.1.....	71
5.3.1.2	Condições otimizadas obtidas com o programa na versão VS 2103.2	72
5.3.3	Determinação de paracetamol em medicamentos empregando o conceito de zonas de mistura.....	73
5.4	Conclusões Parciais e Perspectivas.	75
Capítulo 6	Detecção óptica baseada em imagens digitais para medidas fluorescência.	76
6.1	Introdução.....	76
6.2	Materiais e Métodos.....	76
6.2.1	Construção das microcélulas de detecção.....	77
6.2.2	Aparatos.....	77

6.2.3	Reagentes e soluções.....	79
6.2.3.1	Soluções Estoque.....	79
6.2.3.2	Soluções de trabalho.....	79
6.2.4	Procedimento de análise.....	79
6.3	Resultados e Discussão.....	80
6.3.1	Estudos para discriminação de diferentes concentrações de Fluoresceína por imagens digitais.....	80
6.4	Conclusões parciais e perspectivas.....	84
Capítulo 7	Determinação da dureza de águas minerais utilizando detecção óptica baseada em imagens digitais para medidas de fluorescência.....	85
7.1	Introdução.....	85
7.2	Materiais e Métodos.....	85
7.2.1	Construção dos microdispositivos.....	85
7.2.2	Aparatos.....	86
7.2.3	Reagentes e soluções.....	87
7.2.3.1	Soluções Estoque.....	87
7.2.3.2	Soluções de trabalho.....	87
7.2.3.3	Preparo de amostra.....	88
7.2.3.4	Método de Referência.....	88
7.2.4	Procedimentos automatizados de análise.....	88
7.2.4.1	Otimizações univariadas para a determinação de Ca^{2+} e Mg^{2+} com calceína.....	89
7.3	Resultados e Discussão.....	90
7.3.1	Avaliação da integração da célula de detecção fluorimétrica: discriminação de diferentes concentrações de Fluoresceína em microssistemas fluídicos utilizando detecção por imagens digitais.....	90
7.3.2	Parâmetros otimizados de análise.....	92
7.3.3	Determinação da dureza da água em amostras de água mineral por fluorescência em μFIA com detecção por imagens digitais.....	92
7.4	Conclusões parciais e perspectivas.....	95
Capítulo 8	Conclusões Gerais e Referências Bibliográficas.....	97
8.1	Conclusões Gerais.....	97
8.2	Referências Bibliográficas.....	98

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CI circuitos integrados
CL quimiluminescência
CLAE -Cromatografoa Líquida de Alta Eficiência
DGT difusão em filmes finos por gradiente de concentração
DNA acido desoxirribonucleico
FIA análise por injeção em fluxo
LIF fluorescência induzida por laser
LED diodo emissor de luz
LOCs laboratório em um chip
 μ TAS micro sistemas de análise total
PDMS- polidimetilsiloxano
UA uretano-acrilato
PMMA polimetilmetaacrilato
PMT fotomultiplicadora
RGB (red, green, blue)
RNI razão normatizada internacional
UV ultra violeta

Lista de Figuras

Figura 1: diagrama de Jablonski, onde S_0 representa o estado fundamental, S_1 e S_2 estados excitados singlete. (A) excitação de $S_0 \rightarrow S_2$. (B) Transição vibracional dentro do mesmo estado eletrônico. (C) conversão interna. (D) excitação de $S_0 \rightarrow S_1$. (E) emissão fluorescente. adaptado da ref. [19].....	18
Figura 2: representação esquemática de um fluorímetro comercial.	19
Figura 3: Representação simplificada da reação entre o luminol e o íon hipoclorito em meio básico. Adaptado de ref [43].....	28
Figura 4: Representação simplificada da reação entre o paracetamol e o íon hipoclorito Adaptado de ref [43].....	28
Figura 5: Representação das etapas de preparo do conjunto contendo a máscara com a configuração desejada, moldura de borracha e placa de vidro(A); reservatório para a resina sendo preenchido (B); conjunto com máscara e tampa unidos.	30
Figura 6: Expositora <i>lab-made</i> utilizada para polimerização da resina.	30
Figura 7: Representação da exposição das faces do conjunto para gravação dos canais pela face que não contém os canais (A); exposição pela face que contém os canais (B)	31
Figura 8: Conjunto contendo as placas e resiste, sem máscara com canais (A); Exposição do conjunto por apenas uma das faces(B); Fino filme não polimerizado (C); Selagem manual (D); Selagem irreversível(E).....	32
Figura 9: Protótipo desenvolvido para a aplicação (A); Fotografia do microsistema fabricado.....	32
Figura 10: Diagrama de posição das vias das válvulas solenóides, em A, a válvula encontra-se desligada e em B, ligada.	33
Figura 11: Fotografias mostrando a montagem do sistema de detecção. Mini fotomultiplicadora (A); Microsistema alinhado a FMT (B); fixação do microdispositivo com auxílio de uma chapa de alumínio(C); Caixa fechada com o conjunto já internalizados e acesso aos fluidos criados com tubos Tygon® (D)	34
Figura 12. Diagrama de fluxo do microsistema utilizado. As válvulas estão desligadas. (Legenda: BP – Bomba Peristáltica; V1 a V5 – Válvulas Solenóides; E1-canal de entrada do carregador; Am – Alça de amostragem; R- canal para injeção de luminol; P- ponto de confluência com luminol;CD – Célula de Detecção; BR- Bobina de reação; D – Descarte. Vazões indicadas na figura em mL.min ⁻¹).	34
Figura 13: Fotografia com a visão geral dos componentes do sistema em fluxo.Bomba peristáltica (1); Conjunto de válvulas Solenóides (2); Fonte Eletrica que alimenta as válvulas solenóides (3); Caixa com a Fotomultiplicadora (4); Circuito elétrico que alimenta a Fotomultiplicadora (5); Interface para comunicação das válvulas solenóides (6)	35
Figura 14. Diagrama obtido para determinação de paracetamol em medicamentos com injeção hidrodinâmica. Picos referentes aos quatro padrões de paracetamol, solução do branco e das seis amostras de medicamentos. Concentrações de paracetamol indicadas em mg L ⁻¹ . Barras em cinza ocultam picos referentes às injeções de limpeza.	38
Figura 15: Curva analítica obtida para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas por injeção hidrodinâmica. Faixa de concentração de 1,21-4,84 mg L ⁻¹	39
Figura (16): Ilustração da injeção de diferentes segmentos de reagentes em um fluxo multicomutado. S_1 , S_2 e S_3 representam três soluções arbitrárias, (BP) bomba peristáltica, (BR) bobina reacional e (D) detector.....	42
Figura 17: Protótipo do microsistema para realizar a multicomutação. Em (A), layout que	

comporta canais para inserção de solução carregadora (E1), segmentos de padrão/amostra (E2), hipoclorito (E3) ,os quais confluem no ponto “P”, além de canal para inserção de luminol, (R), a bobina reacional (BR) e cela de detecção quimiluminescente (CD). Dispositivo já confeccionado (B).	43
Figura 18: Diagrama de fluxo do microsistema utilizado. As válvulas estão desligadas. (Legenda: BP – Bomba Peristáltica; V1 a V3 – Válvulas Solenóides; CD – Célula de Detecção; E1, canal para injeção de solução carregadora, E2 canal para injeção de solução padrão/ amostra de paracetamol e E3, canal para injeção de solução de hipoclorito; R- canal para injeção de luminol; P- ponto de confluência; D – Descarte. Vazões indicadas na figura em mL mim ⁻¹).	45
Figura 19: Configuração dos segmentos das soluções de paracetamol e hipoclorito após a injeção de todos os segmentos de solução.	46
Figura 20. Fiagrama obtido para determinação de paracetamol em amostras de medicamentos com injeção multicomutada. Compõe este fiagrama os picos referentes aos quatro padrões de paracetamol, o, o sinal da solução do branco e os sinais das nove amostras de medicamentos. Concentrações de paracetamol indicadas em mg L ⁻¹ . As barras em cinza ocultam picos referentes à limpeza.	47
Figura 21: Curva analítica obtida para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando o conceito de multicomutação. Faixa de concentração de 1,0 -4,0 mg L ⁻¹	48
Figura 22: Gráfico de correlação para verificar a concordância dos valores obtidos pelo μ FIA com injeção multicomutada e o método de referência para a análise paracetamol em medicamentos.	50
Figura 23: Novas configurações de cela de detecção (A); fotografia das celas confeccionadas (B)	53
Figura 24: Caixa de madeira de pequenas dimensões com suporte em EVA acoplado(A); <i>webcam</i> adquirida (B); Conjunto contendo a câmera e a caixa (C). Modelo de cela de detecção acondicionado na caixa e conectado ao mundo externo por tubos Tygon®(D).	54
Figura 25: Diagrama de fluxo para FIA convencional. Configuração na posição “amostragem”. (Legenda: BP – Bomba Peristáltica; CD – Célula de Detecção; AM – Alça de amostragem para injeção de OCl ⁻ , D – Descarte. Vazões indicadas na figura em mL min ⁻¹). ...	55
Figura 26: Fotografia da montagem do sistema FIA convencional, contendo uma bomba peristáltica (A), o injetor proporcional (B) e a caixa contendo a cela de detecção (C).....	55
Figura 27: Interface gráfica que permitiu a visualização dos dados adquiridos em tempo real. Na imagem, um amostrador foi posicionado horizontalmente sobre a imagem da emissão quimiluminescente e o sinal obtido registrado no gráfico que é exibido na interface. Detalhe em laranja mostra o local onde o amostrador foi posicionado.	56
Figura 28: Fotografia do sinal quimiluminescente em cada uma das conformações:	58
Figura 29: Imagem da quimiluminescência nas conformações nº 5 e nº 6. Detalhes em branco indicam a posição onde o amostrador foi posicionado. Detalhes em laranja indicam o sentido de fluxo das soluções.	59
Figura 30: Perfil de sinal analítico para as configurações nº 5 e nº 6. CV 1,40% e 1,44 %, respectivamente.	60
Figura 31: Fiagrama obtido com a configuração nº 5 para discriminação de diferentes concentrações de íon hipoclorito. Concentrações indicadas em mg L ⁻¹ de OCl ⁻	60
Figura 32: Espectro de emissão do sistema Luminol hipoclorito. Ref [49]	61

Figura 33: Curva analítica obtida com a intensidade da componente azul para a configuração nº 5. Faixa de trabalho de 102,9 – 257,3 mg L ⁻¹ de OCl ⁻¹	61
Figura 34: Fiagrama obtido com a configuração nº 6 para a discriminação de OCl ⁻¹ . Concentrações indicadas em mg L ⁻¹ de OCl ⁻¹ ,	62
Figura 35 Curva analítica obtida com os dados obtidos pela intensidade da componente azul e utilizando a configuração nº 6.	62
Figura 36: Representação do segmento formado pela injeção concomitante de ambos os reagentes para formar uma zona de mistura.	64
Figura 37: Protótipo desenvolvido (A) e fotografia do dispositivo. (B). E1, E2, E3 e R são canais para injeção de soluções, (BR) a bobina reacional, CD a cela de detecção.	65
Figura 38: (A) caixa adaptada para realização das medidas de quimiluminescência com suporte em EVA com espessura de 0,5 cm para fixar o detector. (B) microssistema acondicionado no interior, fixado com auxílio de fita dupla face. (C) <i>webcam</i> utilizada para realizar as medidas; (D) <i>webcam</i> adaptada à caixa confeccionada.	65
Figura 39: Disposição dos equipamentos utilizados (A) Bomba peristáltica; (B) Válvula solenoides; (C) Caixa adaptada que acomoda o microssistema; (D) Fonte elétrica que alimenta as válvulas; (E) Interface de comunicação com as válvulas solenoides.	66
Figura 40: Interface gráfica do programa escrito em linguagem VisualStudio. Na imagem do programa, as marcações em branco consistem nas três regiões de aquisição de dados.	66
Figura 41: Formação da zona de mistura entre os reagentes após a injeção das soluções.....	68
Figura 42: Gráficos de atenuação percentual para cada otimização univariada utilizando uma região de aquisição de dados., com sinal sendo representado pela média dos valores da região de aquisição..(A) vazão de leitura. (B) volume injetado. (C) tempo de parada de fluxo.	71
Figura 43: Gráficos de atenuação percentual para cada otimização univariada utilizando três regiões de aquisição de imagem. (A) vazão de leitura. (B) volume injetado. (C) tempo de parada de fluxo. Programa faz média e a soma das intensidades de cada componente.	72
Figura 44 : Fiagrama obtido para determinação de paracetamol em amostras de medicamentos empregando o conceito de zona de mistura. Compões este fiagrama os picos referentes aos cinco padrões de paracetamol , com concentrações indicadas em mg L ⁻¹ , picos referentes ao branco e as seis amostras de medicamentos.	73
Figura 45: Curva analítica obtida para determinação de paracetamol em medicamentos empregando o conceito de zona de mistura. Faixa de concentração de 100- 500 mg L ⁻¹	74
Figura 46: <i>layout</i> dos novos protótipos (A e C); celas de detecção já confeccionadas (B eD). MF, MF1 e MF2 são os acessos criados para o acoplamento das FO.	77
Figura 47: Microssistemas confeccionados com FO integrada. Em (A), a configuração nº 7 e em (B) a nº 8; (C) Microssistema com FO integrada acondicionado na caixa adaptada (D); Acesso para FO (B)	78
Figura 48: Diagrama de fluxo para FIA convencional. Posição de amostragem. Com detecção em micro cela (Legenda: BP – Bomba Peristáltica; CD – Cela de Detecção; AM – Alça de amostragem para injeção de solução padrão de fluoresceína; LED- diodo emissor de luz; FO- fibra óptica; D – Descarte. Vazões indicadas na figura em mL h ⁻¹)	78
Figura 49: Sistema de análise para discriminação de fluoresceína por imagens digitais.	78
Figura 50: Fiagrama obtido com a configuração nº 7 para as injeções dos padrões de fluoresceína. Concentrações dadas em mg L ⁻¹	80
Figura 51: Curva analítica obtida para a discriminação de diferentes concentrações de	

fluoresceína, utilizando configuração nº 7. Faixa dinâmica de 5,0-25,0 mg L ⁻¹	81
Figura 52: Imagens da microcelula de detecção. Em (A) observa-se o espalhamento da emissão do LED na ausência de fluoróforo e em (B) com a presença de fluoresceína. As setas indicam a direção do fluxo das soluções	81
Figura 53: Fiagrama obtido para injeção de fluoresceína com a configuração nº 8. Concentrações indicadas em mg L ⁻¹	82
Figura 54: Espectro de emissão do LED utilizado e da fluoresceína. Adaptado de Fonseca e colaboradores [54]	83
Figura 55: Curva analítica de fluoresceína obtida com a configuração nº 8 pela intensidade da componente vermelha (R), do sinal RGB.	83
Figura 56: (A) <i>layout</i> do microssistema utilizado para determinações fluorescentes, (B) fotografia do dispositivo confeccionado.	86
Figura 57: Diagrama de fluxo geral utilizado para as determinações fluorimétricas com detecção óptica por imagens digitais. (BP) bomba peristáltica, (V1 a V3) válvulas solenóides, D descarte Detalhes em vermelho destacam as soluções utilizadas para a discriminação de fluoresceína e os em preto para a determinação de cálcio. Vazões indicadas em mL min ⁻¹	86
Figura 58: disposição geral dos aparatos utilizados. (A) bomba peristáltica, (B) conjunto de válvulas solenoides, (C) Caixa adaptada contendo o dispositivo, (D) LED utilizado, (E) circuito para acionamento do LED, (F) interface de comunicação das válvulas solenoides com o microcomputador	87
Figura 59. Fiagrama obtido com a variação da componente G (A) e a curva analítica para a determinação de fluoresceína (B)	91
Figura 60: Gráficos de diferença de intensidade da emissão fluorescente para cada otimização univariada.(A) vazão de leitura. (B) volume injetado. (C) tempo de parada de fluxo. (D) concentração de calceína.	92
Figura 61: Fiagrama obtido para determinação da dureza total da água em amostras de águas minerais para consumo humano empregando o conceito de zona de mistura. Compõe este fiagrama os picos referentes aos cinco padrões de Ca ²⁺ , com concentrações indicadas em µmol L ⁻¹ , picos referentes ao branco (0,0) e as seis amostras de águam minerais.	93
Figura 62: Curva analítica obtida para determinação da dureza total de amostra de águas minerais para consumo humano. Faixa de concentração de 125- 625 µmol L ⁻¹	94

Lista de Tabelas

Tabela 1: Forma na qual a mostra se encontra e quantidade de princípio ativo discriminada nos rótulos....	36
Tabela 2: Resultados obtidos para a determinação de paracetamol em seis medicamentos comerciais.....	40
Tabela 3: Forma na qual a mostra se encontra e quantidade de princípio ativo discriminada nos rótulos....	44
Tabela 4: Tempo de parada de fluxo e porcentagem de atenuação obtida para padrão de 3 mg L ⁻¹	49
Tabela 5: Resultados obtidos para a determinação de paracetamol em nove medicamentos comerciais.....	50
Tabela 6: largura, profundidade, comprimento e capacidade volumétrica da CD de cada configuração de microcélula de detecção	53
Tabela 7: Forma na qual a mostra se encontra e quantidade de princípio ativo discriminada nos rótulos....	67
Tabela 8: Resultados obtidos para a determinação de paracetamol em seis medicamentos comerciais.	75
Tabela 9: Relação de amostras adquiridas e suas respectivas durezas expressas em mg L ⁻¹ de CaCO ₃	88
Tabela 10: Resultados obtidos para a determinação da dureza total de amostras de águas minerais para consumo humano pelo método proposto (μ FIA) e pelo método de referência(MR*).....	95

Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica e Objetivos

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Miniaturização de sistemas de análise

Desde os anos 1940, a comunidade científica demonstra interesse em miniaturizar os sistemas de análise. Apesar de nesta década terem sido desenvolvidos testes miniaturizado de caráter qualitativos em papel para identificação de fármacos, considera-se que o primeiro dispositivo miniaturizado tenha sido construído em 1975, o qual constituiu de um cromatógrafo gasoso construído sobre uma pastilha circular de silício com 5 cm de diâmetro. Inicialmente, o objetivo de diminuir a escala dos equipamentos estava em aumentar a eficiência das separações cromatográficas, entretanto, a falta de compreensão em relação aos processos de separação fez com que a instrumentação desenvolvida não fosse prontamente aceita pela comunidade científica [1]. Avanços maiores para a miniaturização foram possibilitados pelo progresso da microeletrônica ocorrido nos anos de 1960, que culminou com o desenvolvimento dos circuitos integrados (CI), possibilitando não somente a redução do tamanho dos componentes eletrônicos, o que favorece a portabilidade, mas também o aumento da velocidade de processamento de informações.

Este fato foi de vital importância para outros âmbitos da sociedade moderna, uma vez que já havia a necessidade, em um sentido *point of care*, do desenvolvimento de métodos de análise que favorecessem respostas com rapidez e precisão e que pudessem, por exemplo, embasar a tomada de decisões em situações de risco (como situações clínicas), bem como facilitar a realização de monitoramentos nas áreas da saúde, ambiental, engenharia, segurança pública dentre outras [2]. Como exemplos de métodos desenvolvidos (atuais) que atendem a estas demandas, podem ser citados o teste de a razão normatizada internacional, chamado de RNI *point-of-care test* (RNI-POCT) [3], realizado para a identificação preliminar de acidente vascular cerebral, o desenvolvimento de equipamentos portáteis como o utilizado no monitoramento da taxa glicêmica de pacientes portadores de diabetes e sensores para identificação rápida da presença de drogas de abuso (utilizados em aeroportos) [4].

Em química analítica, a miniaturização de sistemas de análise tem sido alvo de intensa pesquisa e desenvolvimento, em particular após a introdução do conceito de microssistemas de análise total, ou μ TAS (do inglês *micro total analytical systems*) proposto por Manz e colaboradores [5]. Nessa visão, um μ TAS deve ser um dispositivo com dimensões bastante reduzidas e ao mesmo tempo capaz de realizar todas as etapas pertinentes a uma análise química, desde o processamento da amostra até a detecção do analito, de maneira automatizada, rápida, empregando pequenos volumes de reagentes e utilizando aparatos de dimensões miniaturizadas. Este conceito engloba a utilização de micro propulsores para as soluções, detectores adaptados para a escala miniaturizada, unidades de preparo de amostra integradas, etc. Devido a este conceito, os μ TAS também são denominados “laboratório em um chip” (LOCs, do inglês *lab on a chip*).

Desde a introdução destes conceitos, muitos esforços têm sido empregados para realizar a construção de dispositivos que possam atender, pelo menos em parte, os requisitos estabelecidos. Para atender às demandas propostas pelos μ TAS, a literatura tem mostrado o crescente interesse nas instrumentações do tipo *lab-made*, as quais costumam ser desenvolvidos de forma dedicada e para aplicações específicas, frequentemente apresentando resultados compatíveis aos obtidos pelos métodos de análise usuais para diversas determinações, tanto para compostos orgânicos quanto inorgânicos e em variedade de aplicações, como separação de biomoléculas [6], amplificação de DNA [7,8], ensaios enzimáticos [9] e imunológicos [10,11], detecção de fármacos [12-15].

Nesse sentido, para o químico analítico, é interessante conciliar as vantagens proporcionadas pelos dispositivos miniaturizados com a praticidade, e benefícios oferecidos pela análise em fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*), configurando os dispositivos microfluídicos de análise. Estes apresentam como vantagens a portabilidade, possibilidade de serem obtidos menores tempos de análise e a considerável diminuição no consumo de reagentes e geração de resíduos, melhorando as determinações analíticas e tornando-as mais adequadamente viáveis e mais próximas das premissas idealizadas pela Química Verde [5]. Para tal, primeiramente, os dispositivos precisam ser fabricados, e para tal, diversas tecnologias têm sido empregadas para a fabricação, adaptações para acoplamento de sistemas de detecção, introdução e processamento de amostras.

1.1.2 Técnicas de fabricação

O processo de fabricação de um microdispositivo consiste basicamente em gravar microcanais em baixo relevo em um substrato (frequentemente esta porção do microdispositivo é denominado de “máscara”), em seguida, deve-se realizar a selagem dessa máscara, ou com o mesmo substrato utilizado na gravação dos canais ou com um substrato diferente, para que haja a formação dos canais, nos quais ocorre o gerenciamento de soluções. Durante este processo, deve ser realizada a integração dos sistemas de inserção de amostra e de detecção. Diversas técnicas podem ser empregadas para gravar os canais em diferentes substratos e assim muitas tecnologias têm sido utilizadas para a fabricação dos dispositivos, criar adaptações para acoplamento de sistemas de detecção, etc. Dentre os avanços obtidos nesse campo, encontra-se a variedade de substratos que podem ser empregados para a fabricação dos dispositivos. Os primeiros dispositivos miniaturizados eram construídos empregando materiais como o silício, quartzo e vidro, entretanto as técnicas de fabricação utilizadas para estes substratos necessitam de condições rígidas de limpeza (sala limpa), equipamentos sofisticados e utilizam ácidos e bases concentrados para sua realização, além de apresentarem custos elevados e longos tempos para a execução de todas as etapas necessárias, dificultando a fabricação destes dispositivos em laboratórios convencionais. [1].

Alternativamente, outras técnicas menos onerosas têm surgido para o desenvolvimento de microssistemas empregando-se outros materiais, como os polímeros. Estes têm mostrado desempenhos promissores e contam com características importantes como a facilidade no manuseio do material

poliméricos, fácil selagem, maleabilidade e por apresentarem boa resistência. Ainda assim, muitos polímeros ainda podem apresentar procedimentos de fabricação um tanto laboriosos como polimetilmetacrilato e o polidimetilsiloxano (PDMS) [16,17].

Conciliando as vantagens apresentadas pelos materiais poliméricos e empregando um procedimento rápido e de fácil execução, Fonseca e colaboradores [18] demonstraram a facilidade na construção e a eficiência de microdispositivos fabricados com uma resina fotopolimerizável à base de uretano-acrilato (UA). A técnica denominada fotolitografia profunda no ultravioleta foi utilizada por estes pesquisadores para confeccionar microdispositivos fluídicos que apresentam um custo bastante reduzido e que pode ser implementada sem a necessidade de condições especiais.

1.1.3 Fenômenos Luminescentes

A luminescência é um fenômeno óptico no qual uma molécula emite radiação após ser excitada. Existem diversos tipos de luminescência e estes são classificados de acordo com a maneira com a qual a excitação ocorre. Os processos luminescentes mais conhecidos são os fotoluminescentes e aqueles promovidos por reações químicas [19]. Na fotoluminescência, os elétrons de uma molécula são excitados pela absorção de fótons, e assim, promovidos do estado fundamental (S_0) para estados excitados (S_1 , S_2), conforme mostrado no diagrama de Jablonski, representado na Figura 1. Naturalmente, os elétrons excitados liberam a energia absorvida, para retornar ao estado fundamental. Durante este processo denominado de relaxamento, a energia excedente pode ser liberada por meio de transições não radiativas (vibracionais, representadas pelas setas curvas) e radiativas (representadas por setas retilíneas).

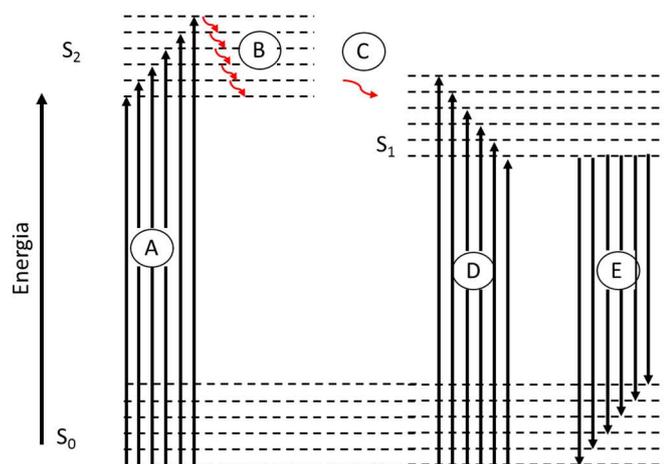
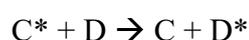
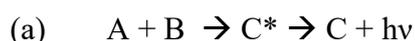


Figura 1: diagrama de Jablonski, onde S_0 representa o estado fundamental, S_1 e S_2 estados excitados singleto. (A) excitação de $S_0 \rightarrow S_2$. (B) Transição vibracional dentro do mesmo estado eletrônico. (C) conversão interna. (D) excitação de $S_0 \rightarrow S_1$. (E) emissão fluorescente. adaptado da ref. [19]

A fluorescência é um tipo de fotoluminescência e, neste caso, os elétrons são excitados sem que ocorra mudança no número quântico *spin*. Durante o processo de relaxamento, as transições não radiativas, provocam o aquecimento do solvente. Dois mecanismos destas transições são majoritariamente considerados. O primeiro é caracterizado por transições eletrônicas entre níveis

vibacionais pertencentes ao mesmo estado eletrônico (por exemplo S_2). Este tipo de transição parte de um nível vibracional mais energético para níveis vibracionais de menores energias conforme representado em B na Figura 1. Já o segundo tipo, caracteriza-se pela transição do elétron entre níveis vibracionais de energias semelhantes, porém que pertencem a estados eletrônicos distintos (por exemplo, $S_2 \rightarrow S_1$), conforme representado em C da Figura 1. Este processo é denominado conversão interna. Uma vez que já ocorreram perdas de energia, as emissões radiativas (fluorescência) apresentam energias menores do que a da radiação de excitação, resultando em emissões fluorescentes com comprimentos de onda maiores do que aquele apresentado pela radiação de excitação, efeito denominado de deslocamento Stokes [20].

Já a quimiluminescência é um tipo de luminescência promovida por reações químicas. Durante o curso da reação, uma espécie eletronicamente excitada é gerada (C^*), e esta, ao decair para o estado fundamental, libera o excesso de energia na forma de radiação eletromagnética. O processo de relaxamento pode ocorrer de forma direta ou indireta. No primeiro caso, a espécie excitada libera, na forma de luz, a energia excedente, conforme mostra a Equação 1 (a). Já no mecanismo indireto, a espécie excitada transfere energia para outra molécula, excitando-a eletronicamente. Este acceptor (D^*) libera a energia na forma de luz, conforme mostrado na Equação 1(b).



Equação 1: representação de uma reação que gera uma molécula excitada e a liberação de energia na forma de radiação eletromagnética. Em (a), mecanismo direto e em (b) mecanismo indireto. Ref [19]

1.1.3.1 Instrumentação comercial para as detecções de fluorescência e quimiluminescência

Um instrumento comercial utilizado para realizar medidas de fluorescência é denominado fluorímetro. Este equipamento apresenta essencialmente a configuração representada na Figura 2, a qual possui uma (A) fonte de radiação de alta potência, (B) filtros para seleção do comprimento de onda de excitação, (C) suporte para amostra, (D) sistema de seleção de comprimento de onda de emissão, (E) um transdutor de sinal e (F) um detector. Já para a detecção de quimiluminescência, como não são necessárias fontes de radiação, a instrumentação é mais simples, sendo constituída apenas por uma câmara escura e um detector, geralmente, uma fotomultiplicadora.

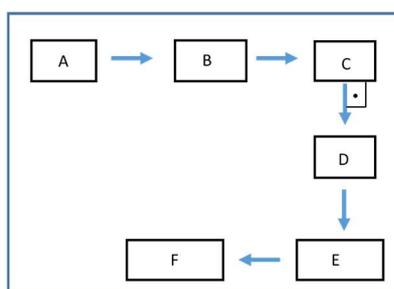


Figura 2: representação esquemática de um fluorímetro comercial.

1.1.4 Estratégias de detecção em sistemas miniaturizados

Conforme foi dito anteriormente, a miniaturização abrange desde o dispositivo de análise, até seu sistema de detecção. De fato, a literatura mostra que os microdispositivos costumam apresentar sistemas de detecção nos quais informações químicas são obtidas a partir de sinais elétricos ou ópticos, o que favorece a automação do sistema de análise [1]. A seguir, serão apresentados alguns exemplos de detecções ópticas em sistemas miniaturizados.

1.1.4.1 Detecções ópticas

Detecções ópticas dependem do caminho óptico utilizado. Em microdispositivos, este tornou-se bastante reduzido em virtude de os canais possuírem dimensões micrométricas e assim, a utilização destas técnicas costuma resultar em baixos valores de sensibilidade, dificultando seu emprego para muitas aplicações. Mogensen e colaboradores [21] dividem as técnicas ópticas em duas subcategorias: as técnicas que medem a mudança na intensidade da radiação e as que se valem de estratégias baseadas na promoção de alterações no comprimento de onda emitido/absorvido por uma espécie, ou na fase da onda emitida ou em sua polarização. No primeiro caso, enquadram-se as medidas de absorção molecular e fenômenos luminescentes e no segundo grupo, técnicas baseadas em reflexão, espalhamento, dentre outras. Em microssistemas, o tipo de detecção óptica mais comumente empregado é o primeiro, principalmente as técnicas luminescentes devido ao fato de se mostrarem bastante seletivas para diversos analitos.

Entretanto, conforme os autores destacam, são encontradas algumas dificuldades na sua implementação em sistemas miniaturizados. No caso das medidas quimiluminescentes, a literatura aponta a necessidade de utilizar detectores sensíveis, como as PMT ou os arranjos de fotodiodos, os quais possuem custos relativamente elevados, porém que proporcionam bons resultados em diversas áreas. Apesar disto, a instrumentação utilizada é simples, sendo constituída por apenas um detector. Já para medidas de fluorescência, os autores relatam a necessidade de uma instrumentação bastante complexa tanto para guiar e focalizar a radiação proveniente da fonte de excitação para o interior dos microcanais quanto para guiar a radiação de resposta até o detector. Nesse sentido, a literatura tem reportado o uso de lasers como fonte de radiação de excitação, como no caso da fluorescência induzida por laser (LIF, do inglês *laser induced fluorescence*) [22,23] e o emprego de lentes de microscópio, tanto para focalizar a radiação de excitação, como para amplificar a emissão fluorescente [24,25] a ser detectada, resultando também, em uma instrumentação de custo elevado.

Bishop e colaboradores [22] confeccionaram microdispositivo em vidro e utilizaram a LIF como fonte de excitação para a separação e determinação de quatro benzodiazepinas nitradas em amostras biológicas. Os autores utilizaram um corante (Cy5) como fluoróforo e a ação supressora das moléculas nitradas sobre a fluorescência do corante. A separação dos componentes da mistura foi feita por cromatografia eletrocinética e a detecção procedeu-se no detector UV do cromatógrafo.

Hellmich e colaboradores [23] desenvolveram um dispositivo microfluídico a base de PDMS para realizar a separação dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina em amostras biológicas. O dispositivo foi acomodado entre dois conjuntos de lentes de um microscópio invertido. Um laser com emissão máxima em 266 nm foi utilizado como fonte de excitação para induzir a fluorescência, e um conjunto de espelhos e lentes do próprio microscópio foi empregado para direcionar a radiação da fonte em direção ao compartimento contendo a amostra. Para reduzir a intensidade da radiação do laser, foi utilizado um filtro absorção, o qual foi inserido entre a fonte de excitação e o recipiente da amostra e para detectar os sinais fluorescentes dos aminoácidos, um segundo conjunto de lentes objetivas foi utilizado para amplificar a intensidade da luminescência e direcioná-la até uma PMT.

As montagens descritas por Bishop [22] e Helmich [23] não são facilmente implementadas em laboratórios convencionais, não somente devido à complexidade das instrumentações, mas também aos custos elevados de seus componentes. Ainda assim, as determinações fluorimétricas tem se tornado populares em sistemas miniaturizados devido ao desenvolvimento dos diodos emissores de luz (LED, do inglês *light emitting diode*). [24]. Com o emprego dos LEDs, as instrumentações tendem a ser menos complexas. Sauer e Colaboradores [25] desenvolveram um microdispositivo para detecção fluorimétrica de DNA de bactérias *B.subtilis* em amostras biológicas líquidas. O dispositivo foi fabricado em resina termoresistente (Zeonex®) para realizar reações de polimerização em cadeia (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*). Seu processo de fabricação incluiu etapas onde são utilizadas altas temperaturas e pressão, e a duração do processo foi de aproximadamente 90 minutos. O dispositivo conta com câmaras para realizar extração em fase sólida, e tratamento dos resíduos biológicos. Para a detecção, os autores utilizaram um LED com emissão máxima em 470 nm, entretanto, a radiação foi focalizada com auxílio de lentes ópticas e espelhos.

Já para a detecção de CL, Jorgensen e colaboradores [26] realizaram a determinação das enzimas colina oxidase, lactato oxidase, e glucose oxidase baseado no sistema luminol-peróxido de hidrogênio. Estas enzimas em ambientes ricos em oxigênio e água, produzem peróxido de hidrogênio, e este, em condições adequadas de pH, produz uma emissão quimiluminescente na presença de luminol. O microdispositivo utilizado foi confeccionado a base de filmes de silício e silicone, os quais foram integrados por deposição plasmódica. Como detectores, foi utilizado um arranjo contendo oito fotodiodos. Lv e Colaboradores [27] desenvolveram um biosensor para a determinação de glucose em amostras de sangue. O sensor foi construído a base de vidro/sílica. Para realizar a determinação, os autores utilizaram vidro com poros de dimensões controladas para imobilizar a enzima glucose oxidase. Na presença de ferricnato de potássio e luminol a reação entre a glucose e a enzima produzem uma emissão quimiluminescente a qual foi detectada por uma fotomultiplicadora (PMT). Outras aplicações envolvendo a detecção de CL frequentemente envolvem o uso de fotomultiplicadoras [28,29].

