UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

KELLITON JOSÉ MENDONÇA FRANCISCO

**Implementação e Otimização de Detector
Condutométrico sem Contato para Eletroforese
Capilar**

(Revisado)

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
21/10/2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F818i Francisco, Kelliton José Mendonça
Implementação e otimização de detector condutométrico sem
contato para eletroforese capilar. / Kelliton José Mendonça
Francisco. -- São Paulo, 2010.
132p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Lago, Claudimir Lucio do

1. Instrumentação : Química analítica I. T. II. Lago,
Claudimir Lucio do, orientador.

543.07 CDD

KELLITON JOSÉ MENDONÇA FRANCISCO

**Implementação e Otimização de Detector
Conducométrico sem Contato para Eletroforese
Capilar**

(Revisado)

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Química (Química Analítica)*

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago)

São Paulo
2010

Kelliton José Mendonça Francisco

Implementação e Otimização de Detector Condutométrico sem Contato para Eletroforese Capilar

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Química (Química Analítica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Claudimir Lucio do Lago pela orientação, paciência e pelos bate-papos no B19, onde surgiram várias idéias regadas a café.

Aos professores Gutz e Lúcio pelo apoio e incentivo durante os trabalhos.

Aos meus pais Dirceu e Valéria pelo carinho, incentivos, por estarem sempre presentes nos momentos difíceis e por terem me apoiado desde o início.

À minhas irmãs Cátia e Caroline pela compreensão e pelas conversas...

A toda minha família, em especial aos meus avós Ivone e José, pelo carinho e acolhimento todas as vezes que voltava para casa e ao Sérgio pelo apoio.

À Adriana, que se mostrou não apenas como uma boa amiga, mas também a companheira para toda a vida.

Ao amigo Denis pelo trabalho em equipe e brincadeiras nos momentos em que era necessário descontrair: “somos nozes”.

À Lúcia e à Renata que me acolheram como irmão, e como todo irmão, fiz o possível para ser “menos” chato... acho que consegui...

Blanes pelas dicas no dia-a-dia do laboratório: Valeu Produção!

Minoru que contribuiu muito nas montagens, idéias...

Ferds pela paciência, principalmente quando se tratava de discussões relacionadas à LabView e eletrônica...

Baby pela ajuda durante as aplicações e por ser o primeiro a testar o detector em seus trabalhos! Valeu Baby!!

Ao Carlos pelas idéias durante o projeto.

Pop e Vini pelas descontrações, dicas e sobre assuntos relacionados à informática e por às vezes me “emprestar” espaço de suas mesas durante alguns testes.

De modo geral, a todos os amigos e colegas que contribuíram direta e indiretamente com idéias, palavras de incentivo, palavras amigas e momentos de alegria e reflexão.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

E por último, mas não menos importante, agradeço a Deus por me acompanhar em todos os momentos da minha vida mostrando os caminhos e me guiando através das dificuldades.

“A vantagem competitiva de uma sociedade não virá da eficiência com que a escola ensina multiplicação e tabela periódica, mas do modo como estimula a imaginação e a criatividade.”

Walter Isaacson

I. Resumo

Francisco, K. J. M. **Implementação e otimização de detector condutométrico sem contato para eletroforese capilar**. 2010. 132p. Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A presente dissertação trata da implementação e otimização de um sistema de detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C^4D) para Eletroforese Capilar (CE). O sistema é caracterizado pela compactação do sistema de detecção, versatilidade e flexibilidade de instalação em diferentes equipamentos comerciais de eletroforese capilar e *home made*.

Desde a década de 80, a eletroforese capilar vem se consolidando como uma das técnicas de separação mais relevantes. Normalmente, os instrumentos comerciais são disponibilizados com detectores ópticos e detectores eletroquímicos. A C^4D é utilizada em eletroforese capilar posicionando-se dois eletrodos tubulares envoltos ao capilar. A aplicação de sinais de alta frequência entre os eletrodos permite monitorar variações de condutividade da solução dentro do capilar. Assim, a resposta do detector depende de diversos fatores como mobilidade do analito, do co-íon do eletrólito, da frequência e amplitude do sinal aplicado entre os eletrodos e da geometria dos mesmos.

A ausência de componentes móveis torna o presente detector compacto (6,5 cm³) e robusto. O presente C^4D é constituído de um oscilador local funcionando a 1,1 MHz, um circuito capaz de converter corrente em tensão, retificar e filtrar os sinais analógicos, além de apresentar um conversor de sinais analógicos em digitais (Conversor A/D) de alta resolução (21 bits efetivos).

Outra vantagem é a possibilidade de determinar o diâmetro interno do capilar através da leitura do conversor A/D quando se faz passar um fluxo de ar e, posteriormente água através do capilar. A diferença de leitura de conversor A/D pode ser convertida em diâmetro interno mediante uma curva de calibração.

Em uma aplicação típica, os limites de detecção baseado no critério 3s (sem filtragem inicial) foi de 0,6, 0,4, 0,3, 0,5, 0,6 e 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ ,

Mg²⁺ e Li⁺, respectivamente, é comparável a outras implementações de alta qualidade de um detector condutométrico sem contato capacitivamente acoplado.

Palavras Chave: Detecção Condutométrica Sem Contato Capacitivamente Acoplada, C⁴D, Íons alcalinos, Caféina, Faixa dinâmica, Eletroforese Capilar.

II. Abstract

Francisco, K. J. M. **Implementation and optimization of contactless conductometric detector for capillary electrophoresis**. 2010. 132p. Master Thesis – Program in Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

This dissertation deals with the implementation and optimization of a Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector (C^4D) applied to capillary electrophoresis (CE). The system is characterized by compaction of the detection system, installation flexibility and versatility in different commercial capillary electrophoresis equipment and home-made.

Since the 80s, capillary electrophoresis has been consolidated as one of the most important separation techniques. Typically, commercial instruments are available to optical detectors and electrochemical detectors. The C^4D is used in capillary electrophoresis positioning two electrodes encased in tubular capillary. The application of high frequency signals between the electrodes allows monitoring changes in conductivity of the solution within the capillary. Thus, the detector response depends on several factors such as mobility of the analyte, the co-ion electrolyte, the frequency and amplitude of the signal applied between the electrodes and the geometry of the same.

The absence of moving parts makes this compact detector (6.5 cm^3) and robust. This C^4D is composed of a local oscillator, working at 1.1 MHz, a circuit capable of converting current into voltage, rectify and filter the analogs signals, besides presenting a high-resolution analog-to-digital converter (ADC) (21 bits effective).

Another advantage is the possibility of determining the internal diameter of the capillary by reading the ADC when it is passed a stream of air and then water through the capillary. A readings different ADC can be converted into inner diameter through a curve a calibration curve.

In a typical application, the detection limits based on the 3s criterion (without baseline filtering) was 0.6, 0.4, 0.3, 0.5, 0.6 and $0.8\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ for K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} and Li^+ , respectively, is comparable to other high-quality implementations of a capacitively coupled contactless conductivity detector.

Keywords: Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector, C⁴D, alkali ions, Caffeine, dynamic range, Capillary Electrophoresis.

III. Lista de figuras

Figura 1: Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.

Figura 2: Coluna usada em eletroforese capilar. Capilar de sílica fundida (A) recoberto por poliimida (B). Em destaque a estrutura molecular da poliimida.

Figura 3: Diferentes configurações de celas eletroquímicas usadas em CE. (A) Detecção eletroquímica com eletrodo posicionado externamente – *e*: eletrodo de trabalho do detector; (B) Detecção eletroquímica com eletrodo posicionado internamente à ponta cônica de um capilar – *e*: eletrodo de trabalho do detector; (C) Eletrodo – *e*: eletrodo de trabalho do detector, *m*: membrana semipermeável, *r*: reservatório com eletrólito de corrida, *f*: fratura nas paredes do capilar, *t*: terra da fonte de alta tensão e *s*: suporte de fixação da membrana *m*; (D) Detecção condutométrica convencional ou com contato – *e*: eletrodo de trabalho do detector.

Figura 4: Diagrama de blocos do sistema de detecção condutométrico sem contato proposto por Gaš. 1) Circuito oscilador a base de cristal; E_1 , E_2 , E_3 , E_4 são eletrodos posicionados externamente à coluna; 3) Circuito do sinal analítico; 4) Dispositivo registrador.

Figura 5: Comparação das proporções entre os capilares comumente usados em CE e a coluna de vidro usado por Gaš em 1980 (11). E_1 , E_2 , E_3 , E_4 – Eletrodos de cobre de 0,2 mm; A, B, C, D são tubos capilares de 200/800, 75/360, 50/360 e 20/360 μm i.d./o.d., respectivamente.

Figura 6: Cella de detecção de um detector condutométrico sem contato; A – Tubo capilar; B – Eletrodo conectado à fonte de sinal de rádio frequência; C – Eletrodo conectado ao circuito de tratamento de dados.

Figura 7: Diagrama elétrico equivalente da cela de detecção de um C^4D . HV – Fonte de alta tensão, R1 e R3 – resistências relacionadas ao capilar preenchido com eletrólito, R2 - resistor relacionado ao sinal analítico, C1 e C2 – Capacitores relacionados ao acoplamento capacitivo entre os eletrodos E1 e E2 e a solução no interior do capilar.

Figura 8: Diagrama de blocos do detector condutométrico sem contato capacitivamente acoplado. (A) fonte de sinal AC, (B) conversor de corrente em tensão, (C) Retificador, (D) ganho e filtragem do sinal e (E) interface composta por conversor de sinal analógico em digital, entre outros.

Figura 9: Exemplos de perfis de alguns sinais alternados com amplitude de 4 V, A - Sinal Senoidal, B - Sinal Triangular e C - Sinal Quadrado.

Figura 10: Avaliação do perfil de sinal de RF usado para excitação do detector. (A) onda senoidal; (B) onda quadrada; (C) onda triangular; (1) K^+ , (2) Na^+ e (3) Li^+ .

Figura 11: Gráficos das alturas de pico (i, iii e v) e relação sinal-ruído (ii, iv e vi) para K^+ , Na^+ e Li^+ , respectivamente. Amplitudes do sinal: A - 1 Vpp; B - 2 Vpp; C - 4 Vpp; D - 8 Vpp.

Figura 12: Fotos de versões de detectores preliminares à versão atual: Versão 1 (A) e Versão 2 (B) do detector condutométrico sem contato.

