LEANDRO COLEVATI DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE EQUIPAMENTO DE TESTE DE ESTRUTURAS
MINIATURIZADAS: TESTES EM ESTRUTURA ÚTIL NA ELIMINAÇÃO
DE PARTÍCULAS**

**Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de
São Paulo para a obtenção do
Título de Mestre em Engenharia**

**São Paulo
2006**

LEANDRO COLEVATI DOS SANTOS

Tecnólogo Formado em Materiais, Processos e Componentes Eletrônicos – FATEC SP - 2003

Desenvolvimento de Equipamento de Teste de Estruturas

Miniaturizadas: Testes em Estrutura Útil na Eliminação de Partículas

**Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de
São Paulo para a obtenção do
Título de Mestre em Engenharia**

**Área de Concentração:
Microeletrônica**

**Orientadora:
Prof^a. Dr^a.
Maria Lucia Pereira da Silva**

**São Paulo
2006**

Santos, Leandro Colevati dos

Desenvolvimento de Equipamento de Teste de Estruturas Miniaturizadas: Testes em Estrutura Útil na Eliminação de Partículas. São Paulo, 2006.

70 p.

Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos.

1. LabVIEW [®]	2. Equipamento Semi-Automatizado
3. Chicana Miniaturizada	4. Retenção de Partículas

I. Universidade de São Paulo, Escola Politécnica. Departamento de Sistemas Eletrônicos.

*Dedico esse trabalho a meus pais Nelson e Nadir,
que sempre me apoiaram e fizeram tudo o que foi
possível e impossível para que esse desejo se
tornasse realização.*

*“Hoje os ventos do destino começaram a soprar
Nosso tempo de menino foi ficando para trás
Com a força de um moinho que trabalha devagar
Vai buscar o teu caminho, nunca olha para trás...
Hoje o tempo escorre nos dedos da nossa mão
Ele não devolve o tempo perdido em vão
É o mensageiro das almas dos que virão ao mundo
Depois de nós”
(Carlos Maltz)*

SUMÁRIO

Capítulo	Página
Resumo	
Abstract	
Lista de Siglas	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
i. Introdução	i.1
i.1 Bibliografia	i.5
1. Conceitos Teóricos	1.1
1.1. Técnica de Detecção: Microbalança de Quartzo (QCM) e Periféricos	1.1
1.1.1. Arranjo Experimental do QCM	1.2
1.1.2. Instrumentação, para Aquisição de Sinais e Análise de Dados	1.4
1.2. Manipulação de Partículas	1.5
1.2.1 Retenção	1.5
1.2.1.1. Principais Processos	1.5
1.2.2. Eliminação	1.8
1.3. Equipamentos para Eliminação de Bactérias	1.11
1.3.1. Equipamentos Macroscópicos	1.11
1.3.2. Equipamentos Microscópicos	1.12
1.4 Bibliografia	1.14
2. Metodologia, Materiais e Métodos	2.1
2.1 Metodologia	2.1
2.1.1. Definição e Construção do Equipamento	2.1
2.1.2. Sistema em Estudo	2.2
2.1.3. Condições de Contorno	2.2
2.2. Materiais	2.3
2.2.1. Equipamentos	2.3
2.2.2. Software	2.4
2.2.3. Sistema para Manipulação de Fluxo e Periféricos	2.6
2.2.4. Manipulação com Aquecimento	2.8

2.3. Métodos	2.9
2.3.1. Medidas Utilizando Cristais Piezelétricos de Quartzo	2.9
2.4 Bibliografia	2.11
3. Resultados e Discussão	3.1
3.1. Construção e Teste do Instrumento	3.1
3.1.1. Descrição dos Monitoramentos e Testes	3.2
3.1.1.1. Aquecimento	3.2
3.1.1.2. Detecção (QCM _L)	3.5
3.1.2. Montagem do Sistema	3.12
3.2. Construção e Teste da Estrutura Utilizada	3.13
3.2.1. Testes Utilizando Silicone	3.14
3.2.1.1. Simulação das Estruturas Utilizando Água, Acetona e Silicone como Fluidos	3.15
3.2.1.2. Variação das Dimensões da Chicana	3.20
3.2.1.2.1. Conclusão Parcial	3.21
3.2.1.3. Simulação das Estruturas Utilizando Silicone e Supondo as Paredes <i>slip</i>	3.22
3.2.2 Teste para Partículas em Fase Líquida	3.25
3.2.2.1 Simulação com Partículas em Fase Líquida	3.29
3.3. Conclusão	3.31
3.4 Bibliografia	3.32
4. Conclusão e Trabalhos Futuros	4.1
4.1 Bibliografia	4.3
Anexo A	A.1

LISTA DE SIGLAS

Sigla	Denominação
NHMRC	Australian Government - National Health and Medical Research Council
ARMCANZ	Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand
DEF	Dieletroforese
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
MEMS	Microeletromechanical Systems
CMOS	Complementary Metal-Oxide Semiconductor
QCM	Quartz Crystal Microbalance
PQC	Piezoelectric Quartz Crystal
DAQ	Data Acquisition
PVC	Polyvinyl Chloride
AC	Alternate Current
DC	Direct Current
VI	Virtual Instruments
RAM	Random Access Memory
HMDS	Hexametildissilazana
NTC	Negative Temperature Coefficient
CI	Circuito Integrado
VOC	Volatile Organic Compound
PCI	Placa de Circuito Impresso

LISTA DE TABELAS

Nº	Descrição	Página
1.1	Condições de aquecimento recomendadas para eliminação de microorganismos	1.9
1.2	Resistência Térmica de Alguns Microorganismos Encontrados em Alimentos	1.10
3.1	Resultados Quantitativos Obtidos Pelos Testes Descritos na Figura 3.14	3.12
3.2	Principais Resultados Obtidos Simulando Chicanas de Dimensões Assimétricas (1) e Simétricas (2) em Seus Canais Horizontais e Verticais	3.21
A.1	Comparação de Valores de Sistema de Aquisição Consagrado com o Sistema Proposto	A.1
A.2	Configuração Recomendada para Softwares Baseados em Labview®	A.2

LISTA DE FIGURAS

Nº	Descrição	Página
1.1	Esquema da Microbalança de Quartzo	1.3
1.2	Esquema de um Sistema de Instrumentação Virtual para Aquisição de Sinais	1.5
1.3	Tamanho de partículas e tipos de filtração	1.6
2.1	Diagrama de Blocos da Definição e Construção do Equipamento de Sistema de Análise	2.1
2.2	Fluxograma de descrição do equipamento em uso	2.4
2.3	Esquema de Funcionamento de Aquisição e Processamento de Dados	2.5
2.4A	Dispositivo SCB-100	2.5
2.4B	Esquema de Ligação da PCI na SCB-100 para Aquisição de Sinais no LabVIEW®7.0	2.5
2.5	Esquema da Cella de Detecção Utilizada para Medidas em Fase Líquida	2.6
2.6	Esquema da Admissão Líquida	2.7
2.7	Oscilador Utilizado nas Medidas de QCM_L	2.8
2.8A	Sistema Proposto por Souza para Aquecimento de Estruturas	2.9
2.8B	Detalhe da Cella de Aquecimento Após Recorte	2.9
2.9	Gráfico Típico para Caracterização das Estruturas Acrílicas das Medidas Obtidas no Modo Pulsado Usando QCM e n-hexano Como Reagente	2.10
2.10	Gráfico Típico Para Caracterização das Estruturas Acrílicas Usando Modo Contínuo nas Medidas Feitas em QCM	2.11
3.1	Fluxograma para o Desenvolvimento de Laboratório Virtual com LabVIEW® 7.0	3.1
3.2A	Esquema do Circuito Elétrico Usado para Medição de Temperatura	3.3
3.2B	Variação de Tensão em Função da Temperatura no NTC	3.3
3.3A	Painel Frontal do Algoritmo para Aquecimento com os Módulos para as Relações Temperatura versus Frequência	3.4

3.3B	Painel Frontal do Algoritmo para Aquecimento com os Módulos para as Relações Temperatura versus Tempo	3.4
3.4A	Medidas de Frequência em Função da Temperatura	3.5
3.4B	Variação de Resistência no NTC em Função do Tempo na Faixa de Temperatura Ambiente até 150°C	3.5
3.5	Circuito Comparador de Frequências	3.6
3.6	Esquema do Circuito Divisor de Frequências Utilizado	3.7
3.7	Fluxograma de Descrição do Módulo para QCM _L	3.7
3.8	Painel de Controle do Software para QCM _L	3.8
3.8	Painel de Controle do Software para QCM _L (continuação)	3.9
3.9	Testes de Adsorção em Microestrutura Mostrando Eluição do n-hexano por 2-propanol em Fase Gasosa	3.10
3.10	Variação da Frequência em Função do Tempo para Pulso de n-hexano Seguido de Pulsos de Acetona em Fase Líquida	3.10
3.11	Variação da Frequência em Função do Tempo para Estrutura Tipo Chicana com Filme a Base de 2-propanol Depositado Sobre Ela e Testada para Adsorção de 2-propanol em Solução Aquosa	3.11
3.12	Variação da Frequência em Função do Tempo para Estrutura Chicana com Filme a Base de HMDS Depositado e Vapor de n-hexano Admitido Sequencialmente	3.11
3.13	Sistema Montado: A) QCMg B) QCM _L C) Eletrodos D) Aquecimento	3.12
3.14	Dimensões da Estrutura do Tipo Chicana	3.13
3.15	Experimento com Chicana Passando Silicone e Solução de Azul de Metileno pela Estrutura	3.15
3.16	Simulação para Acetona nos Quatro Fluxos Pré-Determinados (A-0,35 mL/min; B-0,50 mL/min; C-0,75 mL/min; D-1 mL/min)	3.17
3.17	Simulação para Água nos Quatro Fluxos Pré-Determinados (A-0,35 mL/min; B-0,50 mL/min; C-0,75 mL/min; D-1 mL/min)	3.18
3.18	Simulação para Silicone em Fluxo Pré-Determinados	3.19
3.19	Exemplo de Simulação do Fluido Silicone em Velocidade de 1 mL/min e Chicana com Dimensões Iguais em Cada Braço (Horizontal e Vertical)	3.20

3.20A	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de CIN para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.23
3.20B	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de CIN para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.23
3.20C	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de PN, para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.23
3.20D	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de PN, para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.23
3.20E	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de TPN, para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.23
3.20F	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de TPN, para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.23
3.20G	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de CIN para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.23
3.20H	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de CIN para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.23
3.20I	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de PN, para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.24
3.20J	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de PN, para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.24
3.20L	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de TPN, para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.24
3.20M	Chicanas Simuladas com as Hipóteses de TPN, para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min	3.24
3.21 A a I	Seqüência da Inserção de Pulso de Partículas na Chicana com Fluido Líquido	3.25
3.22A	Foto de Dois Recipientes Onde 10 mL de Fluido com Partículas foi Recolhido Sem Presença da Estrutura	3.26
3.22B	Foto de Dois Recipientes Onde 10 mL de Fluido com Partículas foi Recolhido Com Presença da Estrutura	3.26
3.23A	Foto Obtida em Microscópio Óptico e Aumento de 60X de Canto da estrutura	3.27

3.23B	Foto Obtida em Microscópio Óptico e Aumento de 60X do Braço Horizontal da Estrutura	3.27
3.24 A a I	Seqüência da Inserção de Pulso de Solução de Azul de Metileno na Chicana	3.28
3.25	Velocidade da Partícula de 13 μm em Função do Tempo em uma Chicana Simulada Supondo Parede Neutral	3.29
3.26	Velocidade da Partícula de 50 μm em Função do Tempo em uma Chicana Simulada Supondo Parede Neutral	3.29
3.27A	Foto em Microscopia Óptica da Estrutura Chicana Após Pulso de Partículas em Fluxo Gasoso	3.30
3.27B	Destaque para Região Entre Braços Verticais, Rompido Após o Pulso e Preenchido por Partículas	3.30
3.28A	Anteparos de 25 mm de Menor Dimensão, Colocados a 5mm da Saída da Estrutura para Fluxo com Partículas de 13 μm	3.30
3.28B	Anteparos de 25 mm de Menor Dimensão, Colocados a 5mm da Saída da Estrutura para Fluxo com Partículas de 50 μm	3.30
3.29	Velocidade da Partícula de 50 μm em Função do Tempo em uma Chicana Simulada Supondo Parede Neutral e Fluido Gasoso	3.31
3.30	Velocidade das Partículas de 13 μm e 50 μm em Função do Tempo em uma Chicana Simulada Supondo Parede Neutral e Fluido Gasoso	3.31

ABSTRACT

Samples with small volume and complex matrix, such as biological systems, require careful preparation. Many of these samples are better analyzed in miniaturized structures owing to the need of detect cells and microorganisms in different arrays. Therefore equipment able to detect and destroy microorganisms and structures to previously retain them are required in the modern life. Chicanes, i.e. constrictions used to reduce flow velocity, can be useful to retain compounds, are macroscopic devices to remove waste removal from lakes, farms, etc. and miniaturized chicane was used to adsorption of organic compounds from air and water. Thus, this work has two different targets: 1) Production of a low-cost equipment useful for tests of particle or microorganisms elimination and 2) The development of miniaturized structures useful for retention and/or selection of particles and viscous substances from a liquid flow.

The methodology used was: 1) Two software were chosen to this work. The LabVIEW[®] 7.0 was used for development of equipment software and FemLAB[®] 3.1 for structures simulation. The equipment production used Quartz Crystal Microbalance as detector and an admission system based on simple pumps and plumbing. 2) The design of the structure design was optimized using flow simulation. The optimized design was manufactured in poly(methyl methacrylate) -acrylic, with conventional tools. Acrylic was used due to the optical transparency that allows photographic tests and the structures can be easily disassembled. The simulations considered nitrogen and water for gaseous and liquid flow, respectively. It was evaluated the behavior of particles (50 μ m and 13 μ m) on gaseous flow and polydimethylsiloxane (silicone, viscosity of 350 cSt) and particles on liquid flow. The structures were characterized using equipment produced to measure adsorption and optical microscopy to evaluate particle retention. The structures were also continuously photographed during the experiments and the photos were analyzed to determine flow behavior. The reactants were inserted in the structure in small pulses.

The equipment shows good performance for detection of adsorption in liquid flows and reproducibility on monitoring heated structures. Chicanes showed good ability to retain big particles (50 μ m) but not small ones (13 μ m) for both liquid and gaseous flow. However, the structure has small load capacity for liquids (≤ 1 mg). Moreover, the retention of silicone samples in the structure on liquid flow occurs due to the difference in the fluid velocity. The simulation and experimental results are in good agreement and also chicane structure shows the possibility of selectively separate particles from gaseous and liquid flow or retain viscous

substances from a liquid flow. These results point out to several applications, such as sample pretreatment for biological analysis and microorganism retention or elimination.