Pode-se perceber que diversos trabalhos que utilizam detecções ópticas para medidas de CL e fluorescência, apresentam instrumentações que dificilmente podem ser confeccionadas em laboratórios convencionais. Assim, para que os dispositivos microfluídicos possam se aproximar mais do conceito

dos μ TAS, são necessários mais estudos para a implementação de sistemas de detecção ópticas que possam ser integrados com maior facilidade nas instrumentações do tipo *lab-made*, construindo assim uma demanda para esta área de pesquisa.

1.1.5 Imagens digitais

Diversos equipamentos estão disponíveis no mercado capazes de realizar medidas baseadas na absorção ou emissão de radiação eletromagnética, como os fotômetros e espectrofotômetros. Entretanto, estes equipamentos tendem a apresentar custos elevados e necessitam de pessoal capacitado para manuseá-los [30]. Nos últimos anos, uma nova maneira de se realizar medidas ópticas surgiu como alternativa aos equipamentos comerciais: a realização de medidas baseadas em imagens digitais.

As medidas baseadas em imagens digitais estão relacionadas com as cores da imagem. Para compor uma cor, combinações de componentes (da cor) são realizadas. No chamado sistema RGB, as cores são formadas pela combinação das componentes R (*red*, vermelho), G (*green*, verde), e B (*blue*, azul). Semelhantemente, o sistema CMYK compõe as cores pelas componentes ciano (*cian*), magenta (*magenta*), amarelo (*yellow*) e preto (*black*). Com o sistema RGB, por exemplo, cada cor pode ser decomposta em matrizes de dados de 8 *bits*, e suas componentes possuem uma faixa de variação de intensidade entre 0 -255, permitindo uma diferenciação das cores a partir dos valores de intensidade de cada componente [31]

Dessa forma, qualquer equipamento que possibilite a comparação da mudança de coloração com uma referência tem potencial para ser utilizado para análises quantitativas [30]. Nesse sentido, câmeras digitais, *webcams* e *scanners* podem atuar como detectores. O arranjo CCD (*charge-coupled device*), por exemplo, é um sensor muito utilizado nestes dispositivos, o qual detecta as cores refletidas pelo objeto após a absorção de radiação eletromagnética. Utilizando o sistema RGB, cada cor é decomposta nestas componentes e são obtidas respostas tricromáticas, as quais produzem grandes quantidades de informação, que ficam armazenadas em imagens digitais, e podem ser utilizadas para fins analíticos.

1.1.5.1 Detecção baseada em imagens digitais para fins analíticos

Diversas estratégias baseadas em imagens digitais têm sido empregadas em determinações colorimétricas, e apresentam como principais vantagens um sistema de detecção de menor custo, de tamanho reduzido, favorecendo a portabilidade, e que possibilita o monitoramento contínuo do sistema em análise. Outra vantagem encontrada está no processamento dos dados, o qual é facilitado pelo uso de softwares desenvolvidos pelos próprios grupos de pesquisa. A literatura mostra que ao utilizar esses dispositivos como detectores, podem ser obtidos resultados em concordância, ou até melhores que os métodos estabelecidos, entretanto, estas estratégias, majoritariamente, são aplicadas em sistemas não miniaturizados [32-35]. A seguir, são apresentadas algumas aplicações nas quais estes detectores alternativos foram empregados.

Lyra e colaboradores [32] realizaram a determinação de lítio em antidepressivos, de sódio em soro fisiológico e cálcio em águas para irrigação utilizando uma *webcam* para captar as emissões dos íons metálicos produzidos quando da utilização da fotometria de chama. Para analisar as imagens obtidas, o grupo desenvolveu um software que calcula a média dos valores de R, G e B de cada pixel presente em uma região pré-selecionada para definir valores dos mesmos, realizar comparações e construção de curvas analíticas para cada analito individualmente. Após as análises, foram obtidos melhores limites de detecção e de quantificação quando comparados com a fotometria de chama convencional. Semelhantemente, Gaião e colaboradores [33] utilizaram o sistema RGB para determinar a alcalinidade total de amostras de águas minerais e torneiras por titulação espectrofotométrica com o uso de imagens digitais produzidas por uma *webcam* para identificar o ponto final de uma titulação. Maleki e colaboradores [34] utilizou a ferramenta matemática ANN (*Artificial Neural Network*) para determinar simultaneamente os metais alumínio e ferro complexados com CAS (*Chrome azurol S*). Como sistema de detecção, utilizou uma câmera com arranjo CCD. Uma única imagem foi tirada de cada amostra para realizar as análises. Para esta análise, o preparo das amostras foi bastante elaborado, sendo necessárias 50 cubetas de 2 ml contendo os analitos em diferentes concentrações.

Lopez e colaboradores [35] fizeram uso do sistema RGB para quantificar titânio em amostras de plásticos. Uma câmera digital foi utilizada para captar as diferenças de coloração de uma reação colorimétrica. As análises apresentaram resultados em concordância com os apresentados pelo método de referência (plasma indutivo acoplado). Foi utilizada uma cubeta de 2 mL adaptada ao interior de uma caixa escura para realizar as análises.

Os trabalhos citados possuem em comum a maneira manual de se preparar as amostras, o que possibilita um aumento no erro das determinações além do fato de que o monitoramento é feito em um sistema estático (não fluídico). Nestes casos, poucas imagens (ou até mesmo uma somente) são utilizadas para aquisição e processamento dos dados. Poucos trabalhos têm sido realizados com sistemas em fluxo e miniaturizados, que permitiriam um menor grau de manipulação das amostras e reagentes pelo analista. O intuito de se automatizar o processo de preparo de amostras e a confluência de reagentes é diminuir as possibilidades de erros no preparo das amostras, o tempo de análise e otimizar as condições das mesmas.

Nesse sentido Andrade e colaboradores. [36] utilizaram o sistema RGB para determinar as concentrações de alumínio (III) e cromo (IV) em águas naturais. Os autores realizaram as análises em uma câmara com aproximadamente 800 μ L. As determinações foram feitas em linha. Todos os reagentes são impulsionados para dentro da câmara por micro tubos conectados a uma bomba peristáltica. O aparato fica posicionado sobre um agitador magnético, utilizado para homogeneizar a mistura reacional que contém o íon metálico e o agente cromogênico quercetina. O grupo obteve menor limite de detecção para o alumínio (III) e um equivalente para o cromo (IV) e também maiores faixas de trabalho em comparação com o método de referência (fotometria de chama).

Apesar dos benefícios apresentados pela detecção por imagens digitais, poucas aplicações são encontradas na literatura abordando determinações baseadas em fluorescência e CL quimiluminescentes utilizando estes detectores alternativos. Balson e colaboradores [37] utilizaram uma *webcam* com sistema de detecção baseados em semicondutor metal-óxido complementar (CMOS, do inglês *complementary metal oxide semiconductor*) para discriminar diferentes concentrações de fluoresceína. Este fluoróforo foi excitado pela radiação proveniente de um LED multicolor, e a emissão fluorescente resultante foi detectada para diferentes soluções padrão.

Rajendra e colaboradores [38] desenvolveram um sistema para realizar ensaios imunológicos. Os autores conseguiram identificar bactéria patogênicas que se desenvolvem nos alimentos, e para tal, valeram-se da resposta fluorescente das bactérias à anticorpos específicos. O dispositivo foi construído sobre uma tira de nitrocelulose e os anticorpos foram imobilizados em sílica funcionalizada. Para focalizar a radiação do LED, foram necessárias lentes convexas e para selecionar o comprimento de onda a ser utilizado, um filtro de absorção também foi utilizado. Os aparatos ficaram armazenados e uma câmara escura, e a emissão fluorescente é fotografada com uma câmera de celular. É válido ressaltar o custo da instrumentação e também dos reagentes utilizados.

Com base nos exemplos descritos, é possível perceber que são poucos os sistemas miniaturizados que utilizam as estratégias de detecção baseadas em imagens digitais, principalmente para determinações que utilizam medidas de luminescência. Este tipo de detecção pode proporcionar monitoramento contínuo de sistemas dinâmicos, facilidades operacionais, diminuição de custos de equipamentos e facilidades para serem integrados em instrumentações do tipo *lab-made*. Nesse sentido, para que os microdispositivos possam se aproximar mais do conceito dos μ TAS, é interessante buscar por novas possibilidades para aplicar os microdispositivos fluidicos a novas determinações, utilizando detectores alternativos. Baseados nos resultados satisfatórios das determinações que empregam dispositivos miniaturizados e nos benefícios oferecidos pela detecção por imagens digitais, este projeto se propõe a aplicar os microdispositivos fluidicos em determinações quimiluminescentes e fluorescentes utilizando estratégias de detecção baseadas em imagens digitais.

Considerando que os dispositivos microfluidicos frequentemente são desenvolvidos de forma dedicada, estes apresentam-se promissores para aplicações em determinações de rotina, as quais costumam determinar um único analito, como por exemplo, nos setores responsáveis pelo controle de qualidade dos produtos (fármacos, alimentos, etc). Nesse sentido, duas determinações de rotina foram estudadas neste projeto, uma quimiluminescente e outra fluorescente. Duas possibilidades passíveis de serem aplicadas aos microdispositivos fluidicos são apresentadas a seguir.

1.1.6 Determinação de paracetamol.

O paracetamol é um dos analgésicos-antipiréticos mais utilizados pela população, tanto em adultos quanto em crianças. [39]. Em se tratando de uma questão de saúde pública, antes de um medicamento ser liberado para consumo pela população, uma série de fatores devem ser avaliados para

garantir a segurança do consumidor e a eficácia do medicamento. Existem, portanto órgãos reguladores bem como diretrizes específicas para que o controle de qualidade sobre o processo produtivo das indústrias (farmacêuticas) seja realizado. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão que fiscaliza a aplicação do controle de qualidade a estas indústrias além de ser responsável pela elaboração e manutenção da Farmacopéia Brasileira. Este documento é composto por um compêndio de monografias contendo as especificações para o controle de qualidade de medicamentos e de insumos para saúde, trazendo os procedimentos adequados para as análises biológicas e de caráter físico-químico, dentre os quais encontram-se procedimentos para identificação de compostos, ensaios para determinação de pureza e dosagem, dentre outros [40].

Para o fármaco paracetamol, em amostras de medicamentos, as diretrizes da Farmacopéia abrem a possibilidade de se realizar dois tipos de detecção: em meio básico, por espectrofotometria de absorção na região do UV, ou por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) acoplada a um detector ultravioleta. Considerando-se que juntamente com o princípio ativo podem estar presentes excipientes e outros compostos, para as análises por CLAE, utiliza-se a extração em fase sólida, empregando uma coluna empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano e, como fase móvel, uma mistura de água e metanol (75:25) [40]

Apesar das vantagens na sua utilização, as técnicas cromatográficas, como CLAE apresentam alguns inconvenientes, como alto custo de instrumentação e operação, tempo relativamente longo de análise e necessidade de experiência no manuseio do equipamento e no tratamento de amostras. Dessa forma, diversos grupos de pesquisa têm buscado por novas alternativas para se realizar a determinação de paracetamol por métodos menos dispendiosos, e/ou menos laboriosos, como por espectrometria de absorção molecular na região do visível [41], empregando análise por injeção em fluxo com detecção fotométrica [42], e por quimiluminescência [43,44].

Oliveira e colaboradores [43] propuseram uma estratégia para determinação de paracetamol em formulações farmacêutica em sistema de análise em fluxo. Os autores empregaram o sistema quimiluminescente luminol- hipoclorito e utilizaram a ação supressora do fármaco sobre a quimiluminescência do sistema para realizar sua quantificação de forma indireta. Esta proposta conta com vantagens apreciáveis, como tempo de análise pequenos, elevada frequência analítica, facilidade no preparo de amostra, ausência de solventes orgânicos e ácidos ou bases concentrados além de um procedimento automatizado para realizar as análises. Apesar das vantagens, é interessante miniaturizar este procedimento para reduzir ainda mais a produção de resíduos, e o consumo dos reagentes.

1.1.7 Determinação de Ca^{2+}

Os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , assim como outras espécies, estão presentes nos corpos aquáticos. A presença destes íons e muito outros deve-se a solubilização de formações rochosas no subsolo dos aquíferos. Estes íons juntamente com outros metálicos em águas, como Fe, Mn, Cu e Al provocam efeitos indesejados, como a diminuição da eficiência dos sabões nas águas destinadas a lavagens, e

conferem sabores desagradáveis em águas para consumo humano. De acordo com o Ministério do Meio Ambiente, águas contendo concentrações destes íons acima de 500 mg L^{-1} não são consideradas aptas para consumo humano, segundo a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde, a qual dispõe sobre os padrões de potabilidade, qualidade da água, e regulamenta os valores máximos permitidos para diversas substâncias presentes na água para consumo humano [45].

O doseamento destes íons é um procedimento de rotina para as indústrias de alimentos, entretanto os métodos utilizados para quantificar estas espécies são métodos clássicos, colorimétricos, (titulação complexométrica com EDTA) os quais dependem da acuidade visual do analista, necessitam de controles rígidos de pH e as determinações podem ser afetadas pela presença de outros metais [46]. Além disso, os métodos clássicos de análise empregam grandes quantidades de reagentes, e geram volumes consideráveis de resíduos, e devido a maneira manual de se proceder com as determinações, esta são mais susceptíveis a erros por parte do analista, devido às longas jornadas de trabalho. Na tentativa de minimizar o manuseio dos reagentes, métodos colorimétricos automatizados podem ser empregados [47,48].

Alternativamente, existem outros métodos para se realizar o doseamento de Ca^{2+} e Mg^{2+} , como por métodos fluorimétricos. Chimpalee e colaboradores [49] realizaram a determinação de cálcio em amostras de águas minerais para consumo humano em um sistema de análise por injeção em fluxo. Os autores empregaram um agente complexante específico para o íon cálcio, de forma que, o complexo formado com o referido íon emite fluorescência. Na montagem dos autores, um sistema automatizado foi empregado, diminuindo as possibilidades de erros por parte do analista. Diferentemente dos métodos baseados em titulação, a fluorimetria não necessita de indicadores ácido-base, e assim, pode oferecer menores probabilidades de erros sistemáticos. Considerando estes fatores, a miniaturização poderia proporcionar a redução do consumo de reagentes, produção de resíduos e favorecer a automação do sistema de análise, corroborando com os preceitos estabelecido pela Química Verde.

1.2 Objetivos

Considerando estes aspectos, este projeto se propõe a avaliar a aplicação de microdispositivos fluídicos à base de uretano-acrilato em determinações quimiluminescentes e fluorescentes utilizando detecção baseada em imagens digitais adquiridas em tempo real, utilizando como aplicações as determinações de paracetamol em amostras de medicamentos por QL e a determinação da dureza da água em amostras de água mineral para consumo humano por fluorescência

1.2.1 Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- Avaliar o uso de microssistemas confeccionados em UA para determinações quimiluminescentes e fluorescentes.
- Estudar o potencial de utilizar detecção baseada em imagens digitais para medidas de quimiluminescência e fluorescência em μ FIA.
- Avaliar o desempenho analítico das estratégias de detecção por imagens digitais em sistemas microfluídicos para determinações quantitativas
- Determinar o fármaco paracetamol em medicamentos por quimiluminescência
- Determinar a dureza de águas minerais para consumo humano por fluorescência.

Capítulo 2-Determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas por quimiluminescência, utilizando microssistema com injeção hidrodinâmica

2.1 Introdução

A determinação de paracetamol em medicamentos foi baseada nos estudos de Oliveira e colaboradores [43], que utilizaram a ação supressora do paracetamol sobre a quimiluminescência do sistema luminol- OCl^- na realização das medidas quantitativas. Nesta estratégia, o luminol reage com o íon hipoclorito em meio básico produzindo uma intensa emissão quimiluminescente, conforme representado na Figura 3.

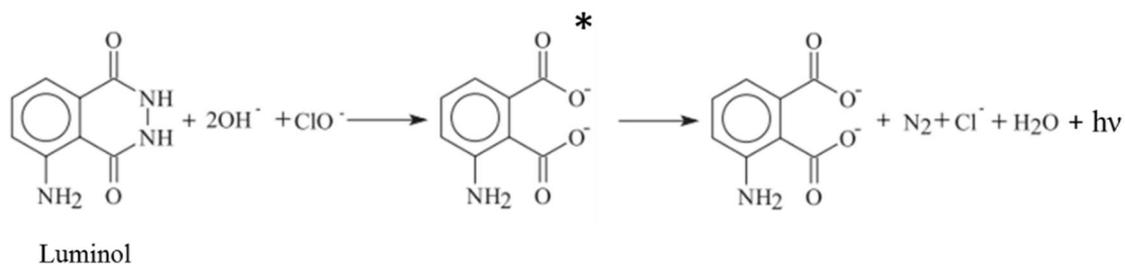


Figura 3: Representação simplificada da reação entre o luminol e o íon hipoclorito em meio básico. Adaptado de ref. [43]

O fármaco paracetamol reage com o íon hipoclorito de acordo com a reação representada na Figura 4, diminuindo a quantidade de OCl^- disponível para reagir com o luminol, provocando uma atenuação na intensidade da quimiluminescência que é proporcional à concentração de paracetamol.

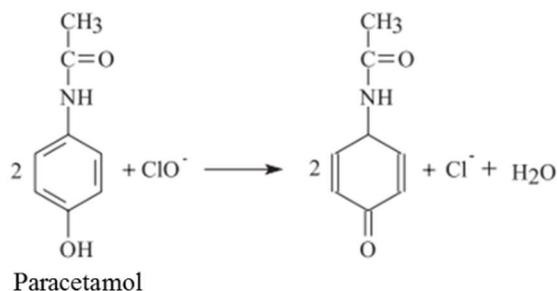


Figura 4: Representação simplificada da reação entre o paracetamol e o íon hipoclorito. Adaptado de ref [43]

Oliveira e colaboradores [43] utilizaram um sistema em fluxo multicomutado para inserir de forma sequencial segmentos de uma solução contendo hipoclorito e de uma solução padrão contendo paracetamol. Estes segmentos eram então bombeados por um fluxo carregador de água deionizada, passando por uma bobina reacional na forma helicoidal e seguindo até um ponto de confluência para a mistura com uma solução de luminol ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$). O fluxo dos reagentes foi então direcionado para uma cela de polietileno (0,8 mm de diâmetro, com 25 cm de comprimento, em formato de espiral) que se encontrava ente dois fotodiodos de silício, os quais foram utilizados como detectores.

Partindo-se da reação utilizada pelos autores em um sistema FIA convencional [43], neste capítulo foram realizados estudos para empregar os microssistemas fluídicos na determinação de paracetamol em amostras de medicamentos.

2.2 Materiais e Métodos

A determinação do fármaco em microssistemas fluídicos foi inicialmente avaliada empregando-se a estratégia de injeção hidrodinâmica [50], que consistiu em inserir, em um fluxo carregador, um segmento contendo os reagentes paracetamol e hipoclorito previamente misturados, enquanto os autores citados realizaram a mistura dos reagentes em linha. A estratégia abordada neste capítulo foi mais simples que a proposta por Oliveira e colaboradores [43], entretanto, apresentou algumas limitações que posteriormente foram pontuadas neste capítulo.

2.2.1 Construção dos microdispositivos.

Para construção dos microdispositivos, foi utilizado o procedimento proposto por Fonseca e colaboradores [51], os quais empregam a técnica da fotolitografia profunda no ultravioleta para gravação dos canais em substrato à base de uretano-acrilato (UA). A construção do microdispositivo fluídico foi dividida em três etapas:

- 1- Desenvolvimento da máscara com a configuração desejada para os canais de fluxo.
- 2- Gravação e revelação dos canais no substrato.
- 3- Selagem do dispositivo e adaptação de conexões para acesso do fluxo de soluções.

Para a primeira etapa, o *layout* desejado para configuração dos canais foi desenvolvido em programa computacional AutoCad[®] 2002, e impresso em folha de transparência (Abezeta – PLT A4) com uma impressora a laser (HP LaserJet P2055dn) com resolução de 1200 dpi. A folha de transparência foi utilizada como máscara para exposição do substrato à radiação ultravioleta na etapa seguinte.

A máscara com a configuração dos canais foi fixada sobre uma placa de vidro, sendo que, a face da transparência onde a configuração foi impressa, deve ficar voltada para o vidro, para que a impressão não seja danificada durante o processo. Uma moldura de borracha foi fixada sobre a outra face da transparência, formando assim, um reservatório de aproximadamente 2 mm de profundidade, conforme ilustrado na Figura (5A).

Uma segunda placa de vidro foi coberta por um filme PVC em uma de suas faces para facilitar a remoção da placa após a polimerização. Sobre o reservatório formado pela moldura, a resina ainda líquida (também chamada de resiste ou fotoresiste), foi derramada, preenchendo todo o seu volume conforme mostra a Figura (5B). Para evitar deformações nos canais a serem formados, bolhas que pudessem surgir na resina foram retiradas com o auxílio de uma agulha. Após esta etapa, a outra placa de vidro foi colocada sobre o reservatório, fechando-o, conforme a Figura (5C). A face contendo o filme PVC fica em contato com a resina. Para garantir que as placa de vidro não se movimentassem

causando formação de bolhas, e para evitar possíveis vazamentos de resina durante a exposição, grampos mantiveram as placas unidas.

Para a etapa de gravação e revelação dos canais, uma expositora *lab-made* foi utilizada para a exposição ultravioleta. Esta consiste em uma caixa preta com uma lâmpada de luz ultravioleta (Philips Actinic-BL, TL-D 15W, 380 nm) e um suporte para o reservatório de resina. A Figura 6 mostra uma imagem da expositora.

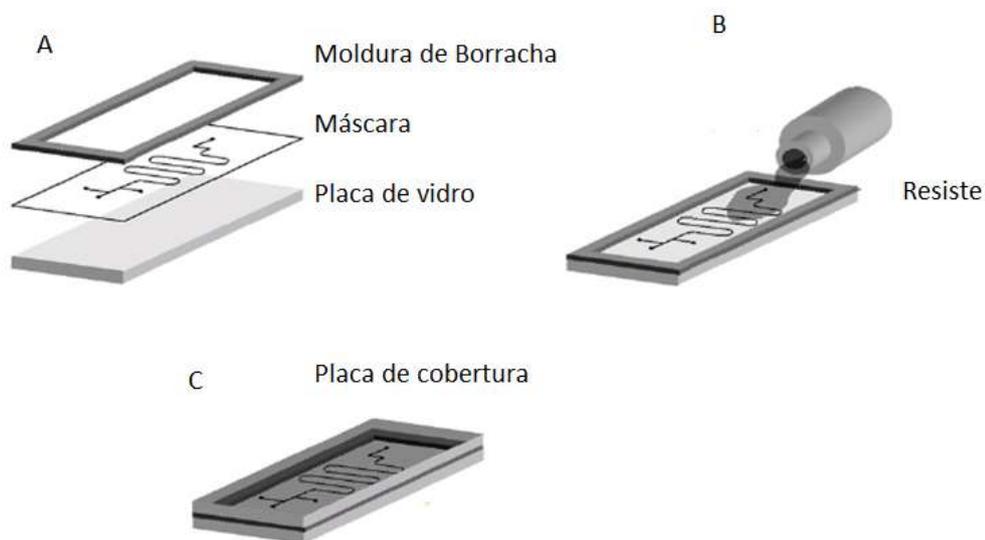


Figura 5: Representação das etapas de preparo do conjunto contendo a máscara com a configuração desejada, moldura de borracha e placa de vidro(A); reservatório para a resina sendo preenchido (B); conjunto com máscara e tampa unidos.



Figura 6: Expositora *lab-made* utilizada para polimerização da resina.

O conjunto foi irradiado primeiramente pela face que não contém a máscara por 35 s, a fim de que uma base para os canais fosse formada. Em seguida, a face que contém a máscara foi exposta por mais 35 s, formando os canais sobre o substrato. A Figura 7 ilustra este processo.

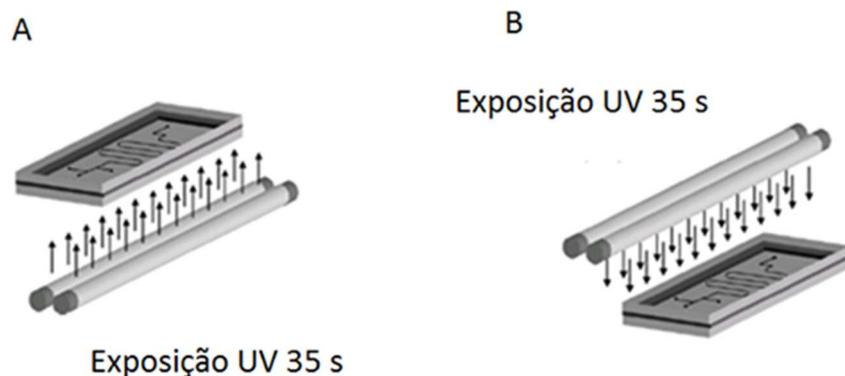


Figura 7: Representação da exposição das faces do conjunto para gravação dos canais pela face que não contém os canais (A); exposição pela face que contém os canais (B)

Prosseguindo a microfabricação, para a etapa de revelação dos canais, a placa polimerizada foi retirada da superfície do suporte de vidro, separando-a da máscara, e colocada em banho ultrassônico (Ultra Cleaner 1400 - Unique) com água e detergente (5% m/v) por cerca de 5 minutos. Após isso, os canais formados foram limpos com o auxílio de um pincel com detergente e água. A placa polimerizada foi lavada três vezes com água e detergente, e também com álcool (92,8° INPM) para remover qualquer resíduo de resina não polimerizada de dentro dos canais, e, em seguida, foi submetida à secagem com ar quente. Após esse procedimento, a placa com canais foi armazenada em um recipiente limpo e coberto para protegê-la da poeira que poderia se aderir a ela.

Para a etapa de selagem, uma placa de cobertura foi polimerizada, utilizando-se um reservatório de resina sem a máscara impressa com canais. A exposição foi realizada somente por uma das faces e durante 240 segundos. Vale destacar que, para este procedimento foram utilizadas placas de acrílico e não placas de vidro para conter o resiste.

A exposição de apenas uma das faces tem por objetivo a formação de um filme fino de resina não polimerizado sobre a superfície oposta à exposição, auxiliando a selagem das duas partes polimerizadas [52]. Esta placa de cobertura polimerizada foi lavada e seca da mesma forma que a placa que contém os canais, porém, dispensa-se o uso do banho ultrassônico. As duas placas foram unidas manual e cuidadosamente para evitar a formação de bolhas entre as mesmas. As placas unidas foram dispostas diretamente sobre a lâmpada UV, dentro da expositora e irradiadas por 600 segundos para a selagem irreversível da estrutura. A Figura 8 mostra uma representação do procedimento de selagem descrito.

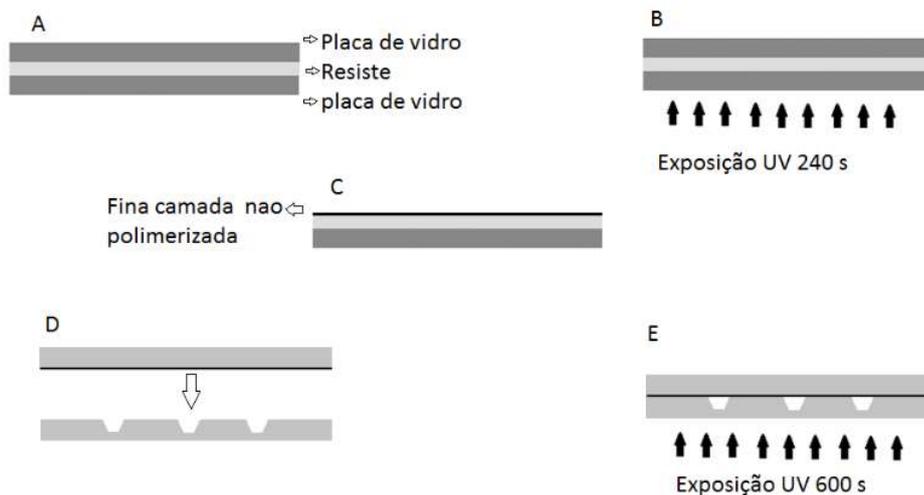


Figura 8: Conjunto contendo as placas e resiste, sem máscara com canais (A); Exposição do conjunto por apenas uma das faces(B); Fino filme não polimerizada (C); Selagem manual (D); Selagem irreversível(E).

Para criar o acesso das soluções aos dispositivos, agulhas hipodérmicas (BD Precision Glide – 0,45 × 13 mm) foram fixadas aos canais de entrada e saída de fluxo do microsistema. O protótipo desenvolvido e o microsistema final construído por meio deste procedimento para a determinação de paracetamol por quimiluminescência com injeção hidrodinâmica são apresentados na Figura 9. Este protótipo possui um canal para comportar a amostra ou padrão (Am), um canal para injeção de reagente quimiluminescente (R), um ponto de confluência de soluções (P), um canal para bombeamento do carregador (E1), uma bobina reacional (BR), e uma célula para detecção da quimiluminescência (CD) integrada. O dispositivo possui dimensões menores que as de um cartão de crédito (6,6 cm x 3,9 cm x 4 mm) e seus canais apresentam dimensões aproximadas de 0,5 x 0,44 mm (largura x profundidade) para o plug de amostragem, bobina reacional e célula de fluxo. Seus comprimentos e capacidade volumétrica são 44 mm, 360mm e 50 mm, comportando cerca de 9, 80 e 11 µL respectivamente. Todos os microdispositivos utilizados neste trabalho, foram construídos a partir deste procedimento variando-se as configurações dos canais a depender da finalidade.

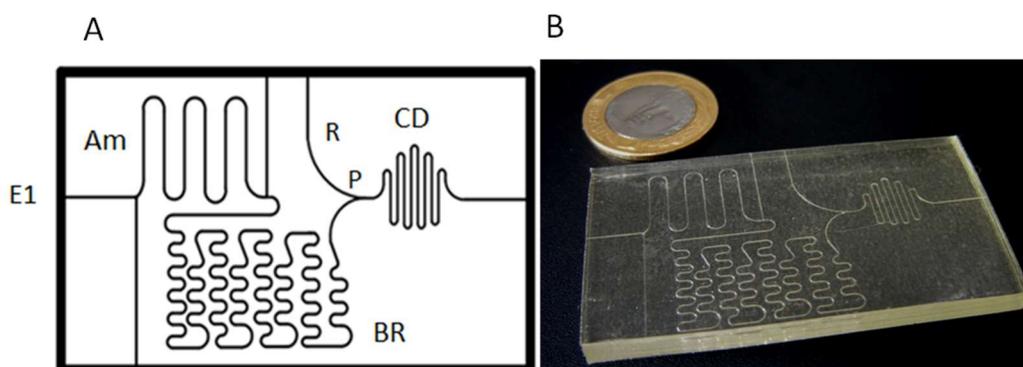


Figura 9: Protótipo desenvolvido para a aplicação (A); Fotografia do microsistema fabricado (B).

2.2.2 Aparatos

Para medidas de pH, foi utilizado um pHmetro HANNA 21.

Para a realização dos estudos propostos, os microdispositivos fabricados foram conectados a um conjunto de válvulas solenóides de três vias Cole Parmer, 01540-11, para direcionamento dos fluidos, e uma bomba peristáltica (Ismatec-Reglo Analog) foi utilizada para bombeamento/aspiração das soluções de trabalho.

Nos diagramas de fluxo que serão apresentados mais adiante, as válvulas solenóides foram representadas como mostrado na Figura 10, tendo uma via que permanece normalmente fechada (NC), uma via que permanece normalmente aberta (NO) e uma via comum (COM) a qual se interliga com a via normalmente aberta (NO) quando a válvula está desligada e se interliga com a via normalmente fechada (NC) quando a válvula está ligada. Vale destacar que a linha tracejada na Figura 10 representa a via que não se interliga a via comum (COM) da válvula a depender do estado da mesma (ligada ou desligada).

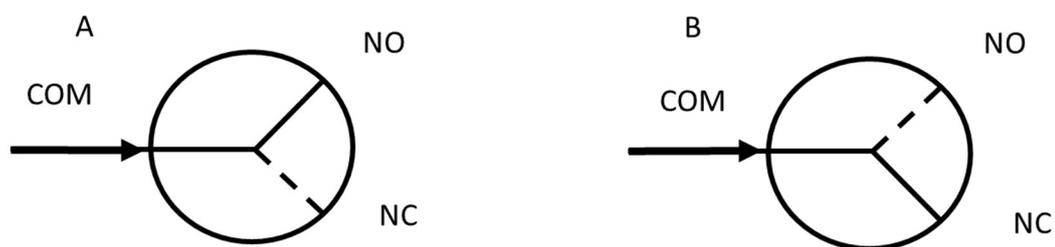


Figura 10: Diagrama de posição das vias das válvulas solenóides, em A, a válvula encontra-se desligada e em B, ligada.

Para realizar as medidas da intensidade da quimiluminescência, foi utilizada uma mini-fotomultiplicadora (Hamamatsu -H7468-03). Este dispositivo comercial já apresenta, em seu *hardware* uma fonte variável de tensão (0-1000V), um conversor A/D de 12 bits e também uma interface RS-232 para comunicação com o computador, atuando como transdutor de sinal. Uma interface eletrônica (USB 6009 – National Instruments) foi também utilizada para comunicação do computador com as válvulas solenóides.

As válvulas solenóides, a bomba peristáltica e a fotomultiplicadora (FTM) foram controlados através de um programa de computador escrito em VisualBasic 6.0. A partir deste programa, o usuário pôde realizar procedimentos de injeção de amostra nos microsistemas através da estratégia baseada em injeção hidrodinâmica, a aquisição do sinal analítico e o salvamento dos dados.

Antes da realização dos procedimentos analíticos, a interface gráfica desenvolvida permitiu definir alguns parâmetros como o tempo de amostragem, número de leituras, intervalo de espera entre uma medida e a subsequente, além de parâmetros da fotomultiplicadora, como o tempo de integração e a diferença de potencial aplicada entre os dinodos.

Para a detecção da quimiluminescência, o microdispositivo foi fixado à fotomultiplicadora empregando-se uma placa de alumínio e parafusos, conforme apresentado na Figura 11 (C). Como a quimiluminescência é uma técnica de campo escuro, o conjunto foi acondicionado no interior de uma caixa confeccionada em plástico preto, com pequenos furos para permitir a entrada de tubos Tygon®

que conectam o microdispositivo ao mundo externo. A Figura 11 mostra a montagem da caixa e o dispositivo já fixado na fotomultiplicadora, a Figura 12 ilustra o diagrama de fluxo empregado para a estratégia abordada neste capítulo e a disposição geral do sistema montado é mostrada na Figura 13.