Figura 13: Oscilador senoidal de frequência e amplitude variável. IC1 OPA2822 (Texas Instruments Inc., Texas); IC2 OPA354 (Texas Instruments Inc., Texas); R1: 243 Ω ; R2: 910 Ω ; R3: 649 Ω ; R4: 1 k Ω ; R5: 390 Ω ; R6: 1,2 k Ω ; C1: 1 nF; C2: 1 nF; C3: 10 Pf; C7: 100 nF; C8: 100 nF.

Figura 14: Conversor de corrente em tensão. Os valores dos componentes são R9: 1 M Ω , C13: 100 nF e IC4: OPA380 (Texas Instruments Inc., Texas).

Figura 15: Diagrama elétrico do retificador de onda completa usado no detector. Valores dos componentes: C15: 1nF; C14: 100nF; R12: 150Ω; R13 and R14: 499Ω; D1: BAR43S (STMicroelectronics, Switzerland) e IC5: OPA380 (Texas Instruments Inc., Texas).

Figura 16: Diagrama elétrico do filtro RC do tipo passa-baixas usado no detector. Valores dos componentes: C18 e C19: 1μF; R16 e R17: 10kΩ.

Figura 17: Diagrama de blocos do conversor Sigma-Delta. In - Entrada de sinais analógicos; Out – Saída de sinais digitais; 1 – circuito responsável pela soma do sinal do conversor D/A com o sinal de entrada; 2 – Integrador; 3 – Comparador de tensão; 4 – *Flip-Flop*; 5 – *Clock* para chaveamento do flip-flop; 6 – Conversor A/D de 1 bit.

Figura 18: Diagrama elétrico do detector condutométrico sem contato. Valores dos componentes elétricos: C17: 10 μF; C20: 100 nF; C21: 1 μF; R18: 1,2 kΩ; R15: 820 Ω; R19: 10 Ω; R20, R21 e R22: 100 Ω; Todos os resistores possuem tolerância de ±1%. IC6: MCP3551(Microchip Technology Inc.,USA).

Figura 19: Diferentes placas de circuito impresso. A – Placa de circuito impresso constituída fibra de vidro e resina epóxi (FR-4) e B e C – Placas de circuito impresso constituídas de papel e resinas fenólicas, também conhecidas como placas de fenolite (FR-1).

Figura 20: Diferentes situações de roteamentos em uma placa dupla face contendo circuitos analógicos e digitais. A cor indica o cobre das trilhas, a fibra do PCB e as capacitâncias parasitas que surgem entre as trilhas de cobre estão representadas.

Figura 21: Perfis de trilhas usadas em roteamento de circuito impressos. (A) perfil circular, (B) 45° e (C) 90°

Figura 22: Blindagens do C^4D confeccionadas e FR-4. A – Blindagem do transdutor; B – Blindagem do oscilador.

Figura 23: Placas de circuito impresso dos circuitos que compõem o C^4D Lite. A – Oscilador senoidal e B – circuito transdutor. Em destaque o local onde são soldados os eletrodos após o processo de furação.

Figura 24: Vista em corte do eletrodo em relação à placa de circuito impresso. A – placa de circuito impresso a base de fibra de vidro e resina epóxi (FR-4); B – solda; C – eletrodo de cobre com 2 mm de comprimento e 1 mm de largura com furo de 400 μm ; D – trilha de cobre.

Figura 25: Montagem das partes do C^4D . A, B, C e D são a vista superior da blindagem, circuito transdutor, isolante de polietileno, plano de terra de cobre, respectivamente. E, F, G são a vista inferior do segundo isolante de polietileno, circuito oscilador e blindagem inferior. H mostra todas as partes anteriormente descritas, o capilar atravessando todas as placas (i) e um cabo (j) que conecta o C^4D ao sistema de aquisição de dados.

Figura 26: Configuração da modulação dos pinos da interface SPI do conversor A/D MCP355. CS, SDO/RDY e SCK são as portas de *Chip Select*, *Data/Ready Data Output* e *Serial Clock*, respectivamente. Valores dos tempos descritos: $t_{CSL} > 50 \text{ ns}$; $t_{CSD} > 90 \text{ ns}$; $t_{RDY} = 50 \text{ ns}$; $t_{DIS} > 20 \text{ ns}$; $t_{CSHSD} = 10 \mu\text{s}$; $t_{DO} = 90 \text{ ns}$; $f_{SCK} = 5 \text{ MHz}$; $t_{SU} > 20 \text{ ns}$; $t_{HI} > 90 \text{ ns}$; $t_{LO} > 90 \text{ ns}$.

Figura 27: Placa de aquisição e controle MCU Lite. A - Conectores para instalação de 4 detectores Lite; B - *Trigger* externo; C – Porta de comunicação UART; D - Entrada de alimentação Auxiliar (+9 V); E - Entrada de alimentação principal (+9 V); F - Botão de *reset*; G – Strapp de comutação para entrada de alimentação das marcas térmicas;

H - Entrada de alimentação Auxiliar (+5 V); I - Linhas digitais disponíveis para uso geral e J – Conectores destinados à ligação de marcas térmicas.

Figura 28: Tela principal do programa de aquisição C⁴D Lite. A – inicia a aquisição de dados, B – finaliza a aquisição de dados, C – Nome do arquivo a ser salvo.

Figura 29: Aba de configurações do programa de aquisição. A - Definição da porta de comunicação; B – Trigger externo ou interno; C – Tempo máximo de aquisição de dados; D – Endereço para salvar o arquivo; E – Tipo de resposta do detector; F - Capilar usado na análise; G – Número de detectores utilizados; H – Grava as configurações e continua o programa e I – Sair do programa.

Figura 30: Aba de com funções adicionais do programa de aquisição. A - Identificação do diâmetro interno do capilar; B - Desvio-padrão da linha base; C - Versão do *firmware* e D - Informações sobre *front end*.

Figura 31: Circuito eletrônico do detector e os respectivos pontos de teste. A, B e C - saída quadrada, triangular e senoidal, respectivamente; D- saída do conversor i/V; E- saída do amplificador do retificador de onda completa; F e G- saída retificada de semi-ciclo negativo e positivo, respectivamente; H e I- entrada V_{in+} e V_{in-} do conversor A/D, respectivamente.

Figura 32: A – Saída triangular e B – sua respectiva Transformada de Fourier.

Figura 33: A – Saída senoidal e B – sua respectiva Transformada de Fourier.

Figura 34: Saída do conversor i/V (D) com sinal senoidal centrado em aproximadamente $2,45 V_{rms}$.

Figura 35: Saídas do retificador de onda completa quando injetou-se uma solução de KCl 10 μ M em um capilar de diâmetro interno 75 μ m inserido no detector. G – saída de semi-ciclo positivo, E – Saída do amplificador operacional e F – saída de semi-ciclo negativo.

Figura 36: Sinais provenientes da saída de cada filtro passivo, obtidos durante uma injeção de solução de KCl 10 μ M em um capilar de diâmetro interno 75 μ m inserido no detector.e a diferença entre eles. H – Sinal filtrado proveniente do semi-ciclo positivo, I – sinal filtrado proveniente do semi-ciclo negativo, H-I – sinal a ser digitalizado pelo conversor A/D.

Figura 37: Comparação entre eletroferogramas visualizados sob as condições de um conversor A/D de 12 bits (A) 16 bits (B) e 22 bits (C) considerando apenas valores positivos

Figura 38: Frequência em que ocorre a mudança de intervalo de tempo em função do intervalo de tempo entre cada dado obtido pelo sistema de amostragem. Em destaque, o intervalo de tempo entre cada dado amostrado em função do tempo total de aquisição de dados.

Figura 39: Curva de desvio padrão da linha base em função do tempo.

Figura 40: Correlação entre a resposta do conversor A/D e a condutividade da solução utilizando colunas capilares de 100 (a), 75 (b), 50 (c) e 20 μm (d) de diâmetro interno. Resultado experimental utilizando para a obtenção da equação de calibração 17. A região delimitada pelas linhas pontilhadas representa a faixa de condutividade comumente utilizada nos eletrólitos em eletroforese capilar.

Figura 41: Correlação entre a resposta do conversor A/D e a condutividade da solução utilizando colunas capilares de 100 (a), 75 (b), 50 (c) e 20 μm (d) de diâmetro interno. Resultado experimental utilizando a equação 17. A região delimitada pelas linhas pontilhadas representa a faixa de condutividade comumente utilizada nos eletrólitos em eletroforese capilar.

Figura 42: Eletroferograma de uma solução 16 μM de cada cátion com resposta em condutividade. O detalhe mostra o mesmo eletroferograma com resposta em valores correspondentes à resposta do conversor A/D de 22-bits.

Figura 43: Os eletroferogramas *b*, *c*, *d*, *e* e *f* representam respectivamente os padrões de 50, 100, 200, 300 e 400 mg L^{-1} de cafeína; *a* e *g* representam amostras de café Taeaq® Descafeinado e café solúvel Nescafé® Original, respectivamente.

Figura 44: Curva de calibração das soluções padrões de cafeína 50, 100, 200, 300 e 400 mg L^{-1} analisadas em triplicata.

Figura 45: Registros de calibração do C⁴D Lite para identificação de diâmetros internos de capilares. Em destaque a curva de calibração utilizada nas identificações de i.d. A – capilar com $\text{id} = 20 \mu\text{m}$, B – capilar com $\text{id} = 50 \mu\text{m}$, C – capilar com $\text{id} = 75 \mu\text{m}$ e D – capilar com $\text{id} = 100 \mu\text{m}$. Δ – diferença entre a linha base e o patamar obtido no deslocamento da linha base em bits.

Figura 46: Diagrama elétrico do C⁴D. Os valores dos componentes são: C1, C2 e C15 1nF; C3 10pF; C4, C10 e C17 10μF; C5, C7, C8, C9, C11, C13, C14, C16 e C20 100nF; C6, C12, C18, C19 e C21 1μF. R1 243Ω; R2 910Ω; R3 649Ω; R4 1kΩ; R5 390Ω; R6 e R18 1k2Ω; R7, R8, R10, R11, R16 e R17 10kΩ; R9 1MΩ; R12 150Ω; R13 e R14 499Ω; R15 820Ω; R19 10Ω; R20, R21 and R22 100Ω; Aqui todos resistores possuem tolerância ±1%. L1 e L2 100μH; D1 BAR43S (STMicroelectronics, Switzerland); IC1 OPA2822 (Texas Instruments Inc., Texas); IC2 OPA354 (Texas Instruments Inc., Texas); IC3 NCV7805 (ON Semiconductor Components Ind., Arizona); IC4 and IC5 OPA380 (Texas Instruments Inc., Texas); IC6 MCP3551(Microchip Technology Inc.,USA). GB representa a placa onde se encontra o oscilador local e PB a placa onde se encontra o circuito responsável pelo tratamento do sinal analítico obtido pela cela de detecção.

