



UnB

Instituto de Química

Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Química

SISTEMA MICROFLUÍDICO EQUIPADO COM MICROBOMBAS PIEZOELÉTRICAS
PARA A REALIZAÇÃO DE ANÁLISES POR QUIMILUMINESCÊNCIA

Aluna: Maria Luíza de Andrade Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília – DF
2019



UnB

Universidade de Brasília
Instituto de Química

Maria Luíza de Andrade Rodrigues

**SISTEMA MICROFLUÍDICO EQUIPADO COM MICROBOMBAS
PIEZOELÉTRICAS PARA A REALIZAÇÃO DE ANÁLISES POR
QUIMILUMINESCÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso em Ensino de Química apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Química.

Orientador: Alexandre Fonseca

1.º/2019

DEDICATÓRIA

[...] Pela intercessão de Nossa Senhora Rainha da Paz, colocamo-nos ao Vosso serviço [...] e, mesmo assim, se houver quedas, que com o auxílio da Tua graça, possamos recomeçar. A vida em Ti é peregrinar, pois Tu és o nosso pastor e nada nos faltará.

*Oração do Pastoreio - Grupo Jovem Cristão de
Brasília*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos órgãos de fomento que permitiram a realização dessa pesquisa: CAPES e CNPq. Agradeço também ao aluno Luiz Felipe por todas as contribuições no trabalho em questão.

Muitas foram as pessoas que estiveram ao meu lado e me apoiaram para que eu pudesse chegar até essa etapa da minha formação acadêmica. Minha mãe (Zélia), meu pai (José Roberto) e meus irmãos (João Roberto e Vinícius) foram, sem dúvida, o meu suporte principal em todos os âmbitos da minha vida e é justamente à minha família e a Deus que quero dedicar este trabalho. Essa família também conta com uma muito querida: tia Cleia, meu muito obrigada pelos conselhos sábios. Bem, posso dizer que possuo pais que não são de sangue, mas de consideração. Estes são a Dona Vanda e o Seu Luciano que, juntamente com seus filhos, me acompanharam e me ajudaram em momentos bons e ruins.

Recentemente, justo nessa fase de final de curso, surgiu um ser humano incrível com o qual eu aprendo todos os dias: muito obrigada pela paciência e por ser desse jeitinho, Matheus Sampaio! Já DEUS certo!

Há uma frase que diz que “quem tem amigos, tem tudo” e eu posso afirmar que tenho os melhores amigos do mundo aos quais também quero agradecer nesse trabalho. São eles:

Meus amigos de infância: Caio Henrique, Andreza Marques e Luíza Marina

Meus melhores presentes do 2º ano do Ensino Médio: Ana Luiza e Bárbara Carolina

Minhas companheiras de viagens: Gabriela Rennó, Geovanna Pires e Juliana Luzio

Meus amigos Marcão, André, Alex, Mirella, Nathália, Ana Luiza, Vivian e Leane.

Meus amigos da faculdade: Izabella, Eduardo, Karine e Paula Mayumi

Meus companheiros de trabalho: Amanda, Ana Rosa, Dhyan, Hanna, Marcão e Sarah

Ao Grupo Jovem Pastoreio e aos meus amigos da Equipe Sala e da Equipe Copa

Aos meus alunos e ex-alunos

Além disso, gostaria de agradecer ao Guilherme Alves por toda contribuição nesse TCC. Que Deus ilumine você e toda a sua família. Por fim, e de modo especial, gostaria de agradecer ao Professor Dr. Alexandre Fonseca por ter me orientado não só nesse trabalho, mas em outras pesquisas sendo um exemplo de pessoa e de profissional.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. Introdução.....	8
2. Fundamentação Teórica.....	10
3. Objetivos.....	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivo Específico	13
4. Materiais e Métodos	14
5. Estudos com Microbombas e WebCam.....	16
5.1 Procedimentos para Construção do Microdispositivo.....	16
5.2 Estrutura de suporte das bombas, do microdispositivo, dos frascos para armazenamento das soluções e do <i>smartphone</i>	20
5.3 Princípio de funcionamento das micro-bombas com acionamento piezoelétrico.....	21
5.4 Controle das micro-bombas piezoelétricas	22
6. Análise Preliminar	24
6.1 Reagentes	24
6.2 Solução Estoque	24
6.3 Soluções de Trabalho	24
6.4 Procedimento Experimental.....	24
7. Estudos com <i>Smartphone</i>	27
8. O Aplicativo	30
9. Resultados e Conclusões	35
10. Referências Bibliográficas.....	38

RESUMO

Ao longo dos anos, diversas pesquisas foram desenvolvidas na área da Química Analítica voltadas para a construção de equipamentos miniaturizados e portáteis. Nessa perspectiva, foram criados os microdispositivos fluídicos, que consistem num conjunto de ductos com proporções da ordem de micrômetros impressos em um substrato pelos quais se dá a passagem das soluções necessárias para análise. Esses microssistemas permitem o consumo de uma menor quantidade de reagentes e amostra; produzindo, inclusive, menos resíduos durante a determinação. Além disso, eles proporcionam um maior número de análises e podem apresentar resultados analíticos semelhantes ou até mesmo mais satisfatórios se comparados aos métodos usualmente empregados. No entanto, nota-se que a miniaturização e a portabilidade do sistema como um todo são prejudicados devido às dimensões dos dispositivos de bombeamento das soluções, das válvulas e dos detectores dos sinais analíticos, bem como devido ao fato desses três componentes serem controlados por um computador. Perante o exposto, o trabalho em questão propõe a construção de um aparato para análises baseadas em reações quimiluminescentes de fato miniaturizado e portátil, constituído por *chips* microfluídicos conectados a micro-bombas com acionamento piezoelétrico para injeção das soluções nos microcanais, cujos comandos são fornecidos por meio de comunicação *bluetooth* enviada por um *smartphone* no qual se encontra instalado um aplicativo desenvolvido na linguagem Java de programação. Ademais, esse aplicativo também possui a função de captar a luminescência da reação em tempo real para que os analitos possam ser determinados com base nos valores do sistema RGB das imagens.

Palavras-chaves: microssistema fluídico, quimiluminescência, imagens digitais.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

App	Aplicativo
CI	Circuito Eletrônico Integrado
CV	Coefficiente de Variação
LD	Limite de Detecção
LOCs	<i>Lab on a Chip</i> (em português: “laboratório em um chip”)
PLA	Ácido Polilático
PMDS	Polidimetilsiloxano
TCC	Trabalho de Conclusão de Curso
USB	<i>Universal Serial Bus</i> (em português: “porta universal”)
UV	Ultravioleta
3D	Terceira Dimensão
μTAS	<i>MicroTotal Analytical Systems</i> (em português: “microssistemas de análise total”)

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Hurtubise [1], a luminescência consiste em uma radiação que átomos ou moléculas emitem no momento em que ocorre a transferência eletrônica de um nível excitado de energia para um estado de menor energia. Para que ocorra a luminescência, há a necessidade de que o material luminescente absorva certa quantidade de energia a fim de que ocorra a promoção dos elétrons de seu nível fundamental para um estado mais energético [2]. A Figura 1 mostrada abaixo exhibe simplificada o chamado *Diagrama de Jablonski*, que mostra a transição dos elétrons de uma molécula do estado fundamental para o estado excitado após absorverem energia, bem como a posterior emissão de energia excedente.

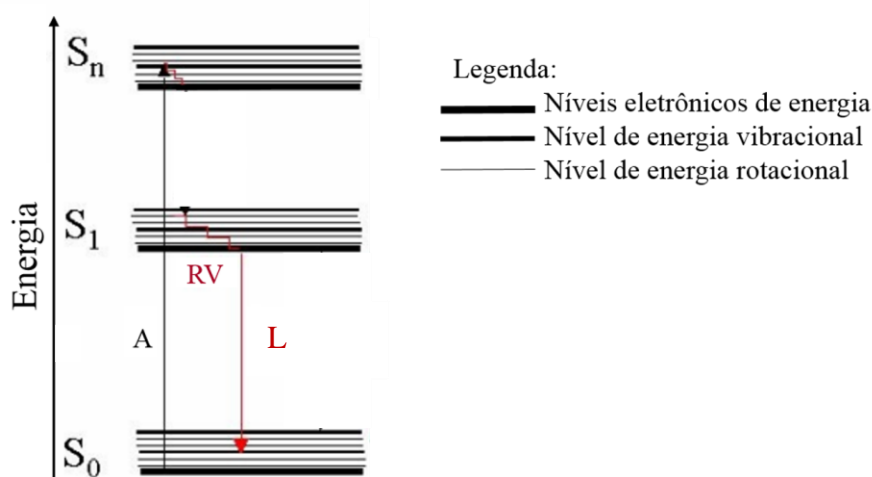


Figura 1 – Diagrama simplificado de Jablonski adaptado de Coelho, 2004 [3], em que: a molécula se encontra no seu estado fundamental em S_0 e os níveis S_1 e S_n representam os estados excitados. (A) ilustra a absorção de energia que leva à transição eletrônica de S_0 para S_n . (RV) equivale ao relaxamento vibracional. (L) é a luminescência.

O relaxamento vibracional (RV) se refere às transições vibracionais que acontecem em um mesmo nível eletrônico. Nesse processo, não há emissão de radiação eletromagnética [3].

Existem diferentes tipos de luminescência e a classificação é feita de acordo com o tipo de energia responsável pela excitação [4]. Alguns tipos de luminescência são: a piroluminescência, em que o calor é a fonte de energia que promove a espécie química ao seu estado excitado; a fotoluminescência, na qual os fótons provocam a excitação do material, a quimiluminescência, cuja emissão de luz se dá durante uma reação química, dentre outros [4].