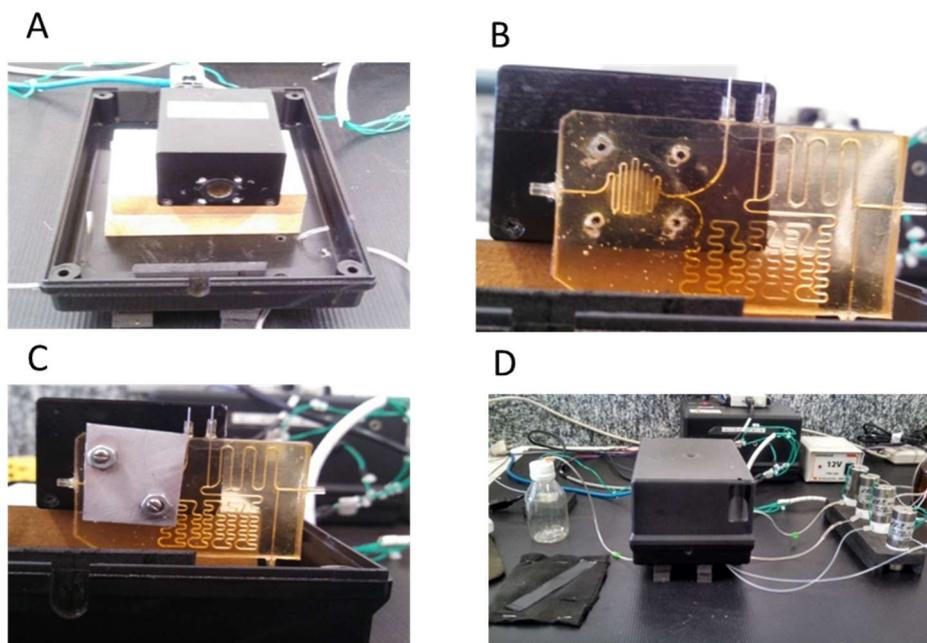


Figura 11: Fotografias mostrando a montagem do sistema de detecção. Mini fotomultiplicadora (A); Microsistema alinhado a FMT (B); fixação do microdispositivo com auxílio de uma chapa de alumínio(C); Caixa fechada com o conjunto já internalizados e acesso aos fluidos criados com tubos Tygon® (D)

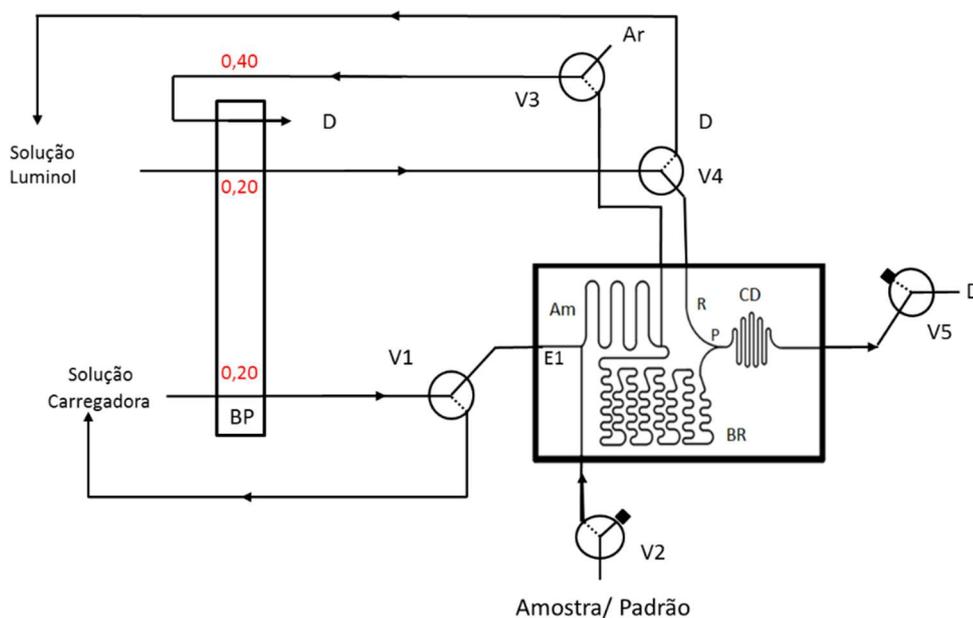


Figura 12. Diagrama de fluxo do microsistema utilizado. As válvulas estão desligadas. (Legenda: BP – Bomba Peristáltica; V1 a V5 – Válvulas Solenóides; E1-canal de entrada do carregador; Am – Alça de amostragem; R- canal para injeção de luminol; P- ponto de confluência com luminol; CD – Célula de Detecção; BR- Bobina de reação; D – Descarte. Vazões indicadas na figura em mL.min⁻¹).

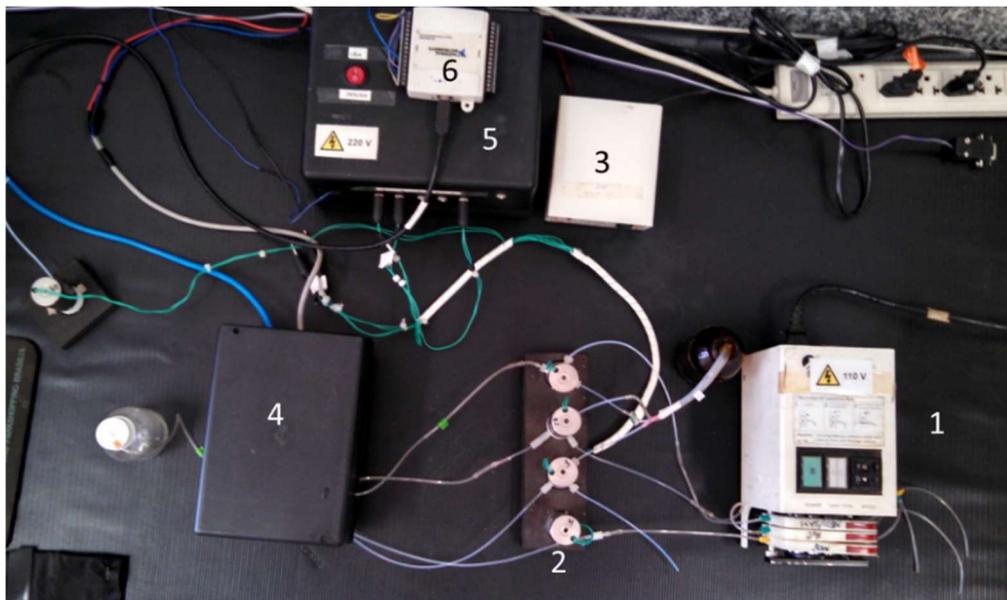


Figura 13: Fotografia com a visão geral dos componentes do sistema em fluxo. Bomba peristáltica (1); Conjunto de válvulas Solenóides (2); Fonte Elétrica que alimenta as válvulas solenóides (3); Caixa com a Fotomultiplicadora (4); Circuito elétrico que alimenta a Fotomultiplicadora (5); Interface para comunicação das válvulas solenóides (6)

2.2.3 Reagentes e soluções

A maioria das soluções foi preparada com água purificada por osmose reversa e com reagentes possuindo, ao menos, 99 % de pureza. Para as soluções em que esta condição não foi obedecida, a descrição específica será realizada ao longo do texto.

2.2.3.1 Soluções Estoque

A partir do reagente P.A NaOCl (Vetec, solução 4-6% (m/v)) foi preparada uma solução estoque de NaOCl na concentração de $514,5 \text{ mg L}^{-1}$, diluindo-se o volume apropriado do reagente grau analítico em água. Para o preparo de uma solução estoque de paracetamol na concentração $151,6 \text{ mg L}^{-1}$ a massa apropriada do reagente (Sigma Aldrich) foi solubilizada em água.

2.2.3.2 Soluções de trabalho

Uma solução tampão carbonato na concentração $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 11 foi preparada pela dissolução da massa apropriada de K_2CO_3 (Carlos Erba) em água seguido do ajuste do pH com pequenas adições de solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Uma solução de luminol (3-aminofthalohidrazida) na concentração de 2 mmol L^{-1} , foi preparada pela dissolução da massa adequada do reagente (Acros, pureza de 98%) em solução tampão carbonato $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, pH 11,0. A solubilização do sal foi acelerada com auxílio de banho ultrassônico por 5 minutos.

Uma curva analítica para a determinação da concentração de paracetamol foi construída com quatro soluções padrão. Estas foram constituídas por uma concentração fixa de $20,58 \text{ mg L}^{-1}$ de OCl⁻ e a cada um dos quatro balões volumétricos foram adicionados, individualmente, volumes crescentes da

solução estoque de paracetamol de forma a se obter as concentrações na faixa de 1,21 a 4,84 mg L⁻¹ do analito. Uma solução de referência (branco) foi constituída apenas pela adição de hipoclorito em água, de forma a se obter a concentração 20,6 mg L⁻¹.

Nesta configuração, os reagentes paracetamol e hipoclorito foram adicionados no mesmo balão volumétrico para que a reação entre os dois ocorresse fora do microssistema. Esta solução é então injetada no microssistema e a intensidade da quimiluminescência é medida. As concentrações de hipoclorito e paracetamol foram baseadas nos estudos de Oliveira e colaboradores [43], e de testes de bancada. Como os autores realizaram etapas de otimizações para realizar a determinação, para a estratégia testada neste capítulo, novas otimizações não foram consideradas.

2.2.3.3 Preparo de amostras.

Para a realizar a determinação de paracetamol em medicamentos, seis amostras comerciais foram adquiridas nas farmácias locais e discriminadas como M1 a M6. Os medicamentos podem ser comercializados com diferentes formulações e em diversa formas, como comprimidos, cápsulas ou chás. A Tabela 1 relaciona a forma com a amostra se apresenta e a dosagem de paracetamol indicada nos rótulos.

Tabela 1: Forma na qual a mostra se encontra e quantidade de princípio ativo discriminada nos rótulos.

Amostra	Forma comercial	Dosagem (unidade)
M1	Chá	500 mg
M2	Cápsula	400 mg
M3	Chá	400 mg
M4	Chá	500 mg
M5	Comprimido	800 mg
M6	Comprimido	750 mg

O preparo das amostras deu-se da seguinte maneira: para as amostras comercializadas como chás, os conteúdos de três saches foram pesados individualmente, em seguida, os conteúdos foram misturados em um béquer. A massa média de um sache foi pesada, solubilizada em água, filtrada e transferida para um balão volumétrico. Para as amostras em cápsula, os reservatórios de três cápsulas foram rompidos e tiveram seus conteúdos pesados individualmente. Em seguida, foram misturados e a massa média do conteúdo de uma cápsula foi solubilizada, filtrada e transferida para um balão volumétrico. Já para as amostras em comprimidos, três unidades foram pesadas individualmente, trituradas com auxílio de um almofariz e pistilo e misturadas. A massa média de um comprimido foi solubilizada, filtrada e transferida para um balão volumétrico. Todas as soluções estoque de amostras foram armazenadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para injeção das amostras no

microdispositivo, foram feitas diluições das soluções estoque em água, para concentrações adequadas para a curva analítica.

2.2.4 Procedimento automatizado de análise

O diagrama de fluxo utilizado para a determinação abordada neste capítulo encontra-se representado na Figura 12, o qual mostra a disposição da bomba peristáltica (BP) e das cinco válvulas solenóides (V1-V5), necessárias à realização do procedimento, em seu estado desligado (via comum interligada a via normalmente aberta). Para um melhor entendimento, o procedimento realizado foi descrito a seguir em três etapas: Início, Amostragem e Aquisição.

Início: Nesta etapa, todas as válvulas estavam desativadas. Deste modo, o fluxo do carregador foi direcionado para o interior do microsistema através de V1, percorrendo a alça de amostragem (Am) e a bobina de reação (BR) chegando no ponto “P”, onde conflui com o luminol. A mistura seguiu em direção a cela de detecção (CD) até V5, onde foi direcionada para o descarte. Nessa etapa, a solução de carregador limpou os canais do microsistema, condicionando-os para a posterior injeção de padrões ou amostras e V4 direcionou o fluxo de luminol para o interior do microsistema para que eventuais bolhas que estivessem presentes no interior do canal fossem removidas. A vazão dos fluidos era de $0,20 \text{ mL min}^{-1}$. Não há aquisição de dados neste estágio.

Amostragem: Nesta etapa, todas as válvulas foram ativadas de modo que a solução da amostra (ou dos padrões) foi aspirada durante 20 segundos através de V2, preenchendo a alça de amostragem (Am) com cerca de $8,0 \mu\text{L}$ de solução. Todo o volume excedente de solução padrão foi aspirado através de V3 e direcionado para o descarte. Além disso, a solução carregadora foi direcionada para o seu frasco de origem, o que também ocorre com a solução de luminol, por V4, e permite a economia destes reagentes. A vazão dos fluidos permaneceu a mesma.

Aquisição: As válvulas tornaram a ser desativadas (Figura 13), liberando o fluxo do carregador para o interior do microsistema. Este fluxo impulsionou o segmento de solução padrão contendo paracetamol e hipoclorito, previamente misturados, em direção a bobina de reação (BR) onde ocorreu a mistura das soluções carregadora e injetada. Através de V4, o fluxo de luminol tornou a ser direcionado para o microsistema, e confluiu com a solução injetada no ponto “P” imediatamente antes da célula de detecção quimiluminescente (CD), onde o sinal transiente foi detectado. A vazão dos fluidos permaneceu de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$.

Este processo se repetiu quatro vezes para cada padrão e cada amostra. A primeira replicata funcionou como “solução de limpeza”, e não foi considerada. Assim, quando a troca de solução padrão foi realizada, a alça de amostragem foi preenchida com a nova solução padrão, bem como a BR e CD, permitindo que um efeito de diluição indesejado provocado por resíduos de solução padrão de concentração diferente fosse minimizado

2.3 Resultados e Discussão

O Diagrama obtido para as injeções dos padrões e das soluções das amostras de medicamentos está apresentado na Figura 14. Conforme esperado de uma técnica de campo escuro, o sinal da linha de base se aproximou muito do valor “zero” e se manteve bastante estável durante as medidas, indicando a ausência de interferências de radiação externa à caixa plástica, utilizada para abrigar o microssistema fluídico. Pode-se observar também que as alturas dos picos tendem a diminuir com o aumento da concentração de paracetamol, devido à diminuição da concentração de íons hipoclorito no meio.

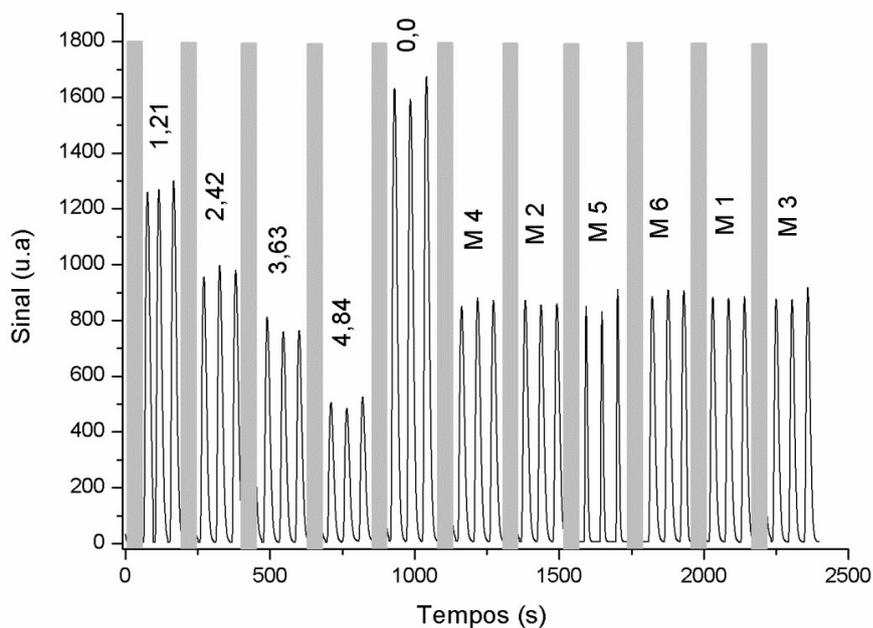


Figura 14. Diagrama obtido para determinação de paracetamol em medicamentos com injeção hidrodinâmica. Picos referentes aos quatro padrões de paracetamol, solução do branco e das seis amostras de medicamentos. Concentrações de paracetamol indicadas em mg L^{-1} . Barras em cinza ocultam picos referentes às injeções de limpeza.

Deste diagrama, foram obtidos os valores de intensidade do sinal, proporcionais à concentração de paracetamol, pela subtração da altura média dos picos para o branco das alturas dos picos obtidos para as soluções contendo paracetamol. Os sinais estimados desta forma foram utilizados para a construção da curva analítica representada na Figura 15, a qual apresentou uma boa correlação linear ($R^2 = 0,997$) e uma sensibilidade de $208,24$ unidades de sinal/ mg L^{-1} . As pequenas barras de erros relacionadas aos pontos apresentados na curva analítica indicaram também uma repetibilidade adequada das medidas. Para avaliar a precisão das medidas, foi calculado o coeficiente de variação (CV) para as três injeções do padrão com $3,63 \text{ mg L}^{-1}$, o qual apresenta o maior desvio de resíduos em relação a curva traçada. Obteve-se um CV do sinal de supressão de $3,29\%$, indicando uma boa precisão.

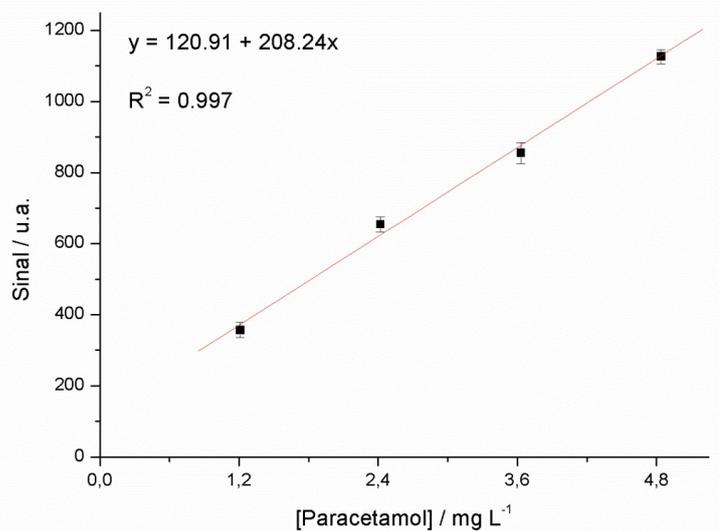


Figura 15: Curva analítica obtida para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas por injeção hidrodinâmica. Faixa de concentração de 1,21-4,84 mg L⁻¹.

Ainda com relação à curva analítica, observou-se que o intercepto em “y” não passa pela origem, o que pode indicar que o método não é linear para concentrações abaixo da concentração mínima estudada (1,21 mg L⁻¹), levando a um limite de detecção (LD) relativamente elevado. De fato, um LD de 0,33 mg L⁻¹ foi estimado pela equação $(3 \cdot s_{y/x})/b$, onde “b” é o coeficiente angular e $s_{y/x}$ é o desvio dos seus resíduos. O LD obtido está bem próximo ao de Oliveira e colaboradores [43], os quais obtiveram o valor de 0,27 mg L⁻¹ em um sistema FIA convencional. Vale observar que para a estratégia desenvolvida neste capítulo, o fato de não ter sido obtido um valor de LD menor não representa um obstáculo para a aplicação, pois o analito encontra-se em uma grande quantidade de produtos (medicamentos) e ainda em concentrações elevadas, haja visto que apenas um comprimido de paracetamol pode conter de 250 mg a 800 mg do princípio ativo.

Ainda em comparação com os resultados obtidos pelos autores citados, com relação ao valor do intercepto, os autores obtiveram melhores resultados sendo de 2,18, valor bem mais próximo de “zero”, diferentemente dos resultados obtidos pelo método proposto, sendo de 120,91. Os autores citados também obtiveram um maior valor de sensibilidade, sendo de $2,84 \times 10^4$ mV/mg.L⁻¹ de paracetamol, enquanto no método proposto, foi obtido um valor de sensibilidade de 208,24 unidades de sinal/mg.L⁻¹ de paracetamol.

Para as amostras de medicamento, os resultados obtidos foram comparados com os valores indicados nos rótulos e são apresentados na Tabela 2. Embora os rótulos não sejam amplamente utilizados como comparativo, para esta aplicação, a comparação foi considerada válida devido à natureza das amostras. Tratando-se de medicamentos para uso da população, e que estes passaram por um processo de controle de qualidade bem estabelecido, os valores indicados nos rótulos foram tidos como uma base confiável para comparação. Dessa forma, ao observar os valores obtidos pelo método proposto e os valores estipulados nos rótulos, pode-se verificar erros relativos menores que 3,5 % para todas as amostras analisadas e que estes erros posicionaram-se acima e abaixo dos valores dos rótulos, indicando a possível ausência de erros sistemáticos para o método proposto.

Tabela 2: Resultados obtidos para a determinação de paracetamol em seis medicamentos comerciais.

Medicamento	μFIA (mg/dose)	Rótulo (mg/dose)	Erro Relativo (%)
M1	501,66 \pm 2,78	500	+0,33
M2	413,56 \pm 5,08	400	+3,39
M3	396,27 \pm 12,94	400	-0,93
M4	513,33 \pm 10,44	500	+2,66
M5	827,29 \pm 14,30	800	+3,41
M6	733,25 \pm 12,53	750	-2,23

Ao comparar alguns parâmetros do sistema proposto com os dos estudos de Oliveira [43], foram encontrados diversos fatores que necessitam ser melhorados. Os autores obtiveram uma frequência analítica de 180 injeções hora⁻¹, enquanto nesta proposta, foi obtida a frequência de 49 injeções hora⁻¹. Essa diminuição da frequência analítica pode ser atribuída a dois fatores principais, sendo estes as configurações do programa, as quais determinam a velocidade de aquisição do sinal analítico, como também a vazão dos fluidos. Enquanto os autores citados realizaram uma determinação a cada 20 segundos, na proposta realizada neste capítulo, devido as configurações do programa cada determinação leva 52 segundos (mais 20 segundos de injeção de amostra, totalizando 72 s por pico). Este elevado tempo de aquisição também proporcionou um aumento no consumo do reagente luminol, sendo de 62 μ g na estratégia apresentada, enquanto Oliveira e Colaboradores [43] obtiveram um consumo de 24 μ g deste reagente por determinação. Entretanto, é válido ressaltar que 62 μ g ainda representa um baixo consumo deste reagente. Uma vantagem observada na estratégia proposta foi o consumo de apenas 0,2 μ g de hipoclorito por determinação, enquanto os autores tiveram um consumo de 7,5 μ g deste reagente.

Já com relação a vazão dos fluidos, no sistema proposto, seu valor foi de 0,2 mL min⁻¹, enquanto na estratégia que utiliza o sistema em FIA convencional, um valor consideravelmente maior foi necessário, sendo de 2,0 mL min⁻¹. O motivo para a utilização de uma vazão dez vezes menor está no tamanho do microdispositivo. Vazões muito elevadas fariam com que o fluxo de reagentes percorresse toda a extensão dos canais em um espaço de tempo muito curto, o que poderia inviabilizar as medidas. Além de proporcionar que um número maior de medidas compusesse a determinação (35 pontos compõe um pico), este valor de vazão também possibilitou a diminuição dos resíduos gerados, sendo este de aproximadamente 100 mL após uma jornada de trabalho de 6 h. A grande vantagem da estratégia proposta em relação aos estudos de Oliveira e colaboradores [43] encontrou-se na construção do dispositivo, que já apresentou em seu protótipo de forma integrada os canais para injeção dos reagentes, a bobina reacional e a cela de detecção, enquanto os autores citados necessitaram adquirir esta última separadamente, o que aumenta o custo da instrumentação. Em contrapartida, os fotodiodos de silício utilizados pelos autores têm um custo relativamente menor que uma fotomultiplicadora.

2.4 Conclusões parciais e perspectivas.

A partir destes resultados preliminares, pode-se concluir que a determinação de paracetamol em microssistemas de análise pode ser aplicada com boa linearidade na faixa utilizada para esta aplicação. Entretanto, em comparação com os sistemas em fluxo convencionais, houve uma diminuição considerável na frequência analítica obtida e a reação entre o paracetamol e o hipoclorito ocorre fora do microssistema, ou seja, os reagentes devem ser adicionados individualmente dentro do mesmo frasco reacional previamente a injeção da mistura no microssistema, o que diminui a abrangência da automação no que diz respeito ao sistema de injeção das soluções e mistura dos mesmos, diferentemente dos autores citados os quais empregaram a estratégia de injeção multicomutada. Na aplicação desenvolvida neste capítulo, houve ainda um maior consumo do reagente luminol, que de fato foi o de maior custo. Vale ressaltar que apesar da necessidade de se otimizar diversos parâmetros, a linearidade, a faixa dinâmica e o LD obtidos com o microssistema proposto foram suficientemente próximos aos obtidos com o sistema por injeção em fluxo convencional, e conta ainda com uma menor produção de resíduos e maior portabilidade. Uma das principais vantagens do método proposto em relação à alternativa apresentada por Oliveira e colabores [43] constituiu da integração da célula de fluxo ao microdispositivo, visto que a literatura tem mostrado a dificuldade encontrada nesta etapa para as instrumentações do tipo *lab-made* para medidas de quimiluminescência. De fato, a integração da célula de fluxo diminui o custo de produção do dispositivo.

É importante destacar que o estudo realizado neste capítulo teve por objetivo verificar se as medidas de quimiluminescência para determinação de paracetamol poderiam ser realizadas em um dispositivo microfluídico. Por esta razão, não foram realizadas etapas de otimizações para melhorar o desempenho do dispositivo proposto. Ainda é importante destacar que o sistema de detecção utilizado (PMT), apesar de ter um custo mais elevado, foi escolhido para a realização destes testes devido a sua alta sensibilidade, fator importante quando se utiliza canais de dimensões micrométrica. Como perspectivas para esta aplicação, os procedimentos de injeção de soluções podem ser automatizados alterando-se parte da programação do programa desenvolvido e o *layout* do dispositivo pode ser modificado para que o gerenciamento de soluções seja melhorado. Objetivou-se portanto, o desenvolvimento de um novo protótipo para que esta determinação fosse realizada empregando-se o conceito de multicomutação, permitindo que a reação ocorresse em linha e, dessa forma, conferindo uma maior automação para o sistema proposto

Capítulo 3-Determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas por quimiluminescência em μ FIAs e empregando o conceito de multicomutação.

3.1 Introdução

Na aplicação realizada anteriormente, foi empregada a injeção hidrodinâmica, na qual um segmento da mistura contendo o analito e íons hipoclorito foi injetado em um fluxo de solução carregadora (tampão K_2CO_3 $0,6 \text{ mol L}^{-1}$). Destaca-se então que a automação da reação entre o hipoclorito e o paracetamol não foi atingida, uma vez que no *layout* utilizado só havia um canal para injeção tanto do íon hipoclorito quanto do paracetamol. Dessa forma, ambos os reagentes foram misturados previamente à injeção, diminuindo o caráter automatizado para a injeção dos reagentes. Com o objetivo de conferir uma maior automação aos procedimentos de injeção de amostras e reagentes, e ainda utilizando o sistema luminol-hipoclorito, este capítulo abordou a aplicação do conceito de multicomutação em microssistemas fluídicos para realizar a determinação de paracetamol em amostras de medicamentos.

3.2. Materiais e Métodos

A multicomutação consistiu na inserção de pequenos segmentos de amostras e reagentes de forma alternada, possibilitando que a reação entre o paracetamol e o íon hipoclorito ocorra em linha [53]. Essa modificação pôde se foi implementada no μ FIA com o auxílio de válvulas solenóides de três vias, as quais recebiam comandos do computador para redirecionar os fluxos de soluções para a mesma linha de bombeamento, ou seja, os segmentos foram inseridos na mesma linha de amostragem, com volumes bem determinados. Para realizar o controle dos volumes injetados, o programa escrito em linguagem VisualBasic6.0 sofreu modificações para que pudesse controlar, além das válvulas solenóides, também o acionamento da BP. O volume de solução a ser injetado foi dependente da vazão utilizada na BP e do tempo que a via da válvula foi liberada. Uma ilustração de fluxo multicomutado está apresentada na Figura 16.

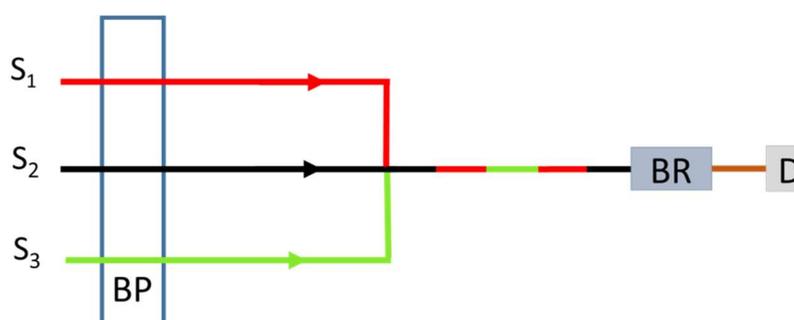


Figura (16): Ilustração da injeção de diferentes segmentos de reagentes em um fluxo multicomutado. S_1 , S_2 e S_3 representam três soluções arbitrárias, (BP) bomba peristáltica, (BR) bobina reacional e (D) detector.

3.2.1. Construção dos microdispositivos.

Para se aplicar a multicomutação, o *layout* do microsistema anterior foi modificado, passando a apresentar 3 canais de entrada de solução (E1, E2 e E3) os quais confluíam no ponto P, além de uma bobina reacional (BR), um canal para confluência com o luminol (R) e a célula para detecção de quimiluminescência integrada (CD). A Figura 17A mostra o novo *layout*. e a Figura 17 B mostra uma fotografia do dispositivo já confeccionado. A construção do microdispositivo foi realizada empregando-se o procedimento descrito na seção 2.2.1 As dimensões dos canais (largura, profundidade e comprimento) BR e CD foram estimados a partir de fotografias obtidas com um microscópio USB (Microview 400 x), a partir de imagens da seção transversal dos canais, e o comprimento com régua. Os volumes foram estimados destes compartimentos a partir destas medidas foram os mesmos que os do dispositivo apresentado na seção 2.2.1.

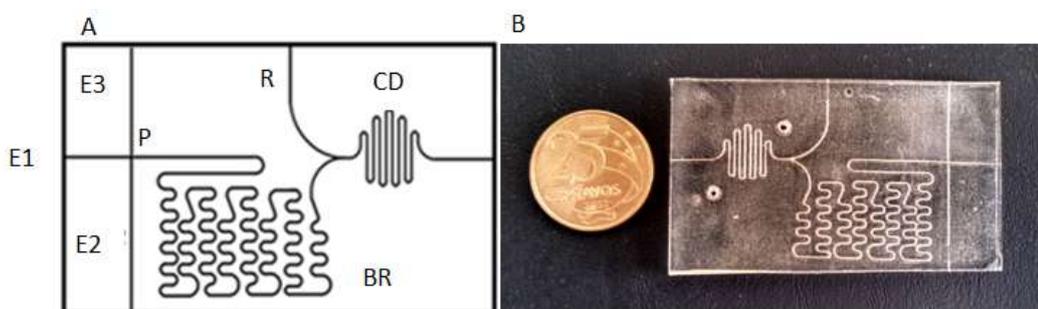


Figura 17: Protótipo do microsistema para realizar a multicomutação. Em (A), layout que comporta canais para inserção de solução carregadora (E1), segmentos de padrão/amostra (E2), hipoclorito (E3) ,os quais confluem no ponto “P”, além de canal para inserção de luminol, (R), a bobina reacional (BR) e cela de detecção quimiluminescente (CD). Dispositivo já confeccionado (B).

3.2.2. Aparatos

Forma utilizados os mesmos aparatos que os descritos na seção 2.2.2.

3.2.3. Reagentes e soluções

A maioria das soluções foi preparada com água purificada por osmose reversa e com reagentes possuindo, ao menos, 99 % de pureza. Para as soluções em que esta condição não foi obedecida, a descrição específica ao longo do texto foi realizada.

3.2.3.1. Soluções Estoque

A partir de uma solução P.A de NaOCl (Vetec, 4-6% (m/v)) foi preparada uma solução estoque de NaOCl na concentração 2525 mg L^{-1} , diluindo-se o volume apropriado do reagente grau analítico em água. O reagente P.A foi padronizado empregando a titulação iodimétrica [47]. Para o preparo de uma solução estoque de paracetamol na concentração 1000 mg L^{-1} , a massa apropriada do reagente (Sigma Aldrich) foi solubilizada em solução 1% (v/v) de etanol.

3.2.3.2. Soluções de trabalho

Uma solução de hipoclorito na concentração de 51,5 mg L⁻¹ foi preparada pela diluição do volume adequado da solução estoque em água. Uma curva analítica para a determinação da concentração de paracetamol foi construída com quatro soluções padrão (1,0-4,0 mg L⁻¹), as quais foram preparadas pela diluição apropriada da solução estoque de paracetamol em água. As demais soluções foram preparadas de acordo com o descrito na seção 2.2.3.2.

3.2.3.3. Preparo de amostras.

Nove amostras de medicamentos contendo paracetamol foram adquiridas em estabelecimentos comerciais e foram discriminadas como AM1 a AM9. As amostras são comercializadas como comprimidos, cápsulas ou chás e a Tabela 3 relaciona a forma como a amostra se apresenta e a dosagem de paracetamol indicada nos rótulos.

Tabela 3: Forma na qual a mostra se encontra e quantidade de princípio ativo discriminada nos rótulos.

Amostra	Forma comercial	Dosagem (un)
AM1	Comprimido	750 mg
AM2	Comprimido	750 mg
AM3	Comprimido	750 mg
AM4	Chá	500 mg
AM5	Chá	500 mg
AM6	Chá	500 mg
AM7	Cápsula	400 mg
AM8	Cápsula	400 mg
AM9	Cápsula	400 mg

Para fins de doseamento, é estabelecido pela Farmacopéia brasileira [40] sua solubilização em mistura água e metanol (75:25) para a determinação por CLAE (método de referência, o qual será utilizado posteriormente). Entretanto, para a injeção das amostras no μ FIA, devido a elevada solubilidade do paracetamol em etanol, e por este solvente ser menos reativo e menos tóxico que o metanol (o qual degrada o material polimérico do microdispositivo), as soluções estoque dos medicamentos foram todas preparadas em solução aquosa 1% (v/v) etanol e armazenadas ao abrigo da luz e a 4°C. Os demais procedimentos de preparo de amostra foram realizados conforme descrito na seção 2.2.3.3. Para injeção das amostras no microdispositivo, foram feitas diluições das soluções estoque em água, para concentrações adequadas à curva analítica.