Figura 47: Diagrama elétrico da microcontroladora MCU Lite. Os valores dos componentes são: R1 10 kΩ; C1, C2, C4 e C5 47μF; C3 100nF; K1 PinHead; IC1 ATmega168 ATmega168 (Atmel, San Jose, CA); IC2 LM7805 (Fairchild Semiconductor Corporation, Califórnia); IC3 LM7809 (Fairchild Semiconductor Corporation, Califórnia).

Figura 4: Fluxograma do programa de aquisição de dados oC4D Lite LV8.

IV. Lista de tabelas

Tabela I: Estudo da SNR em função dos diferentes tipos de ondas para os cátions K^+ , Na^+ e Li^+

Tabela II: Desvio padrão de linha base em função do tipo de fonte de alimentação

Tabela III: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para metais alcalinos e alcalino-terrosos.

Tabela IV: Concentrações obtidas experimentalmente e limites estabelecidos pela Anvisa

V. Lista de abreviaturas

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE- eletroforese capilar

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EOF – Fluxo eletrosmótico

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LOD – limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

HV – Alta tensão

C⁴D – Detector condutométrico sem contato capacitivamente acoplado

RF – Rádio frequência

MES - ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico

His – histidina

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

ADC – conversor de sinais analógicos em digitais

i/V – corrente/tensão

AC – corrente alternada

DC – corrente contínua

SNR – relação sinal-ruído

MFB – realimentação múltipla

IC – circuito integrado

GBW – largura de banda de ganho

A/D – analógico/digital

I/O – entrada/saída

sps – amostragens por segundo

SPI – interface serial periférica

CS – Chip Select

SDO – Data/Ready Data Output

SCK – Serial Clock

UART – Receptor/Transmissor universal assíncrono

USB – Barramento serial universal

MCU – Unidade microcontrolada

LED – Diodo emissor de luz

PCB – placa de circuito impresso

SRAM – memória estática de acesso aleatório

Op Amp – Amplificador operacional

SMD – Dispositivo montado na superfície

VI. Lista de símbolos

E – Campo elétrico

$i.d.$ – diâmetro interno

$o.d.$ – diâmetro externo

m/m – massa/massa

G – condutância

B – susceptância

V_{ref} – tensão de referencia

V_{conv} – sinal convertido

V_{in+} – entrada não inversora do conversor A/D

V_{in-} – entrada inversora do conversor A/D

ω – frequência angular

$\Sigma\Delta$ – Sistema de modulação do tipo Sigma - Delta utilizado na conversão em conversão analógica/digital e digital/analógica

V_{RMS} – Potencial quadrático médio

V_{pp} – Potencial pico-a-pico

G – ganho

Z – Impedância elétrica

R_F – resistor de realimentação

μ_{ef} – mobilidade efetiva

μ – mobilidade eletroforética

α – grau de dissociação

v_{ep} – velocidade eletroforética

μ_{eo} – Mobilidade do fluxo eletrosmótico

ε – constante dielétrica

η – viscosidade

ζ – potencial zeta

v_a – velocidade aparente

t_m – tempo de migração

l – distância do ponto de injeção até o detector

L – comprimento total do capilar

V – potencial aplicado

N – pratos teóricos

μ_e – mobilidade eletroforética

D – coeficiente de difusão

Y – admitância

K – constante de cela

κ – condutividade da solução

f – frequência de oscilação

V_{out} – potencial de saída

C_w – capacitância da parede do capilar

C_A^S – concentração do analito (A^-)

μ_{A^-} – mobilidade da espécie A^-

μ_{E^-} – mobilidade do co-íon do eletrólito

μ_{E^+} – mobilidade do contra-íon do eletrólito

λ_{A^-} – condutância iônica molar da espécie A^-

F – constante de Faraday

SUMÁRIO:

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Introdução à eletroforese capilar.....	2
1.1.1 Histórico.....	2
1.1.2 A eletroforese capilar.....	3
1.1.3 O equipamento de eletroforese capilar.....	6
1.1.3.1 Controle de temperatura.....	7
1.1.3.2 Fonte de alta tensão e capilares.....	8
1.1.3.3 Sistemas de injeção.....	9
1.1.3.4 Sistemas de detecção.....	10
1.2 Objetivos.....	20
2 – REAGENTES E CAPILARES.....	21
2.1 Soluções e reagentes.....	22
2.2 Capilares.....	22
3 – CONSTRUÇÃO DO DETECTOR CONDUTOMÉTRICO SEM CONTATO CAPACITIVAMENTE ACOPLADO.....	23
3.1 Introdução.....	24
3.2 Fonte de sinal alternado.....	25
3.2.1 Forma de onda e oscilador local.....	27
3.3 Conversor de corrente em tensão.....	35
3.4 Retificador de precisão de onda completa.....	37
3.5 Etapa de filtragem.....	39
3.6 Conversor de sinais analógicos em digitais MCP3551.....	40
3.7 Confeção da placa de circuito impresso (PCB) e montagem do C ⁴ D.....	44
3.7.1 Placa de circuito impresso.....	44
3.7.2 Planos de terra e aterramento.....	45
3.7.3 Roteamento e <i>layout</i>	46
3.7.4 Blindagens.....	49
3.7.5 Montagem.....	49
3.8 Interfaceamento do detector condutométrico sem contato ao microcomputador.....	52

3.9 Softwares.....	56
3.9.1 Firmware.....	56
3.9.2 <i>Front end</i>	57
4 – CARACTERIZAÇÃO DO DETECTOR C⁴D LITE.....	62
4.1 Caracterização eletrônica.....	63
4.1.1 Oscilador.....	63
4.1.2 Conversor i/V.....	65
4.1.3 Retificador de onda completa e filtro.....	66
4.1.4 Conversor A/D.....	69
4.2 Estabilidade em tempo (ATmega168).....	70
4.3 Fonte de alimentação.....	72
4.4 Estabilidade térmica.....	73
4.5 Calibração.....	74
5 – APLICAÇÕES.....	77
5.1 Introdução.....	78
5.2 Determinação de metais alcalinos em meio aquoso.....	78
5.3 Determinação de cafeína em café.....	81
5.4 Determinação de diâmetro interno de capilares.....	84
6 – CONCLUSOES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	88
6.1 Conclusões.....	89
6.2 Perspectivas futuras.....	91
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXOS.....	97

1 – Introdução e Objetivos

1.1 Introdução à eletroforese capilar

1.1.1 Histórico

Entre os anos de 1930 e 1937, Arne Wilhelm Karsin Tiselius aperfeiçoou a técnica de eletroforese e a utilizou no estudo das proteínas que compõe o soro sanguíneo [5]. Sua pesquisa resultou no Prêmio Nobel de 1948 pela contribuição aos estudos sobre a composição do soro sanguíneo, além do aprimoramento das características do equipamento de eletroforese que ainda são utilizadas nos equipamentos atuais.

Em meados de 1979, Mikkers *et al.* enunciaram estudos teóricos sobre o comportamento dos analitos e concentração em eletroforese por zona livre CZE [2]. Os resultados obtidos motivaram o grupo a desenvolver estudos práticos [3] utilizando um equipamento de eletroforese desenvolvido por Everaerts *et al.* [4] que utilizava um tubo de teflon com 0,2 mm de diâmetro interno e 0,35 mm de diâmetro externo.

Os trabalhos de Mikkers *et al.* contribuíram consideravelmente para o avanço da eletroforese, no entanto, apenas na década de 80, Jorgenson e Lukacs enunciaram pela primeira vez a Eletroforese Capilar (CE) demonstrando sua alta eficiência de separação sob um elevado campo elétrico, em uma coluna capilar de 75 μm de diâmetro interno [6].

Devido a sua elevada capacidade de separação e ao baixo tempo de análise, em 1999, a Eletroforese Capilar foi incorporada ao Projeto Genoma, que tinha como meta a obtenção do sequenciamento completo do DNA humano (que possui aproximadamente 3 bilhões de nucleotídeos) para a distinção de alguns destes diversos polinucleotídeos com massas molares por volta de 200 a 500 Daltons. Milhares destes nucleotídeos

foram sequenciados em um único dia, graças à alta resolução e velocidade das análises promovidas pela eletroforese capilar [7].

Desde então, a Eletroforese Capilar vem se consolidando como uma das técnicas mais relevantes na separação de aminoácidos, íons inorgânicos, ácidos orgânicos, substâncias quirais, entre outros, ao lado da Cromatografia Gasosa (GC) e da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) [8].

1.1.2 A eletroforese capilar

A Eletroforese é um método de separação na qual as espécies de interesse são submetidas a um elevado campo elétrico E . Este campo elétrico acentua as diferenças de mobilidade entre as espécies iônicas e/ou ionizáveis em meios aquosos ou mesmo orgânicos [1].

As espécies envolvidas na análise por CE participam de reações de equilíbrio, podendo variar sua carga e mobilidade em função das condições de análise. Sob a condição de equilíbrio, estas espécies movimentam-se como uma banda única, cuja mobilidade efetiva (μ_{ef}) depende das mobilidades eletroforéticas (μ) e dos graus de dissociação (α) das n espécies individuais:

$$\mu_{ef} = \sum_{i=1}^n \alpha_i \mu_i \quad (1)$$

Durante uma separação, a velocidade eletroforética (v_{ep}) que um determinado íon adquire, quando o mesmo é submetido à ação de um campo elétrico, depende de algumas propriedades da solução, como a viscosidade do meio, além das características intrínsecas dos analitos, como a relação entre raio iônico hidratado e a carga. A

velocidade eletroforética v_{ep} pode ser expressa matematicamente como um produto da mobilidade eletroforética do íon, (μ_{ef}), pelo campo elétrico (E) ao qual o íon é submetido durante a separação:

$$v_{ep} = \mu_{ef} E \quad (2)$$

A aplicação de um elevado campo elétrico gera uma corrente no interior do capilar, que promove o movimento dos analitos em direção aos eletrodos. Durante as separações em CE, há a presença de um fluxo eletricamente induzido, denominado fluxo eletrosmótico - EOF.

O fluxo eletrosmótico é um fenômeno eletroforético, capaz de provocar o fluxo da solução dentro do capilar até mesmo para que substâncias neutras sejam deslocadas em direção ao detector [9].

Este fluxo pode reduzir significativamente o tempo de análise de compostos, desde que os analitos possuam mobilidade no mesmo sentido que o fluxo eletrosmótico. Dependendo da magnitude e sentido do EOF, o analito pode reverter o seu sentido de migração devido à força exercida pelo fluxo, além de permitir que moléculas neutras se movam no interior da coluna capilar e, desta forma, tais moléculas passam a ter a mesma mobilidade e sentido do EOF.