A literatura reúne diversas pesquisas voltadas para análises baseadas em quimiluminescência que utilizam a instrumentação clássica, a qual apresenta custo elevado e não pode ser operada fora do ambiente de laboratório.

Na tentativa de miniaturizar os equipamentos empregados nesse tipo de determinação, alguns estudos foram realizados usando-se microdispositivos de análise em fluxo. Contudo, ainda há limitações na miniaturização e a portabilidade do sistema como um todo, uma vez que as válvulas, os dispositivos de bombeamento e os detectores de sinais possuem dimensões significativamente superiores em comparação ao sistema microfluídico (chip). Outro empecilho é o fato do controle dos três elementos citados anteriormente ser feito por meio de um computador, o que aumenta o tamanho do sistema como um todo.

O problema associado aos tamanhos das bombas e das válvulas em relação às dimensões dos microdispositivos pode ser solucionado com o emprego de mini-bombas piezoelétricas ou peristálticas e de micro-válvulas solenoides, que permitem acionamento por meio de comunicação via *bluetooth* e inclusive já são encontradas no mercado atualmente.

Já o obstáculo causado pelos comandos dados por meio do computador pode ser resolvido utilizando-se telefones celulares (*smartphones*). A utilização de *smartphones* pode servir também para obtenção de imagens digitais através da câmera (substituindo-se, então os detectores convencionais). A câmera integrada ao celular captura as imagens de luminescência e a determina os analitos com base nos valores de RGB das cores verificadas nas imagens [5].

Diversos trabalhos relatam a efetividade do emprego de imagens adquiridas por câmeras de *smartphones* em determinações que empregam os chips microfluídicos. Barbosa et. al [6], por exemplo, realizaram a determinação do chamado antígeno prostático específico utilizando um dispositivo microfluídico, cujo substrato era constituído por um fluoro-polímero e a quantificação colorimétrica da espécie de interesse foi feita com o auxílio de um *smartphone*. Vale ressaltar ainda que, nessa pesquisa, o sistema de propulsão dos fluidos era manual, portanto, o *smartphone* não foi usado para o controle das soluções.

Diante do exposto, a elaboração de um sistema analítico microfluídico para determinações por quimiluminescência efetivamente miniaturizado e portátil pode ser alcançada ao se construir uma instrumentação constituída por um microdispositivo fluídico acoplado a mini-válvulas e mini-bombas piezoelétricas controladas por um *smartphone* que, além de comandar o funcionamento do sistema de propulsão de fluidos, também realiza a detecção dos sinais.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Diversas pesquisas científicas são desenvolvidas com o intuito de reduzir as dimensões dos sistemas analíticos. A miniaturização dos equipamentos empregados em análises químicas é almejada desde a década de 40, mas somente no ano de 1975 foi registrado o primeiro aparelho miniaturizado: um instrumento de cromatografia gasosa [7]. O interesse em diminuir o tamanho dos dispositivos está associado não somente à possibilidade de portabilidade dos mesmos, mas também ao menor consumo de reagentes e amostras, à redução da quantidade de resíduos produzidos, ao maior número de determinações e aos resultados analíticos semelhantes ou até melhores se comparados aos métodos comumente utilizados [8].

Manz e colaboradores [9] propuseram o conceito das chamadas *micro total analytical systems* (conhecidas como μ TAS) e que, em português, correspondem a “microssistemas de análise total”. Com isso, a miniaturização de sistemas analíticos passou a ser o foco de diversos estudos e pesquisas. De acordo com os autores, um μ TAS consiste num dispositivo com tamanhos diminutos com capacidade de efetuar uma determinação química em sua totalidade (isto é, a partir do processamento da amostra em questão até a detecção da espécie de interesse). Ademais, a análise química feita por um μ TAS é automatizada, rápida e utiliza quantidades reduzidas de reagentes. Os microssistemas de análise total também são conhecidos como “laboratório em um chip” (ou *lab on a chip* em inglês, cuja sigla é LOCs).

Para cumprir as exigências definidas para se obter um μ TAS, diversas pesquisas voltadas para a construção de microdispositivos vêm sendo desenvolvidas. Além disso, a instrumentação *lab-made* é, ultimamente, alvo de estudos para determinadas análises; proporcionando, na maioria das vezes, resultados similares àqueles adquiridos por métodos comumente empregados. A literatura mostra que dispositivos do tipo *lab-made* podem ser empregados para diversas finalidades, tais como ensaios imunológicos, determinação de fármacos e separação de biomoléculas.

À procura das vantagens proporcionadas pela miniaturização, diversos grupos de pesquisas na área de Química Analítica se voltaram à construção, aplicação e avaliação dos chamados sistemas microfluídicos. Estes, por sua vez, consistem em um conjunto de microcanais (isto é, ductos cujas dimensões são da ordem de micrômetros) impressos em um substrato que pode ser de natureza polimérica, de vidro, dentre outros. É por esses canais que

ocorre a passagem das soluções empregadas na determinação [10]. Além de sistemas microfluídicos, esses dispositivos também são conhecidos como *chips* microfluídicos pela semelhança entre suas dimensões e às de CI – circuito eletrônico integrado.

Muitos microdispositivos foram construídos para utilização em separações eletroforéticas, tais como separações de fármacos, de biomoléculas, de compostos quirais, de cátions e ânions, dentre outros [11]. Além disso, os microssistemas fluídicos também permitem detecções por fluorescência, quimiluminescência e detecções eletroquímicas [11].

As análises baseadas em reações quimiluminescentes necessitam de uma simples instrumentação que envolve somente um detector (na maioria das vezes, uma fotomultiplicadora) e um recipiente de reação específico. Visto que a reação química entre o reagente e o analito é a única fonte de radiação, de modo geral, não se utiliza um equipamento de seleção de comprimento de onda para esse tipo de determinação [12]. Apesar de ser uma aparelhagem mais elementar se comparada àquelas empregadas em medidas de fluorescência ou fosforescência, os componentes dessa instrumentação não permitem análises *in situ*.

Os dispositivos microfluídicos são uma alternativa para a miniaturização e a possível portabilidade da instrumentação necessária para determinações por quimiluminescência. No ano de 2003, Jorgensen e colaboradores [13] empregaram um sistema luminol-peróxido de hidrogênio para analisar as enzimas glucose oxidase, colina oxidase e lactato oxidase por quimiluminescência utilizando um chip microfluídico à base de filmes de silício e silicone. As enzimas em questão geram H₂O₂ em locais com bastante disponibilidade de água. A reação entre o peróxido de hidrogênio produzido pelas enzimas citadas e o luminol num meio com determinado pH é quimiluminescente.

Para diminuir o custo e a complexidade do arranjo eletrônico associados às detecções ópticas, os detectores normalmente utilizados (fotomultiplicadoras) podem ser substituídos por câmeras de *webcam*. Além desses benefícios, esses aparelhos de imagens digitais permitem o processamento dos dados obtidos em computador por meio de programas de *softwares*.

Diversos trabalhos retratados na literatura utilizam sistemas microfluídicos acoplados a instrumentos de propulsão e controle das soluções, que possuem dimensões muito maiores que os próprios microssistemas. As válvulas solenoides e as bombas peristálticas são comandadas por computador e suas dimensões representam a maior parcela do tamanho de

todo o sistema. Estes dois fatores aliados à necessidade de conexão da *webcam* com um computador limitam a miniaturização do sistema fluídico.

Uma possível solução para o problema do tamanho das válvulas e das bombas seria o emprego de micro-válvulas solenoides e de bombas piezoelétricas para a orientação e o impulsionamento das soluções nos chips microfluídicos. Para resolver a questão do comando por computador, essas micro-bombas e micro-válvulas podem ser controladas por *smatphones* e pode - se adotar baterias para o sistema de alimentação das mesmas. Ademais, os *smatphones* também podem ser usados para a obtenção das imagens digitais em tempo real (em substituição às câmeras de *webcam*) e determinação das espécies químicas por meio das análises dos sinais RGB.

Li e colaboradores [14] conseguiram desenvolver um sistema de fato portátil formado por um dispositivo microfluídico de PMDS (polidimetilsiloxano) acoplado a um sistema de propulsão e de válvulas pneumáticas, cujo controle era feito por meio de um *smartphone*. Contudo, essa instrumentação apenas pode ser empregada em dispositivos elastoméricos e não se encontra disponível no mercado.

Devido ao desenvolvimento da microfluídica, algumas empresas começaram a construir e disponibilizar comercialmente válvulas e bombas para chips microfluídicos. Atualmente, é possível adquirir válvulas solenoides e micro-bombas piezoelétricas que podem com dimensões da ordem de milímetros e volume morto inferior a 1,0 μL .

A Figura 2 abaixo representa esquematicamente um sistema analítico microfluídico para determinações por quimiluminescência de fato miniaturizado e portátil, de acordo com os aspectos instrumentais nessa seção.

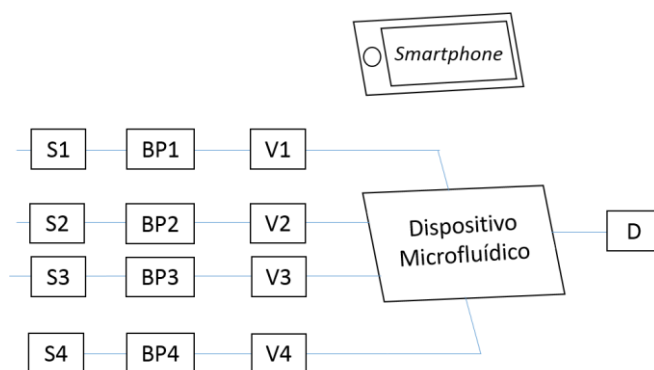


Figura 2 – Diagrama esquemático de um sistema fluídico para análises por quimiluminescência miniaturizado e portátil. As soluções S1, S2, S3 e S4 empregadas na determinação são bombeadas pelas bombas piezoelétricas BP1, BP2, BP3 e BP4, respectivamente. Após serem bombeadas, as válvulas V1, V2, V3 e V4 fazem o direcionamento dos fluidos pelos canais do dispositivo microfluídico. As bombas e válvulas são controladas por um *smartphone*, cuja câmera realiza a detecção dos sinais analíticos. Ao final da análise, as soluções são levadas a um frasco de descarte (D).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O trabalho em questão tinha como finalidade a construção, avaliação e aplicação de um sistema analítico microfluídico portátil que contasse com o emprego de um aparelho de *smartphone*, no qual estaria instalado um aplicativo que desenvolvesse as funções de controlar o acionamento das micro-bombas piezoelétricas e realizar as detecções ópticas da reação luminescente.