RESUMO

Amostras com pequenos volumes e matrizes complexas, como sistemas biológicos, necessitam de preparação criteriosa. Muitas dessas amostras são melhor analisadas em estruturas miniaturizadas devido à necessidade de detectar células e microorganismos em diferentes matrizes. Por essa razão, equipamentos capazes de detectar e destruir microorganismos e estruturas para prévia retenção desses se faz necessários na vida moderna. Chicanas, restrições usadas para reduzir velocidade de fluxo, que podem ser utilizadas para reter compostos, são estruturas macroscópicas para remover resíduos de lagos, fazendas e etc. e chicanas miniaturizadas foram usadas para a adsorção de compostos orgânicos do ar e da água. Assim, esse trabalho tem dois diferentes objetivos: 1) Produção de um equipamento de baixo custo, para teste de partículas ou eliminação de microorganismos e 2) O desenvolvimento de estruturas miniaturizadas para retenção e/ou seleção de partículas e substâncias viscosas de um fluido líquido.

A metodologia utilizada foi: 1) Dois *software* foram escolhidos para esse trabalho. O LabVIEW® 7.0 foi utilizado como plataforma para o desenvolvimento do software do equipamento e o FemLAB® 3.1 para a simulação de estruturas. O equipamento produzido usou Microbalança de Quartzo como detector e um sistema de admissão baseado em uma bomba e tubos. 2) O desenho da estrutura foi otimizado por simulação do comportamento do fluxo. A estrutura otimizada foi feita desmontável, e usinada em polimetilmetacrilato – acrílico, com ferramentas convencionais. Acrílico foi usado devido à sua transparência óptica, que permite testes com microscopia óptica. As simulações consideraram N₂ e Água como fluidos gasoso e líquido, respectivamente. Avaliou-se o comportamento das partículas (50µm and 13µm) em fluxo gasoso e polidimetilsiloxano (silicone, com viscosidade de 350 cSt) e partículas em fluxo líquido. As estruturas foram caracterizadas quanto à adsorção e retenção de partículas usando equipamento desenvolvido e por microscopia óptica. As estruturas foram, também, continuamente fotografadas durante a execução do experimento e fotos foram utilizadas para determinar o comportamento do fluxo. Os reagentes foram injetados na estrutura em pequenos pulsos.

O equipamento mostrou boa performance para detecção de adsorção em fluxo líquido e reprodutibilidade no monitoramento do aquecimento de estruturas. As chicanas mostraram boa capacidade de reter partículas grandes (50µm), mas não pequenas (13µm), tanto para fluxos gasosos como líquidos. Contudo, a estrutura tem pequena capacidade de carga para fluidos líquidos ($\leq 1\text{mg}$); além disso, a retenção de amostras de silicone na estrutura,

utilizando fluido líquido, ocorreu devido à diferença de velocidade entre os fluidos. A simulação e os resultados experimentais apresentam boa correlação. Assim, a chicana mostrou a possibilidade de, seletivamente, separar partículas em fluxos gasosos e líquidos ou reter substâncias viscosas em fluxo líquido. Esses resultados apontam para diversas aplicações, como por exemplo, pré-tratamento para análises biológicas e retenção ou eliminação de microorganismos.

i - INTRODUÇÃO

Análises biológicas são vitais por uma série de motivos, pois, historicamente, os microorganismos sempre foram importantes para a cultura e saúde da humanidade. A possibilidade da existência de entidades vivas invisíveis ao olho humano e que seriam a causa das doenças infecciosas remonta à antiguidade. Em 1546, Girolamo Fracastorius (1483-1553) publica o livro "De contagione et contagionis" no qual especulava que doenças contagiosas eram causadas por "germes vivos", mas "a entidade transmissora" das doenças infecciosas permaneceu objeto de meras especulações até a segunda metade do século XIX. A primeira pessoa a relatar a observação de micróbios com um microscópio foi o inglês Robert Hooke em 1665. Posteriormente, as lentes de Leeuwenhoek permitiram-lhe a descoberta de algas, protozoários, leveduras e bactérias maiores. Suas observações foram publicadas, entre 1673 e 1723, no *Philosophical Transactions da Royal Society of London*. [^{i.1}]

Segundo Zilli [^{i.2}], "Os estudos com microorganismos tiveram início em 1673, com van Leeuwenhoek, mas somente ganharam impulso em 1857, com os estudos de Louis Pasteur. A primeira grande contribuição à microbiologia do solo foi o isolamento de estirpes de rizóbio no final do século 19 por Beijerinck". Naquela época, os estudos eram dificultados, principalmente em função do tamanho microscópico dos microorganismos. Avanços significativos, no entanto, podem ser notados a partir da segunda metade do século XIX. Mesmo assim, em função do paradigma científico que exigia que os organismos fossem estudados *in vitro*, até pouco tempo atrás, a detecção e identificação de microorganismos em amostras ambientais eram realizadas através de meios de cultura. [^{i.2}].

Pasteur [^{i.3}] tornou-se um paradigma tão importante para a humanidade porque conseguiu relacionar claramente microorganismos e doenças. Avaliando a importância deste pesquisador nos conceitos atuais, Braga [^{i.4}] observa que "Os estudos de Pasteur trouxeram mudanças radicais para a prática médica". Com a descoberta do agente etiológico (microorganismo) se institucionaliza uma forma de intervenção sobre a doença centrada em seus aspectos biológicos, o tratamento passa a ser baseado na imunização e uso de medicamentos. O modelo biológico se torna hegemônico na medicina, dissociando-se do social.

Pasteur e seu contemporâneo Robert Koch desenvolveram estudos que conduziram ao estabelecimento das bases da Microbiologia como ciência experimental estruturada e especializada. Assim, inúmeros procedimentos tornaram-se conhecidos, disseminados e, finalmente, padrão para manipulação e/ou tratamento de infecções e microorganismos. Pasteur foi o fundador da imunologia moderna e Koch formulou um conjunto de quatro postulados que deveriam ser adotados para que se aceitasse uma relação entre um microorganismo em particular e uma doença. Inegável é também o estabelecimento da relação entre aquecimento de um meio e destruição dos microorganismos nele presentes.

No país, a virada do século XX caracterizou-se, sobretudo pelo destaque dado aos insetos como transmissores de doenças. Médicos, bacteriologistas e zoólogos dedicaram-se com afincos à tentativa de compreender melhor a etiologia de doenças como malária e febre amarela, assim como inventariar as espécies de insetos associadas às doenças, estudar sua classificação científica e biologia e estabelecer procedimentos que permitissem controlar as epidemias.” [i.5]

Até hoje a relação dos microorganismos e o homem é extensamente estudada. Recentemente, o Conselho de Pesquisas Médicas e de Saúde do Governo Nacional da Austrália, o *Australian Government National Health and Medical Research Council* [i.6] sugeriu a mudança dos indicadores da qualidade da água. Assim, coliformes totais deixaram de ser um indicador de contaminação fecal nas diretrizes australianas de água potável (NHMRC-ARMCANZ, 1996); e o *E. coli* (Bactéria em forma de bastonete, normalmente encontrada no cólon de homens e outros mamíferos, amplamente utilizada em pesquisa biomédica) passou a ser o indicador primário de contaminação fecal nas mesmas diretrizes (NHMRC-ARMCANZ, 1996). A principal razão é que “Coliformes totais mostraram ser um parâmetro pobre para a medida de contaminação fecal da água potável, devido à sua presença como “habitantes” normais do meio-ambiente do solo e da água, suas habilidades de crescer no sistema de distribuição de água potável e sua presença inconsistente no abastecimento de água na eclosão de doenças presentes na água” [i.6].

Com o desenvolvimento acelerado da microeletrônica “Detectar células e microorganismos em diferentes matrizes está se tornando crescentemente uma importante tarefa em uma variedade de campos, incluindo controle de bioprocessos, tecnologia de alimentos, tratamentos de saúde e análise de meio-ambiente” [i.7] e uma série de técnicas, sempre baseadas em miniaturização, apareceram para coleta, manipulação e mesmo destruição microorganismos.

Dentre as técnicas possíveis chama a atenção a Dieletroforese (DEF) [i.8]. O fenômeno baseia-se no fato de que “Um campo elétrico espacial, não-uniforme exerce uma força no dipolo de campo-induzido de uma partícula. Partículas com mais alta polaridade que o meio que o circunda sofre dieletroforese (DEF) positiva, ou seja, as partículas movem-se em direção a regiões de concentração de mais alto campo elétrico. Partículas menos polarizadas que o meio que o circunda sofre eletroforese negativa e movem-se em direção a regiões de baixo campo elétrico. A força depende do dipolo induzido e do gradiente do campo elétrico, não da carga da partícula. Então, dieletroforese tem sido usada para precipitar ADN (Ácido Desoxirribonucleico) e proteínas, para manipular bactérias e para manipular e separar células e componentes subcelulares. Para juntar a robustez de ambos, *Lab-on-a-chip* (laboratório em um chip) e o fenômeno DEF, recentemente desenvolveu-se um *lab-on-a-chip* baseado no fenômeno DEF.” Do mesmo modo que aplicação de tensão pode favorecer a manipulação de bactérias, [i.9] um feixe de elétrons, obtido pelo uso de alta tensão, pode ser útil para desinfecção em sistemas macroscópicos.

Para a utilização desses dispositivos conhecidos, mas que, no entanto, são de dimensões muito grandes para serem aplicados na microeletrônica, com microorganismos, costuma-se fazê-los como parte de Sistemas Microeletromecânicos (MEMS – *Microelectricalmechanical Systems*), sistemas que integram atuadores e sistemas eletrônicos, produzidos simultaneamente [i.10]. Nesses sistemas, os equipamentos de medição e controle podem ser miniaturizados e, pelas evoluções computacionais e de produção que permitem uma maior velocidade de análises, com o mínimo de recursos.

Para análise de composto de células *in vitro* [i.14], os dispositivos em microeletrônica são, em sua maioria, desenvolvidos em lâminas de Silício (Tecnologia CMOS), mas alguns materiais plásticos também poderão ser empregados pelo interesse em algumas propriedades desses, segundo Becker [i.15].

Logo, unindo a tecnologia CMOS e os conceitos do *Lab-on-a-chip*, a microeletrônica permite criar um sistema miniaturizado (laboratório miniaturizado), assunto que já vem sendo abordado pela literatura [i.10, i.11, i.12].

Além da fabricação do dispositivo e manipulação do conteúdo sob análise, a detecção desse produto extraído e/ou manipulado é outro desafio, principalmente devido às pequenas proporções manipuladas, como adverte Schwarz [i.10]. Uma técnica bastante comum, porém

aparentemente pouco utilizada para a detecção nestes sistemas é a Microbalança de Quartzo (QCM). Hayden [^{i.11}] a utilizou para avaliar “A adesão de microorganismos em uma superfície padrão de poliuretano simultaneamente *online* e *in situ*.” e Wesley [^{i.12}] para monitorar a produção, por uma bactéria, de polímeros em meio líquido. Skládal [^{i.13}] considera que “os biosensores piezelétricos podem ser aplicados para determinação de vírus, bactérias e outras células, proteínas, ácidos nucleicos e pequenas moléculas encontradas em remédios, hormônios e pesticidas”. A técnica utiliza Cristais Piezelétricos de Quartzo, é muito versátil e muito utilizada em Química Analítica. A técnica monitora da frequência de vibração do cristal de quartzo em um circuito oscilador. Qualquer adsorção ou dessorção de material, tanto em fase gasosa quanto líquida, pode ser detectada rapidamente e em pressão atmosférica.

Pelo exposto acima, ficam claras as vantagens da existência de sistemas de manipulação e eliminação de microorganismos. Para tanto, dois objetivos específicos foram estabelecidos:

1. Um sistema capaz de detectar e destruir microorganismos foi proposto, construído e testado. A destruição, neste caso, baseia-se em aquecimento.
2. Estrutura miniaturizada para a remoção de microorganismos foi proposta e testes preliminares processados.

Este texto encontra-se dividido da seguinte forma: o Capítulo 1 traz os conceitos teóricos importantes para esse trabalho, o Capítulo 2 aborda metodologia, materiais e métodos, o Capítulo 3, resultados e discussão, finalmente o capítulo 4 apresenta conclusão e trabalhos futuros.

i.1 BIBLIOGRAFIA

- ^{i.1} História da Microbiologia-http://www.fam.br/microrganismos/historia_da_microbiologia.htm. Acessado em 2006.
- ^{i.2} Zilli, J. E.; Rumjanek, N. G.; Xavier, G. R.; Coutinho, H. L. C.; Neves, M. C. P., Diversidade Microbiana Como Indicador de Qualidade do Solo, Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v. 20, n. 3 (2003) p. 391-411.
- ^{i.3} Matos, J. A. M. G., Pasteur Ciência para Ajudar a Vida, Quimica Nova na Escola, n° 6 (1997) p. 20-22.
- ^{i.4} Braga, D., Acidente de Trabalho com Material Biológico em Trabalhadores da Equipe de Enfermagem do Centro de Pesquisas Hospital Evandro Chagas – Um Olhar da Saúde do Trabalhador, Dissertação de mestrado Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) (2000).
- ^{i.5} Sanjad, N., On 'The Abominable Profession of Being a Vampire': Emílio Goeldi and Mosquitos in Pará (1905). Hist. Cienc. Saude-Manguinhos, vol.10, no.1 (2003) p.85-111.
- ^{i.6} Stevens, M.; Ashbolt, N.; Cunliffe, D., Review of Coliforms as Microbial Indicators of Drinking Water Quality, Recommendation to Change the Use of Coliforms as Microbial Indicators of Drinking Water Quality, Australian Government National Health and Medical Research Council (2003).
- ^{i.7} Dickert F. L.; Lieberzeit P.; Hayden O., Sensor Strategies for Microorganism Detection--From Physical Principles to Imprinting Procedures, Anal. Bioanal. Chem., 377(3) (2003) p.540-549.
- ^{i.8} Ghallab, Y.; Badawy, W., Sensing Methods for Dielectrophoresis Phenomenon: From Bulky Instruments to Lab-on-a-Chip, IEEE Circuits and Systems Magazine, (2004) p.1-11.
- ^{i.9} Cleghorn, D. A; Nablo, S.V., BF6 Performance of the Electron Beam Fluidized Bed Process For Disinfection and Disinfestation of Stored Products, **CAARI**, Brookhaven National Lab., DOE, USA (2002).
- ^{i.10} Schwarz, M. A.; Hauser, P. C., Recent developments in detection methods for microfabricated analytical devices, Lab on a Chip, 1 (2001) p.1–6.

-
- ^{i.11} Hayden, O.; Bindeus, R; Dickert, F. L., Combining Atomic Force Microscope and Quartz Crystal Microbalance Studies for Cell Detection Oliver, Meas. Sci. Technol. 14 (2003) p.1876–1881.
- ^{i.12} Gee, W. A.; Ritalahti, K. M.; Hunt, W. D.; Löffler, F. E., QCM Viscometer for Bioremediation and Microbial Activity Monitoring, IEEE Sensors Journal, Vol. 3, N°. 3 (2003) p.304-309.
- ^{i.13} Skládal, P.; Braz, J., Piezoelectric Quartz Crystal Sensors Applied for Bioanalytical Assays and Characterization of Affinity Interactions, Chem. Soc., 14 (4) (2003) p.491- 502.