3.2.4 Método de Referência

Para avaliação dos resultados obtidos com o microssistema, realizou-se a determinação de paracetamol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de acordo com o estabelecido pela Farmacopéia Brasileira [40] Uma solução padrão de paracetamol foi preparada na concentração de 10 mg L⁻¹ em mistura de água e metanol (75:25) (solução utilizada como fase móvel) sendo 10 µL injetados no equipamento para a identificação do composto. Para o doseamento das amostras, soluções individuais das mesmas foram preparadas na concentração de 10 mg L⁻¹ em mistura de água e metanol (75:25) e 10 µL foram injetados no equipamento.

3.2.5. Procedimento automatizado de análise

O diagrama de fluxo utilizado para a determinação abordada neste capítulo está representado na Figura 18, o qual mostra a disposição da bomba peristáltica (BP) e das quatro válvulas solenóides (V1-V4), necessárias à realização do procedimento, em seu estado desligado (via comum interligada a via normalmente aberta). Novamente, para um melhor entendimento, o procedimento realizado será descrito a seguir em três etapas: Início, Amostragem e Aquisição.

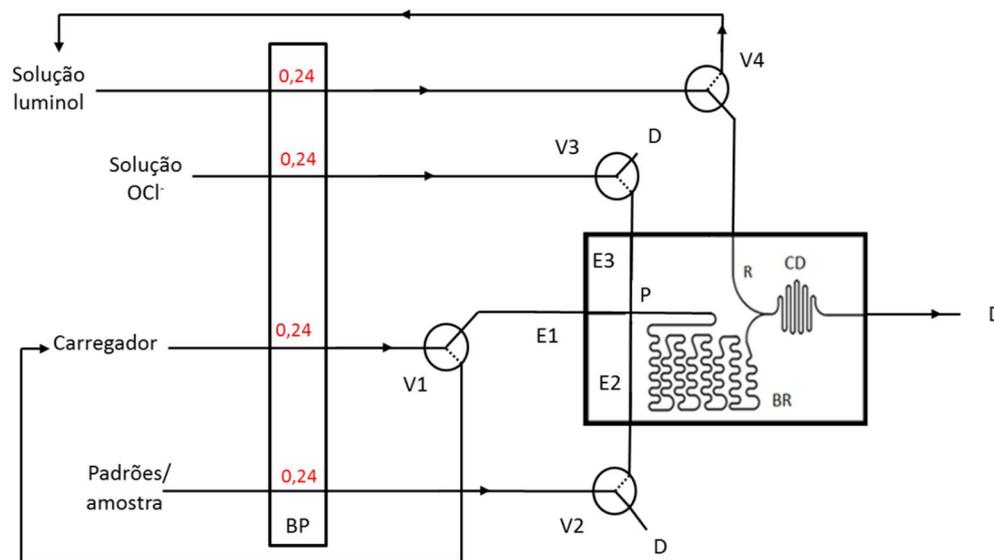


Figura 18: Diagrama de fluxo do microssistema utilizado. As válvulas estão desligadas. (Legenda: BP – Bomba Peristáltica; V1 a V3 – Válvulas Solenóides; CD – Célula de Detecção; E1, canal para injeção de solução carregadora, E2 canal para injeção de solução padrão/ amostra de paracetamol e E3, canal para injeção de solução de hipoclorito; R- canal para injeção de luminol; P- ponto de confluência; D – Descarte. Vazões indicadas na figura em mL mim⁻¹).

Início: todas as válvulas estavam desativadas (Figura 18). Nestas condições, o fluxo do carregador foi direcionado por V1 para o interior do microssistema. Esse fluxo percorreu a linha de fluxo perpendicular às confluências, a bobina de reação e a cela de detecção, condicionando os canais para a passagem dos reagentes. Por V4, o fluxo de luminol foi direcionado para o interior do microssistema. Não houve aquisição de dados neste estágio.

Amostragem: concomitantemente, V1, V2, e V4 foram ativadas durante 8 segundos. Dessa forma, o fluxo da solução padrão de paracetamol foi direcionado para o interior do microssistema, injetando cerca de 32 μL desta solução. Em seguida, concomitantemente, V3, V1 e V4 foram ativadas e V2 desativada, durante 8 segundos, permitindo que cerca de 32 μL de solução de hipoclorito fossem injetados no microssistema. Novamente, durante outros 8 segundos, V3 foi desativada, V2, V1 e V4 foram ativadas, injetando outros 32 μL de solução de paracetamol. O fluxo do carregador e de luminol foram direcionados para seus recipientes de origem, permitindo a economia destes reagentes. Após a formação dos segmentos (multicomutação), todas as válvulas foram desligadas. A Figura 19 ilustra a composição dos segmentos formados após o procedimento de amostragem. A injeção dos três segmentos era realizada uma única vez para cada replicata (visto que poderiam ser feitas mais vezes) Vale destacar que o segmento de hipoclorito é injetado entre os segmentos de paracetamol, para que o sinal transiente tenha seu máximo registrado durante a passagem do hipoclorito remanescente pela cela de detecção.

Aquisição: Nesta etapa, todas as válvulas foram desativadas (Figura 18), direcionando o fluxo do carregador e de luminol para o interior do microssistema. Os segmentos formados foram impelidos através da bobina reacional pelo fluxo do carregador. Na bobina, o paracetamol reagiu com o hipoclorito diminuindo a concentração deste último segundo a equação apresentada na seção 2.1. Imediatamente antes da célula de detecção (CD), o fluxo confluiu com o reagente luminol, para que houvesse a quimiluminescência e ocorresse a detecção do sinal transiente. Para cada padrão, foram feitas 4 replicatas, sendo que o sinal analítico para a primeira replicata foi desconsiderado na construção da curva analítica por ser considerado um pico de estabilização do sinal para a nova concentração injetada.

O procedimento para troca de solução padrão ou de amostra foi diferenciado. Assim que as quatro replicatas de uma determinada solução foram realizadas, a BP foi parada e o frasco contendo a solução com paracetamol foi trocado, permanecendo o de hipoclorito. Logo em seguida, a BP era reativada, porém com o dobro da vazão de trabalho, a fim de permitir a limpeza mais rápida da linha que liga a solução de amostra/padrão ao microssistema. Nesta condição, três injeções de 8 s da nova solução padrão foram feitas para garantir que nenhum resquício da solução anterior tenha permanecido no microssistema.



Figura 19: Configuração dos segmentos das soluções de paracetamol e hipoclorito após a injeção de todos os segmentos de solução.

3.3. Resultados e Discussão

O Diagrama obtido para as injeções dos padrões e das soluções das amostras de medicamentos está apresentado na Figura 20. O sinal da linha de base se aproximou muito do valor “zero”, mantendo-se estável durante a realização das medidas. Semelhantemente ao observado na estratégia utilizando injeção hidrodinâmica, foi possível observar que as intensidades dos picos apresentaram a tendência a diminuir com o aumento da concentração de paracetamol, indicando que a estratégia de injeção multicomutada de fato possibilitou que a reação entre o hipoclorito e o paracetamol ocorresse dentro do microssistema.

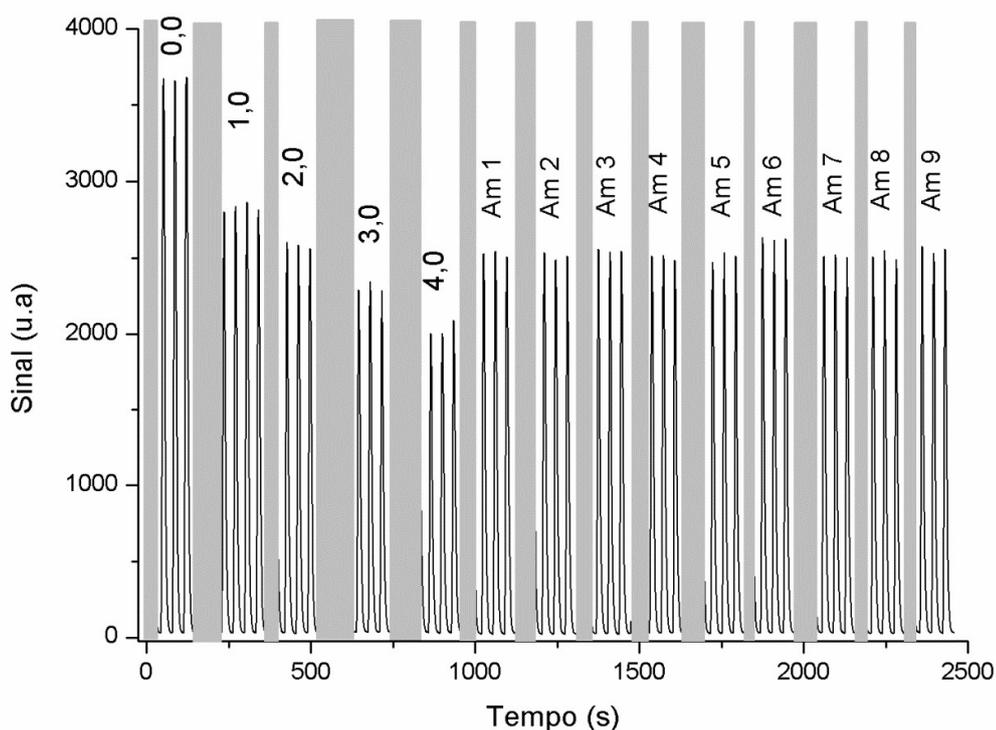


Figura 20. Diagrama obtido para determinação de paracetamol em amostras de medicamentos com injeção multicomutada. Compõe este diagrama os picos referentes aos quatro padrões de paracetamol, o, o sinal da solução do branco e os sinais das nove amostras de medicamentos. Concentrações de paracetamol indicadas em mg L^{-1} . As barras em cinza ocultam picos referentes à limpeza.

Deste diagrama, foram obtidos os valores de altura do sinal, proporcionais à concentração de paracetamol, da mesma forma que anteriormente. Os sinais estimados foram utilizados para a construção da curva analítica, representada na Figura 21, a qual apresentou uma boa correlação linear ($R^2 = 0,999$) e uma sensibilidade de 267,9 unidades de sinal/ mg L^{-1} . As pequenas barras de erros relacionadas aos pontos apresentados na curva analítica indicaram também uma boa repetitividade das medidas, sendo que, para as três injeções do padrão com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$, solução padrão que apresentou o maior desvio de resíduos em relação a curva traçada, foi calculado um coeficiente de variação do sinal de supressão de 3,0%, o que mostra uma boa precisão das medidas.

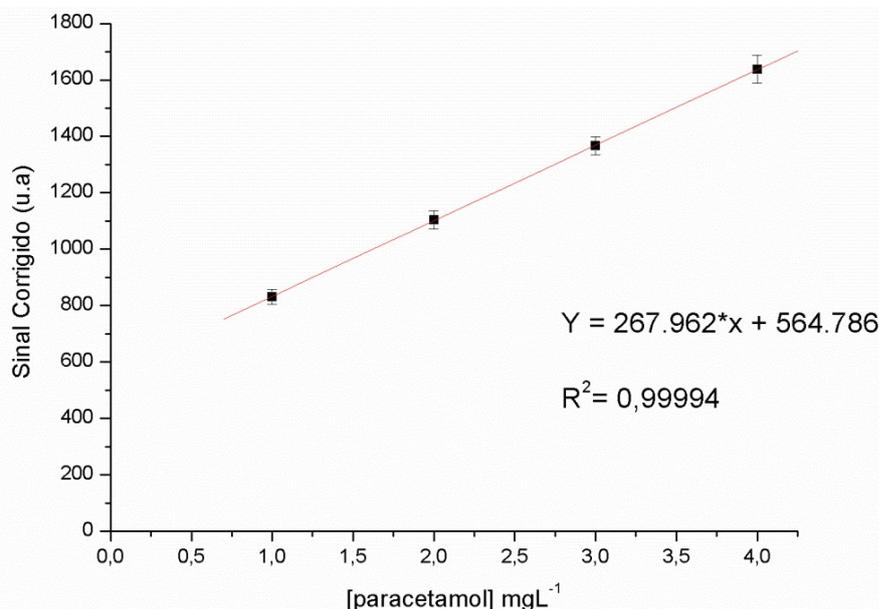


Figura 21: Curva analítica obtida para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando o conceito de multicomutação. Faixa de concentração de 1,0 -4,0 mg L⁻¹.

Novamente, pode-se observar que o intercepto em “y” não passa pela origem, o que sugere, semelhantemente a aplicação por injeção hidrodinâmica, que o método não seja linear para concentrações abaixo da concentração mínima estudada (1,0 mg L⁻¹). Uma observação a ser feita está na pronunciada queda de intensidade da quimiluminescência quando da injeção do padrão de 1,0 mg L⁻¹. Sendo assim, era esperado uma queda de intensidade proeminente quando da injeção do padrão de 2,0 mg L⁻¹, entretanto, como pode ser observado na Figura 20, esta não foi uma queda de intensidade pronunciada., o que também pode ser observado nas injeções para as outras soluções padrão. Este resultado pode indicar que mistura dos reagentes não foi muito eficiente, dificultando a reação completa entre o analito e o hipoclorito. É importante destacar também que foram realizadas injeções de um padrão de paracetamol na concentração de 0,5 mg L⁻¹, mas os picos referentes à estas injeções não apresentaram uma tendência linear de queda de intensidade, corroborando para a hipótese da não linearidade do método para concentrações abaixo de 1,0 mg.L⁻¹.

Para esta aplicação foi estimado um limite de detecção menor, de 0,26 mg L⁻¹, baseado na equação $(3 \cdot s_{y/x})/b$, onde “b” é o coeficiente angular e $s_{y/x}$ é o desvio dos seus resíduos. Vale ressaltar, que apesar do LD estimado, este não pode ser atingido, haja visto a não linearidade do sistema para concentrações abaixo de 1,0 mg L⁻¹, conforme discutido quando da injeção de um padrão de paracetamol na concentração de 0,5 mg.L⁻¹, indicando que o método proposto não é adequado para aplicações que necessitem de um valor de LD abaixo de 1,0 mg. L⁻¹. Com relação à frequência analítica, foi observada uma melhora, resultando em 88 injeções h⁻¹ contra 49 injeções h⁻¹ no estudo anterior. Entretanto, não houve diminuição no consumo de luminol, tendo sido de 63 µg por determinação. Ademais, o consumo de hipoclorito foi de 1,6 µg por determinação.

Para esta aplicação, outras considerações foram feitas para otimizar a determinação. Fonseca e colaboradores [54] mostraram que o fluxo dos fluidos nos microcanais tende a ser laminar. Dessa

forma, a mistura das soluções não apresenta bastante eficiência. Acredita-se que o principal mecanismo de transporte de massa seja a difusão e na tentativa de favorecê-la, foi avaliada a possibilidade de utilizada a estratégia de parada de fluxo, na qual, após a injeção dos segmentos dos reagentes no microdispositivo, o fluxo foi parado, e posteriormente retomado. Foram testados diferentes tempos de parada de fluxo para uma solução padrão de paracetamol na concentração de 3 mg L⁻¹ e a atenuação percentual em relação ao sinal do branco foi medida. A Tabela 4 relaciona a atenuação percentual com o tempo de parada de fluxo. Foi possível observar que a maior atenuação obtida esta relacionada ao tempo de parada de fluxo de 30 segundos, sendo a atenuação medida de 65,3 % enquanto a atenuação sem a parada de fluxo foi de 55,6 %. Desse modo, dada a pequena variação de atenuação, optou-se por realizar as medidas sem a parada de fluxo, o que permitiria uma maior frequência analítica.

Tabela 4: Tempo de parada de fluxo e porcentagem de atenuação obtida para padrão de 3 mg L⁻¹.

Tempo de parada (s)	Porcentagem de atenuação (%)
0	55,6%
10	58,7%,
20	60,9%
30	65,3%
40	64,8%

Para as amostras de medicamento, os resultados obtidos foram comparados com o método de referência (MR) indicado pela Farmacopéia Brasileira [40] e, as amostras analisadas nesta aplicação pertenciam ao mesmo lote que as determinadas pelo MR. Os valores indicados nos rótulos dos medicamentos, os obtidos pelo método de referência e os valores obtidos pelo método proposto foram apresentados na Tabela 5. Ao comparar os valores obtidos pelo método proposto com os determinados pelo MR, pôde-se observar que para seis amostras, as determinações apresentaram erros relativos menores que 3,0 %, estando em boa concordância com o limite máximo estabelecido pela Farmacopéia (5%). Observou-se também que os erros calculados continuam a se posicionar acima e abaixo dos valore rotulados indicando a possível ausência de erros sistemáticos. Com relação às amostras M5 e M6, é possível que as determinações tenham sido prejudicadas devido ao fato de serem amostras em forma de chá, e assim, apresentarem outros compostos e excipientes que poderiam interferir na análise.

Um teste de significância do tipo t-pareado foi utilizado para verificar se os resultados fornecidos pelo métodos propostos e o de referência diferem significativamente a um nível de confiança de 95% . Foi constatado que não há diferença significativa entre os resultados, considerando todas as amostras. A exatidão do método foi também avaliada por meio do gráfico de correlação entre os resultados obtidos com o microsistema e aqueles obtidos pelo método de referência, o qual foi apresentado na Figura 22. Como pode ser observado, mesmo com a inclusão das amostras AM5 e

AM6, foi obtido um coeficiente angular que está suficientemente próximo de “um” e um intercepto na ordenada, que apesar de não passar pela origem, está contemplado em um intervalo que compreende o valor “zero”. Por estes dados, foi possível afirmar que o método proposto se mostrou com boa exatidão.

Tabela 5: Resultados obtidos para a determinação de paracetamol em nove medicamentos comerciais.

Amostra	Rótulo mg/dose	Método de Referência	μFIA*	Erro % (Rótulo)	Erro % (MR)
AM1	750	792,01 ± 0,32	802,42 ± 26,94	6,99	1,31
AM2	750	798,83 ± 1,02	776,16 ± 31,30	3,49	-2,84
AM3	750	781,17 ± 1,84	830,06 ± 14,39	10,67	6,26
AM4	500	539,37 ± 0,38	534,17 ± 15,27	6,83	-0,96
AM5	500	484,33 ± 1,21	578,95 ± 31,09	15,79	19,54
AM6	500	468,97 ± 0,25	554,69 ± 15,39	10,94	18,28
AM7	400	421,37 ± 0,69	410,168 ± 6,49	2,54	-2,66
AM8	400	424,65 ± 0,89	424,35 ± 22,43	6,09	-0,07
AM9	400	433,45 ± 3,45	419,87 ± 17,38	4,97	-3,13

*Os medicamentos analisados pelo método proposto pertenciam ao mesmo lote que os analisados pelo método de referência. A Farmacopéia determina que o teor de medicamento não deve ser inferior a 95,0% nem superior a 105,0% da quantidade declarada, para amostra sólidas.

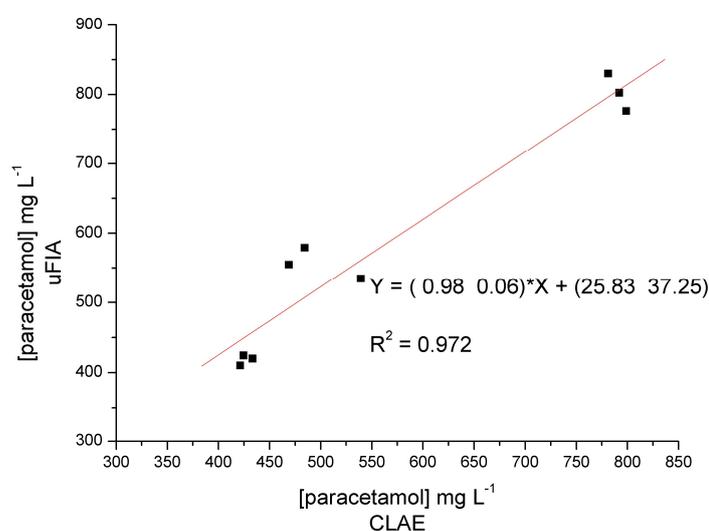


Figura 22: Gráfico de correlação para verificar a concordância dos valores obtidos pelo μFIA com injeção multicomutada e o método de referência para a análise paracetamol em medicamentos.

Em comparação com a estratégia utilizada anteriormente, foram observados diversos ganhos: esta estratégia é mais automatizada em relação a injeção dos reagentes, apresentou uma correlação linear superior ($R^2=0,999$ contra $R^2 = 0,997$), maior frequência analítica (88 injeções h^{-1} contra 49 injeções h^{-1}), menor limite de detecção ($0,26 \text{ mg L}^{-1}$ contra $0,33 \text{ mg L}^{-1}$) e maior sensibilidade ($267,92$ contra $208,24$). Ao comparar o dispositivo μFIA com a proposta de Oliveira e colaboradores [43], o sistema utilizado para realizar a detecção ainda permanece com um custo mais elevado, uma vez que no μFIA foi utilizada uma fotomultiplicadora enquanto os autores utilizaram um fotodiodo de silício.

Entretanto, apesar de o custo do detector dos autores ser menor, foi necessário a aquisição de uma célula de fluxo confeccionada em polietileno e esta foi adquirida separadamente, enquanto no μ FIA, a célula de fluxo já se encontrava integrada ao microdispositivo, barateando o custo da instrumentação. O dispositivo integrado confeccionado ainda conta com vantagens na sua produção nos quesitos de tempo e custo. Sua construção apresentou-se rápida e de baixo custo, sendo relativamente pequeno o prejuízo caso o dispositivo viesse a apresentar defeitos.

3.4 Conclusões parciais e perspectivas.

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a determinação de paracetamol em microssistemas de análise em fluxo pode ser aplicada com exatidão adequada para amostras que não possuem matrizes muito complexas. A boa correlação linear (R^2), a frequência analítica apreciável e a boa correlação obtida para as determinações em comparação com o método de referência, revelam que esta estratégia mostrou-se promissora para realizar esta determinação. As conquistas mais apreciáveis desta aplicação são relacionadas à construção de um sistema por injeção em fluxo miniaturizado que utiliza o conceito de multicomutação. Vale destacar que na literatura são encontrados poucos trabalhos relacionando estratégias miniaturizadas com sistemas multicomutados, mostrando como a estratégia desenvolvida neste capítulo apresentou versatilidade.

Capítulo 4- Detecção óptica baseada em imagens digitais para medidas de quimiluminescência.

4.1 Introdução

Para a realização de medidas ópticas, diversos detectores estão disponíveis no mercado, dentre os quais, as fotomultiplicadoras e fotodiodos estão entre os mais utilizados. Entretanto, esses dispositivos podem ter custos elevados e/ou necessitam de um arranjo eletrônico adequado para o seu uso, principalmente quando se deseja construir uma instrumentação do tipo *lab-made*. Alternativamente, a literatura mostra que é possível realizar detecções ópticas utilizando dispositivos, como as *webcams*. O uso destes detectores alternativos tem sido bastante difundido e apresenta diversas vantagens como, facilitar o processamento dos dados (via *softwares* desenvolvidos pelos próprios usuários), e possibilitar o monitoramento contínuo de sistemas dinâmicos. Além disso, podem ser integrados nas instrumentações *lab-made* com certa facilidade. Podem ainda ser encontrados com valores de custo bastante reduzidos, a depender da resolução. Uma *webcam* pode ser adquirida pelo valor de R\$ 25,00, enquanto uma fotomultiplicadora costuma ter um custo de R\$ 2000,00.

Conforme apresentado na seção 1.1.4.2, as instrumentações para realizar medidas de CL costumam ser de alto custo e não são facilmente implementadas em instrumentações do tipo *lab-made*. Considerando estes desafios, neste capítulo, foram realizados estudos preliminares para utilizar uma *webcam* na detecção de CL por imagens digitais, monitoradas continuamente em sistemas miniaturizados.

4.2 Materiais e Métodos

Ainda utilizando a quimiluminescência emitida pelo sistema luminol-hipoclorito, para iniciar os estudos sobre a detecção óptica por imagens digitais, um ensaio foi conduzido para averiguar se seria possível discriminar diferentes concentrações de hipoclorito pelo sistema tricromático RGB, utilizando como detector uma *webcam* comercial. Os estudos foram conduzidos em um sistema de análise por injeção em fluxo convencional em que a célula de detecção foi desenvolvida por fotolitografia com UA. Um programa computacional escrito em linguagem VisualStudios2013 foi desenvolvido para permitir o monitoramento do sinal RGB e visualizar as emissões quimiluminecentes.

4.2.1 Construção das microcélulas de detecção

Foi utilizado o procedimento apresentado na seção 2.2.1. Antes de utilizar um microssistema completo (contendo canais para injeção de amostras, reagentes, bobina reacional e cela de detecção), os estudos foram iniciados com o desenvolvimento de novos protótipos de celas de detecção, para averiguar qual seria o arranjo mais adequado para realizar medidas de quimiluminescência por imagens digitais. Seis configurações de celas de detecção foram desenvolvidas sendo apresentadas na Figura 23.

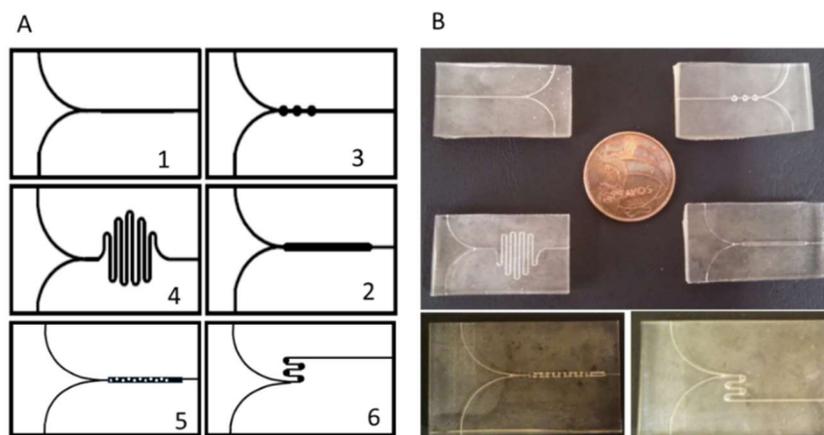


Figura 23: Novas configurações de cela de detecção (A); fotografia das celas confeccionadas (B)

Os quatro primeiros protótipos foram fabricados todos em uma única máscara de impressão e possuem dimensões de 3,1 x 1,6 x 0,5 cm (largura, altura e espessura). Os demais foram fabricados em máscaras distintas e possuem dimensões de 4,5 x 3,0 x 0,5 cm (largura, altura e espessura). Ao longo do texto, as configurações foram referenciadas pela numeração indicada na Figura 23 A. Baseado em imagens obtidas das seções transversais de cada uma das microcélula de detecção com um microscópio USB (Microview 400 x), a capacidade volumétrica de cada microcélula foi estimada. A largura, profundidade e comprimento destes canais estão relacionados na Tabela 6.

Tabela 6: largura, profundidade, comprimento e capacidade volumétrica da CD de cada configuração de microcélula de detecção

Configuração	Canal	Largura (cm)	Profundidade (cm)	Comprimento (cm)	Volume (µL)
Nº 1	CD	0,05	0,02	1,6	1,6
Nº 2	CD	0,08	0,07	1,4	7,84
Nº 3	CD	0,15	0,08	0,3	3,6
Nº 4	CD	0,04	0,05	4,4	8,8
Nº 5	CD	0,2	0,07	1,6	22,4
Nº 6	CD	0,17	0,1	0,4	6,8

A cela de detecção quimiluminescente utilizada nos capítulos 2 e 3 (seção 2.2.2 e 3.2.2) possuía regiões curvas (formato de serpentina), com o intuito de melhorar a mistura dos reagentes e proporcionar uma maior área para se realizar a detecção. Entretanto, testes de bancada mostraram que a presença de bolhas em qualquer porção do canal, afetam a quimiluminescência por toda a sua extensão. Dessa forma, as novas configurações foram desenvolvidas com propósitos específicos: o objetivo da configuração nº1 foi observar o comportamento da quimiluminescência utilizando um caminho simples e retilíneo onde o fluxo de reagentes não sofresse desvios. Já a configuração nº 2 teve por objetivo avaliar se um aumento no diâmetro do canal, o que leva a uma maior área para observação do sinal,

poderia potencializar as medidas. Na configuração nº 3 pequenos reservatórios circulares foram adicionados com o objetivo de favorecer a mistura dos reagentes à medida que o fluxo impellido preenchesse os mesmos, e, também criar uma área pequena que detivesse um volume maior de solução em seu interior (volume maior do que o presente no interior do canal retilíneo apresentado na configuração nº 1) tornando-a mais propícia para a detecção. A configuração nº 4 corresponde à mesma que fora utilizada nas determinações com a mini-fotomultiplicadora.

Na configuração nº 5, após o ponto de confluência dos reagentes (hipoclorito e luminol), foram inseridos alguns anteparos no formato de pequenos cilindros dispostos em “zig zag”. O objetivo era criar um percurso que proporcionasse um aumento de turbulência no fluxo das soluções, e assim favorecesse a eficiência da mistura. Após o percurso com anteparos, uma pequena área foi deixada propositalmente sem anteparos, para que a detecção pudesse ser feita sobre esta área. Já na configuração nº 6, após a confluência dos reagentes, o fluxo segue tangencialmente em quatro reservatório circulares separados por um pequeno segmento retilíneo. Esta última alternativa teve por objetivo favorecer a formação de zonas com diferenças de pressão entre os reservatórios circulares, para que o fluxo de reagentes preenchesse todo o reservatório e, além de favorecer a mistura dos reagentes, proporcionasse uma maior área para realizar a detecção.

4.2.2 Aparatos

Para realizar a detecção por imagens digitais empregou-se uma *webcam* comercial (Multilaser) adaptada a uma caixa de madeira de pequenas dimensões (14,5 x 12,0 x 4,0 cm). Na parte superior da caixa, um acesso circular com 1,8 cm de diâmetro foi confeccionado para encaixar a *webcam* em um suporte de etnil vinil acetato (E.V.A) com espessura de 0,5 cm o qual manteve a câmera fixa por pressão. Este suporte foi afixado com auxílio de fita dupla face e a montagem utilizada está mostrada na Figura 24. As células de detecção foram acondicionadas no interior da caixa, e nesta foram adaptados pequenos acessos nas laterais para a conexão com os demais aparatos por meio de tubos Tygon®. A caixa já contendo estas adaptações e um modelo de célula de detecção está mostrada na Figura 24 D.

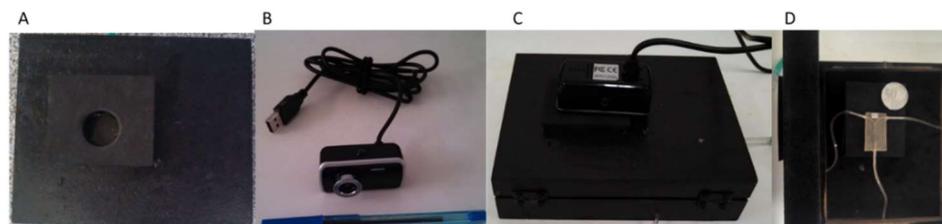


Figura 24: Caixa de madeira de pequenas dimensões com suporte em EVA acoplado(A); *webcam* adquirida (B); Conjunto contendo a câmera e a caixa (C). Modelo de cela de detecção acondicionado na caixa e conectado ao mundo externo por tubos Tygon®(D).

As células de detecção fabricadas foram conectadas a um injetor proporcional para injeção de volumes de amostra da ordem de 100 μ L. Uma bomba peristáltica (Ismatec-Reglo Analog) foi utilizada para o bombeamento das soluções de trabalho. A Figura 25 ilustra o diagrama de fluxo utilizado na estratégia abordada neste capítulo, e a Figura 26 mostra uma fotografia do sistema montado.

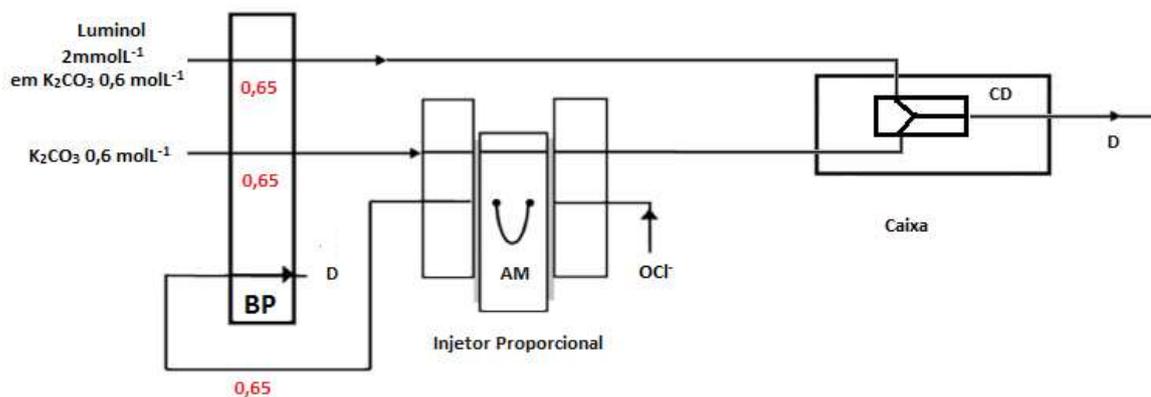


Figura 25: Diagrama de fluxo para FIA convencional. Configuração na posição “amostragem”. (Legenda: BP – Bomba Peristáltica; CD – Célula de Detecção; AM – Alça de amostragem para injeção de OCl^- ; D – Descarte. Vazões indicadas na figura em mL min^{-1}).

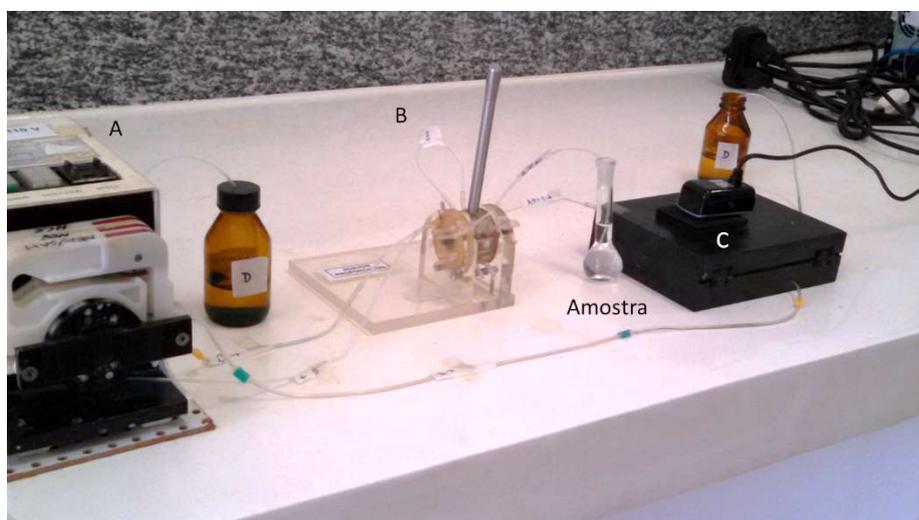


Figura 26: Fotografia da montagem do sistema FIA convencional, contendo uma bomba peristáltica (A), o injetor proporcional (B) e a caixa contendo a cela de detecção (C).