3.2 Objetivo Específico

O sistema desenvolvido é constituído por um dispositivo microfluídico de uretano-acrilato associado a mini-bombas com acionamento piezoelétrico. Todo o sistema analítico foi acomodado em uma estrutura com dimensões que permitiam que ela coubesse na palma da mão e a instrumentação completa (envolvendo inclusive o aparelho *smartphone* e as fontes de alimentação) pese menos que 1,0 kg. Além disso, espera-se que o sistema desenvolvido consiga ser aplicado com êxito na análise de paracetamol em amostras de fármacos com um menor gasto de reagentes e performance analítica semelhante ou até superior em relação aos métodos clássicos de determinação por quimiluminescência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em 5 processos, a saber:

- a) Elaboração de chips microfluídicos à base de uretano-acrilato e conexão do microssistema com micro-bombas piezoelétricas. Desenvolvimento de programação para Arduino Nano que permita o controle das bombas piezoelétricas.
- b) Construção de uma estrutura para acomodação do dispositivo microfluídico, do sistema de gerenciamento de fluidos, dos frascos de armazenamento de soluções e do *smartphone*.
- c) Avaliação do sistema na determinação de paracetamol baseada em quimiluminescência por meio de imagens digitais utilizando câmeras de *webcam*.
- d) Desenvolvimento de um aplicativo para *android* com capacidade de estabelecer comunicação via *bluetooth* com as micro-bombas a fim de controlá-las e capaz de capturar as imagens de luminescência em tempo real, registrando os valores de RGB.
- e) Associação entre o chip microfluídico, bombas e *smartphone*. Verificação da portabilidade e do potencial analítico do sistema sugerido.

Num primeiro momento, os chips microfluídicos foram construídos utilizando-se a técnica de fotolitografia com exposição à radiação ultravioleta para a gravação dos canais no substrato de uretano – acrilato [15]. Posteriormente, as micro-bombas com acionamento piezoelétrico foram conectadas ao microssistema fluídico. Essas micro-bombas desempenham a função de gerenciar os fluidos envolvidos na determinação. Em seguida, foi feita uma avaliação dos dispositivos no intuito de verificar se estes podem ser empregados em análises baseadas em quimiluminescência. As bombas mencionadas acima foram adquiridas por meio de apoio financeiro da Universidade de Brasília e encontram-se disponíveis no laboratório onde a pesquisa foi desenvolvida.

Inicialmente, foi realizada uma análise preliminar a fim de testar e conhecer o funcionamento das micro-bombas bem como avaliar o chip microfluídico elaborado. Até este

momento, as imagens digitais foram registradas com o auxílio de uma *webcam* conectada via USB com um computador que possui um *software* desenvolvido na linguagem *VisualStudio*. Esse sistema foi, então, utilizado para determinação de paracetamol em fármacos por meio de um método quimiluminescente que utiliza o luminol [16]. Depois dessas análises, foram feitos estudos com o intuito de avaliar o emprego de um *smartphone* para realizar tanto o controle das bombas quanto as detecções ópticas.

Para isso, foi desenvolvido um aplicativo em linguagem de programação *Java* para android em uma plataforma *Android Studio*. O aplicativo descrito possibilita a comunicação entre o *smartphone* e o sistema de controle de fluidos via *bluetooth* e o registro do processo de reação luminescente em tempo real por meio da câmera do *smartphone* juntamente com a aquisição dos valores de RGB das imagens.

Para esse fim, foram construídos circuitos eletrônicos que proporcionassem a comunicação entre o *smartphone* e as micro-bombas piezoelétricas. Ademais, tais circuitos também proporcionam tanto o acionamento quanto a alimentação de energia do sistema de gerenciamento de fluidos. O sistema de alimentação é constituído por uma bateria alcalina da marca Panasonic® com 9 V de tensão e o módulo *bluetooth* empregado é o HC-05.

Por fim, o sistema portátil deveria ter sido avaliado realizando-se a aplicação já efetuada no início do projeto (determinação de paracetamol em medicamentos por quimiluminescência). No entanto, a análise com padrões de paracetamol foi feita apenas na primeira parte do projeto e não foram realizadas análises com amostras de medicamentos.

5. ESTUDOS COM MICROBOMBAS E WEBCAM

As análises preliminares desenvolvidas na primeira parte desse trabalho encontram-se detalhadas nas seções seguintes.

5.1 Procedimentos para Construção do Microdispositivo

O procedimento empregado para a elaboração dos microdispositivos fluídicos envolve a técnica de fotolitografia no ultravioleta, na qual os canais onde as soluções serão inseridas são gravados em um substrato composto de uretano-acrilato. Esse procedimento é composto por 3 etapas, que serão detalhadas a seguir, e foi sugerido por Fonseca e seus colaboradores [18] em 2007.

1ª etapa: Preparação da máscara

Nessa etapa, foi feito o desenho dos canais dispostos de acordo com o que se necessitava em um programa de computador denominado AutoCad® 2002. Depois da montagem dos canais no programa, a impressão da imagem foi realizada por uma impressora a laser (HP LaserJet P2055dn) diretamente em uma etiqueta transparente (PIMACO). Abriu-se a etiqueta transparente e, então, o desenho com os canais foi colado em uma placa de acrílico. Posteriormente, uma borda de borracha foi colocada na placa contendo os canais e em uma outra placa de acrílico sem os canais foi feita uma moldura com fita isolante. A Figura 3 apresentada a seguir mostra os procedimentos descritos anteriormente.

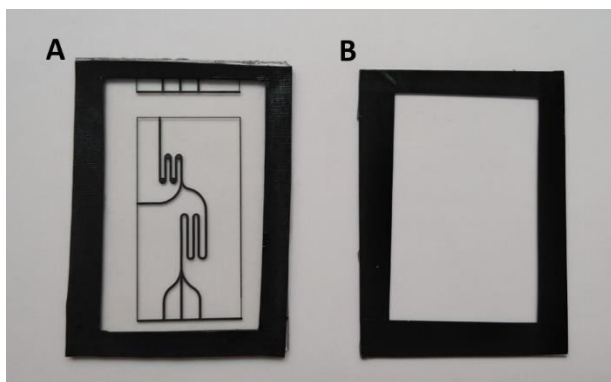


Figura 3 – Fotografias do desenho dos canais colado em uma placa de acrílico emoldurada com borracha (A) e da placa de acrílico sem os canais emoldurada com fita isolante (B).

Na placa com os canais, obteve-se uma espécie de reservatório onde despejou-se a resina líquida (Gold 50) de modo a completar todo o espaço disponível até a altura da borda de

borracha. Com o intuito de evitar a formação de bolhas na resina, a mesma foi inserida na placa lentamente e com o frasco rente à extremidade da placa. Em seguida, assentou-se a outra placa sobre o reservatório e a fixação das duas placas foi finalizada com o auxílio de grampos.

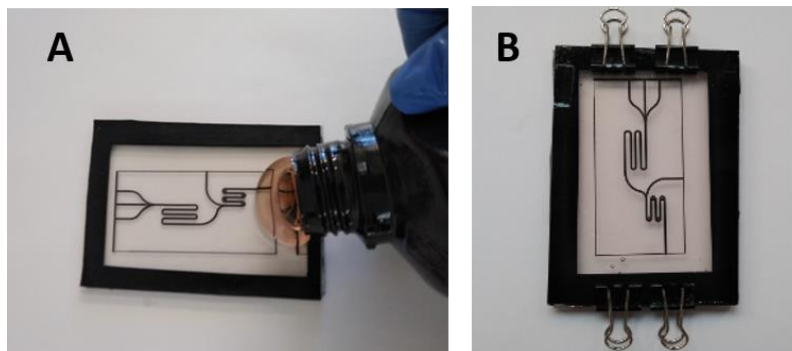


Figura 4 – Fotografias exibindo o preenchimento do reservatório com resina (A) e a junção das duas placas de acrílico – com e sem canais – utilizando-se grampos (B).

2ª etapa: Gravação dos canais no substrato de uretano-acrilato por fotolitografia

As placas foram, então, submetidas à exposição ultravioleta para que os canais fossem gravados em baixo relevo no substrato. Para isso, utilizou-se uma expositora *lab-made* (Figura 5) constituída por uma caixa que contém um apoio para as placas localizado acima de uma lâmpada de luz ultravioleta.



Figura 5 – Imagem da expositora *lab-made* empregada para exposição ultravioleta na etapa de gravação dos canais.

Inicialmente, as placas foram expostas à radiação de forma que aquela sem o desenho dos canais estivesse virada para baixo em contato direto com a lâmpada por 3 minutos. Adiante, as posições das placas foram invertidas, isto é, girou-se o conjunto para que a placa com os

canais ficasse voltada para baixo. Essa segunda exposição durou 40 s. As exposições descritas anteriormente encontram-se representadas na Figura 6 mostrada a seguir.