A mobilidade do fluxo eletrosmótico (μ_{eo}) depende de fatores como a constante dielétrica (ϵ), a viscosidade (η) da solução e o potencial definido no plano de cisalhamento na região difusa, ou seja, o potencial zeta (ζ):

$$\mu_{eo} = \frac{\zeta E}{4\pi\eta} \quad (3)$$

Quando aplicado o campo elétrico, o EOF adquire uma velocidade proporcional ao campo:

$$v_{eo} = \mu_{eo}E \quad (4)$$

onde μ_{eo} pode ser considerada a constante de proporcionalidade.

Devido à presença do fluxo eletrosmótico, a velocidade aparente (v_a), ou seja, a velocidade que as espécies adquirem durante a análise é resultante da soma vetorial da velocidade eletroforética e da velocidade efetiva:

$$v_a = (\mu_{eff} + \mu_{eof})E \quad (5)$$

Através da mobilidade das espécies e de parâmetros experimentais é possível determinar o tempo necessário para os íons atingirem o detector partindo do ponto de injeção, ou seja, o tempo de migração (t_m):

$$t_m = \frac{lL}{(\mu_{eff} + \mu_{eof})V} \quad (6)$$

onde l é a distância do ponto de injeção até o detector, L é o comprimento total do capilar e V o potencial aplicado.

Um parâmetro importante em eletroforese capilar é o número de pratos teóricos (N), pois através deste termo pode-se determinar a eficiência de separação das espécies analisadas. Em CE, o número de pratos teóricos pode ser estimado através da equação:

$$N = \frac{\mu_e V}{2D} \quad (7)$$

onde o valor de N é determinado pela mobilidade eletroforética μ_e , o potencial de separação V e o coeficiente de difusão D .

Características de aspectos experimentais também devem ser consideradas na descrição da técnica, como: o método de detecção, de injeção, eficiência do controle térmico do sistema, entre outros.

1.1.3 O equipamento de eletroforese capilar

Atualmente existem diversos fabricantes de aparelhos de eletroforese capilar e equipamentos do tipo *lab-made*, ou seja, desenvolvidos pelos próprios grupos de pesquisa segundo sua necessidade. No entanto, independentemente do fabricante, um equipamento de CE apresenta componentes básicos, diferenciando-se em desempenho, *design* e estratégias adotadas para controlar variáveis, como temperatura do sistema, potencial de separação, entre outros.

Um equipamento de eletroforese capilar é constituído de uma fonte de alta tensão, um sistema de injeção, dois reservatórios preenchidos com eletrólito de corrida, um reservatório de amostras, eletrodos (geralmente de platina), um sistema de detecção e uma coluna capilar, mais comumente de sílica fundida.

Figura 1: Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.

1.1.3.1 Controle de temperatura

Em função da necessidade do controle da temperatura do sistema, devido ao efeito Joule sobre a separação, os reservatórios, o capilar e o detector são instalados em um compartimento termicamente controlado, evitando assim, problemas durante a separação, como falta de repetibilidade e reprodutibilidade entre as análises.

Atualmente, são dois os métodos de controle térmico da coluna capilar: os sistemas que utilizam líquidos de resfriamento e os que utilizam convecção de ar. Estes têm sido bastante difundidos entre os fabricantes de instrumentos comerciais e entre grupos de pesquisa, os quais desenvolvem seus próprios equipamentos de eletroforese capilar. Os dois tipos de equipamento de CE apresentam boa eficiência no controle térmico, no entanto, o segundo tipo existe maior facilidade de instalação de outros tipos de detectores ao longo da coluna.

1.1.3.2 Fonte de alta tensão e Capilares

Em CE, as separações envolvem uma diferença de potencial (ddp) da ordem de ± 5 a ± 30 kV, aplicado nas extremidades de uma coluna capilar, podendo estabelecer campos elétricos absolutos entre 100 e 500 V cm⁻¹.

As colunas capilares usadas nas separações podem apresentar, geralmente, dimensões da ordem de 15 a 100 μ m de diâmetro interno e comprimentos variados entre 20 e 100 cm. O uso do capilar apresenta várias vantagens, entre elas os pequenos volumes de injeção de amostra, 1 a 100 nL, além de uma eficiente dissipação do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule) [9]. Em sua maioria, os capilares são confeccionados com sílica fundida, recobertos por poliimida, como pode

ser visto na figura 2. Quando submetidos a eletrólitos cujo $\text{pH} \geq 2$, os grupos silanol (SiOH) adquirem carga negativa devido à sua desprotonação. Devido a estes fatores, as análises são realizadas em condições que favoreçam a separação, porém dentro dos limites químicos e físicos intrínsecos aos capilares.

Figura 2: Coluna usada em eletroforese capilar. Capilar de sílica fundida (A) recoberto por poliimida (B). Em destaque a estrutura molecular da poliimida.

1.1.3.3 Sistema de injeção

Os equipamentos de eletroforese capilar possibilitam a utilização de alguns métodos de injeção de amostras: injeção eletrocinética, hidrodinâmica e por sifonamento.

Durante a etapa de injeção, uma das extremidades do capilar é removida de seu respectivo reservatório de eletrólito de corrida e inserida no reservatório de amostra. Após a injeção o capilar é retornado ao reservatório de eletrólito para iniciar a análise.

Na injeção eletrocinética, um potencial é aplicado no capilar por um tempo definido, geralmente alguns poucos segundos. Neste caso, a amostra injetada não

representa efetivamente sua real composição, pois os analitos são injetados em função da mobilidade de cada espécie presente e do fluxo eletrosmótico [9].

Na injeção hidrodinâmica uma bomba é acionada e uma fração da amostra é injetada no interior da coluna. As pressões exercidas nestes sistemas variam de acordo com as bombas implementadas em cada equipamento. A injeção através de sifonamento assemelha-se muito com a anterior, diferenciando-se apenas quanto ao mecanismo de pressurização, pois a pressão é exercida pela própria gravidade. Na injeção por sifonamento, o analista determina o tempo e a altura que o reservatório de amostras é erguido.

Em injeções hidrodinâmicas e através de sifonamento a amostra injetada representa sua real composição, pois os analitos são injetados no interior da coluna capilar por meio de uma pressão externa exercida por bombas e pela gravidade, respectivamente. Isso permite que as diferenças de mobilidade entre as espécies não interfira na composição da amostra injetada, como ocorre na injeção eletrocinética.

1.1.3.4   Sistemas de detecção

Tão importante quanto o sistema de separação é o sistema de detecção, pois, a partir de seu desempenho, se pode quantificar as espécies de interesse em diferentes condições de análise mantendo-se uma boa relação sinal ruído e baixos limites de detecção e quantificação. Os sistemas de detecção utilizados nas mais variadas técnicas analíticas, possuem etapas fundamentais que podem apresentar equivalentes ao se comparar entre diferentes modos de detecção.

Estes sistemas são constituídos basicamente por uma fonte de sinal (fonte luminosa, de calor ou mesmo rádio frequência), um sensor, um circuito capaz de filtrar

e amplificar o sinal analítico e uma interface eletrônica que transmite os dados a um registrador.

Os métodos de detecção adotados em eletroforese capilar são semelhantes aos de HPLC, diferenciando-se apenas pelo baixo volume da cela de detecção. Os métodos de detecção usados em CE podem ser classificados de acordo com suas características:

- i. Fotométricos: representados por detectores de absorção de radiação no UV-Vis ou mesmo infravermelho, fluorescência induzida por laser, Raman, quimiluminescência;
- ii. Eletroquímicos: detectores amperométricos, potenciométricos, voltamétricos, condutométricos e condutométricos sem contato capacitivamente acoplados;
- iii. Acoplados: esta classe pode ser representada por métodos hifenados, como a espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear, fotometria de chama e espectrometria de emissão por plasma;

A escolha do método de detecção mais adequado dependerá das características do analito, da seletividade de detector, da linearidade na faixa de resposta desejada, na precisão e exatidão do detector, na robustez, no limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) [1].

Os detectores podem, ainda, ser classificados de acordo com a seletividade que possuem. Os detectores seletivos, ou seja, que apresentam seletividade, respondem especificamente a certa propriedade do analito. Estes detectores são interessantes em caso de matrizes complexas, no entanto, a seletividade impede identificar diferentes analitos em uma mesma análise.

Outra classe de detectores são os universais, ou seja, não apresentam seletividade. Estes detectores respondem a diferenças entre analitos e o eletrólito de corrida. Ao

contrário dos detectores seletivos, os detectores universais permitem que diferentes analitos sejam determinados em uma única análise, o que os torna relativamente atrativos, apesar de apresentarem LOD superiores aos dos métodos seletivos. Em busca de melhores resultados, os métodos eletroquímicos desenvolveram algumas configurações. A figura 3 apresenta algumas destas configurações estudadas e adotadas por alguns grupos de pesquisa [10]. Tais configurações permitem contaminações dos eletrodos interferindo na sensibilidade e reprodutibilidade da resposta dos mesmos. Outro problema observado quanto à utilização destes detectores é a necessidade de precisão no seu posicionamento.

Figura 3: Diferentes configurações de células eletroquímicas usadas em CE. (A)

Detecção eletroquímica com eletrodo posicionado externamente – *e*: eletrodo de trabalho do detector; (B) Detecção eletroquímica com eletrodo posicionado internamente à ponta cônica de um capilar– *e*: eletrodo de trabalho do detector; (C) Eletrodo – *e*: eletrodo de trabalho do detector, *m*: membrana semipermeável, *r*: reservatório com eletrólito de corrida, *f*: fratura nas paredes do capilar, *t*: terra da fonte de alta tensão e *s*: suporte de fixação da membrana *m*; (D) Detecção condutométrica convencional ou com contato – *e*: eletrodo de trabalho do detector.

A Figura 3-A apresenta uma configuração em que o eletrodo do detector está posicionado externamente ao capilar e em contato direto com a solução propiciando maior efeito do campo elétrico gerado pela fonte de alta tensão. A Figura 3-B apresenta um eletrodo posicionado externamente ao capilar, porém este capilar possui uma abertura cônica que permite um melhor contato do analito com o eletrodo. Na figura 3-C, apesar de o eletrodo estar em contato direto com a solução, buscou-se a possibilidade de afastar o eletrodo de trabalho e da alta tensão evitando, desta forma, o campo elétrico gerado pela fonte de alta tensão durante a separação. O capilar foi previamente trincado em f e, nesta região, envolvido por uma membrana semipermeável m . A membrana foi imobilizada por um suporte s de material inerte. Este suporte foi imerso em um reservatório r preenchido com o mesmo eletrólito de corrida juntamente com o eletrodo de baixa tensão. Apesar de complicada, esta montagem propicia menor efeito do campo elétrico. Na figura 3-D os eletrodos são posicionados no interior do capilar através de furos feitos a laser. Neste caso, como a campo elétrico aplicado em CE pode alcançar 500 V cm^{-1} o desalinhamento de 1 mm dos eletrodos pode submeter os mesmos a uma diferença de potencial de 50 V, o que poderia danificar definitivamente o sistema de detecção.