Para realizar a aquisição de dados envolvendo imagens digitais, um programa escrito em linguagem VisualStudio 2013 foi desenvolvido para captar as emissões e para que o monitoramento do sinal RGB pudesse ser realizado continuamente. O programa permitiu ligar ou desligar a *webcam*, visualizar o sinal analítico e selecionar em qual região da imagem os dados seriam coletados. Vale destacar que foi permitido ao usuário aumentar ou diminuir a largura e altura da região de aquisição da imagem. Uma vez selecionada a região de aquisição, pode-se começar a coletar os valores de RGB. Uma imagem mostrando a interface do programa desenvolvido está mostrada na Figura 27.



Figura 27: Interface gráfica que permitiu a visualização dos dados adquiridos em tempo real. Na imagem, um amostrador foi posicionado horizontalmente sobre a imagem da emissão quimiluminescente e o sinal obtido registrado no gráfico que é exibido na interface. Detalhe em laranja mostra o local onde o amostrador foi posicionado.

4.2.3 Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas com água purificada por osmose reversa e com reagentes possuindo, ao menos, 99 % de pureza. Para as soluções em que esta condição não foi obedecida, a descrição específica foi realizada ao longo do texto.

4.2.3.1 Soluções Estoque

A solução estoque de NaOCl foi preparada conforme apresentado na seção 3.2.3.1.

4.2.3.2 Soluções de trabalho

A partir de uma solução comercial de NaOCl (teor (m/v)2,0-2,5%), foi preparada uma solução de NaOCl na concentração de 1000 mg L⁻¹, pela diluição do volume adequado da solução estoque em água. Para a construção de uma curva analítica para discriminar diferentes concentrações de íon hipoclorito, cinco soluções padrão nas concentrações de 102,9 mg L⁻¹ a 247,3 mg L⁻¹ foram preparadas diluindo-se alíquotas da solução estoque de NaOCl em água. As demais soluções foram preparadas de acordo com a seção 2.2.3.2.

4.2.4 Procedimento de análise

O diagrama de fluxo utilizado para a determinação de hipoclorito abordada neste capítulo está representado na Figura 27, o qual mostra a disposição da bomba peristáltica (BP) e do injetor proporcional na posição “amostragem”. Antes de iniciar uma aquisição de dados, o programa solicita o local de armazenamento dos dados e o operador seleciona a região da imagem na qual estes serão coletados, delimitando as dimensões da região de aquisição. O procedimento para as medidas foi descrito em duas etapas: amostragem e injeção.

Amostragem: o injetor encontrava-se na posição “amostragem” (Figura 25). Nesta posição, A solução de amostra era aspirada preenchendo a alça de amostragem do injetor com cerca de 100 μL da solução de OCI^- . A vazão da solução era de $0,65 \text{ mL min}^{-1}$

Injeção: a alavanca do injetor foi modificada para a posição “injeção”. Nessa posição, o fluxo do carregador impeliu a solução de amostra (contendo hipoclorito) presente na alça de amostragem para o microdispositivo, e em seu interior, onde confluiu com o luminol. A vazão das soluções permaneceu a mesma.

É importante destacar que, nestes estudos preliminares, o sinal analítico era monitorado constantemente, tanto durante a amostragem quanto no procedimento de injeção, em intervalos de aproximadamente 1 s.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Testes iniciais para avaliação de configuração de célula de detecção.

Utilizando a solução hipoclorito na concentração de 1000 mg L^{-1} , foram obtidos vídeos da emissão quimiluminescente em cada uma das configurações de microcélula desenvolvidas. A solução foi bombeada continuamente para a obtenção dos vídeos. As intensidades das componentes R, G e B foram monitoradas em tempo real e os sinais analíticos referentes às três componentes foram avaliados com relação ao perfil apresentado, sendo considerados os fatores estabilidade do sinal e a sua intensidade. A Figura 28 exibe fotografias tiradas da emissão em cada cela de detecção e, para fins comparativos, todas as imagens foram obtidas utilizando-se a mesma solução diluída de hipoclorito de sódio. A diluição da solução comercial de OCI^- foi realizada de forma a se obter um sinal intenso, de forma que pudessem ser observados, por meio da interface desenvolvida, o fluxo das soluções dentro das celas confeccionadas, e eventuais perturbações, como o aparecimento de bolhas, para uma avaliação qualitativa. A partir dos vídeos analisados, foi possível concluir que para realizar a detecção da CL, seriam necessários valores mais elevados de vazão, para que o sinal analítico registrado não apresentasse flutuações muito proeminentes. Para este estudo, não foram realizadas otimizações.

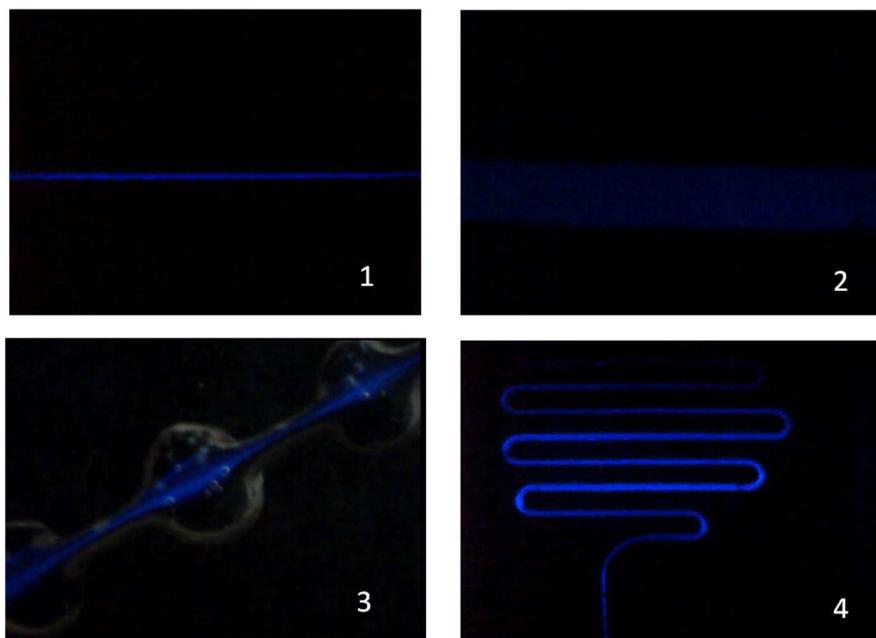


Figura 28: Fotografia do sinal quimiluminescente em cada uma das conformações:

Inicialmente foi realizada uma avaliação visual dos vídeos, observando a distribuição da luminescência no interior dos canais decorrente das diferentes configurações das celas de detecção. Para as configurações nº 1 e nº 4, com canais mais estreitos, foi observado que eventuais bolhas que surgiam nos canais comprometiam grandemente a intensidade de luminescência em determinados pontos, o que poderia inviabilizar a realização de medidas quantitativas. De fato, para estes casos, o amostrador para a leitura RGB deveria ser posicionado de forma a abranger a maior extensão possível de um microcanal e, desta região, obter o valor médio de RGB para os pixels selecionados. Entretanto, observou-se que, em decorrência das bolhas, a luminescência em quase toda a extensão amostrada era comprometida, desfavorecendo a repetibilidade do sinal a ser adquirido. Vale ressaltar que a utilização de uma área maior para realizar a detecção resultaria na aquisição de dados em regiões onde não havia sinal analítico (fundo preto) o que proporciona uma diminuição na intensidade do sinal analítico.

Com relação à configuração nº 2, com canal mais largo, foi observada uma diminuição da intensidade da luminescência em relação às configurações nº 1 e nº 4, o que pode ter sido consequência de uma maior diluição das soluções no canal da célula de detecção. Já para a configuração nº 3, o efeito desejado de acumular um volume maior de mistura para se obter uma área maior para detecção não foi observado. De fato, como mostra a Fotografia 3 da Figura 28, o fluxo luminescente da mistura se concentrou no centro do canal e apenas se espalhou para a região circular do reservatório quando houve a interrupção do bombeamento, o que favorecia a difusão dos reagentes.

Destas observações, pôde-se concluir que nenhuma das configurações inicialmente propostas poderia levar a resultados quantitativos adequados principalmente no que se refere à intensidade de luminescência e a repetibilidade dos procedimentos. Baseado nestes resultados, as configurações nº 5 e nº 6 foram desenvolvidas, com o objetivo de aumentar a eficiência da mistura das soluções e obter um

sinal analítico mais estável e intenso. As novas configurações desenvolvidas foram apresentadas na Figura 23 e imagens captadas da quimiluminescência são mostradas na Figura 29.

Analisando os vídeos obtidos para a configuração nº 5, observou-se um acréscimo na intensidade de luminescência e também uma maior estabilidade da imagem, o que possivelmente foi alcançado por uma turbulência no fluxo provocada pelos anteparos que aumentou a mistura entre os reagentes utilizados. Para a configuração nº 6, os vídeos mostraram que o fluxo luminescente preenche agora a região semi-circular do reservatório gravado no dispositivo, demonstrando também uma melhor mistura dos reagentes em relação às configurações testadas anteriormente (1-4).

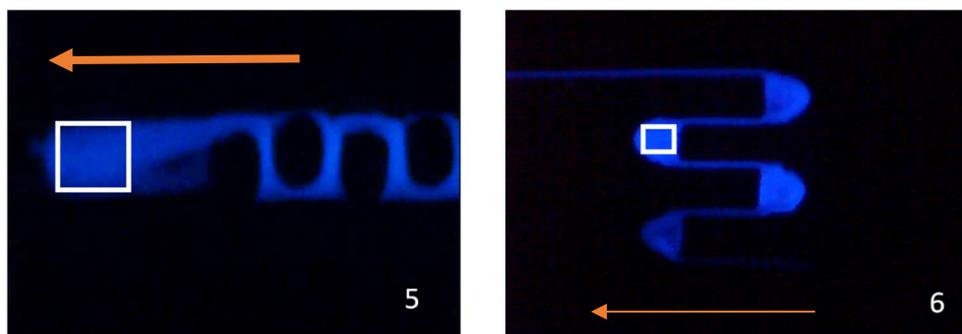


Figura 29: Imagem da quimiluminescência nas conformações nº 5 e nº 6. Detalhes em branco indicam a posição onde o amostrador foi posicionado. Detalhes em laranja indicam o sentido de fluxo das soluções.

Para uma avaliação mais criteriosa do desempenho das células apresentadas na Figura 23, nº 5 e 6, foi realizado o monitoramento do sinal RGB produzido quando da injeção da solução de hipoclorito concentrada utilizada para a obtenção dos vídeos destacados anteriormente. Para estas medidas, a região de aquisição foi posicionada conforme mostrado na Figura 29, ao final da célula para a configuração nº 5 e no terceiro reservatório após a confluência para a configuração nº 6.

Os perfis de sinal analítico transiente para as novas configurações estão mostrados na Figura 30. Em ambos os casos foi observado um perfil de sinal analítico condizente com o de uma técnica de campo escuro, onde as intensidades das componentes partem de valores muito próximos de zero, além de que apresentaram sinais analíticos bastante estáveis na linha de base para todas as componentes e com boa repetitividade (coeficientes de variação menores que 3%). Observou-se, entretanto, que a configuração nº 6 proporcionou um maior sinal analítico para a mesma concentração, o que poderia ser atribuído à própria configuração diferenciada da cela, mas também pode estar relacionada ao posicionamento da *webcam* em relação à cela de detecção. Outra constatação importante com relação ao resultado mostrado na Figura 29 para a configuração nº 6, foi que o sinal para a componente B do sistema RGB se aproximou muito do valor de saturação (255), provavelmente devido ao uso de uma concentração elevada de OCl^- , de modo que concentrações menores desta espécie poderiam ser detectadas com o sistema de imagem, o que foi realizado nos estudos mostrados a seguir.

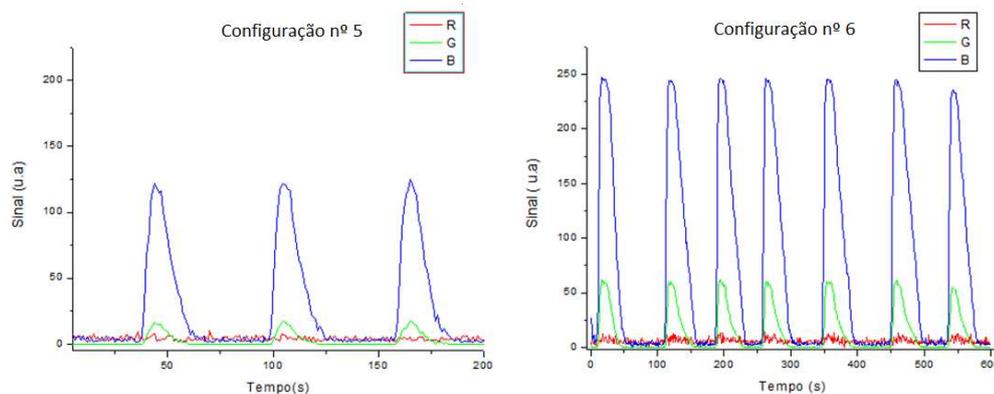


Figura 30: Perfil de sinal analítico para as configurações nº 5 e nº 6. CV 1,40% e 1,44 %, respectivamente.

4.3.2 Estudos para discriminação de diferentes concentrações de íon hipoclorito por imagens digitais.

Utilizando o diagrama de fluxo apresentado na Figura 27, para as conformações nº 5 e 6, foram injetadas soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 102,9 a 257,3 mg L⁻¹, as quais foram cerca de 10 vezes menores que a concentração utilizada durante a avaliação qualitativa das celas de detecção. O diagrama obtido para as injeções dos padrões de hipoclorito utilizando a configuração nº 5 está apresentado na Figura 31, onde foi possível verificar que o sinal da linha de base para todas as componentes se aproximou muito do valor “zero” e se manteve estável durante as medidas. Foi possível verificar também uma boa razão sinal/ruído para a componente B e que à medida que a concentração de íon hipoclorito diminui, a intensidade máxima das componentes azul e verde também decrescem. Em contrapartida, a intensidade da componente vermelha, não apresentou mudanças em sua intensidade, o que condiz com o espectro de emissão de quimiluminescente do sistema luminol-hipoclorito [52], apresentado na Figura 32.

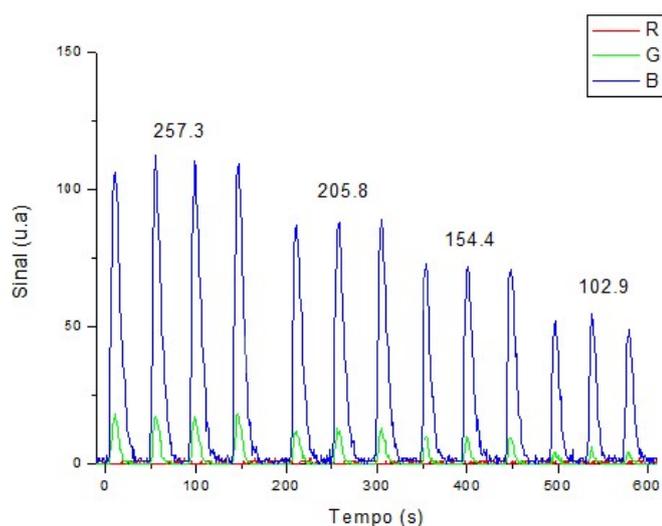


Figura 31: Diagrama obtido com a configuração nº 5 para discriminação de diferentes concentrações de íon hipoclorito. Concentrações indicadas em mg L⁻¹ de OCl⁻

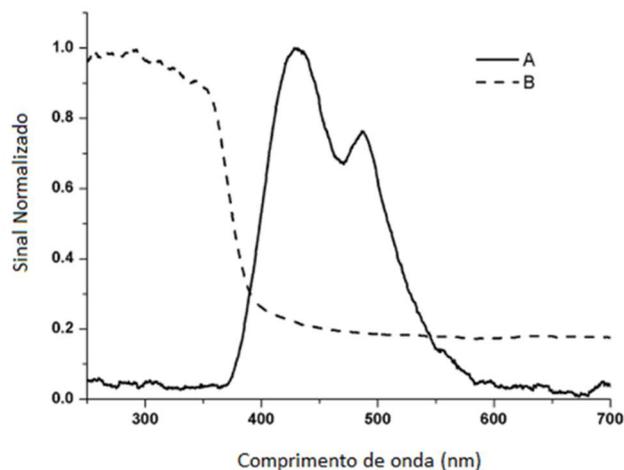


Figura 32: Espectro de emissão do sistema Luminol hipoclorito (A) espectro de absorção do microsistema (B) Ref [52]

Do diagrama representado na Figura 31, foram obtidos os valores de alturas dos picos proporcionais à concentração de hipoclorito pelo monitoramento da componente azul, devido ao fato desta apresentar a melhor razão sinal/ruído. Os sinais estimados foram utilizados para a construção da curva analítica representada na Figura 33, a qual apresentou uma boa correlação linear ($R^2 = 0,993$) e uma sensibilidade de 0,37 unidades de sinal/mg L^{-1} . As pequenas barras de erros relacionadas aos pontos apresentados na curva analítica indicaram também uma boa repetitividade das medidas. Para as três injeções do padrão com 102,9 mg L^{-1} , que apresenta o maior desvio de resíduos em relação a curva traçada, obteve-se um coeficiente de variação do sinal 3,22%.

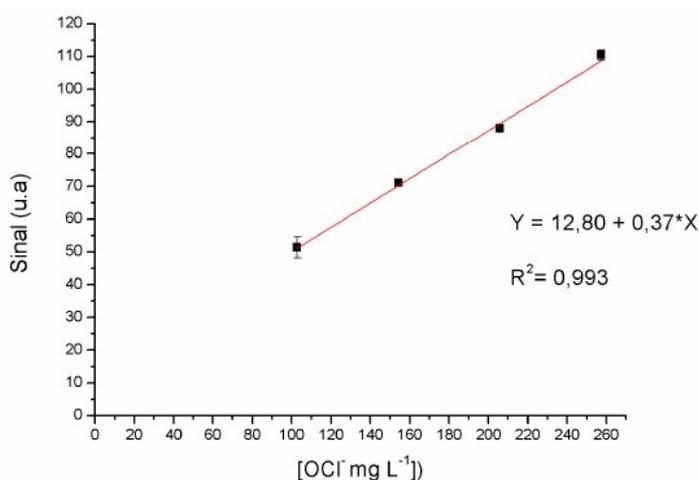


Figura 33: Curva analítica obtida com a intensidade da componente azul para a configuração nº 5. Faixa de trabalho de 102,9 – 257,3 mg L^{-1} de OCI^{-} .

É possível observar que o intercepto em “y” não passa pela origem, indicando que a região linear da curva não se estende para concentrações menores. De fato, ao estudar o comportamento de uma solução com 51,45 mg L^{-1} , foi observada uma distorção proeminente da linearidade, corroborando para a hipótese da não linearidade do sistema para concentrações menores.

A aquisição de dados para a configuração nº 6 foi realizada da mesma forma do que para a nº5. Novamente, a intensidade de sinal proporcional a concentração de hipoclorito foi obtida pela componente azul. O fiograma obtido para as concentrações de 102,9- 257,3 mg L⁻¹ está apresentado na Figura 34.

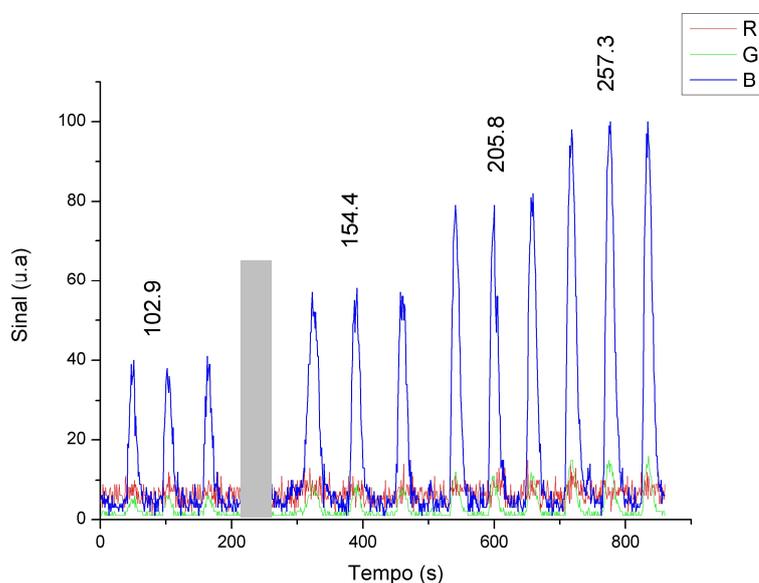


Figura 34: Fiograma obtido com a configuração nº 6 para a discriminação de OCl⁻¹. Concentrações indicadas em mg L⁻¹ de OCl⁻¹,

Foi possível observar que para esta configuração, o sinal das componentes RGB se apresentaram mais ruidosos e que, novamente, a componente B apresenta a melhor razão sinal/ruído. Os valores de intensidade de sinal foram obtidos subtraindo-se o valor da linha de base do valor de intensidade máxima do pico. Com os valores assim obtidos, uma curva analítica foi construída e esta foi apresentada na Figura 35.

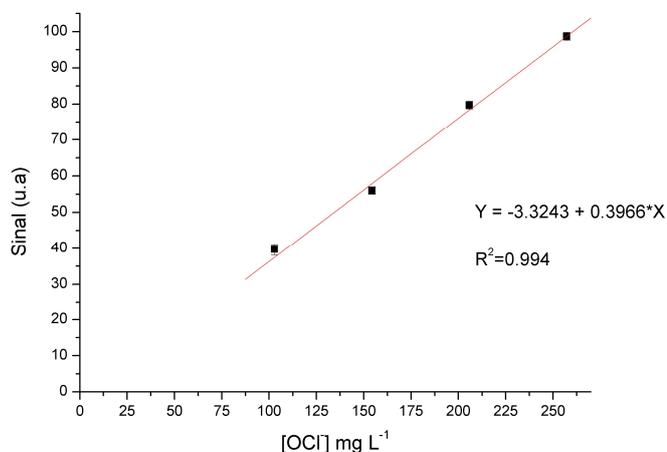


Figura 35: Curva analítica obtida com os dados obtidos pela intensidade da componente azul e utilizando a configuração nº 6.

Novamente, a curva analítica obtida apresenta uma boa linearidade (0,994), e uma sensibilidade de 0,39 unidades de sinal/mg L⁻¹. Ainda pode ser observado que o intercepto não passa pela origem, mas nesta curva o valor em “y” se aproximou mais de “zero” e o erro estimado para o cálculo do coeficiente linear no valor de 2,15. Pode-se ressaltar que as barras de erro são pequenas, indicando uma repetitividade satisfatória. O CV foi calculado para o padrão de 154,4 mg L⁻¹, padrão que possui o maior desvio em relação a curva analítica, e o valor obtido foi de 1,78 %.

É importante destacar que os estudos realizados nesta seção mostraram que a detecção com a *webcam* permitiu a obtenção de sinal analítico para concentrações de hipoclorito similares às aquelas utilizadas na seção 3.3, indicando um potencial para a realização da determinação de paracetamol empregando uma estratégia de detecção mais simples e de menor custo. Sendo que ambas as microcélulas apresentaram desempenhos adequados, ambas poderiam ser utilizadas para realizar esta determinação. Entretanto a configuração n° 6 apresenta um *layout* que possibilita ao operador escolher outras regiões de aquisição de dados, caso uma delas apresente complicações. Sendo assim, esta foi selecionada para continuar os estudos.

4.4 Conclusões parciais e perspectivas

Com os dados obtidos foi possível verificar que os microdispositivos se apresentam como boa alternativa para realizar determinações quimiluminescentes. Diferentes concentrações de íon hipoclorito puderam ser discriminadas, o que sugere que a alternativa proposta está apta para realizar a determinação de paracetamol por quimiluminescência utilizando imagens digitais produzidas por uma *webcam*. Os testes preliminares mostraram boa linearidade para as duas configurações (0,993) e (0,994) e boa repetibilidade (CV = 3,22%) e (CV = 1,78 %) para as configurações n° 5 e n° 6 respectivamente. Uma vantagem apreciável para se realizar estas detecções está em sua instrumentação consideravelmente menos dispendiosa, uma vez que a mini fotomultiplicadora tem um custo de aproximadamente R\$ 2000,00 enquanto a *webcam* utilizada, apenas R\$ 25,00. Outra vantagem considerável em se utilizar as imagens digitais está na possibilidade de visualizar o sistema dinâmico e realizar o seu monitoramento continuamente, o que permitiu a visualização de perturbações como bolhas, as quais interferem no sinal analítico, fato que não era possível de ser discriminado na estratégia que utilizava a fotomultiplicadora.

Partindo destes resultados preliminares, deseja-se realizar a determinação de paracetamol em medicamentos utilizando a detecção por imagens digitais em um microsistema fluídico automatizado. Dessa forma, pretende-se obter um sistema de detecção de baixo custo, e com o potencial de oferecer resultados com boa linearidade, boa precisão e exatidão, combinando os benefícios oferecidos pela análise por injeção em fluxo com a praticidade dos microdispositivos.

Capítulo 5- Determinação de paracetamol em amostras farmacêutica por quimiluminescência e imagens digitais empregando o conceito de zona de mistura

5.1 Introdução

Na aplicação apresentada no capítulo 3, ao empregar a multicomutação, foi possível realizar a reação entre o paracetamol e o íon hipoclorito em linha. Entretanto, devido ao diminuto diâmetro dos canais (400 μm), a interface de contato entre as soluções (padrão/amostra) de paracetamol e o oxidante hipoclorito era bastante reduzida, o que poderia prejudicar a eficiência da mistura dos reagentes. Estes fatores poderiam ser considerados como contribuintes para o desvio do comportamento linear apresentado por soluções padrão de concentrações acima de 5 mg L^{-1} , e baixo de 1 mg.L^{-1} , assim como pela estreita faixa linear utilizada.

Com o objetivo de proporcionar uma maior área de contato entre as soluções, e assim melhorar a eficiência de mistura, neste capítulo foi abordada a aplicação do conceito de “zona de mistura” (*merging zone*) a qual consiste na injeção concomitante, tanto do agente oxidante quanto do redutor, de forma que os volumes injetados sejam dispostos paralelamente (um em relação ao outro) em um segmento formado por ambos. Este segmento foi então inserido em um fluxo carregador, conforme está representado na Figura 36.

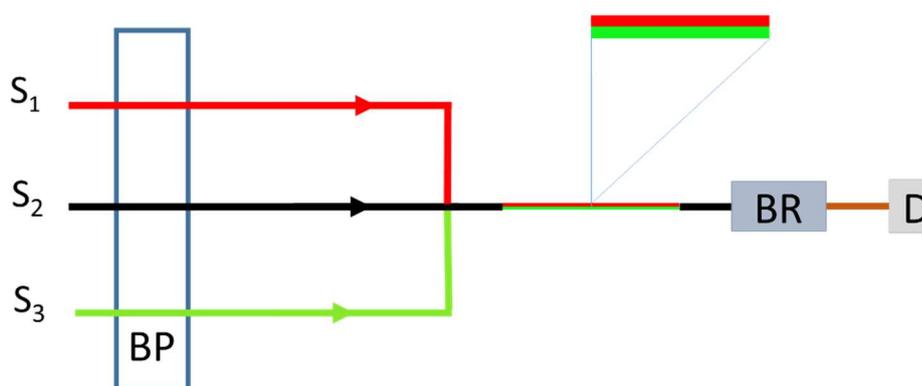


Figura 36: Representação do segmento formado pela injeção concomitante de ambos os reagentes para formar uma zona de mistura.

5.2 Materiais e Métodos

Combinando a automação no sistema de injeção dos reagentes com os benefícios obtidos pelo monitoramento contínuo proporcionado pela detecção óptica por imagens digitais, neste capítulo, foi avaliada a determinação do fármaco paracetamol em microsistemas fluídicos, utilizando a estratégia de zonas de mistura. O segmento formado pelos reagentes paracetamol e hipoclorito (conforme a Figura 36) foi inserido em um fluxo carregador, sendo a reação apresentada na Figura 4 realizada em linha. Para detectar a quimiluminescência do sistema luminol-hipoclorito uma *webcam* comercial foi utilizada.

5.2.1 Construção do microdispositivo

Para aplicar o conceito de zona de mistura, um novo *layout* foi desenvolvido, combinando o arranjo de canais para injeção de reagentes apresentado na Figura 16 com a cela de detecção apresentada na Figura 22, configuração nº 6, a qual apresentou um melhor desempenho nas detecções por imagens digitais (seção 4.3). A Figura 37 mostra o protótipo desenvolvido e também uma fotografia do dispositivo já confeccionado. A construção do dispositivo deu-se empregando o procedimento descrito na seção 2.2.1. A bobina reacional apresenta uma capacidade volumétrica de 80 μL e a célula de detecção de 9 μL . Estes valores foram estimados baseados nas imagens das seções transversais dos referidos canais com um microscópio USB (Microview 400 x)

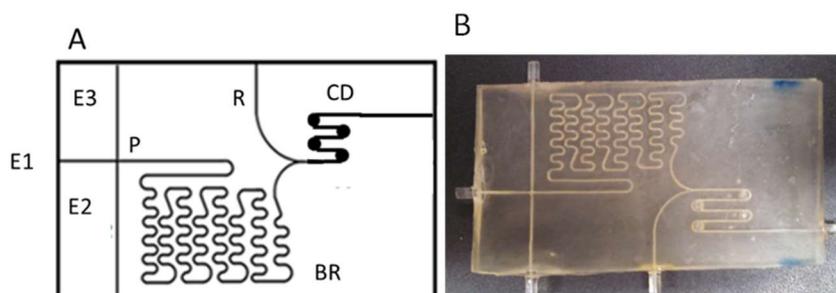


Figura 37: Protótipo desenvolvido (A) e fotografia do dispositivo. (B). E1, E2, E3 e R são canais para injeção de soluções, (BR) a bobina reacional, CD a cela de detecção.

5.2.2 Aparatos

Para realizar os estudos propostos, o microdispositivo foi acomodado no interior da caixa descrita na seção 4.2.2 e conectado a um conjunto de válvulas solenóides de três vias Cole Parmer, 01540-11 para direcionamento dos fluidos. Uma bomba peristáltica (Ismatec-IPC) foi empregada para bombeamento das soluções de trabalho e como detector, foi utilizada uma *webcam* comercial (Multilaser), a qual foi fixada por pressão no orifício superior da caixa, conforme mostra a Figura 38 D. Uma visão geral do sistema utilizado está apresentada na Figura 39.

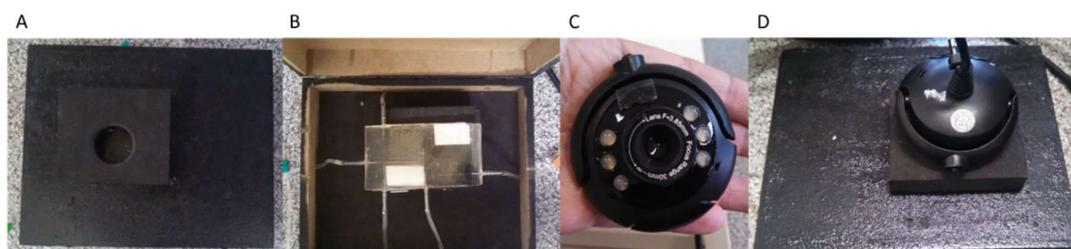


Figura 38: (A) caixa adaptada para realização das medidas de quimiluminescência com suporte em EVA com espessura de 0,5 cm para fixar o detector. (B) microssistema acondicionado no interior, fixado com auxílio de fita dupla face. (C) *webcam* utilizada para realizar as medidas; (D) *webcam* adaptada à caixa confeccionada.

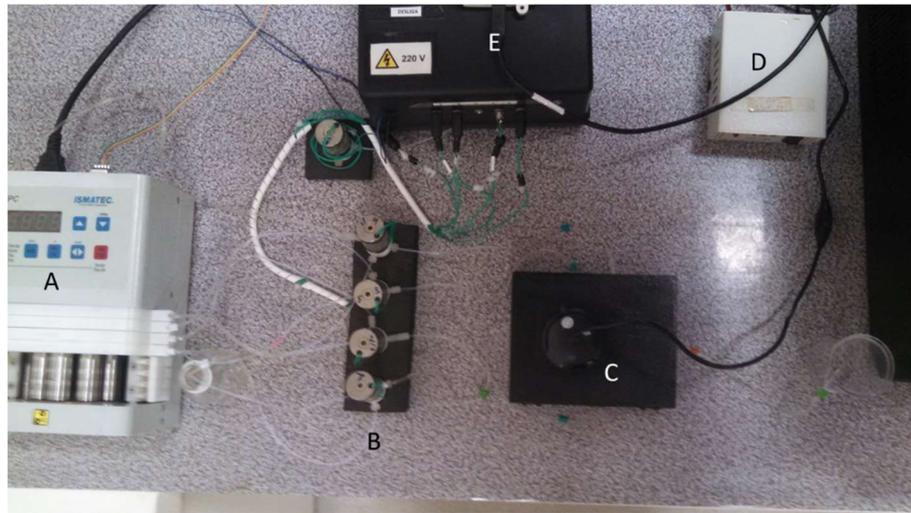


Figura 39: Disposição dos equipamentos utilizados (A) Bomba peristáltica; (B) Válvula solenoides; (C) Caixa adaptada que acomoda o microsistema; (D) Fonte elétrica que alimenta as válvulas; (E) Interface de comunicação com as válvulas solenoides.

Para realizar a aquisição e salvamento dos dados, o programa escrito em linguagem VisualStudio 2013 descrito na seção 4.2.2 sofreu alterações. Além de exercer as funções anteriores, dois novos delimitadores para selecionar regiões de aquisição da imagem foram adicionados à interface, para que fosse possível realizar o monitoramento de até três regiões da imagem. Vale destacar que a interface permite alterar a posição de cada uma das regiões de aquisição bem como modificar suas dimensões (número de *pixels*) para se adequar as necessidades do usuário. A Figura 40 mostra uma imagem da interface gráfica do programa utilizado

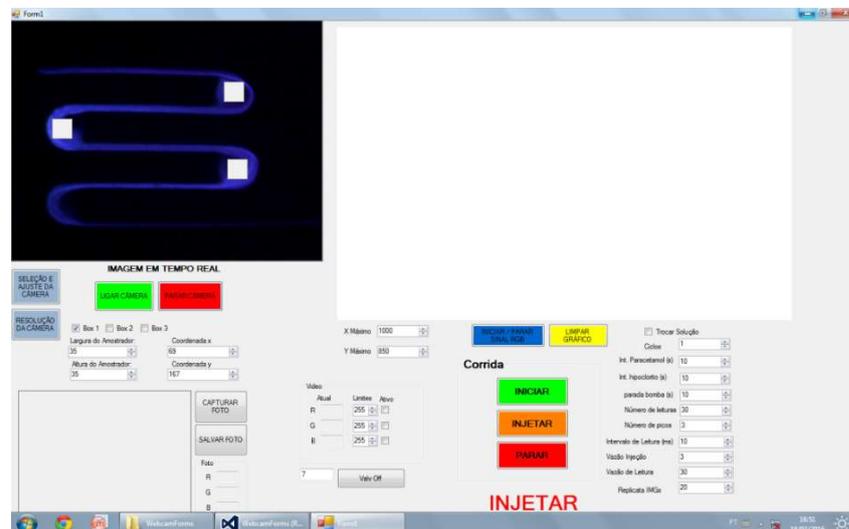


Figura 40: Interface gráfica do programa escrito em linguagem VisualStudio. Na imagem do programa, marcações em branco consistem nas três regiões de aquisição de dados.