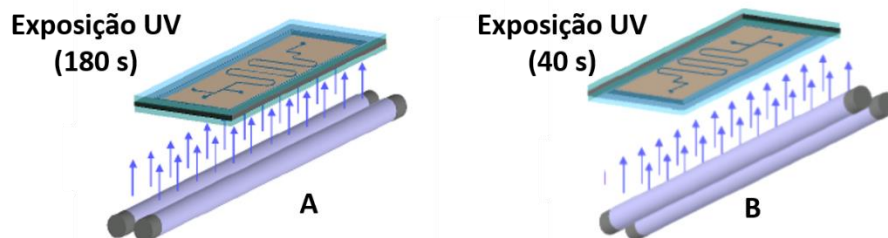


Figura 6 – Ilustração das exposições efetuadas para gravação dos canais. Exposição em que a placa sem o desenho dos canais se encontra voltada para baixo (A). Exposição na qual a placa com os canais está em contato direto com a lâmpada ultravioleta (B). Adaptado de ref [19].

Posteriormente, as placas de vidro foram separadas uma da outra, removeu-se o material polimerizado e ele foi colocado em banho ultrassônico por 5 minutos dentro de um béquer contendo água e detergente. Depois, utilizou-se um pincel para limpar os canais com água e detergente e lavou-se a placa polimerizada também com etanol comercial. Secou-se a placa com o auxílio de um secador e ela foi guardada em um recipiente fechado enquanto se preparava a placa de cobertura que mais tarde seria usada para selagem.

3ª etapa: Selagem e conexão de tubos nas entradas dos canais

A placa de cobertura foi feita despejando-se a resina em uma placa de acrílico que também possuía uma moldura de borracha, no entanto sem a figura com os canais. Em seguida, depois de fechar o reservatório com uma outra placa contendo uma borda de fita isolante, o conjunto foi submetido à exposição ultravioleta por 4 min 12 s em apenas um dos lados. Logo após, lavou-se a placa de cobertura de maneira semelhante à lavagem da placa com os canais, porém sem a etapa do banho ultrassônico. Colou-se manualmente a placa de cobertura na placa com os canais e, então, as placas unidas foram colocadas exatamente em cima da lâmpada ultravioleta e irradiadas durante 10 minutos. A Figura 7 abaixo ilustra o procedimento de selagem detalhado anteriormente.

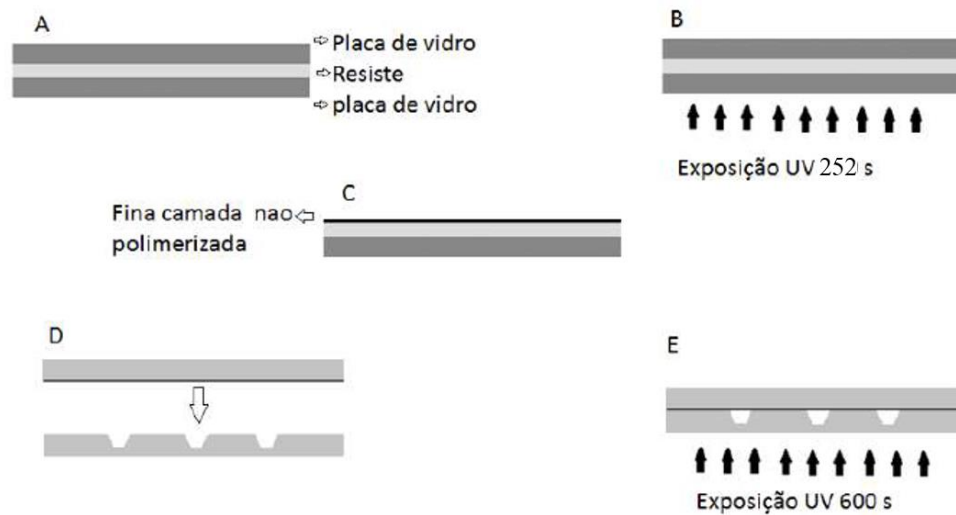


Figura 7 –Conjunto formado por duas placas de acrílico sem canais resina polimérica (A); Exposição do conjunto à radiação ultravioleta somente por um dos lados (B); Superfície não polimerizada (C); Junção manual das placas poliméricas com e sem canal (D); Exposição das placas para selagem irreversível (E).

Após a execução dessas 3 etapas, cortou-se o microdispositivo com o auxílio de um bisturi para retirar o excesso de material polimerizado e tubos de TEFLON foram inseridos nas entradas dos canais.

O microdispositivo possui 5 canais, a saber: um canal para bombeamento do reagente quimiluminescente (C1) – neste caso, o luminol -, um canal para injeção de hipoclorito (C2), um canal para inserção de carregador (C3), um canal para injeção da amostra (C4) e um canal para descarte das soluções (C5). Além disso, o sistema microfluídico é constituído por um ponto de confluência (PC), por uma bobina reacional (BR) e por uma célula de detecção de luminescência (CD). A Figura 8 exibe um esquema indicando os componentes do microdispositivo.

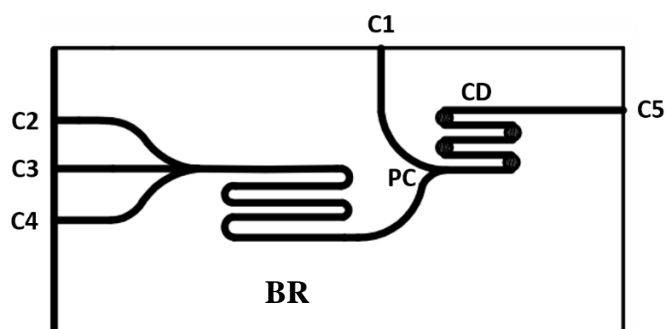


Figura 8- Esquema representativo do microsistema.

A Figura 9 a seguir mostra uma fotografia do protótipo desenvolvido para a análise preliminar já com os tubos conectados nas entradas dos canais

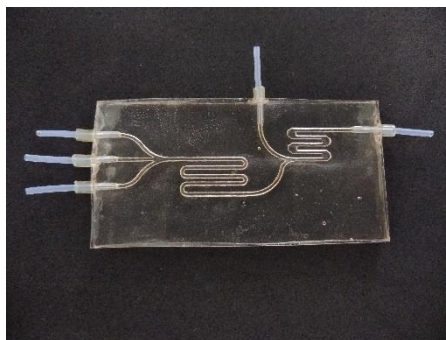


Figura 9 – Fotografia do Microdispositivo fluídico desenvolvido.

5.2 Estrutura de suporte das bombas, do microdispositivo, dos frascos para armazenamento das soluções e do *smartphone*.

Com o emprego de uma impressora 3D (Cliever CL1 Black) foi construída uma estrutura de ácido polilático (PLA) para comportar os aparatos necessários para a análise. Esse material é dividido em dois compartimentos: o compartimento inferior, que armazena as microbombas piezoelétricas, o driver e o arduino Nano; e o compartimento superior, onde ficam dispostos o microdispositivo fluídico e os frascos das soluções empregadas na determinação. Na tampa do compartimento superior, foram feitas instalações e adaptações para que o *smartphone* pudesse ser fixado e sua câmera estivesse alinhada à célula de detecção.

A estrutura impressa em 3D possui como dimensões: 11,5 cm de comprimento; 11,5 cm de largura e 10,4 cm de altura. As conexões entre os frascos de solução e as micro-bombas bem como entre as micro-bombas e os canais do microdispositivo foram feitas através de tubos Tygon®. A Figura 10 apresentada a seguir expõe a estrutura desenvolvida.

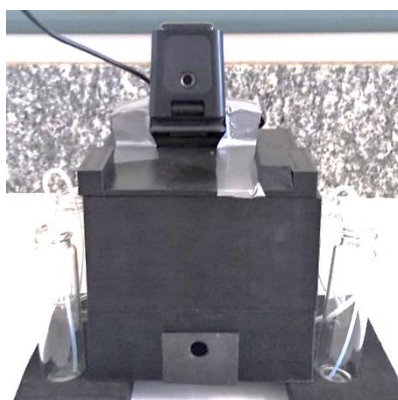


Figura 10- Fotografia da estrutura construída através de impressão 3D para acomodação do dispositivo microfluídico, do sistema de gerenciamento de fluidos, dos frascos de armazenamento de soluções e do *smartphone*.

5.3 Princípio de funcionamento das micro-bombas com acionamento piezoelétrico

As micro-bombas piezoelétricas empregadas foram fabricadas pela empresa *Bartels Mikrotechnik* e servem para transportar pequenas quantidades de líquidos (vazão máxima: 7 ml/min) ou gases (vazão máxima: 18 ml/min). Cada microbomba tem como dimensões: 30 mm de comprimento, 15 mm de largura e 3,8 mm de altura [20]. A Figura 11 a seguir mostra uma das quatro micro-bombas com acionamento piezoelétrico utilizadas na análise.

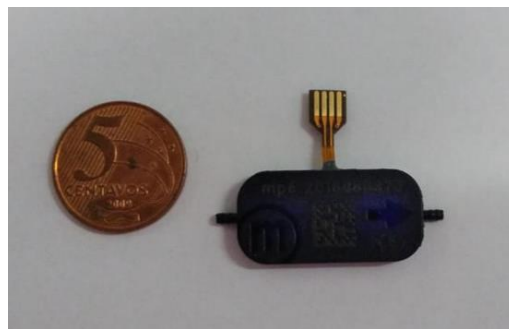


Figura 11 – Fotografia de uma micro-bomba piezoelétrica usada na determinação proposta.

O funcionamento dessas micro-bombas é baseado num acionamento que envolve a associação entre um diafragma piezoelétrico e válvulas de retenção passivas [21]. Abaixo se encontra um desenho esquemático para ilustrar como ocorre a movimentação dos componentes das micro-bombas.