1 - CONCEITOS TEÓRICOS

Este capítulo abordará os principais itens para compreensão do trabalho efetuado. Assim, inicialmente descreve-se uma técnica de análise útil para detecção de microorganismos (QCM). Posteriormente discutem-se métodos de eliminação de microorganismos, pelo uso de aquecimento e preferencialmente em sistemas líquidos. Assim, as condições necessárias para que essa eliminação seja eficiente e/ou eficaz são abordadas no intuito de definir um conjunto de características necessárias a um equipamento com essas funções. Por fim, verifica-se se estruturas, macroscópicas ou não, estão disponíveis para a eliminação de microorganismos ou partículas.

1.1 Técnica de Detecção: Microbalança de Quartzo (QCM) e Periféricos

Para esse trabalho serão utilizados a Microbalança de Quartzo e alguns periféricos importantes para a sua ligação a sistema de coleta de dados. O princípio de operação do QCM está relacionado com o efeito piezelétrico. Este efeito se deve à propriedade de certos materiais gerarem um campo elétrico quando são submetidos a deformações ou pressões externas. Quando a polaridade da perturbação mecânica varia, varia também a polaridade do campo elétrico gerado. Este fenômeno é denominado efeito piezelétrico direto e os cristais que exibem este efeito são chamados cristais piezelétricos (PQC). Também é possível aplicar um campo elétrico sobre o material piezelétrico provocando uma deformação, e estas variações mecânicas no cristal podem seguir as variações de direção da mesma maneira que a perturbação elétrica. Neste caso, observa-se a ocorrência do efeito piezelétrico reverso. Quando a perturbação elétrica tem as características adequadas (amplitude e frequência), as quais são determinadas pela geometria e propriedades do cristal, este oscilará mecanicamente em um modo ressonante. Estas condições significam que um cristal piezelétrico pode oscilar em seu modo de cisalhamento (propagação da onda perpendicularmente ao campo elétrico) devido ao efeito piezelétrico reverso. A técnica de microbalança de quartzo pode ser usada para fluidos líquidos ou gasosos. Neste trabalho dá-se ênfase a sistemas líquidos. A coleta de dados por processamento digital de sinais é bastante relevante para permitir análise rápida, mesmo *online*, além de facilitar posterior tratamento de dados.

1.1.1 Arranjo Experimental do QCM

Há uma série grande de trabalhos na área de Microbalança de Quartzo [^{1.1,1.2,1.3}] e Varela [^{1.4}] apresenta uma excelente revisão. Um dos possíveis modos de uso do QCM é deixar uma das faces do cristal em contato com uma solução eletrolítica, sendo também o eletrodo de trabalho. Neste eletrodo, segundo Varela, uma reação redox é produzida pela aplicação de um sinal de potencial ou corrente. Então, para induzir a oscilação mecânica, um campo elétrico é aplicado entre os dois depósitos metálicos sobre cristal. Em geral, um dos maiores problemas experimentais está relacionado à aderência destes depósitos metálicos sobre o cristal de quartzo, pois uma má aderência produz uma grande instabilidade na frequência de ressonância medida. Para solucionar esse problema, pode-se utilizar um tratamento químico do cristal com um adesivo molecular, como o 3-mercaptopropil-trimetoxissilano, antes do depósito metálico por evaporação. Este processo produz filmes metálicos com excelente aderência e uma alta qualidade sob o ponto de vista eletroquímico.

A aplicação de um campo elétrico alternado produz a oscilação no centro do cristal, esta oscilação está confinada à região do cristal definida pela superfície do filme metálico depositado. Segundo Varela [^{1.4}], esta configuração permite situar o cristal em uma célula eletroquímica, por exemplo, montada entre anéis com alta resistência química e elasticidade (silicone ou viton, Figura 1.1). O diâmetro dos anéis utilizados deve ser maior que a superfície ativa (definida pelo diâmetro do filme metálico depositado) para evitar a produção de tensão mecânica na zona de oscilação do cristal. Este fenômeno define as características do desenho para adequar o cristal à célula eletroquímica. Portanto, a região onde é mantido o QCM, normalmente designada como cela, é fundamental para a operação do sistema.

Figura 1.1 – Esquema da Microbalança de Quartzo [1.4]

Ainda segundo Varela [14], as variações na frequência que correspondem a uma adição ou subtração de massa podem ser descritas utilizando a equação de Sauerbrey:

$$\Delta f = - \left(\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\mu_c \rho_c}} \right) \Delta m = -K \Delta m$$

Onde, Δf é a variação de frequência de ressonância em Hz, A é a área geométrica piezeletricamente ativa em cm^2 definida pela projeção dos filmes metálicos depositadas sobre o cristal, f_0 é a frequência fundamental do cristal, μ_c e ρ_c são massa reduzida e densidade do fluido e Δm a variação de massa. Portanto, a variação de frequência é proporcional à variação de massa.

Algumas considerações são feitas:

- Os filmes devem estar rigidamente ligados ao metal;
- As variações de frequência devem ser menores que 2% da frequência de ressonância;
- Variações na viscosidade do meio ou do filme, assim como variações na tensão mecânica sobre o cristal, produzem variações na frequência fundamental.

Existem inúmeros sistemas de admissão de fluidos em uma região de medida ou reação, no presente caso correspondendo à cela do QCM. Este trabalho dará ênfase a um sistema de baixo custo proposto por Matos [1.5] e desenvolvido para uso em QCM por

Nascimento [1.6]. Segundo Nascimento [1.6] um sistema de admissão de líquidos pode ser formado pelos seguintes componentes: compressor de ar e válvula reguladora, recipiente para armazenamento de fluido (água destilada no estudo em questão) e seringas descartáveis. “O compressor foi utilizado como solução para substituir uma bomba peristáltica, a qual possui alto custo” e “seringas descartáveis com capacidade de 0,5 – 1,0 ou 3 mL, para injeção dos reagentes”. O compressor “empurra” o fluido por tubulações até a entrada da estrutura sobre análise e também da cela do PQC. A injeção permite adição controlada de contaminantes a este fluxo.

1.1.2 Instrumentação, para Aquisição de Sinais e Análise de Dados

Aquisição e processamento de sinais é um campo amplo de atuação [1.7,1.8,1.9]. A seguir será dado apenas um pequeno resumo sobre instrumentação virtual para aquisição e processamento de sinais [1.10].

O sistema para a produção de instrumentação virtual para aquisição de sinais é composto por um conjunto de *hardware* e *software*. O primeiro passo do caminho que o sinal vai passar até chegar à estação de aquisição é um condicionador de sinal, que se faz muito necessário à medida que o sinal sai da unidade em teste com muitos ruídos, além da rede elétrica que também contém muitos ruídos, o que faz com que o sinal original fique imensurável para o “aquisitor virtual”. Uma vez condicionado, o sinal tem que passar pelos controladores, que transformam o sinal analógico em sinal digital, que fazem a contagem digital dos períodos, que dão uma saída de sinal após o sinal já processado e etc. Passado pelos controladores, o sinal estará em uma condição aceitável para passar pela placa de aquisição de dados (DAQ) e ser reconhecido pelo *software* que faz o reconhecimento desse sinal para o processamento. Essa placa pode estar em um microcomputador comum, até mesmo em um computador portátil, no entanto existem microcomputadores dedicados, com a instrumentação modular que, não em sua concepção (que é semelhante à de um Computador Pessoal), mas em sua montagem (disposição de gabinete, maior número de *slots* para controladores, etc.), é voltado para a produção de Laboratórios Virtuais Multifunção. A Figura 1.6 mostra esquema geral dessa aquisição.

Figura 1.2 – Esquema de um Sistema de Instrumentação Virtual para Aquisição de Sinais [1.10]

1.2 Manipulação de Partículas

Como abordado na introdução deste trabalho, há uma série de métodos para manipulação de partículas, incluindo microorganismos. Na maioria das vezes essa manipulação inclui retenção, seleção e/ou eliminação destes microorganismos. Neste trabalho maior ênfase foi dada à eliminação em sistemas líquidos.

1.2.1 Retenção

Ênfase está sendo dada, neste caso, para processos ocorrendo em água.

1.2.1.1 Principais Processos

Para a eliminação de impurezas na água, como compostos químicos e microorganismos causadores de doenças, existem alguns procedimentos, como Purificação e Filtração [1.11]. Para a purificação temos alguns exemplos, como Carvão Ativado, Destilação, que dependem de outros fenômenos que não a retenção por tamanho de poro. A filtração, por

sua vez, depende da existência desses poros, muitas vezes microscópicos como em Osmose Reversa. Uma breve descrição destes métodos é dada a seguir.

1. Filtração ^[1.11]

No caso da filtração, o filtro atua como uma peneira cuja função é reter as impurezas suspensas na água. A purificação da água, feita numa etapa posterior, é um processo mais complexo, pois se encarrega de retirar impurezas muito pequenas, normalmente abaixo de 1 µm, como microorganismos, micropartículas em suspensão e substâncias químicas. Em termos gerais, as diferenças entre os sistemas de filtração simples, ultrafiltração e purificação são mostrados na figura 1.3, em função de suas capacidades de retenção de contaminantes particulados ou de esterilização de microorganismos.

Figura 1.3 – Tamanho de Partículas e Tipos de Filtração ^[1.15]

2. Osmose Reversa ^[1.11]

Osmose é o processo de ultrafiltração, que também é utilizado pelas células de nosso organismo para receber alimentos através de suas membranas externas, semipermeáveis, e expelir os resíduos, em um processo reverso, por diferenças de concentrações.

Este princípio é utilizado pelos purificadores por osmose reversa (atuando só no sentido reverso, o da eliminação de resíduos), que purificam a água fazendo-a passar por uma membrana semipermeável cujos “poros” de filtração medem de 10^{-6} a 10^{-7} mm. Antes de passar por essa membrana, é feita uma pré-filtração da água com um ou dois elementos filtrantes de polipropileno com grau de retenção de 10 e 5 μm (para retirar sólidos em suspensão), e com um cartucho de carvão ativado compacto (para retirar o cloro, cheiros e sabores estranhos). Os poros de filtração, por serem tão pequenos, permitem que as substâncias dissolvidas ou em suspensão na água de entrada sejam separadas “em nível molecular”, pois só as moléculas da água são pequenas o suficiente para passar pelos poros de filtração da membrana. A purificação por osmose reversa é utilizada, por exemplo, para produzir água para hemodiálise, para medicamentos injetáveis, águas purificadas e engarrafadas para o consumo humano e, com equipamentos especiais, para dessalinizar diretamente a água salobra ou a água do mar.

3. Carvão Ativado [^{1.11}]

O carvão ativado tem a capacidade de retirar odores e sabores desagradáveis da água e, principalmente, o cloro, por meio de mecanismos de adsorção. O cloro é um desinfetante poderoso cuja adição à água é necessária para mantê-la desinfetada nas tubulações e reservatórios, porém é um produto prejudicial à saúde devendo, por isso, ser retirado da água antes do seu consumo. O carvão ativado pode ser utilizado na forma granulada ou em blocos compactos. Na forma granulada alcança uma eficiência entre 50 e 60% (dependendo da granulometria e da capacidade de adsorção do carvão utilizado). Isto ocorre porque uma boa parte da água tratada não passa “através” dos grãos de carvão, mas em volta deles, criando, com o tempo, canais preferenciais que permitem sua passagem direta, quase sem manter contato com o carvão. Já o carvão ativado compacto, na forma de um cartucho sólido, obriga a água a permear através de suas paredes, sem possibilidade de criar caminhos alternativos, com o que se consegue uma eficiência de retenção de cloro da ordem de 90 a 98%. O carvão ativado é muitas vezes aditivado com nitrato de prata para evitar a formação de colônias de microorganismos em suas superfícies de contato com a água. A função desse aditivo, nessa aplicação, é bacteriostática, mas não bactericida, isto é, não afeta os microorganismos suspensos na água.

4. Destilação [^{1.11}]

Processo mais usualmente utilizado em laboratórios. A água é fervida, evaporada e, posteriormente, condensada através de resfriamento. Praticamente todos os poluentes são eliminados nesse ciclo. Existe um problema neste processo, o custo da energia consumida para aquecer e resfriar a água.

1.2.2 Eliminação

Neste trabalho, eliminação é compreendida com a destruição da amostra sob manipulação. A destruição de uma amostra normalmente é importante apenas quando microorganismos estão sob análise. Para amostras não biológicas, como compostos químicos em matriz aquosa, a remoção de quaisquer produtos é denominada pré-tratamento de amostras e faz uso de outros processos.

A eliminação de microorganismos é obtida, normalmente, por esterilização. Esterilização é a destruição ou remoção de todas as formas de vida de um dado material. Desinfecção é a destruição dos microorganismos patogênicos, sem que haja, necessariamente, a destruição de todos os microorganismos [^{1.12}].

A esterilização já foi bastante estudada [^{1.13,1.14}] e atualmente é normalizada por regras governamentais [^{1.15}]. No país, recomenda-se o uso de aquecimento de acordo com a Tabela 1.1. Acredita-se que a destruição dos microorganismos por ação térmica se deve a coagulação de suas proteínas e especialmente a inativação das enzimas necessária para o seu metabolismo.

Tabela 1.1 - Condições de Aquecimento Recomendadas para Eliminação de Microorganismos

Processo: ESTUFA		
Uso: O calor seco é utilizado para materiais de vidro, agulhas, instrumentos delicados de corte, artigos metálicos que não são de aço inoxidável.		
Fontes de calor: ar quente, chama direta, incineração, microondas, infravermelhos.		
Condições de temperatura e tempo para o processo:		
<u>Temperatura</u>	<u>Tempo</u>	
160°C	120 minutos	
170°C	60 minutos	
180°C	30 minutos	
Para processamento dos microorganismos:		
<u>Temperatura</u>	<u>Tempo</u>	<u>Umidade relativa</u>
134°C	3 minutos	100 %
121°C	15 minutos	100 %

A esterilização pode ser feita pelo uso de um forno de Pasteur, que é muito semelhante a uma estufa de laboratório químico. Por este método podem ser esterilizados materiais que não podem ser molhados como algodão, compressas de gaze, óleos, gorduras, ceras e pós, desde que não se alterem pelo aquecimento. Para instrumentos metálicos e equipamentos de vidro é considerado um método de esterilização eficaz.

É importante um cálculo da “Destruição Térmica de Microorganismo” nas amostras, como será visto a seguir. Não se encontrou informações dos parâmetros para a destruição de microorganismos quando se utiliza microestruturas, contudo, essa destruição pode ser entendida verificando-se como são tratadas amostras complexas, como os alimentos. Assim, este texto dará certa ênfase a este processo de tratamento, porque é um modo de se avaliar possíveis faixas de trabalho para um equipamento construído para análise e/ou destruição de microorganismos [1.16 – 1.21].