5.2.3 Reagentes e Soluções

A maioria das soluções foi preparada com água purificada por osmose reversa e com reagentes possuindo, ao menos, 99 % de pureza. Para as soluções em que esta condição não foi obedecida, a descrição específica foi realizada ao longo do texto.

5.2.3.1 Soluções estoque

A partir de uma solução P.A de NaOCl (4-6% (m/v), Vetec) foi preparada uma solução estoque de NaOCl na concentração 2000 mg L⁻¹, diluindo-se o volume apropriado do reagente grau analítico em água.. Para o preparo de uma solução estoque de paracetamol na concentração 1000 mg L⁻¹, a massa apropriada do reagente (Sigma Aldrich) foi solubilizada em solução 1% (v/v) de etanol (J. T Baker).

5.2.3.2 Soluções de trabalho

Uma solução tampão carbonato na concentração 0,1 mol L⁻¹ e pH 11 foi preparada pela dissolução da massa apropriada de K₂CO₃ (Carlos Erba, 100%) em água seguido do ajuste do pH com pequenas adições de solução de HCl 1,0 mol L⁻¹. Uma solução de luminol (3-aminofthalohidrazida-com concentração de 2 mmol L⁻¹, foi preparada pela dissolução da massa adequada do reagente (Acros, pureza de 98%) em solução tampão carbonato 0,1 mol L⁻¹, pH 11,0. A solubilização do sal foi acelerada com auxílio de banho ultrassônico por 5 minutos.

As soluções de hipoclorito nas concentrações de 126,3 mg L⁻¹, 252,5 mg L⁻¹, 378,8 mg L⁻¹, 505 mg L⁻¹, foram preparadas pela diluição do volume adequado da solução estoque em água e uma curva analítica para a determinação da concentração de paracetamol foi construída com cinco soluções padrão (100,0-500,0 mg L⁻¹), os quais foram preparados pela diluição apropriada da solução estoque de paracetamol em água.

5.2.3.3 Preparo de amostra

As amostras foram preparadas conforme o apresentado na seção 3.2.3.3. Entretanto, foram utilizadas apenas seis amostras comerciais, diferentes das utilizadas na referida seção. A Tabela 7 relaciona a forma como a amostra é comercializada e a dosagem especificada no rótulo.

Tabela 7: Forma na qual a mostra se encontra e quantidade de princípio ativo discriminada nos rótulos.

Amostra	Forma comercializada	Dosagem (unidade)
AM1	Comprimido	750 mg
AM2	Comprimido	750 mg
AM3	Comprimido	750 mg
AM4	Comprimido	500 mg
AM5	Solução oral	200 mg
AM6	Solução oral	200 mg

5.2.4 Procedimento automatizado de análise

O diagrama de fluxo utilizado na determinação abordada neste capítulo foi o mesmo utilizado na seção 3.2.5 representado na Figura 18 o qual mostra a disposição da bomba peristáltica (BP) e das quatro válvulas solenóides (V1-V4) necessárias à realização do procedimento, em seu estado desligado. Para a abordagem explorada neste capítulo, a etapa de amostragem sofreu alterações, e assim, para um melhor entendimento, o procedimento de análise foi descrito a seguir em três etapas: Início, Amostragem e Aquisição.

Início: todas as válvulas estavam desativadas (Figura 18). Nestas condições, o fluxo do carregador foi direcionado por V1 para o interior do microsistema. Esse fluxo percorre a linha de fluxo perpendicular à confluência, a bobina de reação e a cela de detecção, condicionando os canais para a passagem dos reagentes. O fluxo de luminol foi direcionado para o interior do microsistema para que possíveis bolhas presentes nos canais fossem removidas. Não há aquisição de dados nesta etapa.

Amostragem: durante a amostragem, a vazão de injeção foi de $0,15 \text{ mL min}^{-1}$. Concomitantemente, todas as válvulas foram ativadas durante 10 segundos. Assim, os fluxos dos padrões de paracetamol e de hipoclorito foram direcionados concomitantemente para o interior do microsistema, injetando cerca de $24 \mu\text{L}$ de cada solução. Adicionalmente, os fluxos do carregador e o de luminol foram direcionados para os recipientes de origem, possibilitando a economia destes reagentes. Em seguida, todas as válvulas foram desativadas. A Figura 41 ilustra a disposição dos fluidos no interior do canal após o procedimento de amostragem.

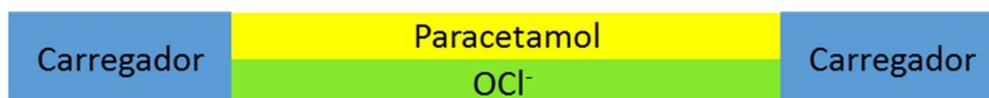


Figura 41: Formação da zona de mistura entre os reagentes após a injeção das soluções.

Aquisição: Durante a etapa de aquisição, a vazão da BP foi alterada via *software* para $1,46 \text{ mL min}^{-1}$. Nesta etapa, todas as válvulas são desativadas, desviando os fluxos das soluções de hipoclorito e paracetamol para seus descartes e os fluxos de luminol e carregador para o interior do microdispositivo. O segmento formado pelos reagentes hipoclorito e paracetamol foi impelido através da bobina reacional pelo fluxo carregador de carregador. Semelhantemente ao descrito na seção 3.2.5, na bobina, o paracetamol reage com o hipoclorito diminuindo a concentração deste último segundo a equação apresentada na Figura 4. Imediatamente antes da célula de detecção (CD), o fluxo confluiu com o reagente luminol, para que houvesse a quimiluminescência e ocorresse a detecção do sinal transiente. Para cada padrão, foram feitas três replicatas. O procedimento de troca de solução consistiu em parar a BP, trocar o recipiente contendo a solução padrão de paracetamol, mantendo-se o de hipoclorito. A BP foi ativada e três injeções do novo padrão foram realizadas com a mesma vazão utilizada durante a aquisição de dados, sem entretanto, coletá-los.

5.2.4.1 Otimizações univariadas.

Nesta aplicação, os reagentes paracetamol e hipoclorito foram injetados concomitantemente para que houvesse um aumento da área de contato entre as soluções. Para obter este efeito, é importante que os volumes dos reagentes injetados sejam controlados com precisão. Contudo, ao empregar as válvulas solenoides, é possível que a precisão dos volumes injetados não seja adequada se o tempo de abertura da via da válvula for muito pequeno. Dessa forma, foi considerado que a via da válvula solenoide deveria ficar aberta (para a injeção das soluções) por no mínimo 5 s. Esta consideração tem efeito sobre o valor de vazão utilizada para injetar os reagentes, o uso de vazões elevadas durante a injeção poderia causar o preenchimento de toda a extensão dos microcanais. Para evitar que esse efeito ocorresse, a vazão de injeção foi modificada sendo fixada no valor de $0,15 \text{ mL min}^{-1}$. Para estabelecer qual valor de vazão seria adequado para realizar as medidas, um teste univariado foi conduzido, o qual foi descrito a seguir. Para a realização das otimizações, foram utilizadas soluções de hipoclorito com concentração de 500 mg L^{-1} e de paracetamol 200 mg L^{-1} .

Utilizando a configuração de fluxo apresentada na Figura 18 e empregando os procedimentos automatizados de análise, foram fixados na interface do programa desenvolvido, os parâmetros vazão de injeção como sendo de $0,15 \text{ mL min}^{-1}$, o volume de cada reagente a ser injetado como sendo de $24 \mu\text{L}$, e uma espera de 10 segundos de parada de fluxo, após a injeção, para favorecer a difusão das soluções. Uma vez ajustado um valor de vazão de leitura na interface do programa, foram realizadas três injeções da solução do “branco” seguidas de três injeções contendo solução padrão de paracetamol. Então, outro valor de vazão era ajustado na interface e as injeções de solução do branco e de padrão de paracetamol eram realizadas novamente. A vazão de leitura foi avaliada no intervalo de $0,5- 2,0 \text{ mL min}^{-1}$ e os critérios utilizados para selecionar qual condição apresentou um desempenho otimizado foram baseados na intensidade do sinal, razão sinal/ruído, coeficiente de variação do sinal e porcentagem de atenuação da quimiluminescência para cada conjunto (branco e injeção de paracetamol). Dessa forma, um valor de vazão de leitura foi selecionado e utilizado nas otimizações seguintes.

Prosseguindo com as otimizações, o próximo fator otimizado foi o volume de reagente a ser injetado. Este fator está relacionado com a superfície de contato entre os reagentes e para realizar sua otimização foram fixados os parâmetros, vazão de injeção ($0,15 \text{ mL min}^{-1}$), vazão de leitura, obtido da otimização anterior, e parada de fluxo como sendo de 10 s. O volume a ser injetado foi controlado pela vazão da bomba peristáltica e selecionando o tempo em que a via da válvula fica aberta. Uma vez ajustado na interface o volume a ser injetado, foram realizadas três injeções da solução do branco e três injeções contendo paracetamol. Foram testados os volumes $12-60 \mu\text{L}$ de cada reagente e, novamente a intensidade do sinal, razão sinal/ruído, coeficiente de variação do sinal e porcentagem de atenuação da quimiluminescência foram medidos para cada conjunto e o volume a ser injetado foi selecionado para a realização das medidas posteriores.

O terceiro parâmetro otimizado foi o tempo de parada de fluxo. Fixando os parâmetros vazão de injeção, vazão de leitura e volume injetado, obtidos nos procedimentos anteriores, a parada de fluxo foi avaliada no intervalo de 10- 120 s. Três injeções da solução do branco e três contendo paracetamol foram realizadas para cada valor de parada de fluxo. Utilizando o mesmo procedimento de avaliação aplicado nas otimizações anteriores, um valor de tempo de parada de fluxo foi selecionado para a realização das medidas posteriores.

Para finalizar a etapa de otimizações univariadas, foi conduzido um teste para verificar qual a concentração de hipoclorito deveria ser utilizada nas determinações seguintes. Para este teste, utilizando os parâmetros otimizados, e resultados preliminares, foram construídas curva analíticas com cinco padrões de paracetamol, na faixa de 100-500 mg L⁻¹ para verificar qual concentração de hipoclorito propiciaria uma curva analítica com melhor correlação linear (R²). Foram testadas as seguintes concentrações de hipoclorito: 126,3 mg L⁻¹, 252,5 mg L⁻¹, 378,8 mg L⁻¹, 505 mg L⁻¹.

Foi avaliada a possibilidade de se utilizar como sinal analítico a soma ou subtração de uma das componentes R ou G do valor da componente B, para verificar se seria possível que estas somas ou subtrações poderiam proporcionar correções de sinal, ou melhores correlações lineares. Os parâmetros otimizados foram utilizados na determinação de paracetamol em amostras de medicamentos.

5.2.4.2 Otimização do sistema de aquisição de imagens

Modificações foram realizadas no processo de aquisição do sinal analítico: duas novas regiões de aquisição de dados foram adicionadas à interface, para permitir o monitoramento de mais de uma região da imagem. Além disso, o sinal analítico passou a ser representado pela média dos valores coletados de cada região de aquisição (para cada componente, R, G ou B). Esta configuração do programa será denominada ao longo do texto como VS2013.1.

Com base nos resultados obtidos pelas otimizações univariadas, (os quais serão discutidos na seção Resultados e Discussão), foi constatada a necessidade de realizar modificações no programa desenvolvido mais uma vez. O programa foi alterado para calcular a média de múltiplas leituras dos sinais RGB de cada região de aquisição de dados, e plotar a soma das médias para cada componente (R,G e B) como sinais analíticos. Essa modificação foi proporcionada pela inserção de um parâmetro denominado de “número de replicatas de imagem”. Por exemplo, quando o usuário ajusta o “número de replicatas de imagens” como 100, o programa realiza 100 medidas sequenciais de R,G e B para cada região de aquisição, o que ocorre em menos de 1 segundo. Em seguida, o programa obtém a média para R,G e B de cada região e soma estes valores médios, que são plotados na tela na forma de um fiograma. Vale lembrar, que dessa forma, o sinal máximo para uma componente, R por exemplo, será de 765 unidades uma vez que cada componente em cada região de aquisição pode assumir o valor máximo de 255 (255 * 3 =765). Esta configuração foi denominada de VS2013.2

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Condições otimizadas obtidas com o programa na versão VS2013.1

Para a aplicação apresentada na seção 4.3, a intensidade da quimiluminescência era medida a cada 1 s em apenas uma região de aquisição de dados. O valor coletado era utilizado nas avaliações qualitativas, sem apresentarem elevados valores de CVs. Entretanto, testes preliminares realizados com o microdispositivo apresentado na seção 5.2.1 mostraram variações intensas na intensidade da QL em diferentes regiões da imagem. As modificações configuraram o programa VS3013.1 tiveram por objetivo calcular uma média da intensidade da QL ao longo de mais regiões da imagem.

Após as otimizações serem realizadas com o programa na versão VS2013.1, foram observados valores de CV elevados em diversos testes. A Figura 42 apresenta os resultados das otimizações realizadas. Como pôde ser observado, os sinais apresentaram bastante variabilidade, tendo sido obtidos CV que variaram entre 4 – 57 %. Entretanto, o monitoramento contínuo possibilitou observar um efeito indesejado no fluxo das soluções dentro dos microcanais: frequentemente era perceptível a formação de regiões não preenchidas dentro dos reservatórios circulares. Essas regiões eram formadas e desfeitas pelo fluxo das soluções, não sendo caracterizadas como “bolhas”. Foi possível observar também que essas regiões não preenchidas proporcionavam alterações no sinal quimiluminescente dos demais reservatórios. Em diversas situações, também foi observado que se um reservatório apresentava uma emissão menos intensa, um outro reservatório apresentava uma intensidade de sinal visivelmente maior.

Uma possível causa para a variabilidade encontrada está nos volumes de reagentes utilizados. Na seção 4.3, o volume de hipoclorito utilizado era cerca de 5 vezes maior (na seção 4.3, o volume injetado era de 100 μL , enquanto neste capítulo, foram testados volumes da ordem de $\sim 20 \mu\text{L}$). Possivelmente devido a diminuição do volume de reagente utilizado (hipoclorito) as variações de fluxo tornaram-se mais proeminentes. Como o programa calcula a média dos valores de R, G e B de cada uma das regiões, as discrepâncias de valores das componentes em cada uma das regiões, poderiam contribuir com o aumento da variabilidade do sinal.

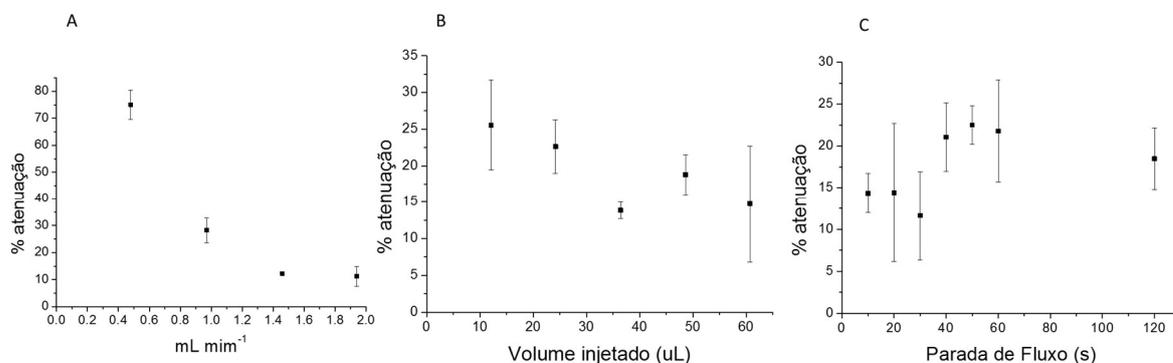


Figura 42: Gráficos de atenuação percentual para cada otimização univariada utilizando uma região de aquisição de dados., com sinal sendo representado pela média dos valores da região de aquisição.. (A) vazão de leitura. (B) volume injetado. (C) tempo de parada de fluxo.

5.3.1.2 Condições otimizadas obtidas com o programa na versão VS2013.2

Baseado nos resultados apresentados na Figura 42, foi possível identificar a necessidade de se obter uma estimativa do sinal analítico ao longo de um intervalo de tempo. Dessa forma, as modificações que configuraram a versão VS2013.2 tinham por objetivo monitorar o sinal analítico não somente em diferentes regiões do espaço, mas também em diferentes instantes. As modificações foram realizadas no programa e assim, as otimizações univariadas foram conduzidas novamente com o programa modificado (VS2013.2). A Figura 43 mostra os resultados obtidos. De maneira geral, pode ser observado que a precisão das medidas melhorou, sendo obtidos valores de variação dos sinais menores. Foram estimados CV que variaram entre 0,65- 13 %.

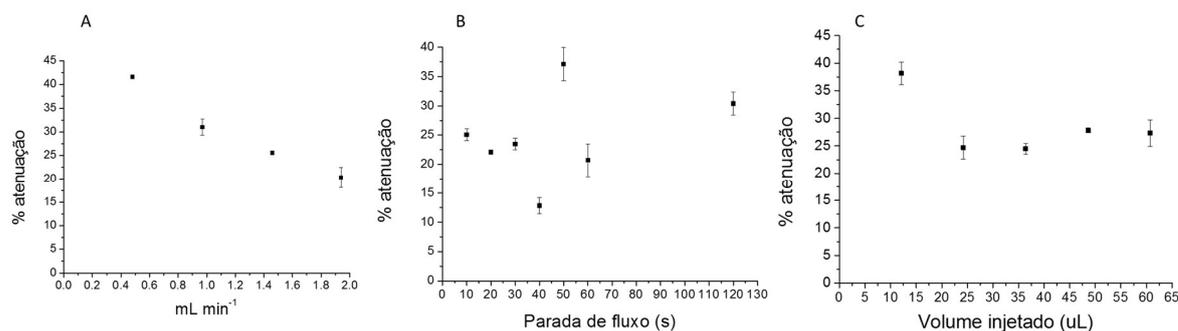


Figura 43: Gráficos de atenuação percentual para cada otimização univariada utilizando três regiões de aquisição de imagem. (A) vazão de leitura. (B) tempo de parada de fluxo. (C). volume injetado Programa faz média e a soma das intensidades de cada componente.

Apesar de a Figura 43 A sugerir que o melhor resultado para o valor de vazão de leitura ser de 0,5 mL min⁻¹, no diagrama obtido para este teste (não mostrado) a razão sinal ruído não foi considerada adequada, tendo sido obtida estabilidade para o sinal analítico apenas para vazões de 1,46 mL min⁻¹, ou superior. Este resultado assemelha-se aos os resultados obtidos na seção 4.3.1, onde também foi constatado que o valor de vazão a ser utilizado para a realização das leituras deveria ser mais elevado, por proporcionar uma maior estabilidade para o fluxo das soluções, e por favorecer uma maior intensidade para o sinal analítico. Entretanto, a vazão de leitura também não deve ser muito elevada, para que o fluxo de soluções não percorra a cela de detecção com muita rapidez, o que poderia prejudicar a aquisição dos dados.

Já para a otimização do volume injetado, foi observado que a injeção de volumes maiores que 40 µL de cada reagente, proporciona que o segmento destes atinja a CD antes de a injeção ser finalizada. Já para a otimização da parada de fluxo, os resultados aparentam ser inconclusivos para tempos de parada superiores a 30 s. Diferentemente do esperado, para a avaliação do tempo de parada de fluxo, novamente, foi observado que um tempo de parada de fluxo de 60 s aumenta menos que 20 % a atenuação percentual em relação a de 10 segundos. Assim sendo, a diminuição da frequência analítica foi novamente considerada mais relevante.

Assim, os valores selecionados para realizar determinação de paracetamol em amostras de medicamentos foram: vazão de leitura de $1,46 \text{ mL min}^{-1}$, volumes injetados de $24 \mu\text{L}$, para cada reagente e uma parada de fluxo de 10 s, sendo obtidos CV de 1,0, 5,4 e 4,0 %, respectivamente. Para a otimização da concentração de hipoclorito, o melhor resultado foi obtido com a concentração de 505 mg L^{-1} de hipoclorito, o qual apresentou uma curva analítica com boa correlação linear, utilizando cinco soluções padrão de paracetamol e não sendo necessária a correção de sinal analítico (pela soma ou subtração da intensidade de R ou G).

5.3.3 Determinação de paracetamol em amostras de medicamentos empregando o conceito de zona de mistura.

O Diagrama obtido para as injeções dos padrões e das soluções das amostras de medicamentos está apresentado na Figura 44. Semelhantemente ao observado na seção 3.3, o sinal da linha de base manteve-se próximo do valor “zero” e mostrou-se estável durante as medidas, indicando que o isolamento proporcionado pela caixa de madeira confeccionada foi eficaz. Novamente, foi possível constatar que a estratégia de zona de mistura pôde proporcionar que a reação ocorresse no interior do microdispositivo, uma vez que as alturas dos picos tendem a diminuir com o aumento da concentração de paracetamol, indicando que houve consumo do íon hipoclorito. Vale destacar que, para esta aplicação, foi necessário realizar um ajuste nas configurações de câmera, para que fosse possível obter uma linha de base mais próxima de “zero”. As configurações incluem não utilizar o brilho da câmera, e alterar a matiz da imagem para o valor de -35.

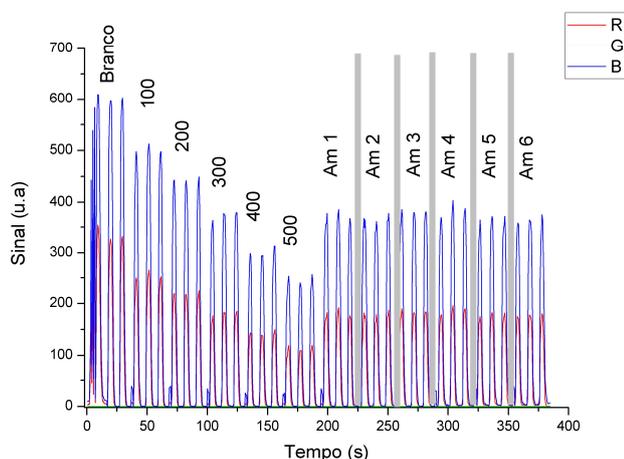


Figura 44: Diagrama obtido para determinação de paracetamol em amostras de medicamentos empregando o conceito de zona de mistura. Compõe este diagrama os picos referentes aos cinco padrões de paracetamol, com concentrações indicadas em mg L^{-1} , picos referentes ao branco e as seis amostras de medicamentos.

Deste diagrama, foram obtidos os valores de altura do sinal, proporcionais à concentração de paracetamol, da mesma forma que na seção 3.3. Os sinais estimados foram utilizados para a construção da curva analítica, representada na Figura 45, a qual apresentou uma boa correlação linear ($R^2 = 0,997$) e uma sensibilidade de $0,657$ unidades de sinal/ mg L^{-1} . Foram observadas barras de erros relativamente pequenas relacionadas aos pontos apresentados na curva analítica, o que indicou uma repetitividade

satisfatória das medidas. Para as três injeções do padrão com 100 mg L⁻¹, solução padrão que apresentou o maior desvio de resíduos em relação a curva traçada, foi calculado um coeficiente de variação do sinal de supressão de 8,0%.

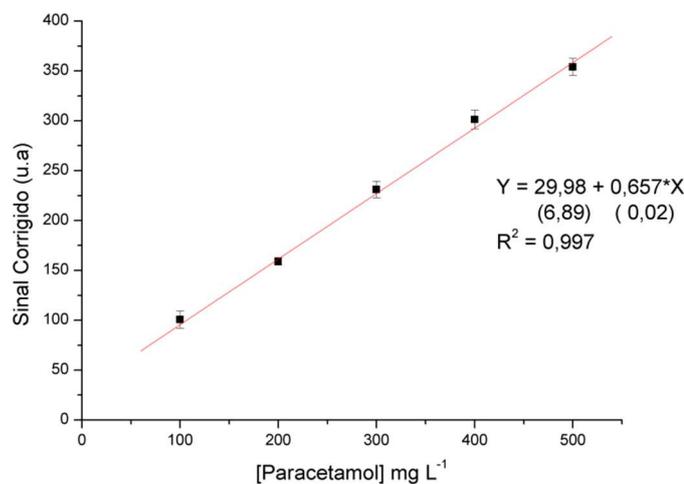


Figura 45: Curva analítica obtida para determinação de paracetamol em medicamentos empregando o conceito de zona de mistura. Faixa de concentração de 100- 500 mg L⁻¹.

Novamente, pode-se observar que o intercepto em “y” não passa pela origem, entretanto, o valor do mesmo representa um valor menor que 8 % do valor máximo de intensidade de sinal corrigido. É interessante ressaltar que, com os parâmetros utilizados nesta determinação, a intensidade de sinal de uma solução de 50 mg L⁻¹ de paracetamol em relação ao sinal do branco apresentou desvio da linearidade. Entretanto, utilizando pequenas modificações nas condições utilizadas para esta determinação, foi possível discriminar uma solução padrão de paracetamol de 25 mg L⁻¹, o que pode indicar que menores limites de detecção podem ser atingidos. Foi estimado um limite de detecção de 31 mg L⁻¹, baseado na equação $(3 \cdot s_{y/x})/b$, onde “b” é o coeficiente angular e $s_{y/x}$ é o desvio dos seus resíduos, valor bastante acima do estimado com uma PMT (0,26 mg L⁻¹). Com relação à frequência analítica, foi observada uma melhora em relação ao apresentado na seção 3.3 resultando em 180 injeções h⁻¹ contra 88 injeções h⁻¹ no estudo anterior. Nota-se que a utilização da *webcam* acarretou em um perda de sensibilidade.

Semelhantemente ao apresentado na seção 2.3, para as amostras de medicamento, os resultados obtidos foram comparados com os valores indicados nos rótulos e estão apresentados na Tabela 8. Ao comparar os valores obtidos pelo método proposto com os estipulados nos rótulos, pode-se observar, majoritariamente, erros relativos menores que 4,0 %, estando em boa concordância com o limite máximo estabelecido pela Farmacopéia (5% para comprimidos, e 10 % para soluções orais). Observa-se ainda que estes erros posicionaram-se acima e abaixo dos valores dos rótulos, indicando a possível ausência de erros sistemáticos para o método proposto.

Tabela 8: Resultados obtidos para a determinação de paracetamol em seis medicamentos comerciais.

Medicamento	μ FIA (mg/dose)	Rótulo	Erro Relativo (%)
AM1	750,05 \pm 36,16	750	0,007
AM2	781,76 \pm 30,75	750	4,06
AM3	727,21 \pm 11,62	750	-3,13
AM4	473,91 \pm 44,45	500	-5,50
AM5	195,12 \pm 3,84	200	-2,49
AM6	198,29 \pm 7,68	200	-0,86

5.4 Conclusões parciais e Perspectivas

Com os resultados apresentados neste capítulo, foi possível concluir que a utilização de imagens digitais apresenta uma alternativa promissora para realizar determinações quimiluminescentes em sistemas miniaturizados, proporcionando um sistema de detecção de baixo custo e que possibilita realizar o monitoramento contínuo do sistema em estudo. Diversos trabalhos são apresentados na literatura utilizando as imagens digitais para detecção óptica, entretanto, estes trabalhos dificilmente utilizam sistemas miniaturizados, ou ainda monitoramento contínuo. Apesar de na aplicação abordada neste capítulo terem sido utilizadas concentrações de hipoclorito dez vezes maiores que nas aplicações apresentadas nas seções 2.3 e 3.3 (20 mgL⁻¹ e 50 mg L⁻¹ respectivamente) e concentrações cem vezes maiores de paracetamol, a detecção por imagens digitais mostrou-se uma alternativa bastante promissora para determinações que não necessitam de LD muito baixos e a instrumentação desenvolvida é mais simples e de fácil operação, diferentemente desta última, podendo ser facilmente implementada em laboratórios convencionais. Ao comparar outros parâmetros obtidos com a detecção por imagens digitais com os da PMT, pode ser observado que o LD obtido com a *webcam* foi consideravelmente maior, sendo de 31 mg L⁻¹, enquanto que com a PMT foi de 0,26 mg L⁻¹. Este fato já era esperado uma vez que a sensibilidade da *webcam* é reduzida (0,657 unidades de sinal/mg.L⁻¹ de paracetamol contra 267,96). Semelhantemente a Oliveira e colaboradores [43], foi obtida uma frequência analítica de 180 injeções h⁻¹, além de dois outros ganhos atingidos nesta aplicação: um consumo de luminol foi reduzido à 27 μ g por determinação, enquanto os autores obtiveram um consume de 22 μ g por determinação, o sistema de detecção de menor custo.

Entretanto, ainda foi observado que o valor de limite de detecção encontrado não pode ser atingido com as configurações utilizadas, o que constitui uma limitação da técnica. Novas otimizações devem ser realizadas para melhorar os resultados e ainda pode-se testar o uso de outros detectores, com melhores resoluções. Espera-se que dessa forma, menores limites de detecção possam ser alcançados.

Capítulo 6- Detecção óptica baseada em imagens digitais para medidas de fluorescência.

6.1 Introdução

Neste capítulo, o principal objetivo foi avaliar o potencial de se utilizar imagens digitais obtidas por uma *webcam* na detecção do sinal de fluorescência gerado em um dispositivo microfluídico. As medidas de fluorescência molecular costumam apresentar elevadas sensibilidade e seletividade, o que as tornam atraentes para a determinação quantitativa de um grande número de substâncias [20]. A literatura mostra, entretanto, que a adaptação da técnica para determinações em sistemas miniaturizados constitui um desafio a ser superado, visto a necessidade de se utilizar arranjos ópticos, algumas vezes complexos, para manipular as radiações de emissão e excitação no interior dos pequenos canais. De fato, muitos autores têm proposto o uso de fibras ópticas [55] ou uma montagem com lentes e espelhos [24,25] para possibilitar este tipo de medida, porém estas alternativas não são facilmente implementadas, sendo o uso de imagens digitais uma possível alternativa para a realização da detecção de fluorescência de forma simplificada em sistemas microfluídicos.

Fonseca e colaboradores [54] realizaram a detecção de fluoresceína em sistemas microfluídicos. Para tal, os autores utilizaram como fonte de excitação (para o referido fluoróforo) um LED (diodo emissor de luz) com emissão máxima em 470 nm e empregaram uma fotomultiplicadora como detector, dispensando o uso de lentes objetivas. Para guiar a radiação pelos microcanais, os autores acoplaram dois conjuntos de fibras ópticas (FO) ao dispositivo, um para guiar a radiação da fonte até um ponto de contato com o fluxo contendo o fluoróforo, e um segundo conjunto para guiar a radiação emitida pelo fluoróforo até o detector. Na proposta dos autores, foi necessária a utilização de um filtro óptico entre as FO que guiam a radiação de resposta e o detector para eliminar o sinal de fundo produzido pelo LED. Pode-se perceber que a instrumentação utilizada apresentou um arranjo complexo e um sistema de detecção de custo relativamente elevado. Neste capítulo, objetivou-se o desenvolvimento de uma instrumentação mais simples, capaz de realizar esta detecção.

6.2 Materiais e Métodos

Baseado na proposta de Fonseca e colaboradores [54] um ensaio foi conduzido para verificar se seria possível discriminar diferentes concentrações de fluoresceína por imagens digitais em um dispositivo fluídico miniaturizado, utilizando uma *webcam* comercial como detector e um LED com emissão máxima em 470 nm como fonte de radiação para excitação do fluoróforo. Para tornar a instrumentação de menor custo e de maior facilidade operacional, foi dispensado o uso de filtros ópticos.

6.2.1 Construção das microcélulas de detecção.

Para iniciar os estudos sobre a utilização de imagens digitais na realização de medidas de fluorescência, semelhantemente ao apresentado na seção 4.2.1, foram utilizadas celas de detecção miniaturizadas em sistema de análise em fluxo de tamanho usual. As configurações de celas nº 5 e nº 6, apresentadas na seção 4.2.1 foram utilizadas nestes estudos, sendo realizadas apenas modificações para permitir o acoplamento de fibras ópticas (FO) para guiar a radiação de excitação da fonte de radiação até a microcelula. Sendo assim, estas novas configurações foram discriminadas como nº 7 e nº 8, conforme apresentado na Figura 44.

A confecção das microcelulas foi realizada conforme o apresentado na seção 2.2.2. e na Figura 46 estão apresentados os *layouts* e as fotografias das microcelulas desenvolvidas. Para a conformação com reservatórios circulares (Figura 46 (A)) foi construído um acesso (MF) que permitiu a inserção de uma fibra óptica plástica (FO) e para a conformação com o misturador mostrado na Figura 46 (C e D) dois acessos (MF1 e MF2), perpendiculares à saída do misturador foram utilizados para acoplamento de duas fibras ópticas plásticas (Toray-Europe) com diâmetro de 250 μm . As dimensões das microcelulas são 4 cm x 5 cm para as configurações nº 7 e nº 8 e apresentaram celas de detecção com volumes internos estimados de 9 μL e de 15 μL respectivamente.

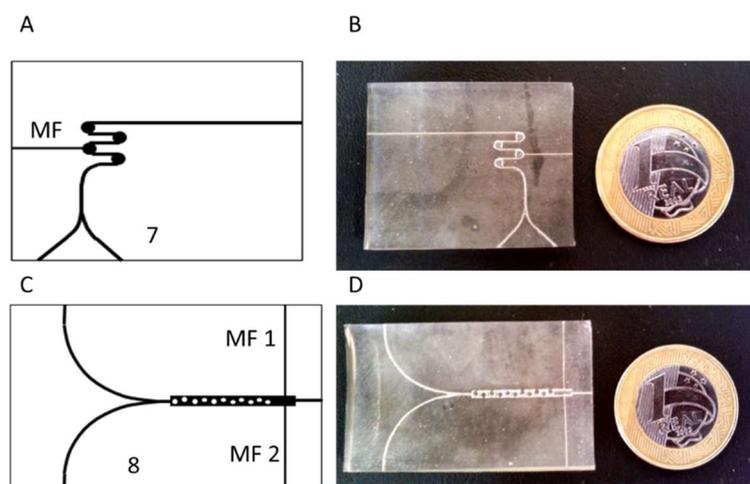


Figura 46: *layout* dos novos protótipos (A e C); celas de detecção já confeccionadas (B e D). MF, MF1 e MF2 são os acessos criados para o acoplamento das FO.