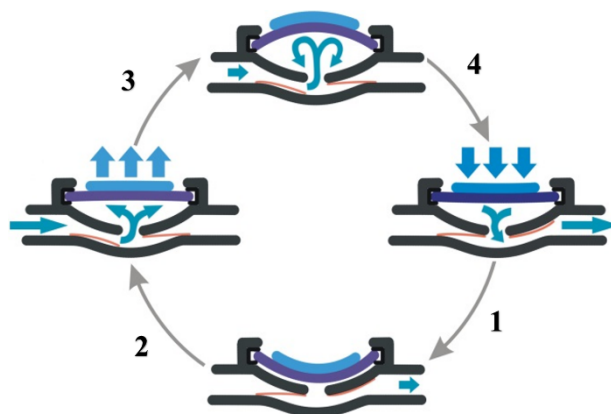


Figura 12 – Ilustração esquemática do princípio de funcionamento das micro-bombas piezoelétricas. Adaptado de ref [21].

No momento em que se aplica uma diferença de potencial, ocorre uma modificação na estrutura do piezo cerâmico (em azul) que se encontra disposto sob uma membrana (em roxo).

Essa deformação está representada na etapa 1. As válvulas de retenção (em laranja) se posicionam de forma a permitir a saída do material contido na câmara. Posteriormente, com a diminuição da tensão aplicada, o diagrama passa a se situar - inicialmente - de modo retilíneo (etapa 2) e, logo em seguida, ele se curva de maneira ascendente (etapa 3). As etapas 2 e 3 descritas fazem com que o líquido (ou o gás) seja sugado para o interior da câmara e, para isso, as válvulas mudam de posição de forma sincronizada. Ao submeter o sistema novamente à uma diferença de potencial, a membrana se movimentada para baixo, tornando a ficar reta (etapa 4) e o ciclo se processa outra vez.

5.4 Controle das micro-bombas piezoelétricas

O sistema de controle das micro-bombas consiste em uma placa mp6-QuadKEY, que é constituída por um microcontrolador compatível com Arduino Nano e um *driver mp6-QuadOEM*. Os comandos registrados no código do Arduino Nano são enviados para o driver por meio de comunicação I2C. O driver, por sua vez sistema de controle das microbombas, se encontra diretamente ligado às micro-bombas através de conectores de cabos flexíveis e efetua o acionamento das mesmas [22]. A fonte de alimentação desse sistema é feito por um conector mini-USB presente na extremidade do microcontrolador. A figura 13 mostra o sistema de controle das micro-bombas e suas dimensões.

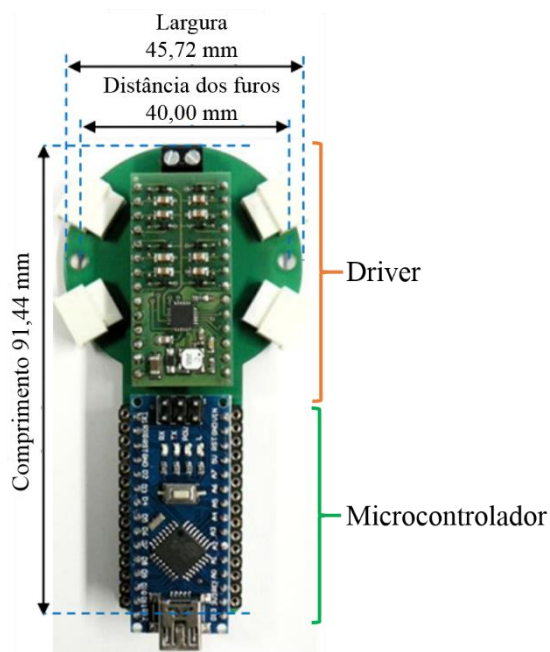


Figura 13 – Imagem do sistema de controle das micro-bombas piezoelétricas. Adaptado de ref [22].

O código-fonte instalado no Arduino Nano (Bartels MP6) se encontra disponível no *Operating Manual for the Micropump Driver mp6- QuadKEY* [22]. É possível fazer alterações no código-fonte para determinar os modos de execução, definindo - para cada modo - quais bombas serão acionadas bem como a frequência e a vazão em que cada uma delas vai operar.

6. ANÁLISE PRELIMINAR

6.1 Reagentes

Utilizou-se água purificada por osmose reversa no preparo de todas as soluções e os reagentes empregados nas análises possuem 99% de pureza.

6.2 Solução Estoque

A solução estoque de paracetamol a $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se a massa correspondente do reagente [Sigma-Aldrich] em água.

6.3 Soluções de Trabalho

As soluções-padrão de paracetamol ($0,003 - 0,015 \text{ mg mL}^{-1}$) utilizadas na construção da curva analítica foram adquiridas por meio da diluição, em água, da solução estoque de paracetamol $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. O preparo da solução de hipoclorito de sódio (NaClO) cuja concentração era de 0,05% (m/v) foi feito ao se diluir o volume adequado do reagente NaClO (Vetec, solução 4% - 6% (m/v)) em água purificada por osmose reversa.

Preparou-se uma solução tampão de carbonato na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 11$ pela dissolução do sal K_2CO_3 (Carlo Erba) em água. A solução de luminol (3-aminofthalohidrazida) de concentração $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi obtida diluindo-se o reagente (Acros, 98%) na solução tampão de carbonato mencionada anteriormente.

6.4 Procedimento Experimental

Para realizar a determinação preliminar, foi necessário montar um sistema formado pelo dispositivo microfluídico, pelas micro-bombas piezoelétricas, pelo sistema de controle dessas micro-bombas, pela *webcam* conectada ao computador e pelos frascos com as soluções a serem usadas na análise. A Figura 14 abaixo mostra essa montagem.

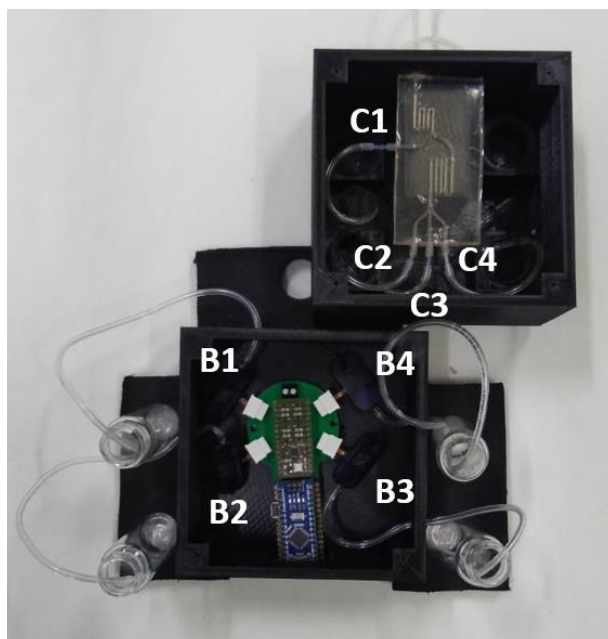


Figura 14 – Fotografia da montagem do sistema analítico exibindo as quatro micro-bombas com acionamento piezoelétrico (**B1**, **B2**, **B3** e **B4**) e o chip microfluídico com seus canais de injeção de soluções **C1**, **C2**, **C3** e **C4**.

Inicialmente, o primeiro modo é executado. Nele, são acionadas as bombas 2 e 4 indicadas na Figura 14. Elas injetam, respectivamente, a solução de hipoclorito e a solução com o padrão (paracetamol) nos canais 2 e 4 (isto é, em C2 e C4) do microdispositivo fluídico. A reação envolvida nessa etapa encontra-se representada a seguir.

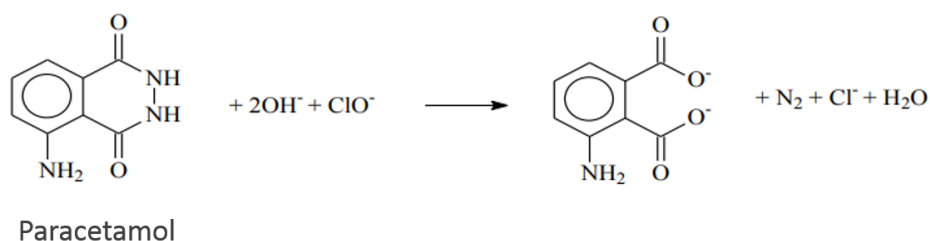


Figura 15 – Reação entre paracetamol e o íon hipoclorito em meio alcalino. Adaptado de ref [16].

Imediatamente após, são acionadas as bombas 1 e 3 que inserem, respectivamente, o luminol e a água no chip microfluídico. Chegando na célula de detecção, o hipoclorito remanescente do primeiro processo químico reage com o luminol em uma reação luminescente, a qual é exibida a seguir.

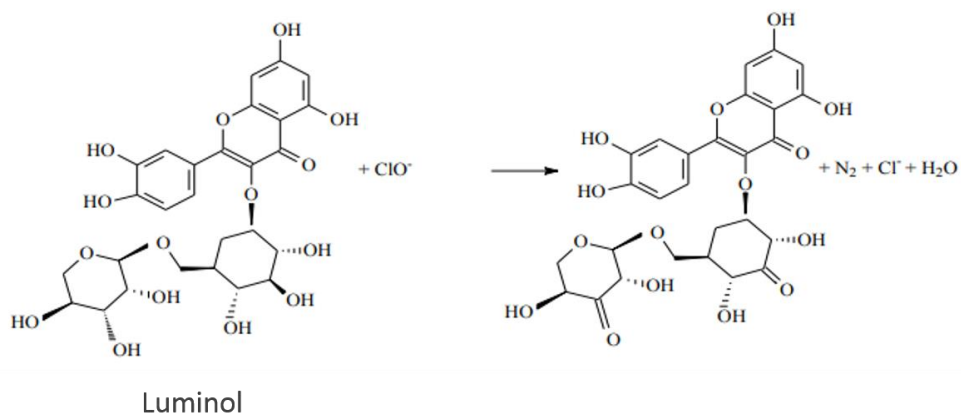


Figura 16 – Representação da reação entre luminol e o íon hipoclorito. Adaptado de ref [16].