Os sistemas de detecção ópticos isolam eletricamente o detector do sistema de separação, porém, necessitam de sistemas mais elaborados de alinhamento. Os detectores ópticos apresentam, também, o incômodo de aberturas de janelas ópticas nos capilares, pois estas fragilizam mecanicamente o capilar, favorecendo a ruptura do mesmo durante sua instalação nos equipamentos. Também são encontrados problemas em relação ao caminho óptico, pois este é demasiadamente reduzido (da ordem de algumas dezenas de micrometros), portanto, alguns capilares apresentam regiões de

detecção com caminho óptico dilatado ou mesmo em “Z” [1] de modo que se mantenha um baixo limite de detecção.

Os métodos eletroquímicos apresentam dificuldades com relação ao posicionamento dos eletrodos no capilar, o que ocasiona perda de reprodutibilidade quando há a necessidade de substituição do capilar ou mesmo eletrodo de trabalho.

Diante dos problemas encontrados na detecção eletroquímica convencional e na detecção óptica, em 1980, Gaš e colaboradores [11] propuseram um sistema de detecção baseado na aplicação de sinais de rádio frequência (RF), o qual pudesse responder à passagem de espécies iônicas por um tubo capilar. A proposta de Gaš tinha como objetivo o desenvolvimento de um detector condutométrico sem contato de alta frequência (operando a 1 MHz com auxílio de um cristal piezoelétrico) dedicado à isotacoforese. Os princípios do dispositivo proposto são semelhantes aos atuais, no entanto, a configuração da cela de detecção apresenta algumas variações, figura 4.

Figura 4: Diagrama de blocos do sistema de detecção condutométrico sem contato proposto por Gaš. 1) Circuito oscilador a base de cristal; E_1 , E_2 , E_3 , E_4 são eletrodos posicionados externamente à coluna; 3) Circuito do sinal analítico; 4) Dispositivo registrador.

Os eletrodos E_1 , E_2 , E_3 , E_4 posicionados ortogonalmente entre si e à coluna permitem a recepção de fração do sinal emitido pela fonte (1). No bloco (3) Este sinal é

amplificado, retificado e filtrado, e só então é enviado ao dispositivo (4) de aquisição de dados.

O arranjo de cela proposto por Gaš trouxe novos conceitos aos sistemas de detecção, desde então, utilizados em Eletroforese Capilar. No entanto, a dificuldade do alinhamento de 4 eletrodos inviabilizou sua popularização como método de detecção. No arranjo proposto por Gaš, o menor desalinhamento dos eletrodos poderia causar perdas de reprodutibilidade do sinal analítico. Outro problema na proposta de Gaš está relacionado com a dimensão do arranjo, figura 5. Como as dimensões dos tubos usados no experimento eram de proporções consideravelmente grandes, quando comparados aos capilares usados em CE, seu sistema foi inviabilizado à técnicas capilares.

Figura 5: Comparação das proporções entre os capilares comumente usados em CE e a coluna de vidro usado por Gaš em 1980 (11). E₁, E₂, E₃, E₄ – Eletrodos de cobre de 0,2 mm; A, B, C, D são tubos capilares de 200/800, 75/360, 50/360 e 20/360 μm i.d./o.d., respectivamente.

Em 1998 dois grupos de pesquisa distintos, Zemmann e colaboradores [12] e Fracassi da Silva e do Lago [13], publicaram simultaneamente a Detecção Condutométrica Sem Contato Capacitivamente Acoplada, em inglês, *Capacitively Coupled Contactless Conductometry Detection - C⁴D*, o qual se tornou um novo e

importante método de detecção, sobre tudo devido à divulgação do diagrama elétrico detalhado feito por Fracassi da Silva e do Lago [14].

O C^4D é um método eletroquímico de detecção, porém, ao contrário da detecção condutométrica convencional, seus eletrodos são posicionados externamente ao capilar evitando, dessa forma, a contaminação e, conseqüentemente, a perda de linearidade por este motivo. Seu acoplamento capacitivo permite o posicionamento dos eletrodos externamente ao capilar e seu desacoplamento da fonte de alta tensão.

Quando comparado aos detectores ópticos, a detecção condutométrica sem contato propicia a vantagem de dispensar a abertura de janelas ópticas no capilar, ou seja, a remoção local da camada de poliimida que reveste o capilar, aumentando assim, sua durabilidade e resistência mecânica na zona de detecção. Apesar destas vantagens, o C^4D sofre uma grande influência da geometria da cela, da eletrônica utilizada e do sinal aplicado pela fonte.

Ao longo dos anos, vários grupos de pesquisa estão se tornando adeptos do C^4D [8-35]. A possibilidade da construção de seu próprio detector a partir da publicação de Fracassi da Silva e do Lago e os estudos relacionados aos arranjos de cela, [15,16], além de estudos teóricos [17,18] permitiram que estes grupos de pesquisa desenvolvessem e otimizassem seus próprios detectores condutométricos sem contato.

Dentre os detectores derivados das primeiras publicações, o C^4D excitado por potenciais elevados, HV- C^4D , é um dos que mais se destacaram. Possui uma cela de detecção semelhante à proposta por Fracassi da Silva e do Lago [19] e uma fonte de sinal que aplica sinais alternados com amplitude de algumas centenas de volts [20]. Estes detectores apresentam sinais analíticos de qualidade, com baixo ruído e elevada

amplificação. No entanto, devido ao uso de potenciais elevados, a eletrônica usada é relativamente cara.

Como pode ser observada na figura 6, a detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada baseia-se no posicionamento de dois eletrodos tubulares metálicos externos ao capilar [13].

Figura 6: Cella de detecção de um detector condutométrico sem contato; A – Tubo capilar; B – Eletrodo conectado à fonte de sinal de rádio frequência; C – Eletrodo conectado ao circuito de tratamento de dados.

No eletrodo **B** aplica-se um sinal de rádio frequência (RF) de amplitude e frequência bem definidos. Portadores de carga em solução, mais especificamente as espécies iônicas do eletrólito e da amostra, permitem a passagem de uma corrente até o eletrodo **C** e, posteriormente, esta corrente é conduzida ao circuito responsável pela conversão desta em potencial, retificação, amplificação e filtragem. Após este tratamento no sinal analítico, o mesmo é conduzido ao dispositivo de registro por meio de uma interface.

Devido ao acoplamento capacitivo entre as paredes do eletrodo e o seio da solução, ocorre uma defasagem entre a tensão de entrada e a medida. Como apenas o módulo do potencial é medido, a diferença de fase é desconsiderada. Avaliando-se o comportamento do circuito, o sinal tende a aumentar quando a concentração aumenta.

Portanto, o sinal é diretamente proporcional à condutância e, conseqüentemente, ao módulo da admitância, $|Y|$:

$$|Y| = \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{K}{\kappa}\right)^2 + \frac{1}{4\pi^2 f^2 C_w^2}}} \quad (8)$$

onde K representa a constante de cela, κ a condutividade da solução, f a frequência de operação e C_w representa a capacitância da parede do capilar. C_w pode ser, também, representado por $\frac{C_1 C_2}{(C_1 + C_2)}$, conforme a do circuito equivalente da cela de detecção da figura 7.

Figura 7: Diagrama elétrico equivalente da cela de detecção de um C⁴D. HV – Fonte de alta tensão, R1e R3 – resistências relacionadas ao capilar preenchido com eletrólito, R2 - resistor relacionado ao sinal analítico, C1 e C2 – Capacitores relacionados ao acoplamento capacitivo entre os eletrodos E1 e E2 e a solução no interior do capilar.

Quando espécies de mobilidades diferentes passam pela região de detecção, representada por R2 na figura 7, a variação da condutividade pode ser expressa através da equação deduzida por Katzmayer. O balanço de cargas deve ser levado em consideração, portanto, lança-se mão da função de Kohlraush. Assim obtém-se a função que relaciona a mobilidade das espécies:

$$\Delta G(\mu_{E^+}, \mu_{E^-}) = \frac{C_A^{S-} \left\{ \mu_{E^+} F \left[1 - \frac{\mu_{E^-} (\mu_{A^-} + \mu_{E^+})}{\mu_{A^-} (\mu_{E^-} + \mu_{E^+})} \right] - \mu_{E^-} F \frac{\mu_{E^-} (\mu_{A^-} + \mu_{E^+})}{\mu_{A^-} (\mu_{E^-} + \mu_{E^+})} + \lambda_{A^-} \right\}}{10^{-3} K} \quad (9)$$

onde C_A^{S-} representa a concentração do analito (anion), μ_{A^-} , a mobilidade absoluta, μ_{E^-} e μ_{E^+} são as mobilidades do íon e contra-íon do eletrólito respectivamente, λ_{A^-} , a condutância molar, K, a constante de cela e F a constante de Faraday.

A equação 9 foi formulada para prever o comportamento de analitos aniônicos, porém ela pode ser facilmente adaptada para analitos catiônicos [17]. Através de manipulações matemáticas, a equação 9 pode ser simplificada:

$$\Delta G = c_A \frac{(\mu_A - \mu_S)(\mu_A + \mu_o)}{\mu_A} \cdot \frac{F}{10^{-3}K} \quad (10)$$

onde C_A e μ_A representam, respectivamente, a concentração do analito e sua mobilidade, μ_S e μ_o são as mobilidades absolutas do co-íon e contra-íon do eletrólito, respectivamente, onde μ_S equivale a μ_{E-} , e μ_{E+} a μ_o .

1.2 Objetivos

O objetivo geral é o desenvolvimento, a implementação e a otimização de um novo detector condutométrico sem contato para eletroforese capilar mais compacto e de baixo ruído.

Para tal fim, foram adotados os seguintes objetivos específicos:

- Construir um detector condutométrico sem contato compacto e versátil;
- Otimizar o oscilador e a etapa de filtragem;
- Incluir um conversor A/D ao detector;
- Implementar o interfaceamento entre o detector e microcomputador através de uma microcontroladora.