Os principais fatores que afetam o desenvolvimento de microorganismos são: Nutrientes, Umidade, Oxigênio e Temperatura. Para cada grupo de microorganismo, há uma faixa de temperatura ótima ou mais favorável para o seu desenvolvimento. Esta faixa é ampla, podendo variar de 14 a 20°C para 45 a 65° C. Portanto há a necessidade de

definir os valores de resistência térmica dos microrganismos a serem eliminados e a Tabela 1.2 mostra as condições utilizadas para eliminação de alguns destes microrganismos em alimentos. Nestas condições, mesmo se dentro de embalagens, provavelmente cerca de 90% dos microrganismos serão destruídos.

Tabela 1.2 – Resistência Térmica de Alguns Microorganismos Encontrados em Alimentos [1.16 – 1.21]

MICROORGANISMOS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (MINUTOS)
<i>Streptococcus fecalis</i>	65,0	5,0 - 30,0
<i>Salmonella spp</i>	65,5	0,02 - 0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	65,5	0,02 - 2,0
<i>Escherichia coli</i>	65,0	0,10
<i>Bolores e Leveduras</i>	65,5	0,50 - 3,0
<i>Clostridium botulinum</i>	100	100 - 330
<i>Clostridium botulinum (esporo)</i>	100	15 - 20
<i>Bacillus anthracis (esporo)</i>	100	1,7
<i>Bactéria fermentativa simples</i>	100	1030

Do mesmo modo que aquecimento, a aplicação de tensão, ou mesmo de um feixe de elétrons, pode favorecer a manipulação de bactérias [1.22]. Um fluido em alta velocidade tem sido usado para produzir um feixe de elétrons, permitindo efetivamente um tratamento isotrópico para cada partícula suspensa (sistema gasoso). Um sistema piloto está em testes baseado em um acelerador *Electrocurtain*® auto-blindado de 250kV e vem sendo usado há anos para desinfecção de superfícies (eliminação de microrganismos) de uma variedade de agro produtos. Bons resultados para a remoção da biocarga natural de um grande número de espécies patogênicas em sementes de alfafa foram obtidos. Sistemas econômicos foram propostos para “Baixa-dose” (<1000 Gray) em processos de desinfecção em potências entre 5 – 100 kW, tensão entre 200-500kV e *throughputs* entre 1-100 ton.H⁻¹.

1.3 Equipamentos para Eliminação de Bactérias

Equipamentos para eliminação de bactérias existem em inúmeras formas e tamanhos, contudo, via de regra estes têm como objetivo o processamento de grandes volumes, como pode se notar pela descrição anterior. Neste item serão descritos sistemas menores que possam vir a ser adaptados ao uso em laboratório, miniaturizados ou mesmo como microestruturas.

1.3.1 Equipamentos Macroscópicos

Em geral, os equipamentos de eliminação de microorganismos não manipulam também a amostra. Como visto anteriormente, são fornos de aquecimento, microondas, ultravioleta, etc. Porém, em um sistema líquido pode haver a necessidade da retenção dos microorganismos previamente à sua eliminação.

Existe um processo simples, conhecido como *settling chamber* (câmara de sedimentação) e que apresenta várias vantagens na retenção de produtos ou partículas. A idéia da câmara de sedimentação é criar condições tais que a partícula sedimente, em geral pela força da gravidade. É comum o uso de chicanas, que são anteparos ao fluxo em um grande número de constrições, deliberadamente provocando grandes variações de velocidades. Nestas constrições, algumas regiões irão apresentar velocidade próxima de zero e possibilidade de retenção de material sólido.

Leite [^{1.23}] usou câmaras de sedimentação para estudo da taxa de sedimentação no reservatório da região de Salto Grande. Leite observa que as câmaras de sedimentação existem há muito, porém foram por muito tempo negligenciadas e só reintroduzidas após a década de 50 do século XX. Os principais parâmetros envolvidos na definição da câmara de sedimentação são a relação comprimento/largura do sistema e o regime de fluxo. O comprimento deve muito maior que a largura, para assegurar o aprisionamento das partículas e o fluxo não turbulento. As câmaras de sedimentação de Leite correspondem a tubos de PVC com relação de comprimento/diâmetro de 3:1 e volume interno de 2,2 litros.

Zanotelli [^{1.24}] descreve o uso de chicanas para o tratamento de dejetos de suinocultura em lagoas de tratamento de água como segue. “Chicanas são paredes ou chapas usadas para canalizar ou direcionar o fluxo do líquido através da lagoa. Estas chapas promovem a

submersão dos microorganismos localizados na superfície, aumentando a concentração dos mesmos nas lagoas através de sua fixação nas paredes, melhorando a taxa de estabilização orgânica na lagoa. As chicanas afetam o fluxo hidráulico padrão do sistema e reduzem os curto-circuitos, promovendo condições favoráveis ao escoamento do líquido ... as chicanas provocam um regime hidráulico semelhante ao de fluxo pistão, o qual aumenta a eficiência de remoção do carbono orgânico e nitrogênio...”. Em escala piloto “As distâncias entre as chicanas são as seguintes, tomando como referência o fundo das lagoas: a chicana da segunda lagoa está instalada no centro da lagoa, ou seja, a 1m da borda inferior; na terceira lagoa as chicanas estão a 0,66m de distância, e na quarta lagoa a 0,40m de distância.”. Um modelo matemático foi desenvolvido considerando a completa mistura dos líquidos na lagoa, concluindo-se que: “em todas as lagoas, o primeiro compartimento é o principal responsável pelo desempenho das mesmas, apresentando o maior valor do coeficiente de degradação”.

Para os testes em escala piloto as principais conclusões foram:

- “Ficou evidenciado que no primeiro compartimento (C1) da lagoa facultativa com chicanas houve a maior parte da atividade de degradação da matéria orgânica, os sólidos foram removidos ao longo de cada compartimento; enquanto que o último compartimento foi responsável pela maior parcela de remoção do fósforo total.
- O sistema total apresentou elevada eficiência na remoção de poluentes, embora apenas os coliformes totais e fecais ficaram com a concentração do efluente condizente com os valores exigidos na Legislação Ambiental Estadual.”

Portanto, os estudos acima sugerem que chicanas também podem ser eficientes para o mesmo fim, mas em escala micrométrica; mas não se encontrou na literatura tal desenho aplicado a sistemas microscópicos, em microeletrônica ou MEMS. Assim, esta hipótese será preliminarmente testada neste trabalho para a retenção de partículas em um meio líquido.

1.3.2 Equipamentos Microscópicos

Os recentes progressos nos Sistemas Microeletromecânicos – tecnologia de Microeletrônica, Microfabricação e Micromáquinas conhecida como MEMS – estão sendo aplicados em biomedicina e têm se tornado um novo campo de pesquisas, conhecido como BioMEMS. A tecnologia é originalmente baseada na mesma tecnologia de microeletrônica

para produção de *microchips* mais poderosos e menos caros. Os BioMEMS aplicam essa tecnologia, além de conceitos nas diversas áreas de pesquisa biomédica e medicina clínica. Os BioMEMS estão se tornando uma tecnologia de grande utilização e baixo custo em sistemas de dimensões reduzidas para diagnósticos médicos e terapias.

Segundo Baal [^{1.25}] duas grandes vantagens podem ser obtidas pela fabricação dos BioMEMS:

- A tendência de miniaturização e paralelização de análise biomolecular e bioquímica pode ser significativamente acelerada. Isto pode contribuir para acelerar o processo da descoberta de medicamentos e permitirá o desenvolvimento de novas e poderosas ferramentas de diagnóstico, como análise genética para a rotina médica diária. Assim a tecnologia BioMEMS para Dispositivos *In Vitro* permite um novo conceito em análise biomolecular e bioquímica.
- A miniaturização e integração de vários processos laboratoriais em um único *chip* (*Lab-on-a-Chip*) permite acelerar o tempo de análise em geral e permite ainda a implementação do novo conceito de monitoramento descentralizado (diagnóstico em postos de saúde).

Provavelmente a miniaturização para análise biomolecular levará à manipulação de microorganismos e de suas partes enquanto ao *Lab-on-a-Chip* caberá sua remoção ou análise de seus constituintes. São exemplos da manipulação de microorganismos e de suas partes o uso da Dieletroforese (DEF) [^{1.26}], como comentado na introdução deste trabalho. A DEF é mais prontamente observada em partículas de diâmetro de 1 a 1000 μm . Nesta técnica, as partículas sofrem a aplicação de uma força porque o campo elétrico é não-uniforme. A força de DEF não depende da polaridade do campo elétrico aplicado e é observada tanto em excitação AC quanto em DC. Dependendo das características das partículas estas serão atraídas ou repelidas para regiões de forte campo elétrico. Portanto, alguns progressos têm sido feitos com experimentos *in vitro* e *in vivo* através de estímulos elétricos e análise da resposta.

As microestruturas são normalmente utilizadas para a manipulação de microorganismos de várias formas:

- para fabricação de soluções de cultura;
- como substrato sobre os quais as células são mantidas e/ou cultivadas, para controle e posterior análise;

A destruição celular permite a obtenção de inúmeros fragmentos com estruturas de interesse para a ciência, cujo estudo pode ocorrer no mesmo meio e local onde se deu a destruição. Assim, microestruturas específicas são construídas para análise destes fragmentos. Às microestruturas podem ser adicionados contatos, para aquisição de sinais e análise de dados, via Instrumentação virtual.

Os avanços da tecnologia associada ao desenvolvimento de MEMS para a investigação de questões da biologia celular têm motivado o surgimento de novas estruturas e o uso de outros substratos. Assim, microestruturas podem ser feitas em silício, mas cada vez mais vidro e material plástico vêm sendo usados, como abordado na introdução deste trabalho. Uma inegável vantagem do uso de material plástico é a facilidade de usinagem e baixo custo.

1.4 BIBLIOGRAFIA

^{1.1} Mueller, R. M.; White, W., Direct Gravimetric Calibration of a Quartz Crystal Microbalance, Review of Scientific Instruments, Volume 39, Issue 3 (1968) p. 291-295.

^{1.2} Elam, J. W.; Groner, M. D.; George, S. M., Viscous Flow Reactor With Quartz Crystal Microbalance for Thin Film Growth by Atomic Layer Deposition, Review of Scientific Instruments, Volume 73, Number 8 (2002).

^{1.3} Marx, K. A., Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface, Biomacromolecules, 4 (5) (2003) p.1099-1120.

^{1.4} Varela, H.; Malta, M.; Torresi, R. M., Técnicas *IN SITU* de Baixo Custo em Eletroquímica: A Microbalança a Cristal de Quartzito Hamilton, Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo (2000).

- ^{1.5} Matos, R. C.; Gutz, I. G. R.; Angnes, L.; Fontenele, R. S.; Pedrotti, J. J., Propulsor Pneumático Versátil E Isento De Pulsação Para Sistemas De Análise Em Fluxo, Quim. Nova, Vol. 24, No. 6 (2001) p.795-798.
- ^{1.6} Nascimento Fº, A. P., Uso de microcanais na pré-concentração de produtos químicos, Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica [Sp-Capital]) - Universidade de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2002).
- ^{1.7} Oppenheim, A. V.; Schafer, R. W., Discrete-Time Signal Processing, Englewood Cliffs, Prentice Hall (1989).
- ^{1.8} Diniz, P. S. R., Adaptive Filtering : Algorithms and Practical Implementation, Kluwer Academic Publishers (1997).
- ^{1.9} Gold, B.; Morgan, N., Speech and Audio Signal Processing, New York: John Wiley & Sons, Inc. (2000).
- ^{1.10} National Instruments – www.ni.com. Acessado em 2006.
- ^{1.11} Springway – www.springway.com.br. Acessado em 2006.
- ^{1.12} Jorge, A. O. C, Princípios de Biossegurança em Odontologia INFECTION CONTROL IN DENTISTRY, Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP
<http://www.unitau.br/prppg/publica/biocienc/downloads/principiosbio-N1-2002.pdf>.
Acessado em 2006.
- ^{1.13} Bier, O., Microbiologia e Imunologia, ed. São Paulo: Melhoramentos, p.1984. 1234.
- ^{1.14} Steiner, R. Y.; Doudoroff, M.; Adelberg, E. A., Mundo dos Micróbios, São Paulo: Edgard Blücher - Universidade de São Paulo (1969) 74 p.
- ^{1.15} Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Saúde – Editor Dr. Ricardo Jorge, Programa Nacional de Controlo de Infecção: Orientações para Elaboração de um Msnuar de Boas Práticas em Bacteriologia (2004) 193p.
- ^{1.16} Frazier, W. C.; Westhoff, D.C., Microbiologia de Los Alimentos, ed. Acríbia (1978).
- ^{1.17} Stumbo, C. R., Thermobacteriology in Food Processing, Academic Pres (1973).
- ^{1.18} Russel. A. D., The Destruction of Bacterial Spore, London Academic Pres (1982).
- ^{1.19} Ball, C. O., Determining by Methods of Calculation, the Time Necessary to Process Canned Foods (1923).

- ^{1.20} Ball, C. O.; Olson, F. C. W., Sterilization in Food Technology, Mc Graw Hill (1957).
- ^{1.21} Banwart, G. J., Basic Food Microbiology, Westpot (1979).
- ^{1.22} Cleghorn, D. A; Nablo, S.V., BF6 Performance of the Electron Beam Fluidized Bed Process For Disinfection and Disinfestation of Stored Products, **CAARI**, Brookhaven National Lab., DOE, USA (2002).
- ^{1.23} Leite, M. A., Variação Espacial e Temporal da Taxa de Sedimentação de Salto Grande e sua Influência nas Características Linmológicas do Sistema, Tese (Mestrado – USP) (1998).
- ^{1.24} Zanotelli, C. T., Modelagem Matemática de Nitrogênio e Fósforo em Lagoas Facultativas e de Aguapés para Tratamento de Dejetos de Suínos, Cladir Teresinha, Tese (Doutorado - UFSC) (2002).
- ^{1.25} Suframa Minapim News – Artigo Dr. Thomas Baal (2005).
- ^{1.26} Ghallab, Y.; Badawy, W., Sensing Methods for Dielectrophoresis Phenomenon: From Bulky Instruments to Lab-on-a-Chip, IEEE Circuits and Systems Magazine, (2004) p.1-11.

2 - METODOLOGIA, MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentada a metodologia, os materiais e os métodos utilizados para o desenvolvimento deste projeto.

2.1 Metodologia

Para melhor descrever a metodologia, esta será dividida em duas partes, a primeira que tratará da definição e construção do equipamento, ao qual esse trabalho propõe, e a segunda fará uma descrição do uso desse sistema.

2.1.1 Definição e Construção do Equipamento

Para ilustrar as etapas que foram utilizadas para a definição e construção do equipamento para o sistema de análise de eliminação de microorganismos, é apresentado o seguinte fluxograma (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Diagrama de Blocos da Definição e Construção do Equipamento de Sistema de Análise.