A detecção dos sinais analíticos foi feita - nessa etapa de análise preliminar - por *webcam* com um sistema adaptado de Fonseca et. al [18]. A comunicação com o sistema de bombeamento das soluções e as configurações das imagens captadas pela *webcam* foram feitas por meio de um programa de computador escrito em *VisualBasic 6.0* e desenvolvido por Moura [23]. Neste programa, o usuário pode definir alguns parâmetros como número de leitura, número de picos e tempo de intervalo entre uma medida e outra.

7. ESTUDOS COM *SMARTPHONE*

A análise preliminar efetuada com soluções padrão de paracetamol ao longo da primeira parte deste trabalho evidenciou que a estrutura do sistema desenvolvido até então deveria sofrer algumas alterações. A parte inferior da caixinha não conseguia comportar de maneira adequada as quatro micro-bombas (conforme mostrado na Figura 14), pois frequentemente notava-se que os cabos flexíveis que conectavam as micro-bombas ao *driver* dobravam. Com isso, um novo projeto foi desenhado, de modo que essa parte do sistema possui agora novas dimensões e conta com estruturas para acoplamento dessas bombas. A Figura 17 abaixo mostra uma fotografia da nova estrutura inferior do sistema, no qual são dispostos o *driver*, o microcontrolador e as micro-bombas piezoelétricas.



Figura 17 – Imagem da estrutura inferior da nova caixinha impressa em 3D comportando todo o sistema de controle das micro-bombas e as quatro micro-bombas com acionamento piezoelétrico.

Além disso, percebeu-se que seria possível criar espaços na parte superior da estrutura ao redor do *chip* microfluídico para acondicionar os frascos das soluções, inclusive de modo estes frascos pudessem ser reabastecidos durante as determinações. A Figura 18 a seguir expõe o resultado



Figura 18 – Fotografia da parte superior da nova caixinha, onde são acomodados os frascos de armazenamento das soluções e o microdispositivo fluídico.

Por fim, foi criada uma tampa para a parte superior da caixinha, na qual o *smartphone* é acoplado. Nessa tampa foi feito um orifício de modo que a câmera do *smartphone* esteja alinhado com a célula de detecção do sistema microfluídico. Essa estrutura que serve para vedar a parte que contém o chip microfluídico e para suportar o celular de suporte para aparelho celular encontra-se exposta logo abaixo, na Figura 19.

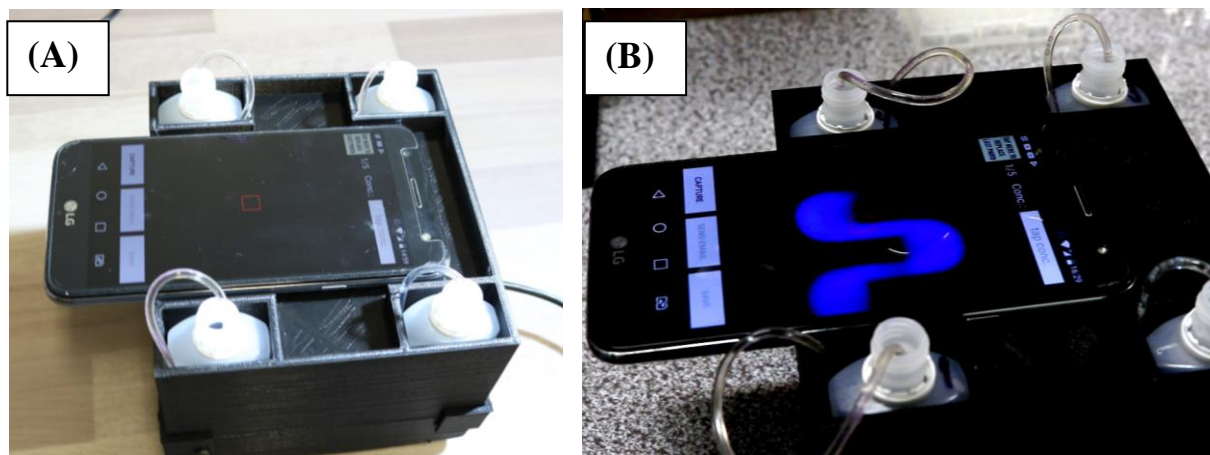


Figura 19 – Imagem do *smartphone* acoplado à tampa do sistema (A) e fotografia do processo de luminescência ocorrendo no interior do microsistema fluídico e sendo acompanhado pela câmera do *smartphone* (B).

A Figura 20 mostrada a seguir apresenta uma visão frontal do sistema construído como um todo, indicando suas dimensões de comprimento e altura.

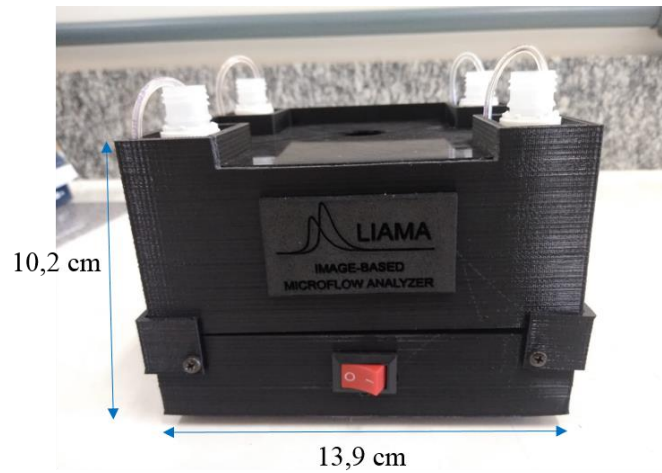


Figura 20 – Fotografia e dimensões da estrutura impressa em 3D completa do ponto de vista frontal.

Já a Figura 21, por sua vez, exibe uma visão superior do sistema apontando suas medidas de largura e comprimento.

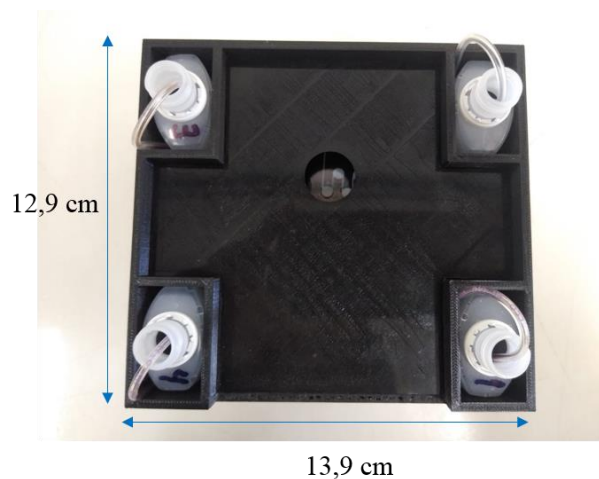


Figura 21 – Imagem da tampa do dispositivo e suas respectivas dimensões.

Além de apresentar tamanho notadamente diminuto, o sistema como um todo se mostrou significativamente leve. Estes são dois fatores que contribuem para a portabilidade do dispositivo proposto e construído. Somente a estrutura impressa em 3D, isenta de soluções nos frascos e sem o *smartphone* acoplado à tampa pesa aproximadamente 534 g. Ao acrescentar o aparelho celular, esse valor vai para 734 g e, ao adicionar as soluções nos quatro frascos até preenche-los completamente, tem-se uma massa total de 867 g.

8. O APLICATIVO

O aplicativo criado foi intitulado “RGB Micro Analysis”. Este nome foi escolhido por expressar as funções que o mesmo executa: ele adquire os valores de RGB da imagem de uma análise realizada em escala micro. Ao baixar e instalar o app no aparelho *smartphone* com sistema operacional Android, é possível visualizar o ícone do app, que se apresenta como exibido na Figura 22 abaixo.

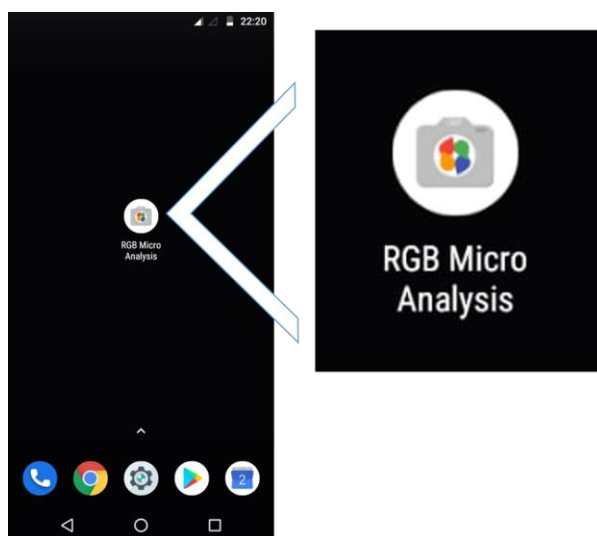


Figura 22 – Imagem da captura de imagem da tela do aparelho celular mostrando o ícone do aplicativo desenvolvido.

Ao clicar no ícone, aparecerá a tela inicial do aplicativo, que se apresenta conforme a Figura 23 expõe.



Figura 23 – Print da tela inicial do app “RGB Micro Analysis”.

Pressionando-se o botão “Fazer Análise”, o aplicativo é direcionado para uma nova tela, na qual ele solicita ao usuário uma permissão para o acionamento do Bluetooth do aparelho celular. Nesse momento, é necessário que o usuário permita a ativação do Bluetooth, pois como já foi mencionado anteriormente, os comandos serão enviados pelo aplicativo via comunicação Bluetooth para o sistema controlador das micro-bombas.