2 – Reagentes e Capilares

2.1 Soluções e reagentes

As soluções foram preparadas utilizando água deionizada com resistência elétrica acima de 17 MΩ (Barnsted, Dubuque, IA, USA). Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico ou superior.

Para os testes caracterização do detector e suas aplicações, foram utilizadas soluções padrão de KCl, NaCl, BaCl₂, MgCl₂, CaCl₂, LiCl e cafeína obtidos da Sigma (St. Louis, USA). Os eletrólitos de corrida foram preparados a partir de ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico (MES), histidina (His), Ácido 3,4-dimetoxycinâmico e tris(hidroximetil)aminometano (Tris) com procedência Sigma (St. Louis, USA).

2.2 Capilares

Os experimentos envolvem capilares de sílica fundida obtidos da J&W Scientific (Folsom, CA, USA) de diferentes tamanhos e diâmetros internos (20, 50, 75 e 100 µm). Suas devidas dimensões serão descritas juntamente com cada experimento.

Os capilares utilizados nas aplicações foram previamente condicionados com (1) 5 min de solução de hidróxido de sódio 0,1 mM, (2) 10 min de água deionizada, (3) 10 min com o tampão de corrida e (4) 30 min com o potencial de corrida aplicado.

Os capilares usados nos experimentos de caracterização foram condicionados passando por eles (1) 5 min de solução de hidróxido de sódio 0,1 mM, (2) 15 min de água deionizada, (3) 15 min da solução ou tampão de corrida quando necessário.

**3 – Construção do detector
condutométrico sem contato
capacitivamente acoplado – C⁴D**

3.1 Introdução

Um detector condutométrico sem contato capacitivamente acoplado é constituído de algumas etapas fundamentais para seu funcionamento, por exemplo, fonte de sinal, transdutor (geralmente constituído por conversor de corrente em tensão (conversor i/V), um retificador, filtros, estágio de amplificação) e dispositivos de registro (geralmente constituídos de interface e microcomputador), figura 8. O detector desenvolvido foi baseado em uma estrutura de blocos semelhante à descrita por Fracassi da Silva e do Lago em 2002 [19].

Figura 8: Diagrama de blocos do detector condutométrico sem contato capacitivamente acoplado. (A) fonte de sinal AC, (B) conversor de corrente em tensão, (C) Retificador, (D) ganho e filtragem do sinal e (E) interface composta por conversor de sinal analógico em digital, entre outros.

3.2 Fonte de sinal alternado

A detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada C^4D utiliza como fonte um sinal de rádio frequência (RF), ou seja, um sinal alternado de frequência e amplitude bem definidos. Os sinais gerados pela fonte podem apresentar diferentes amplitudes e perfis, entre eles os senoidais, triangulares e os quadrados, figura 9.

Figura 9: Exemplos de perfis de alguns sinais alternados com amplitude de 4 V, A - Sinal Senoidal, B - Sinal Triangular e C - Sinal Quadrado.

A relação sinal-ruído do detector depende consideravelmente do sinal de excitação proveniente da fonte. Instabilidades do sinal de RF (como variações de frequência e principalmente amplitude) provocam ruídos consideráveis no sinal analítico, fazendo com que seja reduzida a relação sinal ruído do detector e, consequentemente, os limites de detecção e quantificação.

Os sinais de rádio frequência podem ser obtidos a partir de geradores de função comerciais, como Agilent 33220A (Agilent Technologies, Califórnia), Minipa MGF4202 (Minipa, São Paulo, Brasil), entre outros. Estes aparelhos podem produzir sinais elétricos alternados de diversas formas de onda, frequências e amplitudes, o que permite serem utilizados como fonte de sinal alternado para excitação do detector condutométrico sem contato.

Como a fonte deve apresentar estabilidade em frequência e principalmente em amplitude, apenas geradores de funções de boa qualidade podem ser utilizados, o que torna o sistema de detecção relativamente caro. Apesar de seu tamanho não estar associado à sua qualidade, estes geradores de funções tornam-se limitantes na compactação do sistema de detecção.

Além dos geradores de funções comerciais, outra maneira de gerar sinais de RF são os circuitos osciladores locais [21, 36,38]. No entanto, apenas alguns osciladores são capazes de manter amplitude e frequência estáveis simultaneamente em frequências acima de centenas de quilohertz mantendo baixa complexidade eletrônica na montagem do circuito.

Características do sinal de excitação como frequência, amplitude e perfil de onda associadas à eletrônica utilizada contribuem para um bom desempenho do C^4D , pois o nível de ruído proveniente de instabilidades da fonte é minimizado.

Estudos realizados demonstram que há uma dependência significativa entre o desempenho do detector, a configuração da cela de detecção, a amplitude e a frequência de oscilação. Em 2002, Fracassi da Silva e do Lago [19] demonstraram que a configuração de cela adotada apresentava uma boa sensibilidade relativa (r_s) quando a frequência da fonte de excitação era de 580 kHz, aproximadamente. Posteriormente,

Brito-Neto e colaboradores [17] demonstraram, através de simulações, que acima de 1 MHz a sensibilidade relativa apresentava intensidade elevada em uma ampla faixa de condutividade, (0,02 a 0,12 Sm^{-1}). Brito-Neto e colaboradores [18] estudaram também a influência da amplitude do sinal de excitação sobre a sensibilidade do detector. Foi observado que ao excitar a cela de detecção com sinais de amplitude elevada, a corrente que consegue atravessar a cela será maior, resultando, portanto, em sinais analíticos e relação sinal-ruído (SNR) de maior intensidade.

Outro parâmetro a ser considerado é o perfil do sinal alternado que excita o detector. Os harmônicos presentes no sinal reduzem a qualidade e a intensidade do sinal da fonte. Parte destes harmônicos é eliminada nos acoplamentos capacitivos da cela de detecção, ou seja, apenas uma parcela do sinal é aproveitada na detecção, o que implica numa amplitude efetiva relativamente menor que a estabelecida.

3.2.1 Forma de onda e oscilador local

Para a determinação do perfil do sinal alternado utilizado no detector, foram obtidos eletroferogramas de metais alcalinos, figura 11. Três tipos de perfis de sinais foram testados: quadrado, triangular e senoidal, figura 9. O perfil do sinal de RF foi escolhido baseando-se na maior SNR.

O estudo foi realizado no equipamento implementado pelo grupo de pesquisa [23-26]. O C⁴D deste equipamento é constituído de oitos canais destinados a leitura simultânea de oito colunas capilares.

Para execução deste experimento foi utilizado um gerador de funções Minipa MGF4202 (Minipa Ind. e Com. , São Paulo, Brasil) mantido à amplitude de 2,4 Vpp e frequência de oscilação de 560 kHz. O perfil do sinal de RF (senoidal, triangular ou

quadrado) foi variado entre cada análise realizada em triplicata. Para esta avaliação, foram analisadas soluções de NaCl, LiCl e KCl 30 μ M em tampão de MES/His 30 mM (pH = 6,0). A análise foi realizada à temperatura constante de 28 °C, potencial de separação ajustado em + 28 kV e injeção hidrodinâmica de 180 mm de coluna d'água. Foram utilizados capilares de 75 μ m de diâmetro interno e 360 μ m de diâmetro externo e 75 cm de comprimento.

Figura 10: Avaliação do perfil de sinal de RF usado para excitação do detector. (A) onda senoidal; (B) onda quadrada; (C) onda triangular; (1) K⁺, (2) Na⁺ e (3) Li⁺.

A partir dos eletroferogramas da figura 10, foi obtida a tabela I, na qual se percebe que a onda senoidal apresenta a maior intensidade de sinal que nos casos anteriores, ocasionando em uma maior SNR, calculada dividindo-se a altura de pico pelo desvio padrão da linha base.

Tabela I: Estudo da SNR em função dos diferentes tipos de ondas para os cátions K⁺, Na⁺ e Li⁺

Analito	Tipo de onda					
	Quadrada		Triangular		Senoidal	
	Altura de pico (V)	SNR	Altura de pico (V)	SNR	Altura de pico (V)	SNR
K⁺	0,698	34	0,604	51	0,963	77
Na⁺	0,485	24	0,409	34	0,609	49
Li⁺	0,282	14	0,290	24	0,431	34

Comparando as alturas de pico referentes aos sinais triangular e quadrado, percebe-se que as mesmas apresentaram valores próximos e o sinal de perfil senoidal apresentou um ligeiro aumento quando comparado com os demais. Avaliando-se a relação sinal-ruído, percebe-se que a onda quadrada apresentou menor valor quando comparada com a onda triangular. Tomando como referência a SNR da onda senoidal, percebemos que a SNR das ondas triangular e quadrada são, respectivamente, 66% e 44% daquela da onda senoidal.

Os harmônicos são múltiplos inteiros da frequência fundamental. Sinais alternados com perfil quadrado (sinais de onda quadrada) apresentam harmônicos com maior intensidade do que aqueles dos sinais triangulares e, consecutivamente, que os dos senoidais. Na detecção condutométrica sem contato o sinal de excitação deve ser constituído predominantemente pela frequência fundamental, pois ela reflete a amplitude aproveitada pelo sistema de detecção durante as análises [37].

Diante dos resultados obtidos experimentalmente, assim como os descritos na literatura [13, 17-19], o tipo de onda mais adequado é a onda senoidal, pois a onda senoidal gerada apresenta uma proporção menor de harmônicos, o que propicia uma maior eficiência do detector.

A amplitude e a frequência de oscilação do sinal proveniente da fonte é outro parâmetro importante no desenvolvimento do oscilador destinado à detecção condutométrica sem contato. Portanto, foi realizado um experimento em que um C⁴D de configuração semelhante à descrita por Fracassi da Silva e do Lago em 1998 [13] foi submetido a diferentes frequências e amplitudes. Para realização do experimento, utilizou-se um gerador de funções Agilent 33220A (Agilent Technologies, Califórnia), capilares de 75 µm de diâmetro interno e 360 µm de diâmetro externo e 58 cm de comprimento (53 cm até o detector). A temperatura foi ajustada em 28 °C e o potencial de separação em +25 kV. Soluções padrão de 50 µmol L⁻¹ de KCl, NaCl e LiCl foram injetadas hidrodinamicamente do lado da baixa tensão a 180 mm H₂O, por 30 s em tampão de MES/His 30 mmol L⁻¹ (pH 6,00). Amplitude e a frequência do gerador de funções foram variadas de 1, 2, 4 e 8 Vpp e 128, 256, 512, 1024, 2048 e 4096 kHz , respectivamente, entre cada análise. Os resultados obtidos podem ser verificados na figura 11 que demonstra a intensidade de sinal analítico e relação sinal-ruído em função dos diferentes valores de frequência.