6.2.2 Aparatos

Para realizar a detecção da fluorescência por imagens digitais, a instrumentação foi modificada. Foi necessário acoplar uma fonte de excitação para o analito, a qual foi constituída por um LED (diodo emissor de luz) com máximo de emissão em 470 nm. Este foi interconectado às microcelulas por fibras ópticas plásticas com 250 μm de diâmetro. Estas foram acopladas aos microdispositivos, por pressão, nos canais previamente desenhados (MF para a configuração nº 7 e MF1/MF2 para a nº 8) para esta adaptação e fixadas com cola instantânea. Os demais aparatos utilizados foram os mesmos descritos na seção 4.2.2. A Figura 47 mostra as microcelulas com as FO acopladas, uma das microcelulas acondicionada no interior da caixa adaptada e a Figura 48 ilustra o diagrama de fluxo utilizado para a

estratégia abordada neste capítulo. Na Figura 49 pode-se observar a disposição do sistema contendo a fonte de alimentação para o LED, o injetor proporcional, a câmara escura que abriga a microcelulae a bomba peristáltica utilizada.

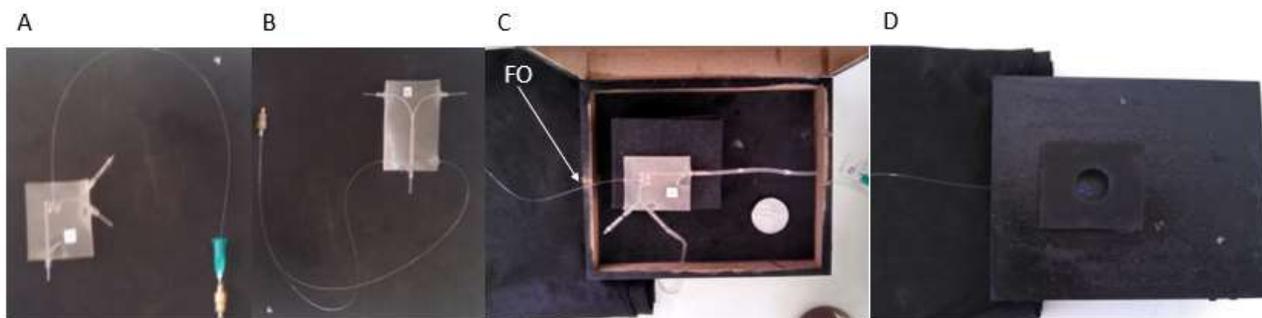


Figura 47: Microsistemas confeccionados com FO integrada. Em (A), a configuração nº 7 e em (B) a nº 8; (C) Microsistema com FO integrada acondicionado na caixa adaptada (D); Acesso para FO (B).

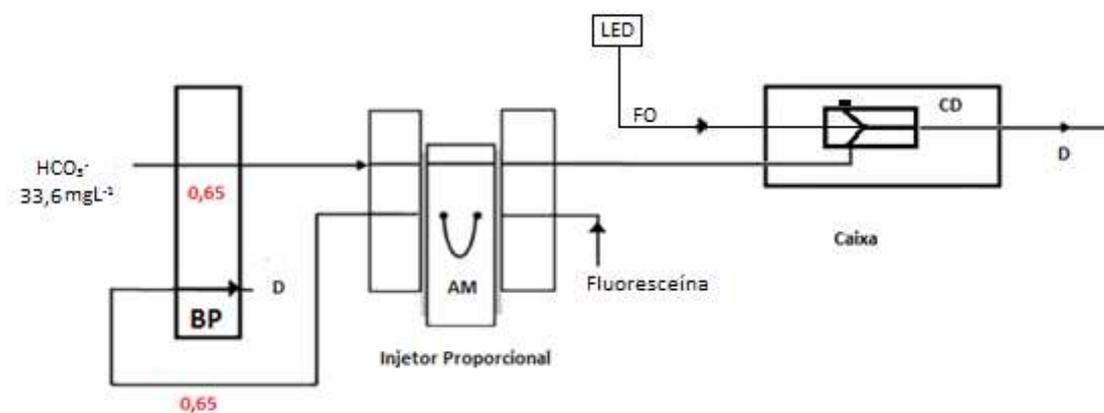


Figura 48: Diagrama de fluxo para FIA convencional. Posição de amostragem. Com detecção em micro cela (Legenda: BP – Bomba Peristáltica; CD – Cella de Detecção; AM – Alça de amostragem para injeção de solução padrão de fluoresceína; LED- diodo emissor de luz; FO- fibra óptica; D – Descarte. Vazões indicadas na figura em mL h⁻¹).

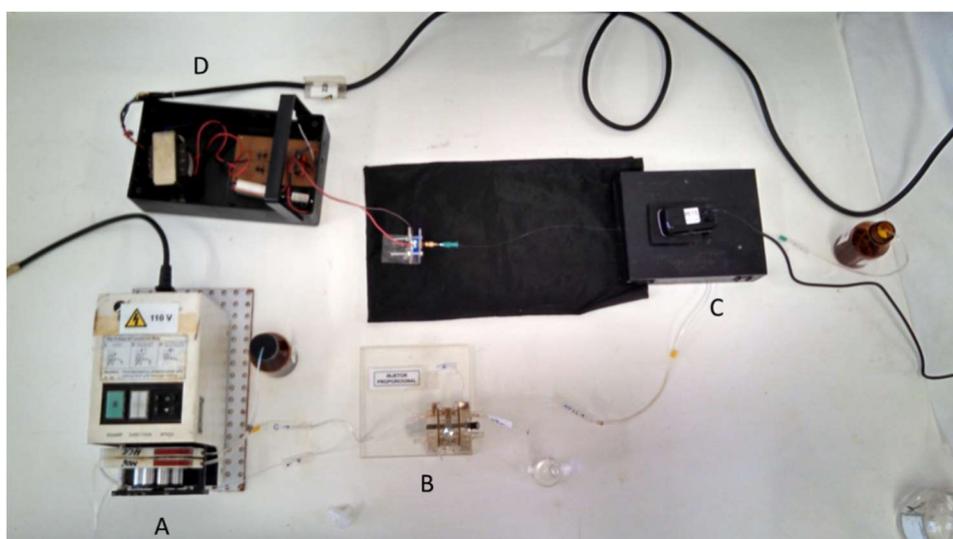


Figura 49: Sistema de análise para discriminação de fluoresceína por imagens digitais. (A) bomba peristáltica, (B) injetor proporcional; (C) câmara contendo o microdispositivo e (D) circuito de acionamento do LED

6.2.3 Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas com água purificada por osmose reversa e com reagentes possuindo, ao menos, 99 % de pureza. Para as soluções em que esta condição não foi obedecida a descrição específica foi realizada ao longo do texto.

6.2.3.1 Soluções Estoque

Uma solução tampão de bicarbonato 8 mmol L^{-1} pH 8,0 foi preparada pela dissolução da massa apropriada do sal NaHCO_3 (pureza 100 %, J.T Baker) em água. O pH foi ajustado com a adição de algumas gotas de $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Uma solução estoque de fluoresceína com concentração de $100,0 \text{ mg L}^{-1}$, foi preparada pela dissolução da massa apropriada da substância (Merck) no tampão bicarbonato descrito.

6.2.3.2 Soluções de trabalho

Para a construção de uma curva analítica de fluoresceína, soluções padrão foram preparadas diluindo-se alíquotas da solução estoque de fluoresceína em tampão bicarbonato 8 mmol L^{-1} pH 8,0. Para a conformação nº 7, foram preparadas soluções padrão nas concentrações de $5\text{-}25 \text{ mg L}^{-1}$. Já para a configuração nº 8, as soluções padrão estavam na faixa de $0,15\text{-}0,35 \text{ mg L}^{-1}$.

6.2.4 Procedimento de análise

O diagrama de fluxo utilizado para a determinação abordada neste capítulo está representado na Figura 48, o qual mostra a disposição da bomba peristáltica (BP) e do injetor proporcional na posição “amostragem”. Antes de iniciar a aquisição de dados, o programa solicita o local de armazenamento dos mesmos e o operador seleciona a região da imagem na qual os dados serão coletados, delimitando as dimensões da região de aquisição. O procedimento para a aquisição das medidas foi descrito em duas etapas: amostragem e injeção.

Amostragem: o injetor encontrava-se na posição “amostragem” (Figura 47). Nesta posição, a solução de amostra foi aspirada preenchendo a alça de amostragem do injetor com cerca de $100 \mu\text{L}$ da solução padrão de fluoresceína.

Injeção: a alavanca do injetor foi modificada manualmente para a posição “injeção”. Nessa posição, o fluxo do carregador impulsiona a solução de amostra presente na alça de amostragem para o interior da microcélula. A vazão das soluções foi de $0,65 \text{ mL min}^{-1}$.

É importante destacar que, durante todo o procedimento (amostragem e injeção), o LED encontrava-se aceso e irradiando sobre o fluxo de soluções no interior da microcélula. Também é válido ressaltar que durante todo o procedimento o programa realizava aquisições de dados em intervalos de aproximadamente 1 s.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Estudos para discriminação de diferentes concentrações de fluoresceína por imagens digitais.

Para a configuração nº 7, com reservatórios circulares, foram injetadas soluções de fluoresceína nas concentrações de 5-25 mg L⁻¹, cujo fiagrama obtido está apresentado na Figura 50. Diferentemente dos fiagramas obtidos nas aplicações anteriores, pode-se verificar que o sinal da linha de base para as componentes azul e verde, não partem do valor de intensidade “zero”, enquanto para a componente vermelha constatou-se que, para esta configuração, não houve variação expressiva durante as medidas, permanecendo com valor bem próximo de “zero”.

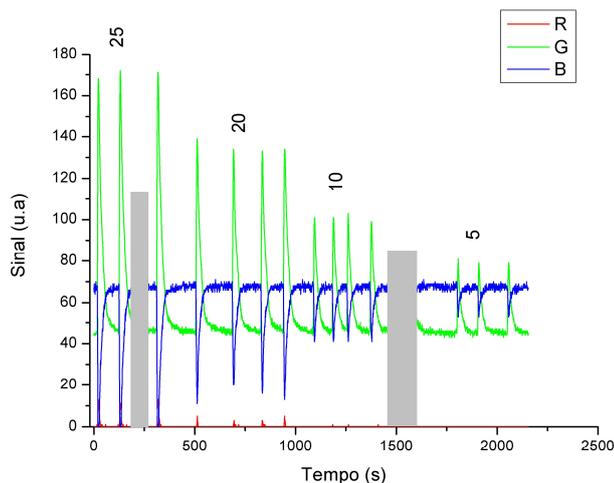


Figura 50: Fiagrama obtido com a configuração nº 7 para as injeções dos padrões de fluoresceína. Concentrações dadas em mg L⁻¹.

Isso se deve ao sinal de fundo produzido pela emissão do LED. Conforme mencionado anteriormente, com o objetivo de diminuir a complexidade da instrumentação para medidas de fluorescência, nesta aplicação o uso de filtros ópticos foi dispensado. Devido a este fato, e da proximidade da FO com as soluções que fluem em um canal de pequeno diâmetro, bem como à transparência do material constituinte das microcélulas, foi observado um espalhamento da radiação proveniente do LED, o qual emite, majoritariamente, radiação no comprimento de onda de 470 nm, correspondente a cor azul, mas também radiações ao redor deste máximo, com intensidades menores como é o caso da radiação de cor verde com comprimento de onda na faixa de 520 nm, conforme pode ser observado na Figura 52. Dessa forma, a intensidade da radiação da fonte de excitação também foi monitorada pelo programa, resultando em um fiagrama no qual algumas componentes não partem do valor ‘zero’, como seria esperado de uma técnica de campo escuro.

A fluoresceína quando excitada por uma fonte de radiação “azul” (~470 nm) apresenta emissão com máximo em aproximadamente 530 nm (verde), de forma que o aumento de sinal mais pronunciado para a componente G já era esperado. O decaimento do sinal da componente B durante as medidas também era previsto, uma vez que a substância absorve fortemente radiação na região do azul. Considerando que a melhor razão sinal/ruído foi obtida para a componente verde, o monitoramento do

sinal referente às diferentes concentrações de fluoresceína foi realizado por esta componente. Pode-se observar que a intensidade do sinal se manteve estável durante as leituras e que, à medida que a concentração de fluoresceína aumenta, a intensidade da componente verde também o faz. As alturas dos picos proporcionais às concentrações de fluoresceína foram obtidas subtraindo-se do valor de intensidade máxima o valor obtido na linha de base e os sinais assim estimados foram utilizados para a construção da curva analítica representada na Figura 51.

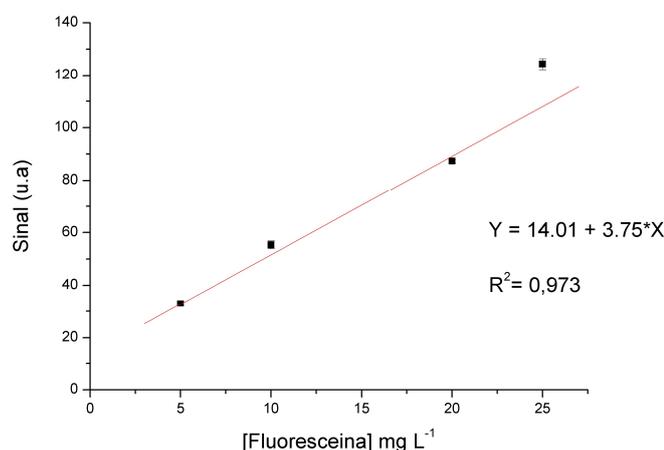


Figura 51: Curva analítica obtida para a discriminação de diferentes concentrações de fluoresceína, utilizando configuração nº 7. Faixa dinâmica de 5,0-25,0 mg L⁻¹.

A curva analítica obtida, apresentou uma correlação linear inferior em relação às outras obtidas neste trabalho, ($R^2 = 0,973$) e uma sensibilidade de 3,75 unidades de sinal/mg L⁻¹. Ainda assim, barras de erros de pequena amplitude foram relacionadas aos pontos apresentados na curva analítica indicam uma boa repetitividade das medidas. A precisão das medidas foi avaliada pelo valor de coeficiente de variação o qual foi estimado no valor de 1,22% para as três injeções do padrão com 25 mg L⁻¹, o qual apresenta o maior desvio em relação a curva traçada. Novamente, o intercepto em “y” não passa pela origem. Uma possibilidade, passível de verificação, está em que o sistema estudado não apresente um comportamento linear para concentrações abaixo das avaliadas. Apesar disto, foi possível demonstrar que a detecção do sinal empregando imagens digitais pode ser realizada.

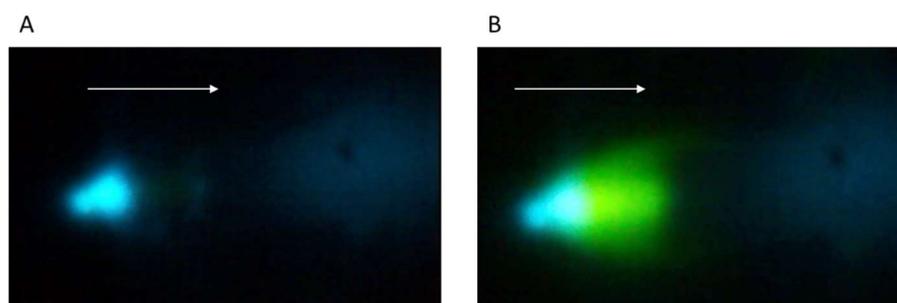


Figura 52: Imagens da microcelula de detecção. Em (A) observa-se o espalhamento da emissão do LED na ausência de fluoróforo e em (B) com a presença de fluoresceína. As setas indicam a direção do fluxo das soluções.

Para a configuração nº 8, onde a excitação foi realizada com duas fibras ópticas, foi observada a saturação dos sinais para todas as componentes da imagem ao se utilizar concentrações de fluoresceína

acima de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Este fato pode ser atribuído ao aumento da intensidade da radiação que chega à microcélula, conforme será discutido adiante. Assim, para esta configuração, foram feitas injeções de soluções padrão na faixa de $0,15$ a $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ e o diagrama com as intensidades das componentes R, G e B está apresentado na Figura 53.

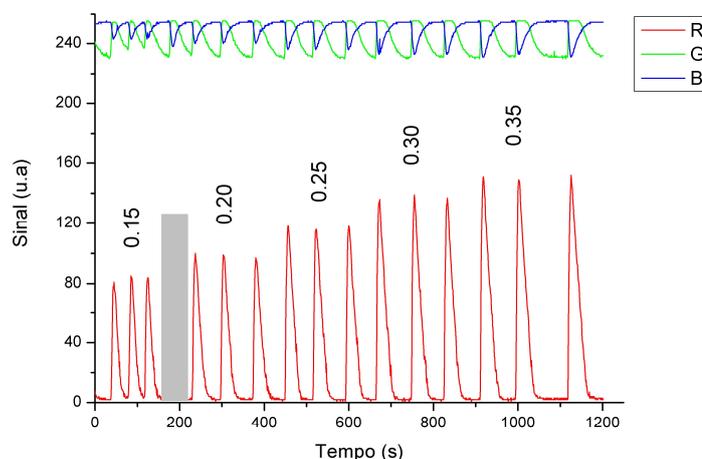


Figura 53: Diagrama obtido para injeção de fluoresceína com a configuração nº 8. Concentrações indicadas em mg L^{-1}

Foi possível observar que, diferentemente da configuração nº7, as componentes azul e verde possuem seus sinais iniciando em intensidades muito elevadas. Os valores iniciais para a componente azul alcançaram o seu nível máximo (255, saturação) e a componente verde esteve com sua intensidade em aproximadamente 240 (muito próxima da saturação). Isso se deve ao fato de que ao invés de utilizar uma fibra óptica, foram utilizadas duas, e assim, a intensidade da emissão do LED atinge o máximo para a sua componente majoritária e aumenta consideravelmente o sinal da emissão em verde (componente emitida pela fluoresceína). Também foi possível averiguar que à medida que as injeções de fluoresceína foram realizadas, a intensidade da componente azul diminuiu singelamente, porém a atenuação da intensidade desta componente não foi suficiente para monitorar a concentração da solução de fluoresceína injetada. Com relação à componente verde, o sinal elevado da linha de base leva à saturação do sinal quando da injeção de fluoresceína, inviabilizando a realização de medidas quantitativas na faixa de concentração estudada.

Apesar das respostas inadequadas para as componentes G e B, a componente R apresentou um comportamento bastante adequado para as medidas de fluorescência avaliadas. À primeira vista, não era esperada uma variação pronunciada do sinal nesta componente, visto que o máximo de emissão da fluoresceína excitada com radiação azul ocorre na região do verde e, portanto, distante dos comprimentos de onda referentes à região vermelha do espectro (acima de 590 nm). Entretanto, observa-se que o espectro de emissão do fluoróforo [54] apresenta uma banda bastante abrangente e que emissões consideráveis podem ser detectadas acima de 600 nm conforme apresentado na Figura 54. Deste modo, a variável R, sob a condição de excitação com maior quantidade de fótons, surgiu como uma variável bastante adequada para as medidas, mantendo o comportamento de campo escuro da

técnica, uma vez que as medidas partem do valor zero quando não há emissão do fluoróforo. Além disso, pode-se considerar que a escolha da variável R dispensa a necessidade de filtros para eliminar ou minimizar a influência da radiação de excitação do LED, tornando todo o sistema de detecção mais simples.

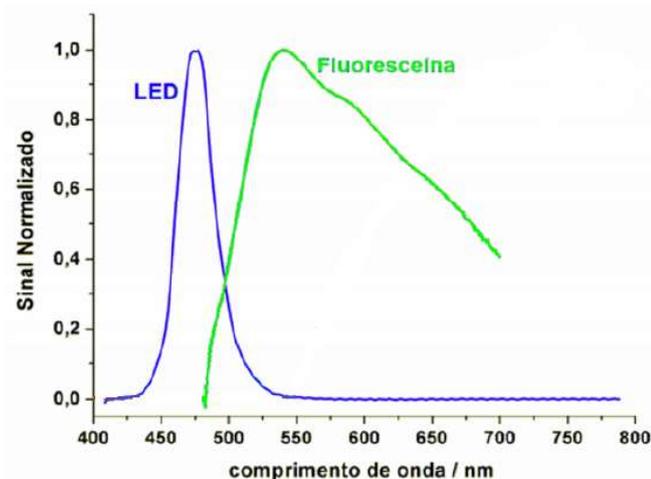


Figura 54: Espectro de emissão do LED utilizado e da fluoresceína. Adaptado de Fonseca e colaboradores [54]

Baseada nas alturas dos picos obtidos com a componente R, construiu-se a curva analítica para a faixa de concentração proposta, a qual está apresentada na Figura 55. Conforme pode ser observado, a curva apresenta uma boa correlação linear ($R^2 = 0,995$) e um valor de sensibilidade de 351,24 unidades de sinal/mg L⁻¹. Apesar de o intercepto não atingir a origem, esta curva ainda conta com um LD de 0,014mg L⁻¹, mostrando que a estratégia proposta tem potencial para aplicações futuras. Também foi possível verificar que as barras de erros para os quatro primeiros padrões apresentaram-se bem pequenas, indicando que as medidas apresentaram boa repetitividade. Para avaliar a precisão das medidas, foi calculado o CV para o padrão de 0,35 mg L⁻¹, o qual apresentou a maior amplitude nas barras de erro, tendo sido obtido um CV de 4,68 %.

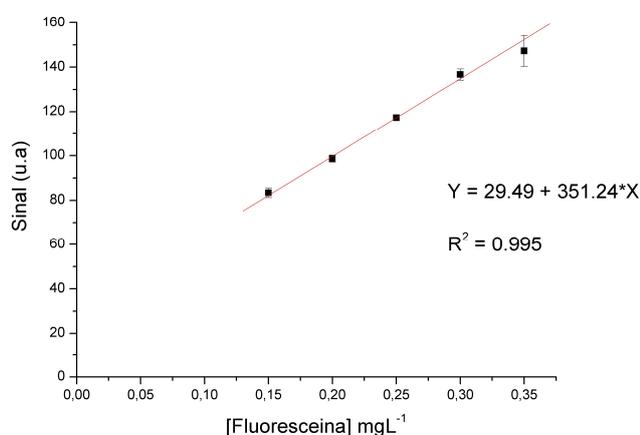


Figura 55: Curva analítica de fluoresceína obtida com a configuração nº 8 pela intensidade da componente vermelha (R), do sinal RGB.

Finalmente, vale ressaltar que neste capítulo foram conduzidos testes preliminares para averiguar a possibilidade de realizar medidas de fluorescência em celas de detecção miniaturizadas por

imagens digitais. Apesar de as celas de detecção serem miniaturizadas, o sistema FIA utilizado foi de tamanho convencional, em virtude de esta técnica ser bem estabelecida e, portanto, mais confiável, para a realização destes testes. Este projeto ainda se propõe a integrar uma cela de detecção à um dispositivo microfluídico completo (contendo canais para inserção de reagentes, bobina reacional e cela de detecção) e emprega-lo para determinações fluorimétricas. Após os resultados obtidos, a configuração nº 8 mostrou-se promissora por ter apresentado uma maior sensibilidade, melhor linearidade e por ter favorecido um perfil de sinal condizente ao de uma técnica de campo escuro.

6.4 Conclusões parciais e perspectivas

Com os dados apresentados, foi possível concluir que a utilização de uma *webcam* comercial possibilita realizar detecções ópticas para medidas de fluorescência em dispositivos miniaturizados. Em relação à configuração nº7, é possível que os resultados insatisfatórios possam estar ligados a intensidade do LED, uma vez que a fonte de radiação pode não ter apresentado intensidade suficiente para excitar com eficiência o analito disponível, e assim, a discriminação foi possível, porém apresentou uma correlação linear inferior (0,973), uma faixa de trabalho bastante restrita e foram necessárias concentrações elevadas de analito para realizar a discriminação.

A utilização da configuração nº 8 permitiu a identificação de diferentes concentrações de fluoresceína com linearidade adequada (0,995), baixos limites de detecção ($0,014 \text{ mg L}^{-1}$), boa precisão ($\text{CV} > 5,0\%$) e elevada sensibilidade ($321,54 \text{ unidades de sinal/mg L}^{-1}$) Esta estratégia conta ainda com uma instrumentação de baixo custo, mais simples do que a utilizada por Fonseca e colaboradores [54], Mogensen e colaboradores [24] e Sauer e colaboradores [25] por dispensar o uso de filtros ópticos para minimizar os efeitos de radiação de fundo provenientes do LED além de um limite de detecção dez vezes menor com um sistema de detecção cem vezes menos dispendioso do que o apresentado por Fonseca e Colaboradores [54]. Esta estratégia mostrou-se bastante promissora para prosseguir com determinações quantitativas por medidas de fluorescência em sistemas microfluídicos, assunto que foi discutido no capítulo seguinte.

Capítulo 7- Determinação da dureza de águas minerais utilizando detecção óptica baseada em imagens digitais para medidas de fluorescência

7.1 Introdução

No capítulo 6, foi estudada a possibilidade de se utilizar a detecção por imagens digitais para medidas de fluorescência em celas de detecção miniaturizadas. Entretanto, foi necessário avaliar se a integração desta cela de detecção poderia ser realizada com sucesso em um microsistema fluídico de análise. Fonseca e Colaboradores [54] já realizaram a integração de uma cela de detecção fluorimétrica a um dispositivo microfluídico de análise, conforme citado na seção 6.1, entretanto, os autores utilizaram um sistema de detecção mais dispendioso, constituído por uma fotomultiplicadora e ainda foi necessário o uso de filtros ópticos para diminuir a interferência do sinal de fundo proveniente da fonte de radiação. Os autores citados utilizaram a mesma montagem para realizar as determinações da dureza da água empregando um método fluorimétrico baseado na complexação dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} com o fluoróforo calceína [49]. Este fluoróforo complexa com os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} em meio básico, liberando uma molécula de fluoresceína, a qual, apresenta uma emissão fluorescente (em aproximadamente 530 nm) quando excitado por radiação no comprimento de onda de 470 nm. Uma vez que o fluoróforo apresenta uma resposta fluorescente para ambos os íons na mesma proporção estequiométrica, Fonseca e colaboradores [54] construíram uma curva analítica utilizando apenas soluções padrão de Ca^{2+} .

Neste capítulo, foram estudadas as mesmas determinações realizadas pelos autores citados, entretanto utilizando a detecção óptica baseada em imagens digitais e empregando o conceito de zona de mistura.

7.2 Materiais e métodos

Inicialmente, para analisar se a cela de detecção fluorimétrica foi integrada com sucesso, o ensaio com fluoresceína apresentado na seção 6.3.1 foi repetido em um microsistema (contendo canais para injeção de amostra, confluências para reagentes e bobina reacional). Em um segundo momento, foram realizadas otimizações nos parâmetros de análise (valores de vazão, volumes de reagentes a serem utilizados, concentração de reagentes, avaliação de faixa dinâmica) para proceder com a determinação da dureza da água em amostras de águas minerais para consumo humano.

7.2.1 Construção do microdispositivo

Para realizar as determinações fluorescentes com detecção por imagens digitais em microsistemas fluídicos de análise, um novo protótipo contendo o *layout* dos canais de injeção de reagentes E_1 , E_2 , E_3 e R do dispositivo utilizado na seção 3.2.1 e o modelo de cela de detecção apresentado na seção 6.2.1, configuração nº 8, representado na Figura 46C, compuseram o microdispositivo utilizado nas determinações deste capítulo. A Figura 56 mostra o *layout* utilizado (A) e uma fotografia (B) do dispositivo já confeccionado, cuja construção foi realizada empregando-se o

procedimento descrito na seção 2.2.1. As dimensões do microdispositivo são as mesmas apresentadas na seção 2.2.1. Os volumes internos estimados da cela de detecção e da BR são de 80 μL e 20 μL respectivamente.

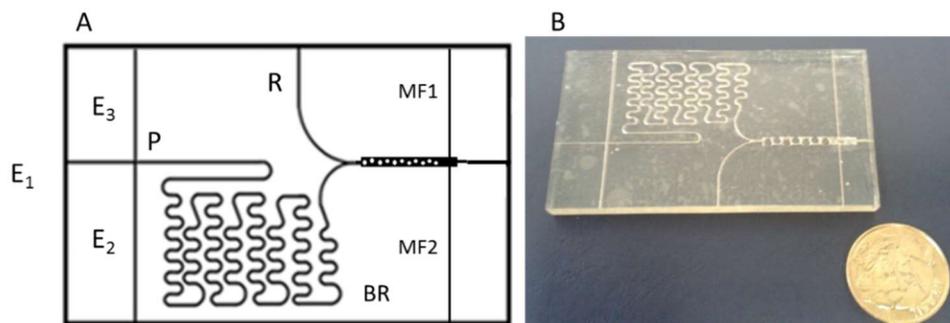


Figura 56: (A) *layout* do microsistema utilizado para determinações fluorescentes, (B) fotografia do dispositivo confeccionado.

7.2.2 Aparatos

No microdispositivo, duas fibras óptica de 250 μm de diâmetro foram acopladas por pressão nos acessos MF1 e MF2, previamente fotolitografados. As FO foram fixadas com auxílio de cola instantânea. Os demais aparatos utilizados foram os mesmos apresentados na seção 5.2.2, o diagrama de fluxo empregado está representado na Figura 57 e a Figura 58 mostra a disposição geral dos equipamentos utilizados.

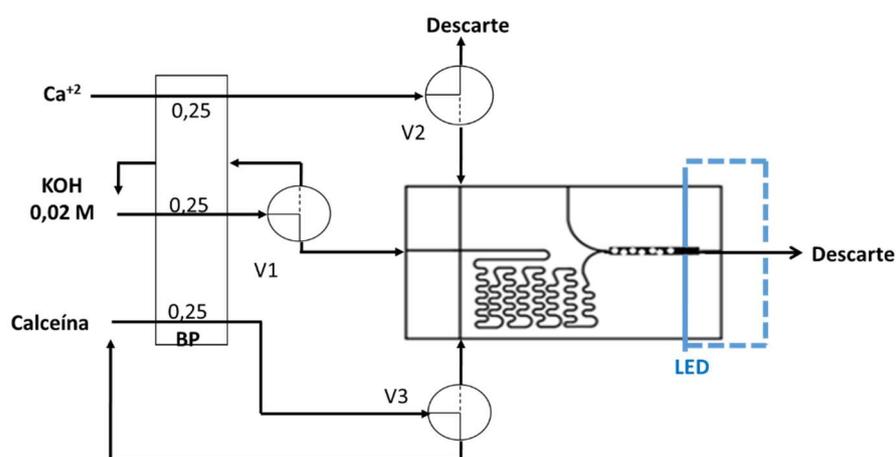


Figura 57: Diagrama de fluxo geral utilizado para as determinações fluorimétricas com detecção óptica por imagens digitais. (BP) bomba peristáltica, (V1 a V3) válvulas solenóides, D descarte. Detalhes em vermelho destacam as soluções utilizadas para a discriminação de fluoresceína e os em preto para a determinação de cálcio. Vazões indicadas em mL min^{-1} .

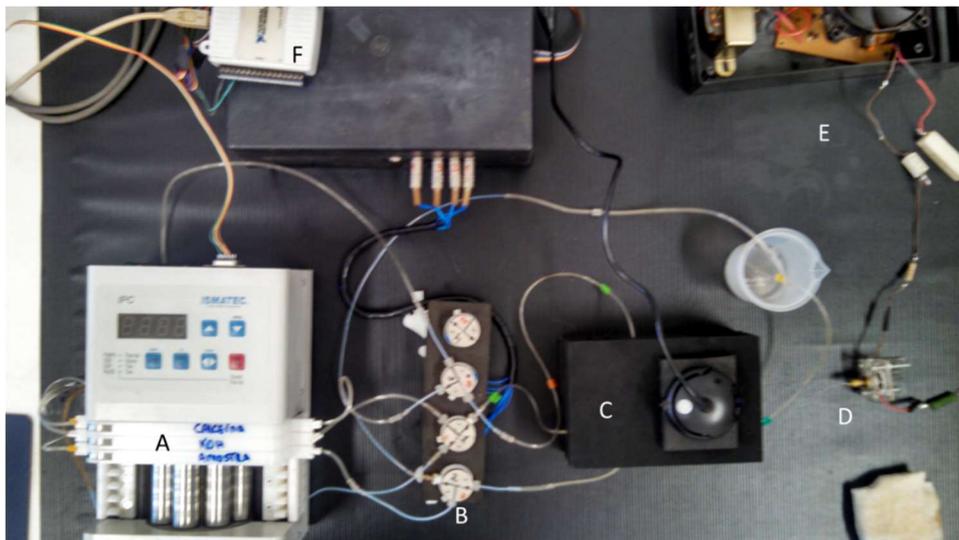


Figura 58: disposição geral dos aparatos utilizados. (A) bomba peristáltica, (B) conjunto de válvulas solenoides, (C) Caixa adaptada contendo o dispositivo, (D) LED utilizado, (E) circuito para acionamento do LED, (F) interface de comunicação das válvulas solenoides com o microcomputador.

7.2.3 Reagentes e Soluções

As soluções foram preparadas com água purificada por osmose reversa e com reagentes possuindo, ao menos, 99 % de pureza. Para as soluções em que esta condição não foi obedecida, a descrição específica foi realizada ao longo do texto.

7.2.3.1 Soluções Estoque

Uma solução estoque de KOH na concentração de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução da massa apropriada do reagente (VETEC) em água deionizada. Uma solução estoque de calceína na concentração de $500,0 \text{ mg L}^{-1}$ foi preparada pela solubilização da massa apropriada do sal (VETEC) em KOH $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Uma solução estoque de Ca^{2+} na concentração 1000 mg L^{-1} foi preparada pela dissolução da massa apropriada de CaCO_3 (VETEC) em água deionizada. As demais soluções utilizadas foram idênticas às apresentadas na seção 6.2.3.1

7.2.3.2 Soluções de Trabalho

Para a realização de otimizações univariadas, foram preparadas soluções padrão de calceína nas concentrações de 250 mg L^{-1} , 300 mg L^{-1} , 400 mg L^{-1} e 500 mg L^{-1} pela dissolução da massa apropriada da substancia em KOH $0,02 \text{ mol L}^{-1}$.

Para a construção de uma curva analítica de fluoresceína, soluções padrão foram preparadas nas concentrações de $0,1- 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ diluindo-se alíquotas da solução estoque de fluoresceína em tampão bicarbonato 8 mmol L^{-1} pH 8,0.

Para a construção de uma curva analítica de Ca^{2+} , soluções padrão foram preparadas nas concentrações de $125- 625 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ diluindo-se alíquotas da solução estoque de Ca^{2+} em água deionizada.

7.2.3.3 Preparo de amostra

Para a determinação da dureza de amostras de águas minerais, seis amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais. Os valores de dureza foram calculados pela soma da quantidade de matéria de Ca^{2+} e Mg^{2+} informados nos rótulos e expressos como mg L^{-1} de CaCO_3 . A Tabela 9 relaciona a amostra adquirida com o valor de dureza calculado.

Tabela 9: Relação de amostras adquiridas e suas respectivas durezas expressas em mg L^{-1} de CaCO_3 .

Amostra	Dureza (mg L^{-1} CaCO_3)
AM1	87,2
AM2	87,2
AM3	61,3
AM4	136,5
AM5	86,3
AM6	155,7

Para injeção das amostras no microdispositivo, foram feitas diluições das mesmas em água deionizada, para concentrações adequadas à curva analítica.