A figura seguinte exibe a mensagem para autorização de ativação do Bluetooth.

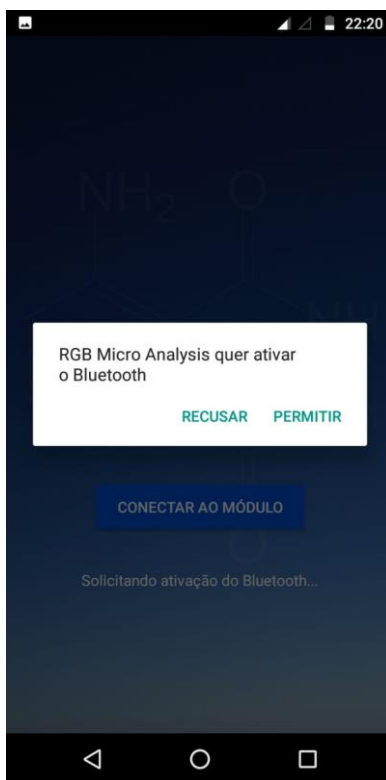


Figura 24 – Mensagem para autorização do acionamento do Bluetooth do *smartphone*.

Selecionando-se a opção “Permitir”, abre-se uma nova tela na qual são listados os dispositivos próximos que possuem Bluetooth habilitado para pareamento com o app. No caso do sistema desenvolvido, utilizou-se o módulo Bluetooth HC-05 para estabelecer comunicação com sistema controlador das micro-bombas piezoelétricas. A Figura 25 a seguir mostra a tela do celular em que são exibidos os dispositivos próximos para pareamento que estão disponíveis. Nessa tela, o usuário deve selecionar o endereço referente ao HC-05 empregado e digitar um código de segurança.

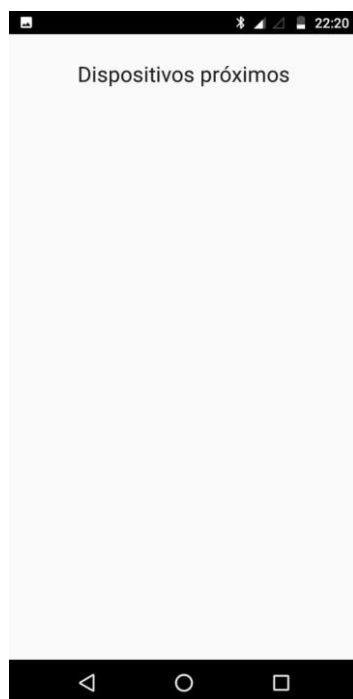


Figura 25 – Tela de exibição dos dispositivos Bluetooth mais próximos do *smartphone* disponíveis para pareamento.

Depois de seleccionar o módulo referente ao HC-05 e fazer o pareamento entre os dois dispositivos, surge uma tela que apresenta o botão “Iniciar as bombas”. Ao pressionar esse botão, as bombas 2 e 4 são ligadas por 10 s. A contagem desses 10 s é feita de forma regressiva e é exibida na mesma tela. A Figura 26 abaixo exhibe as telas que foram descritas previamente.



Figura 26 – Em (A) encontra-se a tela com o botão “Iniciar as bombas” e (B) expõe a contagem regressiva de 10 s depois de clicar no botão “Iniciar as bombas”.

Posteriormente, as bombas 2 e 4 são desligadas e uma nova contagem regressiva é feita. Nesse momento, a espera é de 5 s até que logo em seguida são habilitadas as bombas 1 e 3, surgindo uma nova tela no celular que solicita ao usuário que ele estabeleça dois parâmetros para a análise: o número de picos e o número de leituras. A Figura 27 a seguir apresenta essas duas execuções do aplicativo que foram mencionadas anteriormente.

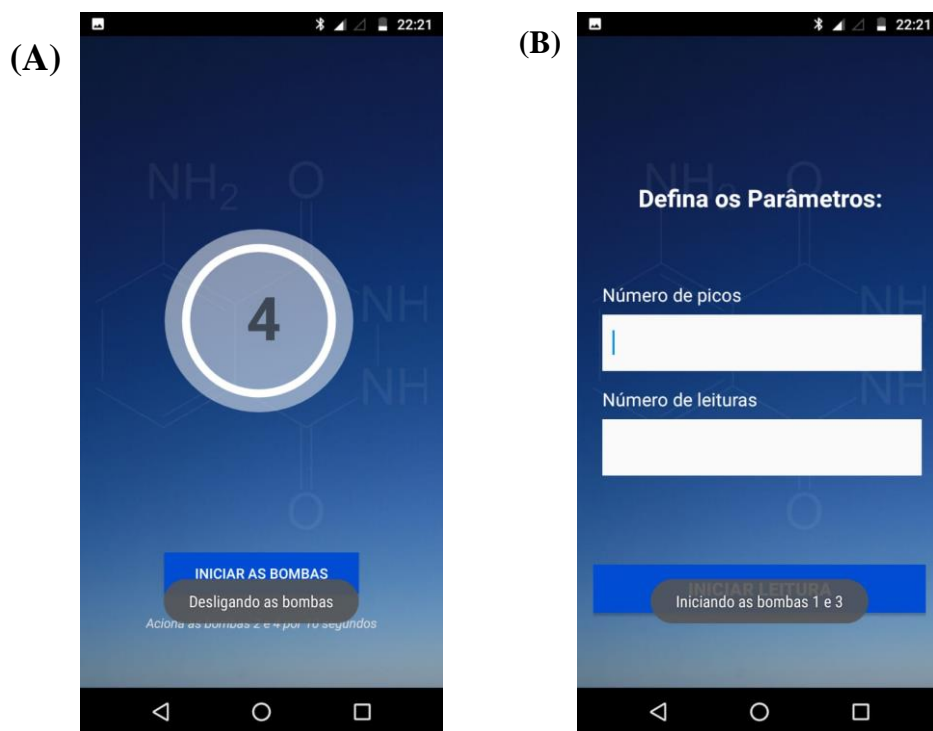


Figura 27 – A imagem (A) mostra a contagem regressiva de 5 s depois do desligamento das bombas 2 e 4. A ilustração (B) exibe a tela de habilitação das bombas 1 e 3 e de definição dos parâmetros de análise.

Apesar do espaço para determinação do número de picos e do número de leituras pelo usuário, o app construído ainda não desenvolve essas funções, ele apenas executa a rotina de leitura para aquisição de 1 pico e a câmera realiza 200 leituras da imagem com intervalo de 0,5 s entre uma leitura e outra.

Ao pressionar o botão “Iniciar Leituras”, outra tela se abre expondo as imagens registradas pela câmera do celular em tempo real. Concomitantemente, são registrados os valores de RGB de cada leitura. A Figura 28 a seguir exibe a tela do aplicativo com os valores de RGB plotados de acordo com o que foi mencionado anteriormente.



Figura 28 - Imagem registrada pela câmera do celular em tempo real e valores de RGB de cada leitura realizada.

Após serem efetuadas todas as leituras, o aplicativo se desconecta do módulo Bluetooth HC-05, mas as bombas 1 e 3 continuam funcionando.

9. RESULTADOS E CONCLUSÕES

A avaliação do primeiro sistema desenvolvido (análise preliminar) foi realizada por meio de uma determinação empregando cinco soluções-padrão de paracetamol ($0,003 - 0,015 \text{ mg mL}^{-1}$). Foram obtidos 3 picos para cada concentração do padrão e a Figura 29 abaixo exibe o fiograma adquirido nessa análise.

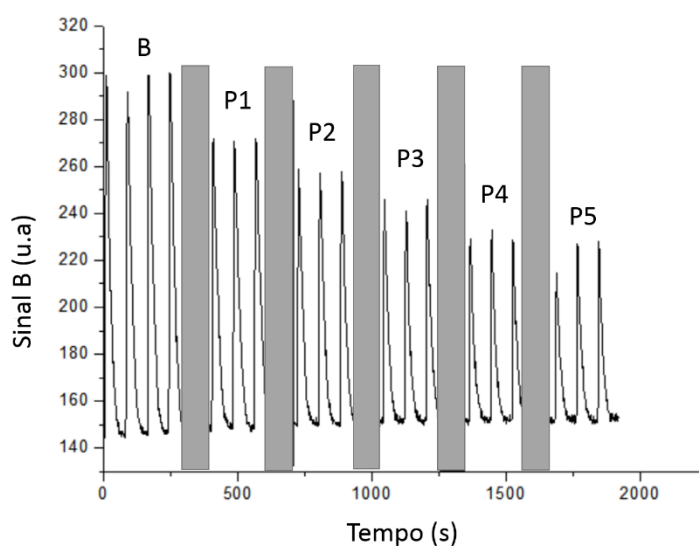


Figura 29 – Fiograma obtido na determinação de paracetamol em soluções-padrão utilizando o sistema proposto. Picos referentes ao branco (**B**) e aos cinco padrões (**P1**, **P2**, **P3**, **P4** e **P5**). Esses padrões possuem, respectivamente, as concentrações: $0,003 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,006 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,009 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,012 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,015 \text{ mg mL}^{-1}$. As barras cinzas encobrem os picos das injeções feitas para a limpeza dos canais do microdispositivo.

Os picos obtidos no fiograma são referentes aos valores dos sinais B de RGB das imagens de luminescência. Observa-se uma boa razão sinal-ruído dos picos obtidos a partir do fiograma apresentado. É importante ressaltar que ao aumentar a concentração das soluções de paracetamol, os picos são menores, conforme mostrado na Figura 28. Isso ocorre devido à supressão da quimiluminescência do luminol.