O nome, Sistema de Análise, foi utilizado porque o equipamento apresenta mais de uma função, e bem distintas, sendo que nesse trabalho serão descritas as partes e peças importantes.

Para o desenvolvimento desse estudo, antes de iniciarmos o processo das análises propriamente dito, verificou-se quais eram as informações desejadas e as mínimas necessárias para podermos verificar em bibliografia e sistemas comerciais, quais eram as técnicas de análises que seriam possíveis de serem empregadas. Uma vez definida a técnica de análise, houve a necessidade de se definir qual(is) equipamento(s) seriam utilizados e, então, a definição das partes e peças a serem utilizadas no equipamento. Com todo o material definido, foi feita a construção e a otimização do sistema de análise e, para tal, foram desenvolvidos, como se verá posteriormente, testes para o algoritmo de aquisição e processamento de sinais e da manipulação da amostra na estrutura definida.

2.1.2 Sistema em Estudo

Esse trabalho propõe a eliminação de microorganismos, através da utilização de uma microestrutura e periféricos do sistema, conectada a um sistema que transforma as informações obtidas na estrutura, via equipamento eletrônico, em sinais elétricos para que esses sejam analisados em um *software*. Para caracterizar o comportamento do equipamento no que se refere a microorganismos utilizou-se, como amostra, partículas, como proposto por Beraldo [2.1].

Para definirmos qual estrutura seria utilizada, procedeu-se da mesma forma que para o sistema de análise, listando-se as condições de contorno e as informações mínimas desejadas. Fez-se testes da estrutura após a otimização do equipamento e apenas para obter informações preliminares, já que o objetivo primeiro é a obtenção deste equipamento.

2.1.3 Condições de Contorno

Para a definição e construção do equipamento, definiu-se algumas condições de contorno:

- Como o objetivo é, em futuro próximo, a eliminação de microorganismos, as estruturas devem ter no mínimo uma dimensão micrométrica (10^{-6}m).
- As técnicas de análise devem adequar-se à análise de materiais de dimensões micrométricas.

- Para assegurar-se do comportamento dinâmico (no tempo) da estrutura, a maior parte das análises deve ser feita *in situ*.
- Do mesmo modo, análises *online*, para trabalhar em conjunto com os algoritmos criados para aquisição e processamento de sinais e a possibilidade de interagir, não só com os sinais adquiridos, mas também com o processo.

As condições de contorno definidas para a estrutura são semelhantes às propostas por Beraldo [2.1]:

- Sistemas desmontáveis, uma vez que pode haver necessidade de outras análises, ou de recolhimento de amostras desses microorganismos, ou mesmo de partes destes.
- Preferência a materiais poliméricos, já utilizados em área de saúde, podendo haver compatibilidade entre os sistemas que se quer estudar e materiais já comerciais, além da própria biocompatibilidade.
- Baixo custo, visando vantagens comerciais, uma vez que passa a ser possível fabricação em larga escala.
- Utilizar, para testes que simulem microorganismos, sistemas inertes, como micropartículas (geralmente SiO₂), para evitar a utilização de organismos vivos, o que requer, entre outros cuidados, permissão especial.

2.2 Materiais

Abordaremos os materiais para a construção do equipamento e para a fabricação da estrutura.

2.2.1 Equipamento

Para ilustrar o funcionamento em uso do sistema de análise, foi criado um fluxograma. De acordo com o fluxograma pode-se perceber que as informações serão manipuladas em um fluxo contínuo desde sua admissão até sua análise. Logo, a linha que se deve seguir para que o material seja analisado é:

- A inserção da amostra no sistema.
- A manipulação da amostra que foi levada à estrutura pelo fluxo, essa manipulação deve suportar variações de temperatura.

- Sistema de detecção, no qual os dados da manipulação serão adquiridos pelo sistema computacional. Este sistema também necessita alimentação de tensão.

Figura 2.2 – Fluxograma de Descrição do Equipamento em Uso

2.2.2 – Software e Periféricos

Considerando o fluxograma acima, houve a necessidade da escolha do software desenvolvedor para a implementação do algoritmo de aquisição e processamento do sinal.

Para esse fim, o software escolhido foi o LabVIEW[®] 7.0 da National Instruments[®] por se tratar de uma plataforma voltada à criação de instrumentos virtuais (VI's) para a medição de sinais elétricos, com algoritmos voltados à aquisição de sinais externos, processamento desses sinais e de interação com processos externos. Com o LabVIEW[®] 7.0 também é possível desenvolver uma forma gráfica de apresentação e representação dos sinais adquiridos e processados. Durante o processo de composição do algoritmo, testes de *debug* foram feitos em busca de eventuais erros de rotina e sub-rotina.

A Figura 2.3 mostra esquematicamente o funcionamento de um sistema de aquisição e processamento de sinais em LabVIEW[®] 7.0. O sinal é gerado e passa por um condicionador de sinais para poder ser adquirido pela placa de aquisição. Após a aquisição o sinal é processado e o resultado pode ser apresentado em qualquer microcomputador ou terminal.

Figura 2.3 – Esquema de Funcionamento de Aquisição e Processamento de Dados

Como interface entre o sinal gerado pela manipulação da amostra e o *software* desenvolvido, para condicionamento do sinal, são utilizados neste caso os periféricos SCB-100, uma placa DAQ e uma placa GPIB.

Como demonstrado esquematicamente na Figura 2.4B, o sinal, por conexões elétricas, pode entrar no dispositivo SCB-100 em dezesseis canais distintos. O dispositivo SCB-100 é ligado por um cabo de dados à placa DAQ, que fornece a informação necessária, de acordo com a requisição feita pelo *software*. A placa GPIB é utilizada para fazer a interface entre o freqüencímetro e o computador, como explicado posteriormente.

Figura 2.4 – Dispositivo SCB-100 (A) e Esquema de Ligação da PCI na SCB-100 para Aquisição de Sinais no LabVIEW®7.0 (B)

Como mostrado no Anexo A desse trabalho, o LabVIEW[®] tem uma configuração recomendada para microcomputadores. Neste trabalho, o microcomputador utilizado para as medidas tem uma configuração próxima da recomendada:

- Processador Pentium III 800 MHz
- 64 MB RAM
- 2 Gb livres de HD

Apesar de não ter a quantidade de memória RAM, como recomendado pelo fabricante (Anexo A), foi possível seu funcionamento sem maiores problemas, devido ao sistema operacional utilizado, Microsoft Windows[®] NT 4.0, que não requer tanta memória RAM. Observe-se que o fabricante recomenda outro sistema operacional.

2.2.3 – Sistema para Manipulação de Fluxo e Periféricos

O sistema utilizado para manipulação dos fluxos líquidos foi o mesmo proposto por Nascimento em sua tese de doutorado [2.2], bem como a cela de detecção pela qual o fluxo passa após a manipulação da amostra. De acordo com o sistema proposto por Nascimento [2.2] os detectores são baseados em cristais piezelétricos de quartzo (PQC), mas adicionamos a esse sistema o uso de aquecimento.

Segundo Nascimento [2.2], “A cela de detecção para o PQC é confeccionada em Teflon[®], para evitar interação do fluxo de reagentes com as paredes (adsorção), o que pode gerar o efeito de memória nas medidas”. A Figura 2.5 mostra o esquema da cela proposto por Nascimento, para detecção em medidas em fase líquida.

Figura 2.5 - Esquema da Cella de Detecção Utilizada para Medidas em Fase Líquida (figura adaptada de Nascimento [2.2]).

De acordo com a técnica de microbalança de quartzo (QCM), os cristais piezelétricos são usados como detectores para medidas em fase líquida ou gasosa. Essa técnica pode ser utilizada para medidas de adsorção (filmes finos) e de retenção/eliminação (estruturas). Para adsorção em filmes finos, faz-se a deposição desse filme diretamente no cristal; para retenção, faz-se uso da estrutura de retenção/eliminação (microestrutura) e o cristal piezelétrico pode ou não receber a deposição de um filme adsorvente. A microestrutura é utilizada imediatamente antes do cristal.

Para os testes, Nascimento ^[2.2] utilizou uma cela de detecção construída especialmente para manter o cristal piezelétrico e um filme obtido por polimerização por plasma de hexametildissilazana (HMDS) por ser este um filme de boa adsorção de compostos orgânicos. Na Figura 2.6, temos o esquema de admissão para reagentes líquidos.

Figura 2.6 - Esquema da Admissão Líquida (figura adaptada de Nascimento ^[2.2]).

Segundo Matos ^[2.3], é possível substituir bombas dosadoras de alto custo por bombas de aquário, de baixo custo, para impulsionar os reagentes para o sistema. Assim, seguindo esse estudo, Nascimento ^[2.2] propôs a produção do sistema com bombas de aquário para o sistema líquido.

O sinal que se obtém nesta cela é uma variação de frequência (de apenas alguns Hz) em um sinal de MHz, que, portanto, precisa ser medida com precisão. Sistemas consagrados normalmente utilizam freqüencímetros de alto custo. Como um dos objetivos do trabalho é gerar um sistema de menor custo que os sistemas já consagrados para o mesmo fim, fez-se a substituição do freqüencímetro usualmente utilizado por um mais simples (HP 34401A) com um divisor de freqüências para que esse modelo de multímetro conseguisse fazer a leitura das freqüências de trabalho. O circuito oscilador utilizado nestas medidas também está de acordo com Nascimento ^[2.2] e encontra-se na Figura 2.7.

Figura 2.7 Circuito Oscilador Utilizado nas Medidas de QCM_L [2.2]

2.2.4 – Manipulação de Amostras por Aquecimento

Como estudado por Souza [2.4], é possível se desenvolver um sistema de baixo custo para dessorção, e que pode ser adaptado para catálise [2.5], utilizando um controlador de temperaturas, e uma cela com revestimento cerâmico e resistências internas que permitam o aquecimento controlado a temperaturas em torno de 200°C. Seguindo esses estudos foi proposto utilizar um arranjo semelhante, porém voltado ao aquecimento para eliminação de microorganismos das estruturas. Neste caso a cobertura da cela de aquecimento foi recortada, de modo a garantir a troca de fluxo rápida, mas sem perda de aquecimento. Este resultado é importante porque, como abordado no capítulo 1, a eliminação de microorganismos exige manutenção da temperatura de modo constante e por vários minutos. O recorte também facilita a troca de estruturas. A Figura 2.8 ilustra o sistema proposto por Souza e o recorte adicionado.

Figura 2.8 – Sistema Proposto por Souza [24] para Aquecimento de Estruturas (A) e Detalhe da Cella de Aquecimento Após Recorte (B)

Por fim, todo o conjunto – admissão, aquecimento, detecção – foi agregado em uma plataforma rígida (manifold), para impedir variações nas medidas devido a variações no fluxo.

2.3 Métodos

2.3.1 Medidas Utilizando Cristais Piezelétricos de Quartz

Para calibração do equipamento, seguiram-se as normas utilizadas por Nascimento [22], segundo as quais normalmente utilizam-se compostos orgânicos em larga faixa de polaridade e a detecção é diretamente proporcional ao fluxo injetado (modo de injeção pulsado).

Semelhante ao proposto por Silva [26], foram utilizados para a detecção, os métodos de inserção em fluxo contínuo e em fluxo pulsado. De acordo com Silva [26], “O modo contínuo corresponde à admissão por longo tempo, da ordem de minutos, do contaminante. O modo pulsado corresponde à admissão de uma massa pequena e bem definida, da ordem de mg ou menor, do contaminante e no menor tempo possível, da ordem de segundo. Uma alternativa é a adição em intervalos regulares de vários “pulsos” de contaminantes; assim, é possível verificar se um contaminante funciona como eluente para o anteriormente admitido... A utilização do modo contínuo tem como objetivo avaliar a cinética do sistema interno da estrutura, quando esta é utilizada... O uso do modo pulsado tem como objetivo a análise da capacidade de retenção do filme em sua superfície.”.

A Figura 2.9 demonstra o comportamento esperado de um gráfico obtido por QCM em modo pulsado.

Figura 2.9 - Gráfico Típico para Caracterização das Estruturas Acrílicas das Medidas Obtidas no Modo Pulsado Usando QCM e n-hexano Como Reagente [2.6].

O comportamento esperado de um gráfico obtido por QCM em modo pulsado obtido por Silva em QCM, como mostrado na Figura 2.10, tem a seguinte análise:

- 0 – 1 ➔ tempo de estabilização da estrutura e da cela de detecção.
- 1 – 2 ➔ adsorção de contaminantes;
- 2 – 3 ➔ dessorção de contaminantes adsorvidos no intervalo anterior;
- 3 – 4 ➔ corresponde a adsorção de contaminantes de modo similar a 1 - 2.
 - A grande diferença entre os intervalos 1-2 e 3-4 é que no segundo intervalo o filme já foi exposto ao contaminante, portanto, provavelmente, sua superfície já adsorveu o produto;
- 4 – 5 ➔ dessorção de contaminantes adsorvidos no intervalo anterior. Permite verificar a reprodutibilidade do sistema;”[2.6].

Finalmente, eventualmente algumas adaptações foram feitas para as medidas e serão explicadas imediatamente antes de seu uso, como por exemplo, o uso de microscopia óptica ou filmagem de comportamento das estruturas.

Figura 2.10 – Gráfico Típico Para Caracterização das Estruturas Acrílicas Usando Modo Contínuo nas Medidas Feitas em QCM [^{2,6}].

2.4 BIBLIOGRAFIA

- ^{2.1} Beraldo, F. P., Desenvolvimento de Estrutura para Retenção de Partículas/Microorganismos Presentes em Fase Gasosa e Testes em Equipamento Dedicado, Dissertação, EPUSP (2006) 72 p.
- ^{2.2} Nascimento F^o, A. P., Uso de Microcanais na Pré-concentração de Produtos Químicos, Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica [Sp-Capital]) - Universidade de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2002).
- ^{2.3} Matos, R. C.; Gutz, I. G. R.; Angnes, L.; Fontenele, R. S.; Pedrotti, J. J., Propulsor Pneumático Versátil E Isento De Pulsação Para Sistemas De Análise Em Fluxo, *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 6 (2001) p.795-798.
- ^{2.4} Souza, S. G., Utilização de Microcanais na Pré-concentração de Poluentes, Tese EPUSP (2002).
- ^{2.5} Carvalho, A. T.; Silva, L. M.; Silva, M. L. P., Use of Electroless Plating Copper Thin Films for Catalysis, *Materials Science Forum*, Vols. 514-516 (2006) p.1328-1332.
- ^{2.6} Silva, L. M., Uso de Microcanais na Detecção De VOC's, Dissertação (Mestrado Em Engenharia Elétrica [Sp-Capital]) - Universidade De São Paulo (2005).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo está dividido em duas partes distintas, abordando a construção do instrumento e os testes preliminares de uma estrutura desenvolvida. Quanto à construção do equipamento, mostra-se o desenvolvimento do *software* e alguns resultados de medidas nele feitas, que atestam sua funcionalidade. Para os testes da estrutura, o texto inicialmente descreve a estrutura testada após o que serão apresentadas as respectivas simulações.