7.2.3.4 Método de Referência

Para avaliação dos resultados obtidos com o microssistema, realizou-se a determinação da dureza das águas pela volumetria de complexação com EDTA. Para as determinações, foram pipetados volumes adequados das amostras, os quais foram adicionados para erlenmeyers. Para correção do pH, 2,0 mL de solução tampão de $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ 1,0 mol L^{-1} , pH 10 foram adicionados aos erlenmeyers. As titulações foram realizadas com adição lenta de uma solução de EDTA 0,02 mol L^{-1} sobre a solução da amostra, com auxílio de uma bureta. Para a visualização do ponto final, foi utilizado o indicador negro de eriocromo T.

7.2.4 Procedimento automatizado de análise

O diagrama de fluxo utilizado nas determinações abordadas neste capítulo está representado na Figura 57, o qual mostra a disposição da bomba peristáltica (BP) e das três válvulas solenóides (V1-V3) necessárias à realização do procedimento, em seu estado desligado. O procedimento de análise foi descrito a seguir em três etapas para um melhor entendimento, sendo estes, Início, Amostragem e Aquisição.

Início: todas as válvulas estavam desativadas (Figura 57). Nestas condições, o fluxo do carregador foi direcionado por V1 para o interior do microssistema. Esse fluxo percorre a linha de fluxo perpendicular à confluência, a bobina de reação e a cela de detecção, condicionando os canais para a passagem dos reagentes. Não há aquisição de dados nesta etapa.

Amostragem: durante a amostragem, concomitantemente, todas as válvulas foram ativadas durante 5 segundos. Assim, os fluxos de calceína e de solução padrão de Ca^{2+} foram direcionados concomitantemente para o interior do microssistema, injetando cerca de 20 μL de cada solução. O fluxo do carregador foi desviado para o seu frasco de origem, evitando o desperdício da solução. Em seguida, todas as válvulas foram desativadas. A velocidade de funcionamento da bomba foi tal que a vazão de todas as soluções era de 0,25 mL min^{-1} . A disposição dos fluidos no interior do canal após o procedimento de amostragem é a mesma representada na Figura 41 (seção 5.2.4)

Aquisição: Nesta etapa, todas as válvulas foram desativadas, desviando o fluxo de carregador para o interior do microdispositivo. Dessa forma, o segmento formado foi impelido em direção à bobina reacional, onde ocorreu a mistura da solução de calceína com a solução padrão cálcio. Em seguida, o fluxo seguiu em direção à cela de detecção, para que ocorresse a detecção do sinal transiente. Adicionalmente, nesta etapa, fluxo da solução de calceína foi desviado para seu frasco de origem e o fluxo de solução padrão para o seu descarte. Durante a etapa de aquisição, a velocidade de funcionamento da BP permaneceu a mesma, sendo a vazão dos fluidos 0,25 mL min^{-1} . Para cada solução padrão foram feitas três replicatas,

O procedimento de troca de solução consistiu em parar a BP, trocar o recipiente contendo a solução padrão cuidadosamente para evitar a formação de bolhas no interior dos turbo Tygon ®. Em seguida a BP foi ativada e três injeções do novo padrão foram realizadas com a mesma vazão utilizada durante a aquisição de dados, sem entretanto, coletá-los

7.2.4.1 Otimizações univariadas para a determinação de Ca^{2+} e Mg^{2+} com Calceína.

Os resultados obtidos na seção 6.3.1 mostraram que, para medidas de fluorescência, houve maior sensibilidade quando duas FO foram utilizadas (estudo realizado com fluoróforo fluoresceína) sendo detectadas concentrações de fluoresceína da ordem de 0,15 mg L^{-1} . No presente capítulo duas modificações foram implementadas, referentes ao fluoróforo utilizado e às dimensões do sistema de análise. Sendo que na seção 6.3.1, foi utilizado um injetor proporcional para FIA convencional, os volumes injetados eram cerca de cinco vezes os volumes de reagentes utilizados no sistema miniaturizado (vide seção 3.3), e, para a aplicação abordada neste capítulo, o fluoróforo a ser utilizado foi constituído de calceína. Diferentemente da fluoresceína, a calceína emite radiação quando complexada com íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . Considerando estas modificações, novas otimizações univariadas foram conduzidas. Algumas alterações foram admitidas baseadas em testes preliminares e durante os procedimentos de otimização, foi utilizado o diagrama de fluxo apresentado na Figura 57.

Novamente foram utilizadas vazões de injeção menores, para possibilitar um controle melhor do volume a ser injetado, e assim, baseados em testes preliminares, o valor da vazão de injeção foi alterado para 0,25 mL min^{-1} e os volumes a serem injetados de fluoróforo e de solução padrão de cálcio como sendo de 20 μL . Para a realização das otimizações, foram utilizadas soluções de calceína 250 mg L^{-1} e uma solução padrão de Ca^{2+} 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Semelhantemente ao descrito na seção 5.3.2, na interface, uma vez fixados os valores de vazão de injeção e volume a ser injetado, um valor de vazão de leitura foi ajustado na interface e procederam-se três injeções da solução do “branco” (água deionizada). Suas emissões fluorescentes foram detectadas e em seguida foram realizadas três injeções contendo padrão de cálcio. As emissões foram detectadas. Um outro valor de vazão de leitura foi ajustado na interface e sucederam as injeções do conjunto de soluções novamente. O intervalo de vazão de injeção avaliado foi de 0,15 -0,4 mL min⁻¹ e a escolha da condição otimizada considerou os seguintes aspectos: diferença da intensidade da fluorescência quando da injeção de solução padrão contendo Ca²⁺ para a solução do branco (água), razão sinal/ruído, estabilidade da linha de base (emissão do LED) e o coeficiente de variação do sinal para cada conjunto (branco e injeção de solução padrão). O valor considerado otimizado foi utilizado nos testes seguintes.

Um teste foi conduzido para avaliar se o tempo de parada de fluxo poderia aumentar a diferença de sinal fluorescente. Entretanto, baseado em resultados anteriores, (seção 5.2.3) pequenas variações no tempo de parada não tendem a proporcionar alterações proeminentes no sinal medido. Dessa forma, utilizando o resultado obtido na otimização da vazão de leitura, dois tempos de parada de fluxo foram avaliados: 5 segundos e 180 segundos.

Para finalizar a etapa de otimizações, foram avaliados os sinais proporcionados por diferentes concentrações de calceína frente à injeção do padrão de cálcio. Entretanto este teste deu-se de maneira diferentes ao apresentado na seção 5.2.3. Foram utilizados os parâmetros otimizados para medir as intensidades de fluorescência para as concentrações de 300, 400 e 500 mg L⁻¹ de calceína quando da injeção de uma solução padrão de cálcio (250 μmol L⁻¹), e não uma curva analítica.

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Avaliação da integração da célula de detecção fluorimétrica: discriminação de diferentes concentrações de fluoresceína em microssistemas fluídicos utilizando detecção óptica por imagens digitais.

Estes estudos foram conduzidos anteriormente ao emprego das otimizações univariadas e tinham por objetivo avaliar a integração da cela de detecção fluorimétrica ao dispositivo microfluídico. Para tal foi necessário verificar se em um microssistema, com a injeção de volumes menores do que os utilizados na aplicação em um sistema FIA convencional (seção 6.3) seria possível discriminar diferentes concentrações de fluoresceína por imagens digitais. Esta molécula foi utilizada como “molécula modelo”, pois a calceína é um agente complexante sintetizado a partir da fluoresceína e, ao complexar com os íons Ca²⁺, libera uma molécula de fluoresceína, a qual é responsável pela emissão fluorescente.

Para este teste preliminares, o diagrama de fluxo apresentado na Figura 57 foi empregado, sendo utilizado como carregador uma solução de bicarbonato 8 mmol L⁻¹ pH 8,0, e diferentes concentrações de fluoresceína na faixa de 0,1-0,5 mg L⁻¹ foram injetadas. Durante o andamento deste

teste, foi constatada a necessidade de se utilizar vazões da ordem de $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ para que o sinal fluorescente fosse registrado adequadamente pela interface gráfica desenvolvida.

A Figura 59A apresenta o fiograma obtido para as injeções dos padrões de fluoresceína e em B, a curva analítica obtida com as alturas dos picos referentes a componente G. Diferentemente do observado na seção 6.3 quando da utilização de duas FO (discriminação ocorreu pela componente R), nesta aplicação a discriminação de fluoresceína deu-se pela componente verde. Uma possível explicação estaria nos volumes utilizados de reagentes, sendo de apenas $12,5 \mu\text{L}$ de fluoróforo na aplicação da presente seção, enquanto na seção 6.3, o volume de fluoróforo utilizado era cerca de dez vezes maior, o que poderia ser responsável pela saturação do sinal da componente verde observada na seção 6.3 enquanto nesta aplicação, esse feito não foi observado.

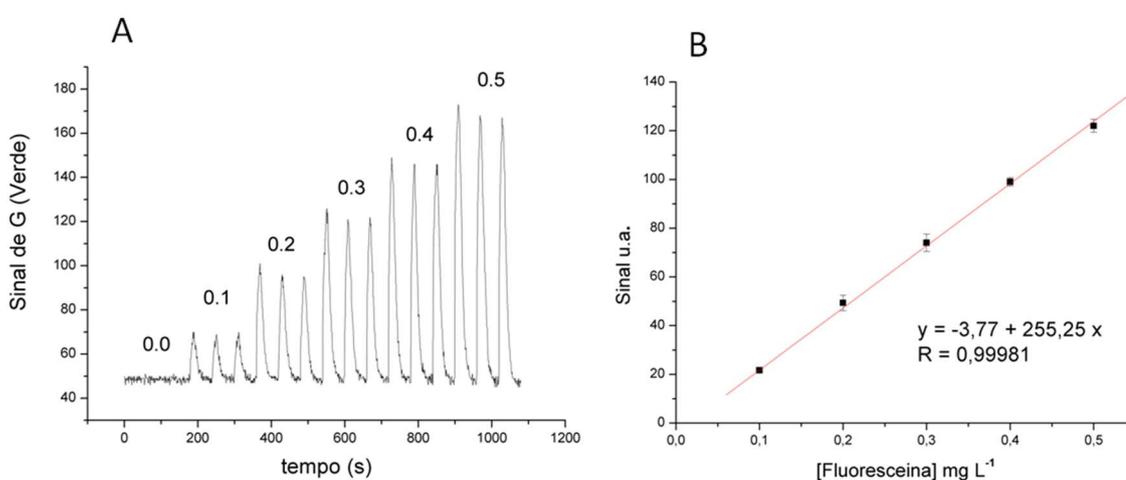


Figura 59. Fiograma obtido com a variação da componente G (A) e a curva analítica para a determinação de fluoresceína (B)

Em relação ao fiograma apresentado na Figura 59, é possível verificar que semelhantemente ao apresentado na seção 6.3, o sinal da linha de base não apresenta o valor “zero”, uma vez que este é referente a intensidade do sinal de fundo do LED. Novamente a linha de base manteve-se estável durante as medidas, indicando a eficácia do isolamento proporcionado pela caixa de madeira confeccionada. Pôde-se verificar que alturas dos picos tendem a aumentar conforme a concentração de fluoróforo aumenta. Adicionalmente, este fiograma apresenta uma frequência analítica de $59 \text{ injeções h}^{-1}$. Com relação à curva analítica, em concordância com o esperado de uma técnica de campo escuro, o intercepto está em um valor próximo de “zero”, esta curva conta com uma boa correlação linear ($R^2 = 0,999$) e uma sensibilidade de $255,25$ unidades de sinal/ mg L^{-1} de analito. Este valor elevado de sensibilidade já era de fato esperado em virtude dos resultados obtidos na seção 6.3. As barras de erro de pequena amplitude indicam uma boa repetitividade para as medidas. A precisão das medidas foi avaliada pelo CV, sendo obtido um valor de $3,2 \%$ para o padrão de fluoresceína de concentração $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, o qual apresentou a maior amplitude de barras de erro. Foi estimado um LD de $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ estimado pela equação $(3 * s_{y/x})/b$, onde “b” é o coeficiente angular e $s_{y/x}$ é o desvio dos seus resíduos.

Após estes resultados, foi atestado que a apesar da utilização de volumes da ordem de 12 μL , ou seja, um quinto do volume utilizado na seção 6.3, foi possível discriminar diferentes concentrações de fluoresceína em microdispositivos fluídico utilizando a detecção por imagens digitais, e este resultado indica que a cela de detecção fluorimétrica foi integrada ao microdispositivo com sucesso.

7.3.2 Parâmetros otimizados de análise

Após as otimizações serem realizadas, foram observados os valores de CV para cada parâmetro testado. A Figura 60 apresenta os resultados das otimizações realizadas.

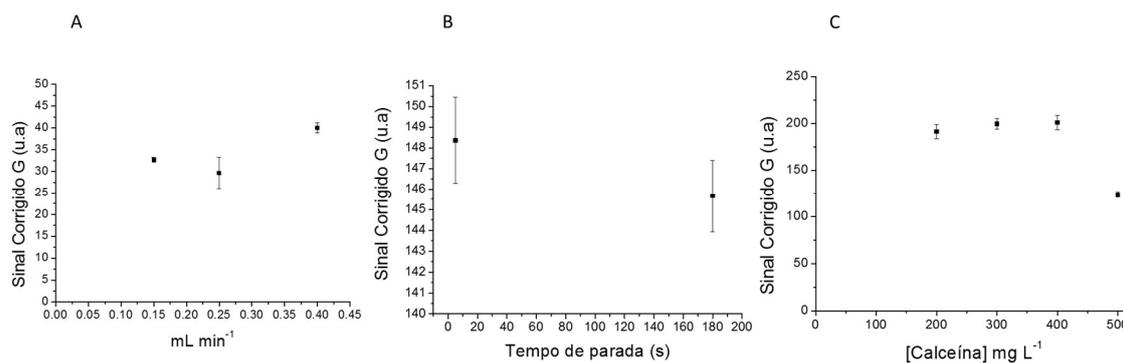


Figura 60: Gráficos de diferença de intensidade da emissão fluorescente para cada otimização univariada. (A) vazão de leitura. (B) tempo de parada de fluxo (C). concentração de calceína.

Apesar de as barras de erros aparentarem uma grande amplitude, as variações obtidas nos sinais corrigidos dos ensaios encontraram-se contempladas em um intervalo de 0,6 – 3,9 %, indicando uma boa repetibilidade para as medidas. Novamente, foi observado que o aumento do tempo de para de fluxo não proporcionou variações de sinal proeminentes, e assim, foi utilizado o valor de 5 segundos. Com os resultados obtidos pela etapa de otimização, a concentração de calceína utilizada foi selecionada como sendo de 400 mg L^{-1} .

7.3.3 Determinação da dureza da água em amostras de água mineral por fluorescência em μFIA com detecção por imagens digitais

Tendo sido realizadas as etapas de otimização, a determinação da dureza da água em amostras de água mineral para consumo humano foi realizada utilizando o diagrama de fluxo apresentado na Figura 57.. As condições otimizadas correspondem às apresentadas na seção 7.2.4.

O Diagrama obtido para as injeções dos padrões de Ca^{2+} e das soluções das amostras de águas minerais para consumo humano está apresentado na Figura 61. Diferentemente do observado nas outras determinações fluorimétricas realizadas neste trabalho (seções 7.3.1 e seção 6.3, configuração nº 7), o sinal da linha de base manteve-se próximo do valor “zero” para o monitoramento da componente G o que pode ser atribuído às configurações de câmera utilizadas (sem brilho e com matiz no valor 0). Além disso, o sinal da linha de base mostrou-se bastante estável durante as medidas, indicando a

eficácia do isolamento proporcionado pela caixa de madeira. Novamente, foi possível constatar que a estratégia de zona de mistura pôde proporcionar que a reação ocorresse no interior do microdispositivo, uma vez que as alturas dos picos tendem a aumentar com o aumento da concentração de Ca^{2+} . É interessante ressaltar o considerável valor para o sinal do branco, fato que não era esperado. Fonseca e Colaboradores [54] não obtiveram altos valores de intensidade para a solução do branco. Na aplicação desenvolvida neste capítulo, este fato poderia estar relacionado a qualidade do reagente (calceína) utilizado. Este foi adquirido por um custo reduzido, diferentemente do esperado de um reagente fornecido por fabricantes mais bem estabelecidos, e assim, apresentava um teor considerável de fluoresceína livre, responsável pelo alto valor de sinal para o branco.

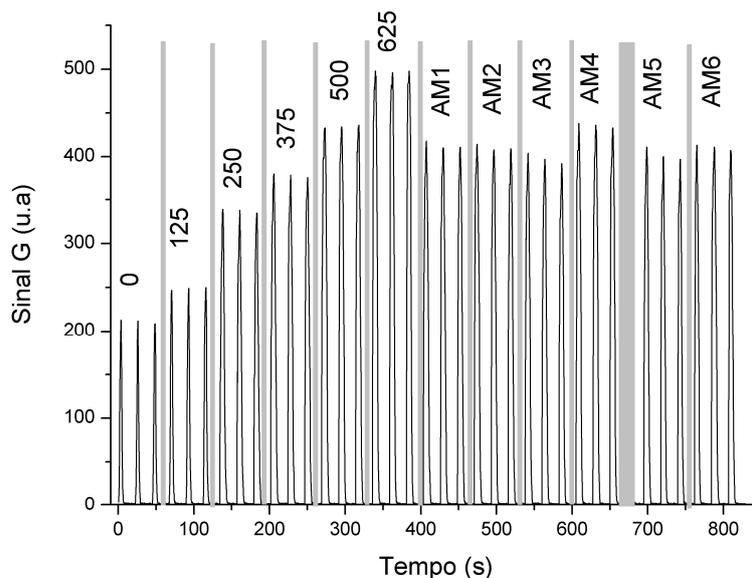


Figura 61: Diagrama obtido para determinação da dureza total da água em amostras de águas minerais para consumo humano empregando o conceito de zona de mistura. Compõe este diagrama os picos referentes aos cinco padrões de Ca^{2+} , com concentrações indicadas em $\mu\text{mol L}^{-1}$, picos referentes ao branco (0,0) e as seis amostras de águas minerais.

Deste diagrama, foram obtidos os valores de altura do sinal, proporcionais à concentração de Ca^{2+} , subtraindo-se das alturas dos picos referentes aos padrões de Ca^{2+} , o valor da altura média para os picos do branco. Os sinais estimados foram utilizados para a construção da curva analítica, representada na Figura 62, a qual apresentou uma boa correlação linear ($R^2 = 0,993$) e uma sensibilidade de 0,482 unidades de sinal/ $\mu\text{mol L}^{-1}$. Foram observadas barras de erros relativamente pequenas relacionadas aos pontos apresentados na curva analítica, o que indicou uma repetitividade satisfatória das medidas. Para as três injeções do padrão com $375 \mu\text{mol L}^{-1}$, solução padrão que apresentou o maior desvio de resíduos em relação à curva traçada, foi calculado um coeficiente de variação da intensidade de fluorescência de 2,0%.

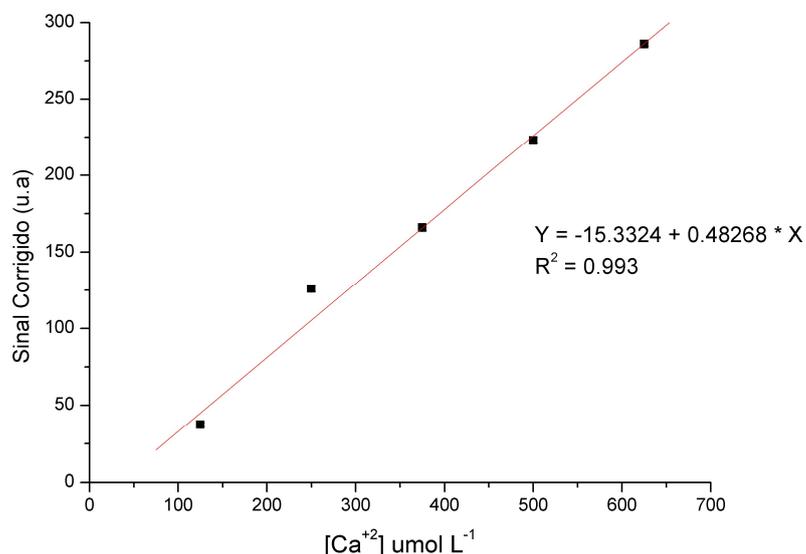


Figura 62: Curva analítica obtida para determinação da dureza total de amostra de águas minerais para consumo humano. Faixa de concentração de 125- 625 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Pode-se observar que o intercepto em “y” não passa pela origem, semelhantemente ao observado na discriminação de fluoresceína na seção anterior. Foi estimado um limite de detecção de $80 \mu\text{mol L}^{-1}$, baseado na equação $(3 * s_{y/x})/b$, onde “b” é o coeficiente angular e $s_{y/x}$ é o desvio dos seus resíduos. Com relação à frequência analítica, foi observada um valor apreciável de $160 \text{ injeções h}^{-1}$

Segundo a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde [45], a qual dispõe sobre os padrões de potabilidade e regulamenta os valores máximos permitidos para diversas substâncias presentes na água para consumo humano, a dureza total da água (Fe, F, Ca, Mg etc.) não deve ser superior a 500 mg L^{-1} . Para os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} uma vez quantificados, a soma das quantidades de matéria destes íons é denominada de dureza temporária da água e pode ser expressa na forma de mg L^{-1} de CaCO_3 .

Com relação às amostras de águas minerais, os resultados obtidos com a estratégia proposta foram comparados com os valores obtidos pelo método padrão e estão apresentados na Tabela 10. Ao comparar os valores obtidos pelo método proposto com os determinados pelo método de referência, podem ser observados erros relativos menores que 7,0 %. Observa-se ainda que estes erros posicionaram-se acima e abaixo dos valores determinados pelo método de referência, indicando a possível ausência de erros sistemáticos para o método proposto. Um teste t pareado foi conduzido para verificar se há diferenças significativas entre os resultados dos dois métodos a um nível de confiança de 95%. Foi constatado que não há diferença significativa.

Tabela 10: Resultados obtidos para a determinação da dureza total de amostras de águas minerais para consumo humano pelo método proposto (μ FIA) e pelo método de referência (MR*)

Amostra	μ FIA (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	MR*	Erro Relativo (%)
AM1	89,9 ± 1,8	87,2 ± 0,5	3.1
AM2	88,8 ± 1,3	87,2 ± 4,6	1.8
AM3	59,7 ± 1,7	61,3 ± 2,6	-2.6
AM4	145,9 ± 1,5	136,5 ± 4,6	6.9
AM5	85,6 ± 3,0	86,3 ± 6,0	-0.7
AM6	148,3 ± 2,1	155,7 ± 2,6	-4.7

MR* como sendo titulação complexométrica com EDTA.

7.4 Conclusões parciais e perspectivas

Tanto o teste preliminar realizado com fluoresceína, quanto a determinação de íons cálcio e magnésio realizados neste capítulo apresentaram boas correlações lineares ($R^2 = 0,999$ e $0,993$ para fluoresceína e calceína respectivamente), interceptos próximos de “zero”, foram obtidos LD de fato atingíveis e uma frequência analítica apreciável para a determinação utilizando calceína e para a discriminação de fluoresceína, uma sensibilidade elevada foi observada. Estes benefícios foram obtidos utilizando um microdispositivo fluídico de baixo custo de produção, de fácil fabricação, com um sistema de detecção de fácil operação e custo reduzido. Apesar da faixa de concentração utilizada na determinação de Ca^{2+} apresentada neste capítulo ter a mesma ordem de grandeza que a apresentada em determinações fluorimétricas realizadas em sistemas FIA convencionais, as conquistas mais apreciáveis demonstradas por estas aplicações foram a construção de um microdispositivo fluídico que já possui de forma integrada uma cela para detecções fluorimétricas, que conta com uma instrumentação que dispensou o uso de filtros ópticos e um sistema de detecção de baixo custo constituído por uma *webcam* comercial que apresentou uma sensibilidade adequada para as aplicações apresentadas.

Em relação ao trabalho de Fonseca e colaboradores[54], os limites de detecção obtidos foram mais elevados, sendo de $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ na aplicação apresentada, enquanto os autores citados obtiveram o valor de $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$. Acredita-se que este fator possa estar ligado ao sistema de detecção, que de fato apresentou uma sensibilidade menor do que uma fotomultiplicadora, mas também na qualidade do fluoróforo utilizado, conforme discutido anteriormente. Em relação a frequência analítica, os autores citados obtiveram um valor de $40 \text{ injeções h}^{-1}$, enquanto na proposta apresentada, foram obtidas $160 \text{ injeções h}^{-1}$, sendo obtido um desempenho superior neste aspecto.

Uma outra vantagem encontrada nas aplicações desenvolvidas está no monitoramento contínuo proporcionado pela detecção por imagens digitais, o que possibilita que possíveis interferentes, como

bolhas, possam ser visualizados durante a realização das medidas, o que propicia que em diversas situações, esses problemas possam ser contornados, facilitando o trabalho do analista. A instrumentação desenvolvida também apresenta maior facilidade operacional, diferentemente de uma fotomultiplicadora. Ainda pode ser ressaltado que o uso dos microssistemas reduz o consumo de reagentes, e o volume de resíduos gerados, sendo produzidos 100 mL de resíduos para uma jornada de trabalho de 6 h. Para estas aplicações, novas otimizações, podem ser conduzidas para melhorar a eficiência da detecção e para aumentar as possibilidades dos sistemas miniaturizados, outras determinações podem ser estudadas.

Capítulo 8- Conclusões Gerais e Referências Bibliográficas

8.1 Conclusões Gerais

Os dados apresentados mostram a versatilidade dos microssistemas fluídicos e o bom desempenho para realizar determinações quimiluminescentes e fluorescentes. Foi demonstrado que o uso de imagens obtidas a partir de uma *webcam* permitem realizar determinações em microssistemas fluídicos. A utilização de uma *webcam* tornou o sistema de detecção pouco dispendioso e mais simples, podendo ser operado por pessoas pouco familiarizadas com as instrumentações analíticas convencionais. Além disso, a interface desenvolvida permite o monitoramento do sinal analítico continuamente, o que favorece a avaliação preliminar do dispositivo em relação a aplicação desejada.

Os dispositivos confeccionados durante a execução deste trabalho podem ser confeccionados com rapidez e facilidade, sem a necessidade de ambientes especiais (salas limpas) e reagentes tóxicos. Outra vantagem na construção dos dispositivos está no fato de estes apresentarem celas de detecção integradas, o que constitui uma vantagem, pois estas costumam apresentar custos elevados, instrumentação específica e são difíceis de serem desenvolvidas. Já os dispositivos confeccionados são facilmente fabricados em diversas configurações, apresentam boa durabilidade e resistência, custos bastante reduzidos e contam com bastante versatilidade, uma vez que os *layouts* podem ser adaptados a diversas aplicações.

Apesar dos benefícios oferecidos pela detecção com imagens digitais, de fato os LD obtidos são consideravelmente maiores do que os obtidos com detectores mais sensíveis, como a PMT. Entretanto, é possível aplicá-los a determinações que não exijam sensibilidade tão elevada e é possível que a detecção por sistemas de respostas tricromados, como o RGB também possa favorecer a seletividade, uma vez que determinada espécie pode responder pra uma componente melhor do que para outra componente

Outras possibilidades que podem ser exploradas, tanto para estas aplicações como para outras, estão o uso de parâmetros de imagem além do RGB, como o CMYK, bem como desenvolver recursos na interface do programa que possibilitem desenhar regiões de aquisição de dados em diversos formatos. Outras possibilidades a serem exploradas estão em outros tipos de detecções como a fotometria molecular, e por fim, a miniaturização total, realizando detecções a partir de *smartphones*. Considerando que o sistema de detecção e o microssistema de análise já foram miniaturizados, deseja-se utilizar dispositivos para processamentos dos dados e propulsão das soluções que também sejam miniaturizados e assim, obter um sistema de análise totalmente portátil, para a continuidade deste projeto.

8.2 Referências Bibliográficas

- 1 Coltro, W. K. T.; Piccin, E.; Carrilho, E. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1986.
- 2 Karsten, S. L.; Tarhan, M. C.; Kudo, L. C.; Collard, D.; Fujita, H. ;*Talanta* **2015**, *145*, 55.
- 3 Dusse, L. M. S.; Oliveira, N. C.; Rios, D. R. A. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* **2012**, *27*, 296.
- 4 O'Neal, C. L.; Crouch, D. J.; Fatah, A. A. ;*Forensic Sci. Int.* **2000**, *109*, 189.
- 5 Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. M. ;*Sensors Actuators B Chem.* **1990**, *1*, 244.
- 6 Hou, H. W.; Bhagat, A. A. S.; Lee, W. C.; Huang, S.; Han, J. *Micromachines* **2011**, *2*, 319.
- 7 Lounsbury, J. A.; Karlsson, A.; Landers, J. P. **2013**, *13*.
- 8 Wu, W.; Trinh, K. T. L.; Zhang, Y.; Yoon Lee, N. ;*RSC Adv.* **2015**, *5*, 12071.
- 9 Leite, O. D.; Vieira, H. J.; Fatibello-Filho, O.; Rocha, F. R. P. ;*J. Braz. Chem. Soc.* **2010**.
- 10 Diercks, A. H.; Ozinsky, A.; Hansen, C. L.; Spotts, J. M. A. ;*Anal. Biochem.* **2009**, *386*, 30.
- 11 Lee, D.; Kim, Y. T.; Lee, J. W.; Kim, D. H.; Seo, T. S. ;*Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 273.
- 12 Kang, L.; Chung, B. G.; Langer, R.; Khademhosseini, A. ;*Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 1.
- 13 Tsui, J. H.; Lee, W.; Pun, S. H.; Kim, J.; Kim, D.-H. ;*Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1575.
- 14 Eribol, P.; Uguz, A. K.; Ulgen, K. O. ;*Biomicrofluidics* **2016**, *10*, 011502.
- 15 Du, G.; Fang, Q.; den Toonder, J. M. J. ;*Anal. Chim. Acta* **2016**, *903*, 36.
- 16 Lee, G. Bin; Chen, S. H.; Huang, G. R.; Sung, W. C. *Sensors Actuators, B Chem.* **2001**, *75*, 142.
- 17 Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4974.
- 18 Fonseca, A.; Raimundo, I. M.; Rohwedder, J. J. R.; Ferreira, L. O. S. ;*Anal. Chim. Acta* **2007**.
- 19 Sotomayor, M. D. P. T. ;*Quim. Nov.* **2008**, *31*, 1755.
- 20 Skoog, D. a.; West, D. M.; Holler, F. J.; Couch, S. R. ;*Fundam. Química Analítica* **2005**.
- 21 Mogensen, K. B.; Kutter, J. P. ;*Electrophoresis* **2009**, *30*, 92-100
- 22 Bishop, S. C.; Lerch, M.; McCord, B. R. ;*J. Chromatogr. A* **2007**, *1154*, 481.
- 23 Hellmich, W.; Greif, D.; Pelargus, C.; Anselmetti, D. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1130*, 195.
- 24 Sauer-Budge, A. F.; Mirer, P.; Chatterjee, A.; Klapperich, C. M.;. ;*Lab Chip* **2009**, *9*, 2803.
- 25 Mogensen, K. B.; Klank, H.; Kutter, J. P. ;*Electrophoresis* **2004**, *25*, 3498.
- 26 Jorgensen, A. M.; Mogensen, K. B.; Kutter. *Sensors and Actuators B*, **2003** ,*90*, 15–21
- 27 Lv, Y.; Zhang, Z.; Chen, F. ;*Talanta* **2003**, *59*, 571.
- 28 Borges, E.; Fernandes, E.; Reis, B. F. ;*Quim. Nova* **2002**, *25*, 1191.
- 29 Leite, O. D.; Fatibello-Filho, O.; Rocha, F. R. P. ;*Quim. Nova* **2004**.
- 30 Byrne, L.; Barker, J.; Pennarun-Thomas, G.; ;*TrAC - Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 517.
- 31 R.; Rafael, D.; Lima, D. Engenho . **2014**, *9*, 63.
- 32 Lyra, W.; dos Santos, V. B.; Dionízio, A. G. G.; Martins, V. L. *Talanta* **2009**, *77*, 1584.
- 33 Gaiao, E. D. N.; Martins, V. L.; Lyra, W. D. S.; Almeida. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *570*, 283.
- 34 Maleki, N.; Safavi, a.; Sedaghatpour, F. ;*Talanta* **2004**, *64*, 830.

-
- 35 Lopez-Molinero, A.; Liñan, D.; Sipiera, D.; Falcon, R. ;*Microchem. J.* **2010**, *96*, 380.
- 36 Andrade, S. I. E.; Lima, M. B.; Barreto, I. S.; *Microchem. J.* **2013**, *109*, 106.
- 37 Balsam, J.; Bruck, H. A.; Kostov, Y. *Sens. Actuators. B. Chem.* **2012**, *171-172*, 141.
- 38 Rajendran, V. K.; Bakthavathsalam, P.; Jaffar Ali, B. M. ;*Microchim. Acta* **2014**, *181*, 1815.
- 39 Espinosa Bosch, M.; Ruiz Sánchez, A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *42*, 291.
- 40 ANVISA *Farmacopéia Brasileira*; 2010; Vol. 5.
- 41 Ratna Shrestha, B.; Ram Pradhananga, R. ;*J. Nepal Chem. Soc* **2009**, *24*.
- 42 Suarez, W. T.; Vieira, H. J.; Fatibello-Filho, O. ;*Eclética Química* **2005**, *30*, 21.
- 43 Oliveira, G. G.; Janegitz, B. C.; Batistão, M. B.; Salami, F; Fatibello-Filho. *Quim. Nova* **2009**.
- 44 Haslag, C. S.; Richter, M. M. ;*J. Lumin.* **2012**, *132*, 636.
- 45 Ministério do Meio Ambiente *Portaria nº 2914/2011*; Brasil, 2011.
- 46 Baccan, N.; Andrade, J. C. *Química analítica quantitativa elementar*; Edgard Blucher, 2001.
- 47 Lopez-Molinero, A.; Cubero, V. T.; Irigoyen, R. D.; Piazuolo, D. S. ;*Talanta* **2013**, *103*, 236.
- 48 Lapresta-Fernández, a.; Capitán-Vallvey, L. F. ;*Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 328.
- 49 Chimpalee, N.; Chimpalee, D.; Jarungpattananon, R. ;*Anal. Chim. Acta* **1993**, *271*, 247.
- 50 Ruzicka, J.; Hansen, H. ;*Anal. Chim. Acta* **1983**, *145*, 1.
- 51 Fonseca, A.; Raimundo, I. M.; Rohwedder, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *603*, 159.
- 52 Sampaio, T. R.; Fonseca, A. ;*Sensors Actuators B Chem.* **2015**, *213*, 215.
- 53 Miró, M.; Hansen, E. H. ;*Anal. Chim. Acta* **2007**, *600*, 46.
- 54 Fonseca, A. *Construção e Avaliação de Microssistemas para Análise em Fluxo*, Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- 55 Roulet, J. C.; Völkel, R.; Herzig, H. P.; Verpoorte, E.; De Rooij, N. F.; Dändliker, R. ;*J. Microelectromechanical Syst.* **2001**