Para se obter os valores de intensidade do sinal, foi feita uma média da altura dos três picos de cada concentração e subtraiu-se esse valor encontrado da média das alturas do branco. Com os resultados dos valores de intensidade do sinal construiu-se a curva analítica representada na figura a seguir.

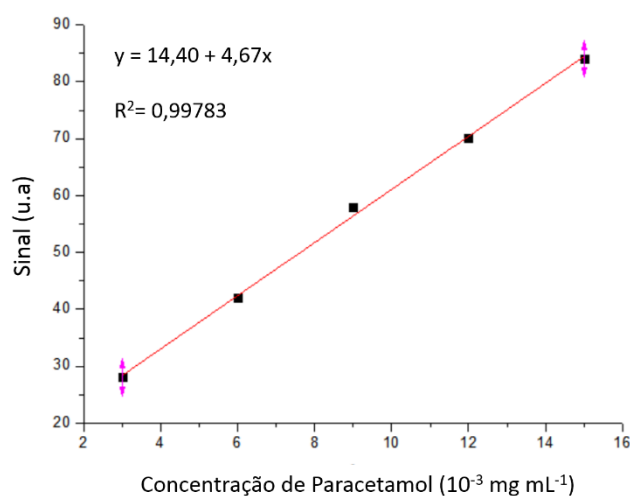


Figura 30 – Curva analítica adquirida para as soluções-padrão de paracetamol com concentrações de 0,003 mg mL⁻¹ a 0,015 mg mL⁻¹.

A curva analítica obtida nessa determinação apresentou uma boa correlação linear ($R^2 = 0,99783$) e a sensibilidade (correspondente à inclinação da reta) foi de 4,67 unidades de sinal/ $10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$. O coeficiente de variação (CV) dos sinais da solução padrão de paracetamol 0,015 mg mL⁻¹ foi calculado no intuito de avaliar a precisão das medidas e o valor encontrado para o CV das 3 detecções em questão foi de 8,67 %, o que revela uma boa precisão.

É possível observar no diagrama mostrado na Figura 18 que o padrão 5 (P5) apresentou o primeiro pico significativamente distinto dos outros dois sinais. Esse resultado pode ter sido observado pelo fato de P5 ser o padrão de paracetamol mais concentrado, pela presença de algum resíduo da solução de P4 no microdispositivo ou por alguma alteração no posicionamento da câmera de *Webcam* em relação à célula de detecção do chip microfluídico.

Uma vez que o ponto de intercepto da reta no eixo “y” não cruza a origem dos eixos, verifica-se que não há linearidade do método empregado para concentrações inferiores à mínima analisada (isto é, $3 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$), fazendo com que o limite de detecção desse método seja elevado. O limite de detecção (LD) do método proposto foi calculado por $LD = (3,3 \times s_{y/x})/b$, em que “ $s_{y/x}$ ” equivale ao desvio dos resíduos do coeficiente angular da reta e o “b” é o valor do coeficiente angular. O valor de LD encontrado foi de $0,68 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ ou $0,68 \text{ mg L}^{-1}$.

Ainda não foram feitas análises para determinação de paracetamol em amostras de medicamentos. Além disso, as medidas realizadas até o momento ainda contavam com

detecções de imagens digitais feitas por meio de uma câmera de *webcam* e com o controle das micro-bombas realizado por computador.

Na segunda parte desse trabalho, que estava voltada principalmente para o desenvolvimento do aplicativo, foi possível atingir a maior parcela dos objetivos definidos em relação às novas adaptações do sistema como um todo e às funções que o app deveria executar.

Inicialmente, a análise preliminar permitiu a percepção de que o sistema utilizado até então deveria ser refeito para atender da melhor forma as demandas da análise. Essa reconstrução do dispositivo de seu de tal modo que o sistema final cumpriu dois anseios que foram estabelecidos no início deste trabalho: a miniaturização e a portabilidade.

Além disso, o aplicativo construído inteiramente de forma autônoma (isto é, sem o auxílio de app's já existentes) foi capaz de cumprir uma parte significativa das suas atribuições almejadas no início da pesquisa. O “RGB Micro Analysis” consegue atualmente enviar comandos para o sistema controlador das micro-bombas piezoelétricas via Bluetooth e estabelecer comunicação com a câmera do aparelho *smartphone* de maneira que as leituras são feitas em tempo real e os valores de RGB dos sinais analíticos são registrados instantaneamente na tela do celular.

O sistema final (com a nova estrutura de acomodação das micro-bombas, do *driver*, do *arduino*, da bateria, do HC-05, do chip microfluídico, dos frascos das soluções e do *smartphone*) e o aplicativo elaborado não foram submetidos à avaliação de seus funcionamentos seja por meio de análises com padrões de paracetamol ou com amostras de medicamentos.

Diante do exposto, é importante ressaltar que tanto a estrutura do dispositivo de modo geral quanto o aplicativo podem ser aperfeiçoados para corrigir eventuais falhas observadas, ampliar a utilização desse sistema em outras análises quimiluminescentes, desenvolver novas pesquisas envolvendo também amostras biológicas e explorar as vantagens da miniaturização e da portabilidade do equipamento proposto.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hurltubise, Robert J. Phosphorimetry: Theory, Instrumentation, and Applications. Laramie: VCH, 1990.
- [2] Lumb, Michael D. Luminescence Spectroscopy. New York: Academic Press, 1978.
- [3] Coelho, Anete L. *Desenvolvimento de procedimento de derivatização fotoquímica para dois glicocorticóides sintéticos (prednisolona e triancinolona acetinado) visando à análise espectrofluorimétrica de formulações farmacêuticas*. 2004. 119p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.
- [4] Dodeigne, C.; Thunus, L.; Lejeune, R. Chemiluminescence as diagnostic tool. *Talanta* 51 (2000) 415 – 439.
- [5] Choodum, A.; Parabun, K.; Klawach, N.; Daeid, N. N.; Kanatharana, P.; Wongniramaikul, W.; Using the iPhone as a device for a rapid quantitative analysis of trinitrotoluene in soil. *Talanta* (2013) 115, 143-149.
- [6] Barbosa, A. I.; Gehlot, P.; Sidapra, K.; Edwards, A. D.; Reis, N. M.; Portable smartphone quantitation of prostate specific antigen (PSA) in fluoropolymer microfluidic device, *Biosens Bioelectron.* (2015) 70, 5-14.
- [7] Terry, S. C.; Jerman, J. H.; Angell, J. B.; A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE Trans. Electron Devices* (1979) 26, 1880 - 1886.
- [8] Temiz, Y.; Lovchik, R. D.; Kaigala, G. V.; Delamarche, E.; Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab?. *Microelectronic Engineering* 132 (2015) 156–175.
- [9] Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. M.; *Sensors Actuators B Chem.* 244 (1990)
- [10] Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane), *Anal. Chem.* 70 (1998) 4974 – 4984.
- [11] Coltro, W. K. T.; Piccin, E.; Carrilho, E.; Jesus, D. P.; Silva, J. A. F.; Silva, H. D. T.; Lago, C. L.; *Microssistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. Quím. Nova* 8 (2007) 1678-7064.
- [12] Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. *Princípios de Análise Instrumental*. Tradução Celio Pasquini [coordenação]; Jarbas José Rodrigues Rohwedder [et al.]. - 6. ed. - Porto Alegre: Bookman, 2009.

- [13] Jorgensen, A. M.; Mogensen, K. B.; Kutter, J. P.; Geschke, O. A biochemical microdevice with an integrated chemiluminescence detector, *Sensors and Actuators B* 90 (2003) 15–21.
- [14] Li, B.; Li, L.; Guan, A.; Dong, Q.; Ruan, K.; Hu, R.; Li, Z.; A smartphone controlled handheld microfluidic liquid handling system, *Lab Chip*. (2013) 24 4085 – 4092.
- [15] Sampaio, T. R.; Fonseca, A.; Chemiluminescence detection in urethane-acrylate microfluidic devices, *Sensors and Actuators B* (2015) 213, 215-221.
- [16] Oliveira, G. G.; Janegitz, B. C.; Bastião, M. B.; Salami, F. H.; Fatibello-Filho, O.; Leite, O. D.; Determinação da paracetamol pela inibição da reação quimiluminescente do luminol-hipoclorito de sódio em um sistema de análise em fluxo empregando o conceito de multicomutação, *Quim. Nova* (2009) 32, 7, 1755-1759.
- [17] Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed., APHA, AWWA and WPCF, Washington, 1999.
- [18] Fonseca, A.; Raimundo Jr., I. M.; Rohwedder, J. J. R.; Ferreira, L. O. S.; Construction and evaluation of a flow injection micro-analyser based on urethane-acrylate resin, *Anal. Chim. Acta* (2007) 60, 3159-3166.
- [19] Fonseca, Alexandre. *Construção e Avaliação de Microsistemas para Análise em Fluxo*. 2008. 176p. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Departamento de Química Analítica da Universidade Estadual de Campinas.
- [20] Operating Manual for Micropump mp6/mp6-pp and Controller. Disponível em: file:///C:/Users/ADM.ADM-PC/Downloads/EN_Manual_mp6_mp6-pp_07-14_rev.2.1%20(1).pdf. Acessado em: 23/01/2019
- [21] mp6 Piezoelectric Diaphragm Micropump. Disponível em: <https://www.servo-flo.com/micropumps/mp6>. Acessado em: 23/01/2019.
- [22] Operating Manual for the Micropump Driver mp6-QuadKEY. Disponível em: file:///C:/Users/ADM.ADMPC/Downloads/Operating%20Manual%20for%20the%20Micropump%20Driver.pdf. Acessado em: 23/01/2019.
- [23] Moura, Hadassa S. R. P. *Uso de imagens digitais para detecção de luminescência em sistemas microfluídicos de análise*. 2016. 100p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade de Brasília.