3.1 Construção e o Teste do Instrumento

Este item dará ênfase ao desenvolvimento do *software*. Este *software* possui 4 pontos distintos, como demonstrado na Figura 3.1. Cada uma destes módulos terá sua construção melhor explicada subseqüentemente.

Figura 3.1 – Fluxograma para o Desenvolvimento de Laboratório Virtual com LabVIEW® 7.0

O primeiro módulo é responsável pela alimentação do sistema, ou seja, através dele é possível gerar uma tensão de $\pm 5V$ (máximo) que alimenta os circuitos.

O segundo módulo é responsável pela aquisição de sinais referente à temperatura e confrontá-los com os sinais oriundos de outros módulos.

O terceiro módulo é responsável pela aquisição de frequência oriunda de um circuito comparador de frequências.

O quarto módulo é responsável pela aquisição de frequência oriunda de um circuito divisor de frequências unido a um freqüencímetro.

3.1.1 Descrição dos Monitoramentos e Testes

Dois tipos de monitoramentos são feitos no *software* desenvolvido:

1. Aquecimento, para obter eliminação de microorganismos e também catálise.
2. Detecção (Adsorção/retenção/etc.) por Microbalança de Quartzo para medidas em meio líquido (QCM_L)

3.1.1.1. Aquecimento

Algoritmo feito para monitorar temperatura o mais próximo possível da estrutura, onde vários fenômenos - tais como adsorção e dessorção, catálise, etc. - estão ocorrendo. Via de regra estes fenômenos ocorrem rapidamente e são bastante dependente das temperaturas, portanto a medida deve ser rápida.

Foi utilizado um circuito cujo esquema elétrico é mostrado na Figura 3.2A. Neste circuito um resistor NTC é exposto ao calor e tem sua resistência variada de acordo com a variação da temperatura. Com a variação da resistência e, conseqüentemente da queda de tensão no NTC, há variação da tensão também no resistor de 50k Ω . A variação de tensão no resistor de 50k Ω é medida e, por um ajuste de curva, feito de acordo com o gráfico mostrado na Figura 3.2B, o *software* faz automaticamente a conversão de tensão para o valor de temperatura correspondente. O NTC utilizado mostrou boa variação de resistência na faixa de temperatura ambiente-300°C e foi mantido durante todo o trabalho.

Figura 3.2 – Esquema do Circuito Elétrico Usado para Medição de Temperatura (A) e Variação de Tensão em Função da Temperatura no NTC (B)

Esse algoritmo também é capaz de demonstrar graficamente as relações de Temperatura versus tempo e Temperatura versus Frequência, para medidas que integrem temperatura e PQC.

A Figura 3.3 mostra os painéis frontais do algoritmo de controle de aquecimento, para Temperatura versus Frequência (Figura 3.3 A). Temperatura versus tempo (Figura 3.3 B). Na Figura 3.3 as abas “Tensão DC aplicada”, “Medir frequência” “HP34401A” e “Dif. Frequência” são relevantes apenas para o sistema de detecção e serão explicadas posteriormente.

A

B

Figura 3.3 – Painel Frontal do Algoritmo para Aquecimento com os Módulos para as Relações Temperatura versus Frequência (A) e Temperatura versus Tempo (B)

A capacidade de medir temperatura e frequência ao mesmo tempo foi testada neste equipamento utilizando-se freqüencímetro, com medida de MHz e erro de medida em kHz, e banho termostatzado. A Figura 3.4A mostra resultado para valor de medida de frequência de $(300,0 \pm 0,3)$ kHz e banho termostatzado $(6,7 \pm 0,3)$ °C. Como pode ser visto nesta figura, os resultados mantiveram-se dentro do intervalo previsto. Medidas de até 4 horas não mostraram variação significativa neste comportamento, portanto o sistema é adequado para efetuar estas medidas no que concerne ao sistema de aquecimento. Para comparar a medida de temperatura em função do tempo utilizou-se o próprio sistema de aquecimento e medida de temperatura por via indireta, com outro termopar, obtendo-se bons resultados, como pode ser visto na Figura 3.4B.

Figura 3.4 - (A) Medidas de Frequência em Função da Temperatura e (B) Variação de Resistência no NTC em Função do Tempo na Faixa de Temperatura Ambiente até 150°C

Após os testes aqui descritos o módulo de aquecimento foi usado continuamente em vários experimentos, demonstrando reprodutibilidade de comportamento.

3.1.1.2. Detecção (QCM_L)

O algoritmo gerado, para a aquisição e processamento dos sinais no QCM_L, baseou-se na necessidade da aquisição de um sinal de frequência gerado por um oscilador, como descrito no Capítulo 2. O cristal oscilador usado tem frequência de 4,096MHz, fazendo-se medidas da variação da sua frequência quando da adsorção, dessorção e/ou retenção, de líquidos ou partículas respectivamente, ao qual foi exposto.

Como o objetivo é medir a frequência e a placa de aquisição (DAQ) não tem boa precisão para medidas nessa faixa de frequência, uma solução testada foi utilizar um circuito eletrônico com comparador de frequência, para que se faça a subtração da frequência de um cristal fixo (não exposto ao teste) e um cuja frequência varia (exposto ao teste), fazendo com que o resultado, isto é, o valor de frequência a ser medido pelo sistema de aquisição seja de dezenas ou poucas centenas de Hz. A Figura 3.5 mostra esquema elétrico do sistema testado. O circuito comparador foi construído de acordo com as especificações do fornecedor do CI.

Figura 3.5 – Circuito Comparador de Frequências

Os testes feitos utilizando o comparador de frequências não foram bem sucedidos, mostrando excesso de ruído gerado principalmente pela frequência da rede (60Hz). Essa situação pode ocorrer quando se utiliza fluido líquido, especialmente água. Testes de aterramento da cela foram efetuados e não mostraram variação no comportamento, indicando que o fluido que se encontra fora da cela pode ser o responsável pela dificuldade da medida.

Portanto, o equipamento necessita de um sistema com Multímetro, de modo semelhante aos equipamentos convencionais. Contudo, para permitir menor custo utilizou-se

um multímetro HP34401A e placa GPIB conectada ao microcomputador, que apresentam menor custo.

O Multímetro HP 34401A mede frequências até 2MHz, que também não é suficiente para avaliar a frequência do cristal utilizado no QCM_L, então utilizou-se um divisor de frequências para que o valor possa ser medido pelo multímetro e depois, matematicamente, convertido ao valor original, via *software*. A Figura 3.6 mostra o esquema elétrico do divisor utilizado.

Figura 3.6 – Esquema do Circuito Divisor de Frequências Utilizado

Após o desenvolvimento destas interfaces (comparador e divisor de frequência), criou-se o algoritmo para o QCM_L. O fluxograma da Figura 3.7 descreve o funcionamento do programa gerado. O acionamento do programa ativa simultaneamente o controle para o divisor de frequência e o programa para aquisição do sinal. Caso o comparador de frequências esteja ativo, o sistema capta automaticamente esta frequência. Porém, caso não haja comparação, o sistema procura o sinal do multímetro, via placa GPIB. Ambos os sinais são mostrados no gráfico gerado pelo *software*.

Figura 3.7 – Fluxograma de Descrição do Módulo para QCM_L

Para o controle do programa de aquisição de dados foi criado um painel de controle, utilizando um sistema de abas para a seleção de cada uma das opções do programa, como pode ser visto na Figura 3.8. Estas funções são: a) ativação do Divisor de Frequências pela aplicação de tensão DC; aquisição do sinal b) via GPIB ou c) via Comparador de Frequências, e, finalmente, d) Diferencial de Frequência, para se ter diretamente no gráfico o valor da variação de frequência em função do tempo.

Figura 3.8 – Painel de Controle do *Software* para QCM_L

Figura 3.8 – Painel de Controle do *Software* para QCM_L (Continuação)

Uma vez terminada a elaboração desse módulo do *software*, havia a necessidade de testá-lo e, para tal, fez-se:

- Para testar a configuração para QCM_L, um filme adsorvente para compostos orgânicos voláteis (VOC's) foi proposto por Hernandez [3.1] e obtido pela polimerização por plasma de acetaldeído. Este filme foi depositado em um cristal piezelétrico e testado no equipamento e *software* gerados. As figuras 3.9 e 3.10 mostram resultados típicos, obtidos tanto para medidas gasosas quanto líquidas. Nestes testes foi possível demonstrar que a bomba líquida pode ser utilizada para adicionar ar ao sistema em lugar do nitrogênio advindo do torpedo. Do mesmo modo verificou-se que é possível utilizar a cela tanto para medidas líquidas quanto gasosas.

Figura 3.9 – Testes de Adsorção em Microestrutura Mostrando Eluição do n-hexano por 2-propanol em Fase Gasosa[3.1]. Os valores entre parênteses indicam o volume de reagente, adicionado na forma de vapor.

Figura 3.10 - Variação da Frequência em Função do Tempo para Pulso de n-hexano Seguido de Pulsos de Acetona em Fase Líquida [3.1]. Os valores entre parênteses indicam o volume de reagente, adicionado na forma líquida.

Hernandez [3.1] verificou que as medidas são coerentes com as propriedades encontradas para este filme adsorvente por outros métodos de medida.

- Podemos comparar as medidas com o obtido por Nascimento [3.2], tanto em fase líquida quanto gasosa, para chicanas semelhantes a que serão utilizadas neste trabalho, mas neste caso testadas para adsorção de compostos orgânicos (VOC's). Para sistema líquido e gasoso as Figuras 3.11 e 3.12 mostram resultados típicos. A Tabela 3.1 mostra os resultados quantitativos obtidos por estes testes. Assim, o sistema apresenta resultados coerentes e, já que este equipamento foi utilizado por vários meses mostrando reprodutibilidade de resultados, considera-se que se encontra desenvolvido.

Figura 3.11 - Variação da Frequência em Função do Tempo para Estrutura Tipo Chicana com Filme a Base de 2-propanol Depositado Sobre Ela e Testada para Adsorção de 2-propanol em Solução Aquosa (10% vol.)

Figura 3.12 - Variação da Frequência em Função do Tempo para Estrutura Chicana com Filme a Base de HMDS Depositado e Vapor de n-hexano Admitido Sequencialmente. As flechas indicam o tempo em que pulso de reagente são adicionados ao fluxo. A quantidade inserida em cada pulso está de acordo com a Tabela 3.1

Tabela 3.1 - Resultados Quantitativos Obtidos Pelos Testes Descritos na Figura 3.14

Número do pulso	Reagente	Quantidade injetada (mg)
1	n-hexano	16,8
2	n-hexano	28
3	n-hexano	8,4
4	n-hexano	16,8
5	n-hexano	28
6	n-hexano	16,8
--	--	114,8 (total injetado)
7	2-propanol	28

3.1.2 Montagem do Sistema

O sistema foi montado de modo a ocupar pouco espaço e posteriormente foi estruturado em um gabinete de microcomputador, de acordo com a Figura 3.13. Nesta foto mostra-se a também construção de outros sistemas, feita por Beraldo [^{3.3}].

**Figura 3.13 – Sistema Montado: A) QCM_g
B) QCM_L
C) Eletrodos
D) Aquecimento**

O sistema de QCMg (letra A, Figura 3.14), foi montado na tampa do gabinete, pois o mesmo permite a mobilidade de abrir e fechar, de acordo com o espaço disponível para a medida e, no sistema de QCMg é possível essa movimentação sem prejudicá-lo. O sistema de QCMg é semelhante ao QCM_L no que concerne à detecção e aquisição de sinal.

O sistema de QCM_L (letra B, Figura 3.14), pela necessidade de ser fixo e não permitir movimentação foi montado na superfície inferior do gabinete, onde pôde-se prender a bomba, e afixar os tubos para que esses não se movimentem durante a medida.

Ainda no interior do gabinete, também está posicionado um sistema de eletrodos, que é ligado ao QCM_L por uma PCI (letra C, Figura 3.14) e ao QCMg por um *Flat-Cable*. Ao lado do QCM_L (letra D, Figura 3.14) encontra-se o sistema de aquecimento.

3.2 Construção e o Teste da Estrutura Utilizada

Para o desenvolvimento de uma estrutura capaz de remoção e posterior destruição de microrganismo, como abordado na introdução, optou-se pela miniaturização e fabricação de estruturas baseadas em sistemas de retenção macroscópicos, denominadas chicanas, como mostradas na Figura 3.14, e, como mencionado anteriormente, testadas por Nascimento [^{3.2}] para adsorção de compostos orgânicos voláteis, tanto em fase gasosa quanto líquida.

Figura 3.14 – Dimensões da Estrutura do Tipo Chicana

Como critério inicial, tanto para teste quanto para simulação, as dimensões das estruturas foram mantidas iguais às propostas por Nascimento [^{3.2}]. Assim, tem-se um processo iterativo de produção, testes e simulação.

Como descrito no Capítulo 2, deseja-se que estas estruturas sejam desmontáveis; assim na maioria das vezes utilizou a adesão por fita (Scotch YR9767, acrílica e de 5 μ m), não por aquecimento.

Os testes iniciais da estrutura tiveram como objetivo verificar sua capacidade de retenção; para tanto seguiram a metodologia proposta por Beraldo [3.3] e avaliaram a retenção de partículas e emulsão. O uso de emulsão assemelha-se à condição em que um microorganismo tem sua estrutura destruída (rompimento celular).

Para emulsão, o teste consistiu na inserção de pequena quantidade de silicone, dimetilsiloxano - 350 cSt, variando a inserção de $2 \cdot 10^{-3}$ a $6 \cdot 10^{-3}$ mL, imediatamente seguido pela adição de 0,01 mL de solução aquosa 1% de azul de metileno (marcador). O teste usou como fase líquida água e a velocidade do fluido foi medida durante todo o processo. A passagem da solução aquosa de azul de metileno foi filmada para permitir o cálculo da vazão do silicone na estrutura. Assim, é possível avaliar a diferença de vazão entre os dois fluidos e, também, como o silicone “espalha-se” pela região interna da estrutura. Este último resultado é obtido através da filmagem da passagem do fluido pela estrutura. A partir dos dados de vazão também se calculou a velocidade linear dos fluidos, necessária para as simulações. Como referência utilizou-se a injeção da solução aquosa de azul de metileno, sendo calculada a vazão desta. Este valor foi comparado com o obtido para o fluido sem nenhuma injeção, ou seja, pelo uso de uma proveta. De modo similar injetou-se pequenas bolhas de ar, apenas para verificar o comportamento de um fluido com viscosidade muito abaixo da encontrada para o silicone, ou mesmo água. Entre dois testes consecutivos a estrutura foi limpa com álcool isopropílico, caso não ocorra a desmontagem.