Figura 11: Gráficos das alturas de pico (i, iii e v) e relação sinal-ruído (ii, iv e vi) para K^{+1} , Na^{+1} e Li^{+1} , respectivamente. Amplitudes do sinal: A - 1 Vpp; B - 2 Vpp; C - 4 Vpp; D - 8 Vpp.

As figuras 11-i, iii e v demonstram as intensidades das alturas de pico em função da frequência estabelecida pelo gerador de funções. Como podem ser observados, os gráficos relacionados à altura de pico são semelhantes entre si, assim como os relacionados à relação sinal-ruído (SNR). Ao verificar os gráficos de altura de pico, percebe-se que na frequência de 1000 kHz a intensidade do sinal se destaca frente às outras quando a amplitude é de 4 Vpp.

Ao observar os gráficos relacionados à relação sinal-ruído (ii, iv e vi), percebe-se que há 3 pontos que se destacam frente aos outros com valores elevados de SNR. Comparando os máximos dos gráficos de altura de pico e de SNR percebemos que os pontos correspondentes a 4 Vpp e 1000 kHz são coincidentes, o que evidencia uma condição ideal de maior intensidade de sinal analítico com elevada relação sinal-ruído para detector do equipamento utilizado.

Portanto, de acordo com estudos realizados, o oscilador deve apresentar um sinal senoidal com amplitude próxima a 4 Vpp e 1 MHz para que se obtenha o melhor desempenho do mesmo utilizando a configuração de cela semelhante à descrita por Fracassi da Silva e do Lago [19].

Há muitas maneiras de obter sinais senoidais, no entanto, para utilização em detectores condutométricos sem contato, amplitude e frequências estáveis são primordiais ao seu bom funcionamento. Mancini descreve um oscilador senoidal que utiliza uma lâmpada incandescente como elemento não Ôhmico para controle da amplitude. Inicialmente, quando o potencial é aplicado aos terminais da lâmpada, a mesma encontra-se fria e a resistência é baixa, o que permite o aumento do ganho. Quando a lâmpada aquece, sua resistência aumenta e o ganho diminui [21]. Este comportamento da lâmpada no circuito permite um controle de amplitude com precisão

de até 1%. No entanto, estes osciladores não passam de algumas dezenas de quilohertz. Outra maneira de se obter um sinal senoidal é remover os harmônicos de um sinal triangular ou mesmo quadrado através de filtros.

Durante os estudos, foram desenvolvidos alguns protótipos que possibilitaram o estudo do circuito eletrônico, *layout* de placa, posicionamento de eletrodos como relação à placa de circuito impresso, entre outros. A figura 12 ilustra alguns protótipos desenvolvidos.

Figura 12: Fotos de versões de detectores preliminares à versão atual: Versão 1 (A) e Versão 2 (B) do detector condutométrico sem contato.

A atual versão do detector possui um oscilador triangular com filtro ativo na saída sintonizado na mesma frequência do oscilador triangular (figura 13).

Figura 13: Oscilador senoidal de frequência e amplitude variável. IC1 OPA2822 (Texas Instruments Inc., Texas); IC2 OPA354 (Texas Instruments Inc., Texas); R1: 243 Ω ; R2: 910 Ω ; R3: 649 Ω ; R4: 1 k Ω ; R5: 390 Ω ; R6: 1,2 k Ω ; C1: 1 nF; C2: 1 nF; C3: 10 Pf; C7: 100 nF; C8: 100 nF.

O circuito da figura 13 possui um oscilador triangular constituído de um amplificador operacional (IC1) e um amplificador operacional (IC2) montado na configuração de filtro ativo passa-baixas.

O oscilador triangular consiste em um amplificador operacional no modo de integração em função do tempo (IC1-A) ligado em série com um amplificador operacional configurado no modo *Schmitt trigger* (IC1-B). O integrador cria uma rampa de potencial cuja inclinação é determinada por C1 e R1. O sentido de integração de IC1-A é determinado por IC1-B, ou seja, enquanto a saída de IC1-B está em +5 V o operacional IC1-A impõe a rampa de linearidade de + 4,3 a 0,7V. Quando a saída de IC1-B está em 0 V o operacional IC1-A integra de 0 a + 5 V. A frequência (f) e a

amplitude de oscilação (V_{out}) podem ser determinadas, respectivamente, pelas equações 11 e 12:

$$f = \frac{R_2}{4C_1R_1R_3} \quad (11)$$

$$V_{out} = 2,5 \pm 2,5 \cdot \frac{R_3}{R_2} \quad (12)$$

Os resistores R_1 , R_2 e R_3 foram determinados de modo a apresentarem valores abaixo de 1 k Ω , pois o aumento de impedância no circuito aumenta o ruído propagado junto ao sinal do oscilador. No entanto, os resistores devem limitar a corrente de modo que o amplificador operacional não aqueça excessivamente provocando deriva térmica ao ligar.

IC2 é um amplificador operacional configurado como filtro ativo passa-baixa de segunda ordem, com topologia MFB (*Multiple Feedback*). A frequência de corte e os valores dos componentes foram calculados através do programa FilterPro (Texas Instruments, Dallas, EUA). O filtro ativo atenua os harmônicos intrínsecos da onda triangular, aproximando o sinal original a um com características senoidais. Promove também um pequeno ganho para melhor aproveitar a faixa dinâmica da eletrônica disponível.

3.3 Conversor de corrente em tensão

Ligado diretamente ao segundo eletrodo da célula de detecção, o conversor de corrente em tensão (conversor i/V) é o primeiro estágio do transdutor responsável pelo tratamento do sinal analítico. Como o próprio nome sugere, esta configuração de ligação do amplificador converte a corrente que circula pela célula de detecção em valores correspondentes de tensão, figura 14.

O conversor de corrente em tensão do presente C⁴D é constituído de um amplificador operacional OPA380 (Texas Instruments Inc., Texas) e um resistor R9 de 1 MΩ na realimentação negativa, figura 14.

Figura 14: Conversor de corrente em tensão. Os valores dos componentes são R9: 1 MΩ, C13: 100 nF e IC4: OPA380 (Texas Instruments Inc., Texas).

A amplificação neste estágio se dá pelo resistor R9 de acordo com a Lei de Ohm (equação 13):

$$U = R \cdot i \quad (13)$$

O capacitor C13 apenas filtra os ruídos provenientes da fonte de alimentação do OPA380. A corrente detectada é inversamente proporcional ao valor de R, portanto, quanto maior a resistência R, menor será a corrente necessária para variar a tensão na saída do operacional. Ao analisar o circuito elétrico segundo a equação 13, percebe-se que o resistor de 1 MΩ de realimentação negativa do amplificador operacional, faz com que cada 1 μA na entrada do conversor i/V corresponda a 1 V em sua saída. No entanto, ao utilizar valores muito elevados de R, o efeito capacitivo deste componente torna-se mais pronunciado, podendo deformar o sinal analítico nesta etapa.

O OPA380 é um amplificador operacional de alta velocidade (90 MHz Gain Bandwidth - GBW) com filtro interno capaz de reduzir ruídos *flicker*, ou seja, ruídos inversamente proporcionais à frequência ($1/f$). Ele foi projetado para alimentação simples (não requer alimentação simétrica para seu funcionamento) de + 5 V, o que o torna particularmente adequado à alimentação proposta para todo circuito.

3.4 Retificador de precisão de onda completa

Os retificadores são circuitos eletrônicos capazes de tornar uma tensão alternada em tensão contínua. Estes circuitos são constituídos basicamente por diodos, no entanto, em alguns casos há a necessidade de se compensar a não idealidade. Os diodos são componentes muito sensíveis a pequenas variações de temperatura sobre sua junção *pn*. Para um diodo com corrente constante, o potencial decresce 2 mV a cada acréscimo de 1 °C sobre sua junção *pn*. Para corrigir tais variações e aproximar a retificação da idealidade, faz-se o uso de retificadores dotados de amplificadores operacionais conhecidos como *retificadores de precisão*.

Diversos tipos de retificadores de precisão são descritos por Sedra e Smith [22]; entre eles, os retificadores de onda completa. Os retificadores de onda completa aproveitam os sinais positivos e negativos referentes ao original. Nesta configuração o ganho obtido na retificação é maior que o obtido por Fracassi da Silva [13], pois se aproveita completamente o sinal alternado.

A atual versão do detector é constituída de um retificador de onda completa, ou seja, os semi-ciclos positivos e negativos são utilizados pelo conversor analógico digital, figura 15. Esta configuração permite um ganho efetivo de aproximadamente o dobro quando comparado em uma configuração que aproveita apenas um semi-ciclo.

Figura 15: Diagrama elétrico do retificador de onda completa usado no detector. Valores dos componentes: C15: 1nF; C14: 100nF; R12: 150Ω; R13 and R14: 499Ω; D1: BAR43S (STMicroelectronics, Switzerland) e IC5: OPA380 (Texas Instruments Inc., Texas).

O diodo BAR43S que compõe o retificador de onda completa foi escolhido por ser um diodo do tipo *Schottky*, ou seja, diodos de alta velocidade com baixo potencial de junção (0,33 V).

O capacitor C15 desacopla a etapa anterior ao retificador, diminuindo a contribuição do ruído de baixa frequência. A frequência de oscilação é importante no cálculo do ganho efetivo de cada semi-ciclo do retificador. Inicialmente é necessário o cálculo da impedância total de C15 e R12 através da equação 13:

$$Z = \sqrt{R^2 + \left(\frac{1}{2\pi f c}\right)^2} \quad (13)$$

onde R representa o resistor R12, f a frequência de oscilação e C o capacitor C15. Considerando $\omega = 1,2$ MHz, $R12 = 150 \, \Omega$ e $C15 = 1$ nF, o valor de Z será $200 \, \Omega$. O ganho relativo (G) desta etapa pode ser calculado a partir da equação 14:

$$G = \frac{R_F}{R} \quad (14)$$

Onde R_F representa os resistores de *feedback* ou realimentação R13 e R14 para cálculo dos semi-ciclos positivo e negativo, respectivamente, e R o valor de resistência determinado por Z calculado anteriormente. Portanto, o ganho relativo da etapa de retificação é de 2,5 vezes o sinal de entrada em cada saída do retificador. Esta configuração de retificador também amplifica os semi-ciclos negativos. Portanto, quando considerados os dois semi-ciclos, o ganho efetivo final é de aproximadamente 5 vezes.

3.5 Etapa de Filtragem

A etapa de filtragem na detecção condutométrica sem contato é de suma importância, pois ela permite a redução dos ruídos eletrônicos presentes no sinal analítico. No entanto, a filtragem deve ser adequada, pois quando aplicada excessivamente, o sinal analítico pode ser deformado, ou seja, os picos presentes no eletroferograma podem apresentar um perfil levemente atenuado e alargado.