Para partículas, o teste consistiu na inserção de uma dispersão com partículas de 50 μm ou 12 μm no fluxo de água. A avaliação da retenção é feita por análise visual do fluxo na saída da estrutura. Após vários testes há a desmontagem desta estrutura e análise por microscopia óptica. O tamanho das partículas é consistente com a região em que ocorre agregação de microorganismos na parede, como comentado anteriormente.

Para comparação testes foram efetuados em outro arranjo experimental¹ e, dependendo dos resultados, testes em fase gasosa foram igualmente processados.

3.2.1 Testes Utilizando Silicone

A Figura 3.16 mostra um quadro obtido da filmagem destas estruturas com silicone como reagente, solução aquosa de azul de metileno como marcador e água como fluido. É possível observar que várias regiões não apresentam forma quadrada, devido à retenção de silicone. A principal característica destes testes é a menor velocidade obtida para o silicone.

Para fluxos de água entre $5,4 \cdot 10^{-4}$ mL/s e $4 \cdot 10^{-2}$ mL/s as velocidades do silicone internamente à estrutura variam apenas de $8 \cdot 10^{-5}$ mL/s e $2 \cdot 10^{-4}$ mL/s, respectivamente. A retenção ocorre, como visto na Figura 3.15, devido a pouca velocidade e, após várias inserções, devido à constrição do caminho para o fluxo essa velocidade pode diminuir ainda mais, o que leva a interrompimento do fluxo caso a pressão de entrada na estrutura não seja variada.

Figura 3.15 – Experimento com Chicana Passando Silicone e Solução de Azul de Metileno pela Estrutura

Portanto, há um comportamento bastante distinto entre os dois fluidos, não só em velocidade como em comportamento dentro da estrutura. Assim, enquanto a água comporta-se como uma “frente”, o que pode ser notado pelo uso do azul de metileno sem a injeção de silicone como mostra a Figura 3.16, o silicone apresenta caminhos preferenciais e em muitos pontos parece aderir à parede, o que pode ser notado pelo impedimento da saída do azul de metileno pelo canal. Assim, esta estrutura parece adequada para a remoção de microrganismos.

3.2.1.1 Simulação das Estruturas Utilizando Água, Acetona e Silicone como Fluidos

A partir dos resultados iniciais, descritos no item 3.2.1.1., tomou-se como critério para a simulação das estruturas as seguintes condições:

- Fluidos: usou-se água e silicone porque estes são soluto e solvente, respectivamente, mas também simulou-se acetona, apenas para comparação, uma vez que esta é menos viscosa que a água e deve ter um comportamento mais parecido com as bolhas. O uso de acetona na estrutura, porém, exigiria proteção com um filme a base de HMDS [^{3,4}].

¹ Pertencente a Universidade de Porto Rico

- Velocidades: usaram-se as comuns ao equipamento e em quatro pontos distintos (0,35 mL/min; 0,50 mL/min; 0,75 mL/min; 1 mL/min).
- Dimensões da estrutura: de acordo com a utilizada no teste
- Condições de contorno: devido ao comportamento demonstrado pela estrutura supôs-se que as paredes destas apresentam um comportamento “slip” para o silicone, mas não para o solvente. Apenas para comparação, também simulou-se o silicone como “*no slip*²”.

Os resultados mais relevantes são mostrados a seguir. A partir desta simulação inicial, escolheram-se novas dimensões para simulação; optando-se por um processo iterativo.

3.2.1.1.1 Simulação das Estruturas Utilizando Água, Acetona e Silicone e Supondo as Paredes *no slip*

Neste caso, pressupõe-se que nenhum fluido terá interação significativa com a parede. Resultados típicos são vistos nas figuras 3.16 a 3.18.

² No Slip – significa, neste software, que a parede não tem interação com o fluido, não importa qual o regime de fluxo que esteja ocorrendo

Figura 3.16 – Simulação para Acetona nos Quatro Fluxos Pré-Determinados (A-0,35 mL/min; B-0,50 mL/min; C-0,75 mL/min; D-1 mL/min)

É possível observar para a acetona (Figura 3.16) que a principal diferença do comportamento do fluido encontra-se no começo e no fim do canal correspondendo a primeira e a última parede por ele encontrada. Conforme se aumenta a velocidade total, a velocidade linear interna da estrutura aumenta e nos 5º e 6º canais verticais, já na velocidade de 1 mL/min, podemos ver grandes aumentos de velocidade, os quais geram turbulência que podem vir a gerar vórtices; nesse caso, como os valores estão muito altos para o canal que está na 6ª parede, podemos concluir que há possibilidade de formação de vórtices nessas

condições, pois a acetona é menos viscosa que a água e pode mostrar grandes velocidades pontuais, muito embora a simulação não mostre esse fenômeno.

É importante observar que a variação não se restringe apenas a vórtices, mas também há pontos de velocidade muito baixa, os cantos da estrutura, que podemos chamar de “volumes-mortos” e que, como esperado, provavelmente facilitam a retenção dos microorganismos.

Figura 3.17 – Simulação para Água nos Quatro Fluxos Pré-Determinados (A-0,35 mL/min; B-0,50 mL/min; C-0,75 mL/min; D-1 mL/min)

A Figura 3.17 mostra comportamento similar entre acetona e água, sendo a principal diferença a velocidade do fluido. O mesmo pode ser observado para o silicone (Figura 3.18).

Figura 3.18 – Simulação para Silicone em Fluxo Pré-Determinados (1 mL/min)

Aparentemente a principal assimetria dos fluidos presentes nas figuras 3.19 a 3.21 ocorre no início e no fim do canal, ou seja, correspondem ao 1º e último canais verticais, onde ocorrem grandes variações de velocidade. No presente caso a explicação mais provável deve-se à grande perda de carga no início da admissão do fluido e a quase nenhuma perda de carga no fim. Assim, no início a dificuldade de passagem cria uma perda de carga que se traduz em aparente turbulência, na saída, a facilidade de saída do fluido não é acompanhada pelo comportamento nos canais anteriores e novamente ocorre turbulência. Em conjunto, provavelmente essas mudanças de velocidade geram as mudanças nas velocidades no meio do canal.

Para se avaliar semi-quantitativamente a variação de volumes mortos calculou-se a diagonal que delimita os volumes mortos, ou seja, os cantos da estrutura onde a velocidade tende a zero foram medidos. Verificou-se que as dimensões não variam, independentemente da velocidade do fluido no canal, o que significa que provavelmente o sistema é útil em grande faixa de velocidade do fluido, independente do fluido.

3.2.1.2 Variação das Dimensões das Chicanas

Considerando que as simulações demonstraram assimetria no comportamento entre os canais horizontal e vertical, novas simulações foram feitas supondo as dimensões dos canais idênticos. A Figura 3.19 mostra resultado típico obtido para silicone.

Figura 3.19 – Exemplo de Simulação do Fluido Silicone em Velocidade de 1 mL/min e Chicana com Dimensões Iguais em Cada Braço (Horizontal e Vertical)

A simulação da estrutura mostrada na Figura 3.19 mostra comportamento interessante, pois evidencia duas características: formação de regiões de alta velocidade não apenas nas paredes, como mostrado anteriormente nas figuras 3.17 a 3.19, mas também no meio do fluído, o que pode significar aparecimento de vórtices na estrutura. Por outro lado os volumes mortos são aparentemente maiores e completamente simétricos. Portanto essa estrutura provavelmente favorece a retenção porém, por outro lado, a também provável formação de vórtices dificulta sua utilização. Isto pode significar que o fluido não teve tempo de se homogeneizar antes de mudar de direção, o que dificulta a retenção e o uso da estrutura.

Água e acetona apresentam comportamento similar, inclusive com velocidades máxima e mínima próximas entre si e os resultados são mostrados na Tabela 3.2. Assim, a dimensão dos canais é mais importante do que a viscosidade para determinar o comportamento do fluido na estrutura.

Os resultados obtidos usando esse tipo de configuração não estão de acordo com o esperado pelo uso de silicone e azul de metileno, portanto é de se esperar que ocorra, principalmente com o silicone, interação com as paredes.

Tabela 3.2 - Principais Resultados Obtidos Simulando Chicanas de Dimensões Assimétricas (1) e Simétricas (2) em Seus Canais Horizontais e Verticais

Fluxo (ml/min)	Estrutura (Chicana)	Reagente			
		H ₂ O		Acetona	
		V máx.	V mín.	V máx.	V mín.
0,35	1	0,0122	0,0015	0,0122	0,0015
	2	0,0111	0,0010	0,0111	0,0010
0,50	1	0,0175	0,0030	0,0175	0,0030
	2	0,0159	0,0030	0,0159	0,0025
0,75	1	0,0262	0,0030	0,0262	0,0030
	2	0,0239	0,0025	0,0238	0,0025
1,00	1	0,0349	0,0050	0,0349	0,0050
	2	0,0318	0,0025	0,0318	0,0025

3.2.1.2.1 Conclusão Parcial

Os resultados da simulação podem ser resumidos como segue:

- Não há variação de velocidade entre Água e Acetona, independente das dimensões, portanto a viscosidade não é importante, além disso, as dimensões são adequadas para permitir que o fluxo volte a se comportar aproximadamente igual ao que existia antes da constrição.
- A turbulência é muito maior na estrutura simétrica (Tabela 3.2, chicana 2) e encontra-se mais concentrada no centro, enquanto na estrutura assimétrica (Tabela 3.2, chicana 1) ela é pequena e concentrada nas paredes.

Assim, por esta simulação, supondo as paredes *no-slip*, a viscosidade não é relevante para determinar a maioria das propriedades, o que é dispare com o observado experimentalmente. Portanto, a simulação foi refeita supondo as paredes com interação com o fluido, como será descrito no próximo item.

3.2.1.3 Simulação das Estruturas Utilizando Silicone e Supondo as Paredes *slip*³

Neste caso, pressupõe-se que o fluido terá interação significativa com a parede, assim sendo, várias hipóteses se inserem, como pode ser visto na Figura 3.20. As hipóteses levantadas neste teste são como segue:

CIN⁴ - as paredes mais relevantes devem ser as verticais (na Figura 3.20a ,b, g, h), uma vez que as horizontais são responsáveis pelo escoamento do fluido e, também supõe-se que uma das paredes verticais permite o escoamento, por acomodação do fluido.

PN⁵ – pressupõe que uma das paredes permite o escoamento por acomodação do fluido vertical (na Figura 3.20c, d, i, j)

TPN⁶ – pressupõe-se interação entre todas as paredes verticais (na Figura 3.20 e, f, l, m)

Foi simulado apenas o silicone, pois unicamente esse apresentou um comportamento diferenciado. Para a solução aquosa de azul de metileno, água, bolha ou álcool isopropílico, ou seja, para todos os outros fluidos, a simulação supondo paredes *no slip* é coerente.

Experimentalmente, notou-se dificuldade do silicone em percorrer o canal, o que diminui a velocidade desse fluido, mas não há nenhuma variação significativa de uma parede para outra da estrutura. Pela simulação, a que apresenta comportamento mais semelhante ao observado experimentalmente é a condição em que se supõe que todas as paredes têm interação com o fluido, pois nesse caso pode-se observar, como no experimental, alta variação de velocidade e de comportamento nas extremidades das estruturas. As outras condições não demonstraram situações coerentes com a realidade física, como velocidade de entrada muito baixa e de saída muito alta, apenas para que se cumpra o que se determinou como condição de contorno (Velocidade de Entrada = Velocidade de Saída).

Uma vez que o resultado não é coerente, muito provavelmente deve estar ocorrendo retenção, o mesmo deve valer para o caso “PN” que demonstra uma possibilidade de saída tendo uma velocidade anterior muito baixa.

³ nesse caso pressupõe-se que há interação entre a parede e o fluido.

⁴ CIN – é a sigla Corredores intercalados neutros. O termo *neutral* (neutro) significa que na parede não se estabeleceu previamente nenhuma condição de contorno

⁵ PN – Sigla para Parede Neutral

⁶ TPN – Sigla para Todas Paredes Neutral

Figura 3.20 – Chicanas Simuladas com as Hipóteses de CIN, PN e TPN, para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min. a ,b, g, h - As Paredes Mais Relevantes Devem ser as Verticais; c, d, i, j - Pressupõe que Uma das Paredes Permite o escoamento por Acomodação do Fluido Vertical; e, f, l, m - Pressupõe-se Interação Entre Todas as Paredes Verticais

Figura 3.20 – Chicanas Simuladas com as Hipóteses de CIN, PN e TPN, para Silicone, com Fluxo de 100 mL/min. a ,b, g, h - As Paredes Mais Relevantes Devem ser as Verticais; c, d, i, j - Pressupõe que Uma das Paredes Permite o Escoamento por Acomodação do Fluido Vertical; e, f, l, m – Pressupõe-se Interação Entre Todas as Paredes Verticais (Continuação)

Nos três casos nota-se assimetria de comportamento dentro da estrutura, como esperado, baseando-se nos experimentos realizados, onde pode haver retenção do silicone e, em longo prazo, comportamento assimétrico. Portanto, os resultados aparentemente díspares demonstram que as condições de contorno não estão coerentes, ou seja, a condição inicial de Velocidade de Entrada = Velocidade de Saída não pôde se manter na maioria dos casos, o que indica que ela está incorreta, ou seja, houve retenção, o que foi verificado nos dados experimentais. Para comparação, simularam-se estruturas simétricas, como feitas no item anterior, verificando-se que o comportamento encontrado é o mesmo observado em estruturas assimétricas. É interessante observar que a velocidade também é completamente diferente das obtidas anteriormente e mais coerente com as obtidas experimentalmente.

É útil observar a necessidade de se considerar a retenção nas estruturas, principalmente na condição denominada TPN, onde, na estrutura completamente simétrica a velocidade tende a ser muito pequena, já após a segunda área vertical.

3.2.2 Teste para Partículas em Fase Líquida

Os testes com partículas foram divididos em duas fases: na primeira utilizou-se filmagem e microscopia óptica para verificar se ocorria retenção das partículas. Nesta fase mediram-se as estruturas em dois arranjos experimentais: em Porto Rico e no Brasil.

A Figura 3.21, de A a I, mostra um processo de inserção de partículas de 13 μm na chicana. Este resultado foi obtido em arranjo existente na Universidade de Porto Rico/Humacao. É possível observar que a partir da Figura 3.21 D ocorre o gotejamento de um fluido turvo, devido à presença de partículas. Nestas condições não há retenção significativa do pulso de partículas.

Figura 3.21 A a I – Sequência da Inserção de Pulso de Partículas na Chicana com Fluido Líquido

Por outro lado, a inserção de partículas de 50 μm mostra retenção efetiva como pode ser visto nas Figuras 3.22 e 3.23. A Figura 3.22 mostra foto de dois recipientes onde 10 mL de fluido foi recolhido. O recolhimento começou imediatamente após a inserção das partículas no fluxo e o tempo de recolhimento é igual nas duas amostras, assim como a velocidade do fluido. A diferença entre as experiências é apenas a presença ou não da estrutura. Nestas condições observa-se que apenas um dos recipientes (Figura 3.22A) apresenta líquido turvo, devido à presença de partículas. Portanto, nestas condições a chicana foi adequada para recolher a amostra.

A Figura 3.23A mostra um canto da estrutura, em foto obtida em microscópio óptico e aumento de 60X, em arranjo existente em Porto Rico. Nesta foto pode-se notar que os cantos aparentam estar mais rugosos que as paredes, devido à retenção das partículas. Testes da estrutura e aquecimento (80°C) não mostraram variação de comportamento.

Assim, como esperado, a chicana funciona para retenção de partículas em seus espaços mortos, ou seja, região onde o fluxo é muito lento e a inércia da partícula pode facilitar sua retenção, o tamanho da partícula que ela retém, contudo, para a configuração testada corresponde à região em que amostras podem ser obtidas por filtração, como comentado anteriormente. A desvantagem da filtração, porém, é que as partículas ficarão imersas em um leito poroso, o que não ocorre aqui. Nota-se, na Figura 3.23B, que no braço horizontal do canal da estrutura, não há retenção de partículas.

Figura 3.22 – Foto de Dois Recipientes Onde 10 mL de Fluido com Partículas foi Recolhido (A) Sem Presença da Estrutura e (B) Com Presença da Estrutura

Figura 3.23 – Foto Obtida em Microscópio Óptico e Aumento de 60X de (A) Canto da estrutura e (B) Braço Horizontal da Estrutura

Sucessivas inserções não romperam a estrutura, como será abordado posteriormente. Portanto, provavelmente essa estrutura tem baixa capacidade de carga para líquidos (<mg) e baixa perda de carga. Considerando que as partículas não conseguiam impedir completamente o fluxo, medidas foram feitas com solução aquosa de azul de metileno, para compreender o regime de fluxo na estrutura. A Figura 3.24, de A a I, mostra o processo de inserção da solução. É possível observar que:

- Imediatamente após a inserção o fluxo começa a apresentar dispersão (Figura 3.24C) porque há diferenças de cor significativas dentro do canal. Esta dispersão é mais visível na frente do pulso, ou seja, no início do pulso da solução colorida. Situação semelhante é observada na Figura 3.24D;
- A saída do pulso favorece a dispersão na região correspondente ao fim do pulso de amostra colorida, como pode ser visto nas Figuras 3.24G e Figura 3.24H;
- Por fim, ao sair da estrutura o pulso já apresenta aumento significativo, como é visto na Figura 3.24I.

Figura 3.24 A a I – Sequência da Inserção de Pulso de Solução de Azul de Metileno na Chicana

Um modelo que pode explicar os resultados é como segue:

- A existência de cantos mortos favorece regiões de menor velocidade, mas também permite a mistura de fluidos;
- Devido à inércia, partículas maiores podem ser retidas nestes cantos, contudo, se ocorrer o aumento destas ou mesmo da velocidade, a possibilidade de mistura de fluidos favorecerá a remoção das partículas (baixa capacidade total de retenção).
- Ocorrendo a remoção das partículas, não haverá perda de carga suficiente para haver rompimento da selagem da estrutura.

3.2.2.1 Simulação com Partículas em Fase Líquida

As partículas foram simuladas como proposto por Beraldo [3.3] e as Figuras 3.25 e 3.26 mostram os resultados para 13 μm e 50 μm , respectivamente. É possível observar que as regiões de maior velocidade ocorrem apenas com as partículas menores; para as maiores há retenção, ou seja, a velocidade tende a zero, já no primeiro braço vertical. Assim, a simulação e os resultados experimentais mostraram boa concordância.

Figura 3.25 - Velocidade da Partícula de 13 μm em Função do Tempo em uma Chicana Simulada Supondo Parede Neutral

Figura 3.26 - Velocidade da Partícula de 50 μm em Função do Tempo em uma Chicana Simulada Supondo Parede Neutral

3.2.3 Testes em Fase Gasosa

Devido aos bons resultados obtidos em líquido, testes em fluxo gasoso (N_2 como fluido) foram efetuados com a inserção de pulsos de partículas ($\sim\text{mg}$), em um período curto ($<1\text{s}$) e o resultados foram observados utilizando-se microscopia óptica. Sucessivas inserções de partículas de 50 μm levaram à ruptura da estrutura, no entanto todas as partículas ficaram nela retida. A Figura 3.27 mostra resultados típicos. Como é possível observar na foto da Figura 3.27, as partículas de 50 μm preenchem completamente o canal, impedindo a passagem do fluxo e ocasionando a referida ruptura. Por outro lado, o uso de partículas de 13 μm não apresenta o mesmo comportamento e as partículas podem atingir um anteparo colocado a 5 mm da saída da estrutura, como mostrado na Figura 3.28.

Figura 3.27 – (A) Foto em Microscopia Óptica da Estrutura Chicana Após Pulso de Partículas em Fluxo Gasoso e (B) Destaque para Região Entre Braços Verticais, Rompido Após o Pulso e Preenchido por Partículas

Figura 3.29 – Anteparos de 25 mm de Menor Dimensão, Colocados a 5mm da Saída da Estrutura para (A) Fluxo com Partículas de 13 μ m e (B) Fluxo com Partículas de 50 μ m

Os resultados estão de acordo com as simulações, como mostrado nas Figuras 3.29 e 3.30. Nestas figuras observa-se a retenção de partículas de 50 μ m no início da estrutura Figura 3.29, no entanto, as partículas de 13 μ m atravessaram o canal, mesmo que se encontrem misturadas com as de 50 μ m (Figura 3.30).

Figura 3.29 - Velocidade da Partícula de 50 µm em Função do Tempo em uma Chicana Simulada Supondo Parede Neutral e Fluido Gasoso

Figura 3.30 - Velocidade das Partículas de 13 µm e 50 µm em Função do Tempo em uma Chicana Simulada Supondo Parede Neutral e Fluido Gasoso

3.3 Conclusão

A partir dos resultados obtidos, nota-se a importância dos espaços mortos, ou seja, cantos vivos da estrutura, e do comprimento de mistura, ou seja, a região que permite que o fluido volte à condição inicial após a exposição ao canto vivo. Portanto, como os cantos causam perturbações sérias, provavelmente uma das dimensões mais importante nessa estrutura corresponde à denominada comprimento de mistura.

Outra observação importante é que a simulação supondo as paredes com interação com o fluido demonstrou-se mais coerente; portanto, principalmente considerando que os testes usando silicone mostraram retenção, fluidos viscosos têm tendência a serem retidos na estrutura. Assim, esta estrutura deve ser adequada para retenção de partículas pequenas, tais como microrganismos ou partes destes. Por outro lado, uma segunda grande aplicação desta estrutura pode ser a remoção de partículas grandes (da ordem de 50µm) por um processo diferente da filtração.

A não adequação da estrutura para uso com fluidos gasosos provavelmente deve-se ao arraste que ocorre devido à turbulência que os cantos inserem no fluido, porém, esta estrutura pode ter uma utilização, mesmo que limitada, para remoção de partículas grandes, da ordem de 50µm, muito embora com pequena capacidade de retenção, da ordem de mg ou menor.

3.4 BIBLIOGRAFIA

- ^{3.1} Hernandez, L. F., Uso de Filme Fino Adsorvente para o Desenvolvimento de Sistemas de Retenção de VOC's em Fase Gasosa e Líquida, Qualificação, EPUSP (2005).
- ^{3.2} Nascimento Fº, A. P., Uso de Microcanais na Pré-concentração de Produtos Químicos, Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica [Sp-Capital]) - Universidade de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2002).
- ^{3.3} Beraldo, F. P., Desenvolvimento de Estrutura para Retenção de Partículas/Microorganismos Presentes em Fase Gasosa e Testes em Equipamento Dedicado, Dissertação, EPUSP (2006) 72 p.
- ^{3.4} Nogueira, S., Caracterização de Filmes Obtidos a Partir da Deposição por Plasma de Hexametildissilazana, Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica [Sp-Capital]) - Universidade de São Paulo (2000).

4 - CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Esse trabalho teve dois objetivos específicos:

1. Um sistema capaz de detectar e destruir microorganismos foi proposto, construído e testado. A destruição, neste caso, baseia-se em retenção, e, quando necessário, aquecimento.
2. Estrutura miniaturizada para a remoção de microorganismos foi proposta e testes preliminares processados.

Quanto ao equipamento, foi possível definir equipamento de baixo custo para análises químicas e/ou biológicas e estudá-lo com estruturas miniaturizadas (chicanas). No momento o instrumento desenvolvido já está sendo utilizado por outros pesquisadores e vários resultados já foram publicados.

Quanto à estrutura analisada, mesmo que testada preliminarmente, esta mostrou as vantagens do uso de estruturas simples, desmontáveis e de baixo custo para retenção de partículas.

Vários trabalhos futuros podem advir destes dois objetivos. Quanto ao equipamento, este já recebeu uma atualização, através de outro trabalho de mestrado [^{4.1}]. Assim, além de baixo custo, este equipamento apresenta outras funções o que o torna de uso mais geral, podendo mesmo ser usado para ensino de Engenharia Química, uma vez que favorece a compreensão do comportamento do fluido em sistemas miniaturizados. Assim, um estudo maior poderia ser feito para diminuir seu custo e, por conseguinte, aumentar seu uso. Um modo de diminuir o custo é a substituição do freqüencímetro por algum modo medida mais barato. Assim, estudos para construção de um módulo comparador de freqüências podem ser feitos.

A estrutura também pode ser melhor explorada, pela variação não do comprimento de seus braços, mas de outras de suas características, tais como rugosidade na área de retenção, ou mesmo inserção de outras constrições. Estas possibilidades podem ser exploradas inicialmente pela simulação e, posteriormente, por construção rápida, uma vez que o custo de fabricação é baixo.

Este trabalho até o momento gerou as seguintes publicações:

- ¹. Beraldo, F. P.; Santos, L. C.; Carvalho, A. T.; Silva, M. L. P., Desenvolvimento de Sistema Automatizado para Testes de Estruturas, XXVI CBRAVIC, Brasil (2005).

2. Carvalho, R. A. M.; Santos, L. C.; Silva, A. N. R.; Silva, M. L. P., Membrana Seletiva para Íons em Solução Aquosa Obtida a Partir da Polimerização por Plasma de Teos, XXVI CBRAVIC, Brasil (2005).
3. Santos, L. C.; Beraldo, F. P.; Hernandez, L. F.; Carvalho, R. A. M.; Silva, M. L. P., Desenvolvimento de Sistema Automatizado para Testes em Estruturas Miniaturizadas, Artigo aprovado para a Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo, 028/2005 (2006).
4. Santos, L. C.; Beraldo, F. P.; Simões, E. W.; Silva, M. L. P., Miniaturization of Macroscopic Structures for Removal of Particles From Liquid Fluids, Artigo aprovado para a 11th International Meeting on Chemical Sensors (2006).
5. Santos, L. C.; Beraldo, F. P.; Simões, E. W.; Silva, M. L. P., Miniaturization of Macroscopic Structures for Removal of Particles From Liquid Fluids, A ser submetido à Revista Sensors and Actuators (2006).
6. Beraldo, F. P.; Santos, L. C.; Simões, E. W.; Silva, M. L. P. Design Of New Miniaturized Structures For Removal Of Particles From Gaseous Fluids, Artigo aprovado para a 11th International Meeting on Chemical Sensors (2006).
7. Beraldo, F. P.; Santos, L. C.; Simões, E. W.; Silva, M. L. P. Design Of New Miniaturized Structures For Removal Of Particles From Gaseous Fluids, A ser submetido à Revista Sensors and Actuators (2006).
8. Amaro, J. O.; Santos, L. C., Avaliação de Ciclo de Vida: Uma Ferramenta Importante da Ecologia Industrial, VIII Simpósio de Iniciação Científica da FATEC, Brasil (2005).
9. Amaro, J. O.; Santos, L. C., Avaliação de Ciclo de Vida: Uma Ferramenta Importante da Ecologia Industrial, Trabalho de Graduação Aprovado Pelo Curso de Materiais Processos e Componentes Eletrônicos da Fatec-SP (2005).
10. Romão, F. L.; Santos, L. C.; Silva, M. L. P., Análise da Utilização de E-Books Como Ferramentas de Educação Ambiental, Trabalho de Graduação Aprovado Pelo Curso de Materiais Processos e Componentes Eletrônicos da Fatec-SP (2005).

4.1 BIBLIOGRAFIA

^{4.1} Beraldo, F. P., Desenvolvimento de Estrutura para Retenção de Partículas/Microorganismos Presentes em Fase Gasosa e Testes em Equipamento Dedicado, Dissertação, EPUSP (2006) 72 p.

ANEXO A

A Tabela A.1 mostra a comparação de valores de sistema de aquisição consagrado com o sistema proposto.

Tabela A.1 - Comparação de Valores de Sistema de Aquisição Consagrado com o Sistema Proposto

Sistema Consagrado	Valor (US\$)	Sistema Proposto	Valor (US\$)
1 Microcomputador	400*	1 Microcomputador	400*
1 GPIB	625**	1 GPIB	625**
1 Multímetro HP 3458A	8000***	1 Multímetro HP 34401A	1000***
		1 Placa PCI 6071E	2300**
		1 SCB-100	300**
Total	9025	Total	4625

* Valor aproximado pela variedade de preços e tipos de computadores disponíveis no mercado.

** Valores obtidos no site da National Instruments (www.ni.com), desconsiderando impostos e taxas de envio (FOB *price*).

*** Valores obtidos no site da Agilent (www.home.agilent.com), desconsiderando impostos e taxas de envio (FOB *price*).

Portanto, tem-se a queda de aproximadamente 50% no valor do equipamento, o que justifica o empenho na implementação deste novo equipamento. Observe-se que tal preço pode ainda ser novamente reduzido, se houver a possibilidade de aplicar o comparador de frequências, que eliminaria a necessidade da placa GPIB e do multímetro HP 34401A, gerando economia de pouco mais de 60% no valor do sistema de aquisição do sinal.

O aparente alto valor atribuído ao microcomputador, para a comparação dos sistemas, deve-se à necessidade de boa capacidade de processamento, para não haver problemas de perdas de dados por falha de equipamento.

Processador – 1.5 GHz
Memória – 256 MB Ram
HD – 20 GB

No entanto, os *softwares* baseados em LabVIEW® tem a configuração recomendada como descrita na Tabela A.2. Versões anteriores requerem máquinas menos potentes, no entanto não tem algumas opções gráficas disponíveis nas últimas versões. Assim, o uso de um computador menos potente pode apresentar algumas dificuldades operacionais.

Tabela A.2 - Configuração Recomendada para *Softwares* Baseados em Labview®

	Labview 7.0	Labview 8.0
Processador	Pentium III/Celeron 866 MHz or equivalent	Pentium 4/M or equivalent
RAM	128 MB	512 MB
Resolução de Vídeo	800 x 600 pixels	1024 x 768 pixels
Sistema Operacional	Windows 2000/XP	Windows XP
Espaço em Disco	1 GB	1.2 GB