No detector modelo Lite, foi utilizado um filtro RC passa-baixas (figura 16) constituído por capacitores e resistores, na saída do retificador com a frequência de corte em 16 Hz. Esta frequência permite que ruídos de alta frequência sofram atenuação

antes de chegarem à etapa de conversão A/D. Os valores dos resistores e capacitores foram determinados de modo a evitar a propagação de ruídos de alta frequência à etapa de digitalização do sinal analítico sem que os mesmos sofram deformações devido a excessos de filtragem.

Figura 16: Diagrama elétrico do filtro RC do tipo passa-baixas usado no detector.

Valores dos componentes: C18 e C19: 1 μ F; R16 e R17: 10k Ω .

3.6 Conversor de sinais analógicos em digitais MCP3551

Atualmente, em função dos avanços tecnológicos referentes à eletrônica e, consequentemente à informática, os dispositivos de aquisição de dados geralmente são dotados de conversores de sinais analógicos em sinais digitais (conversores A/D) capazes de amostrar e digitalizar sinais analógicos em intervalos de tempo regulares. Os conversores digitais podem converter as informações analógicas através de diferentes métodos de conversão. O C⁴D utiliza o conversor A/D MCP3551 (Microchip Technology Inc, USA), um conversor do tipo Sigma-Delta ($\Sigma\Delta$) de 22 bits e taxa de amostragem de 13,75 sps.

Em um conversor do tipo Sigma-Delta como o MCP3551 (figura 17), o sinal analógico é integrado de modo a criar uma onda triangular com amplitude proporcional à tensão do sinal analógico. O sinal triangular é, então, comparado com 0 V por um amplificador operacional, ou seja, nesta etapa pode-se considerar que o amplificador operacional é um conversor A/D de 1 bit. O sinal na saída do comparador é armazenado em um *flip-flop* do tipo D que trabalha com uma frequência de chaveamento muito elevada determinada por um *clock* interno, para que assim ocorra uma sobreamostragem a fim de aumentar a precisão do conversor A/D Sigma-Delta. A saída do *flip-flop* realimenta o circuito através de um conversor de sinais digitais em analógicos (conversor D/A), incluso no próprio circuito integrado. O sinal convertido pelo conversor D/A é somado à saída do integrador de modo que a amostra seguinte seja somada à amostra anterior, isso faz com que a saída do integrador seja mantida em 0 V. Desta maneira a saída do *flip-flop* apresentará um conjunto de zeros e uns que representarão a tensão média do sinal analógico recebido na entrada do conversor A/D, que posteriormente, passarão por um filtro passa-baixas digital capaz de atenuar os ruídos de frequências elevadas.

Figura 17: Diagrama de blocos do conversor Sigma-Delta. In - Entrada de sinais analógicos; Out – Saída de sinais digitais; 1 – circuito responsável pela soma do sinal do conversor D/A com o sinal de entrada; 2 – Integrador; 3 – Comparador de tensão; 4 – *Flip-Flop*; 5 – *Clock* para chaveamento do flip-flop; 6 – Conversor A/D de 1 bit.

Apesar de obter um dado a cada 72,73 ms, o uso do MCP3551 torna-se importante devido seu baixo nível de ruído ($2,5 \mu V_{RMS}$) e pequeno número de componentes periféricos necessários para seu funcionamento (figura 18). A interface de comunicação adotada pelo MCP3551 é do tipo SPI (*Serial Peripheral Interface Bus*) que requer apenas 3 linhas digitais para comunicação (*Chip Select* - CS, *Data Output* - SDO e *Serial Clock* - SCK). Apresenta duas entradas diferenciais V_{in+} e V_{in-} , sendo o sinal convertido a diferença entre suas entradas ($V_{in+} - V_{in-}$). Diante das características do MCP3551, o componente tornou-se atrativo para o desenvolvimento e construção do C⁴D.

Figura 18: Diagrama elétrico do detector condutométrico sem contato. Valores dos componentes elétricos: C17: 10 μF ; C20: 100 nF; C21: 1 μF ; R18: 1,2 k Ω ; R15: 820 Ω ; R19: 10 Ω ; R20, R21 e R22: 100 Ω ; Todos os resistores possuem tolerância de $\pm 1\%$. IC6: MCP3551(Microchip Technology Inc.,USA).

A alimentação do conversor A/D é compartilhada com todo o circuito do detector o que compensa as flutuações da tensão de alimentação decorrentes de possíveis instabilidades mínimas da fonte de alimentação. Como a tensão de referencia (V_{ref}) está ligada diretamente à alimentação principal do conversor A/D através de divisor de tensão (R15 e R18), as flutuações provenientes da alimentação não interferem no funcionamento do MCP3551, pois a mesma determina simultaneamente o valor de V_{ref} e da amplitude do oscilador. Desta forma, caso, por exemplo, a tensão de alimentação momentaneamente aumente, a amplitude do oscilador aumentará – o que poderia ser interpretado erroneamente como um aumento de condutividade, já que em ambos os casos o resultado seria o aumento do sinal na saída do conversor corrente-tensão – sem maiores consequências sobre a medida final, já que a tensão de referência aumentará na mesma proporção.

Como foi mencionado anteriormente, a etapa de retificação possui duas saídas (semi-ciclo positivo e semi-ciclo negativo) que são filtradas separadamente e ligadas diretamente às entradas V_{in+} e V_{in-} , respectivamente do conversor A/D. Como as entradas do MCP3551 são diferenciais, ou seja, o sinal convertido (V_{conv}) é resultado da diferença entre suas portas de entrada (equação 15), e as contribuições do sinal analítico fazem com que estas duas tensões excursionem em sentidos opostos, há um ganho final correspondente ao dobro de se aproveitar apenas um semi-ciclo do retificador.

$$V_{conv} = V_{in+} - V_{in-} \quad (15)$$

Segundo o fabricante, o MCP3551 possui um filtro interno capaz de atenuar frequências de 50 e 60 Hz e seus harmônicos. A fim de verificar a eficiência deste filtro, foi realizado um teste de funcionamento de seu filtro interno. Os resultados obtidos e as discussões pertinentes serão descritas no próximo capítulo.

3.7 Confecção da placa de circuito impresso (PCB) e montagem do C⁴D

O C⁴D, assim com outros detectores, é susceptível a ruídos pertinentes ao ambiente em que estes são submetidos, além dos ruídos intrínsecos dos próprios componentes eletrônicos que o constitui.

O desenvolvimento das versões anteriores à versão atual do C⁴D permitiram que, além do circuito eletrônico, o layout da placa de circuito impresso fosse otimizado de modo que as fontes de ruídos fossem minimizadas e o desempenho do detector fosse maximizado.

Alguns métodos de minimização de ruídos em circuitos eletrônicos podem ser encontrados em diversas folhas de informações sobre componentes eletrônicos ou mesmo livros editados pelos próprios fabricantes destes componentes [21].

3.7.1 Placa de circuito impresso

O desenvolvimento e a otimização da placa de circuito impresso envolveram diversas observações relacionadas a efeitos capacitivos entre trilhas de sinais analógicos, sinais digitais e alimentação DC, além de efeitos indutivos relacionados ao comprimento das trilhas, entre outros. A escolha do tipo de placa de circuito impresso foi um importante fator visto que há diferentes placas de materiais no comércio local.

O material que constitui a placa de circuito impresso é de fundamental importância, pois, no mercado, há placas constituídas de fibra de vidro e resina epóxi e de papel e resinas fenólicas conhecidas também conhecidas como placa de fenolite, figura 19. Atualmente as placas de fenolite estão sendo gradativamente substituídas

pelas placas do tipo FR-4, pois esta última possui maior resistência ao aquecimento e baixa transmissão de sinais AC através de sua superfície [21]. Portanto, a placa constituída de fibra de vidro e resina epóxi é a mais indicada a trabalhos que envolvem aplicações de circuitos de alta frequência, como na detecção condutométrica sem contato.

Figura 19: Diferentes placas de circuito impresso. A – Placa de circuito impresso constituída fibra de vidro e resina epóxi (FR-4) e B e C – Placas de circuito impresso constituídas de papel e resinas fenólicas, também conhecidas como placas de fenolite (FR-1).

3.7.2 Planos de terra e aterramento

Ao projetar uma placa de circuito impresso (PCB), o terra deve ser estudado cuidadosamente, pois o mesmo pode contribuir para o bom desempenho ou mesmo o mal funcionamento do circuito. Uma das estratégias relatadas por Mancini [21] para a redução de ruídos é a confecção de um plano de terra ao redor de amplificadores operacionais (OP Amps) de modo que, sempre que possível, circunde todo o componente.

Além de contribuir para minimizar os efeitos de propagação de RF através da placa de circuito impresso, o plano de terra, quando bem dimensionado, contribui na filtragem de sinais alternados presentes junto a sinais de corrente contínua (DC) em trilhas destinadas aos mesmos, como as trilhas de alimentação do circuito eletrônico.

O detector condutométrico sem contato possui fontes de sinais de RF analógicos e digitais. Alguns cuidados devem ser tomados quando há circuitos analógicos e digitais presentes em um mesmo equipamento, pois o ruído gerado nas transições entre os estados lógicos do circuito digital podem provocar ruídos no circuito analógico. Para evitar tais transtornos, Mancini recomenda que o ponto de convergência entre os terras seja baixa impedância e o mais próximo da fonte de alimentação, o que contribui para uma descarga efetiva do ruído à terra. O C⁴D possui terra analógico e digital convergindo na própria placa de circuito impresso, no entanto há duas linhas destinadas ao aterramento do circuito ligadas diretamente ao terra da fonte, o que contribui para o aterramento eficiente do circuito.

3.7.3 Roteamento e layout

Como o detector compartilha de circuitos analógicos e digitais no mesmo PCB, durante o roteamento, foi evitada a sobreposição de regiões da placa de circuito impresso que contenham circuitos analógicos e digitais. Pois o acoplamento capacitivo entre as faces opostas da placa de circuito impresso podem induzir ruídos no dispositivo eletrônico quando circuitos analógicos e digitais estão envolvidos, figura 20. Portanto durante o desenvolvimento do *layout* levou-se em consideração estas possíveis interferências, pois, devido a elevada sensibilidade do C⁴D Lite, pequenas capacitâncias parasitas podem provocar ruídos sistemáticos no sinal analítico.

Figura 20: Diferentes situações de roteamentos em uma placa dupla face contendo circuitos analógicos e digitais. A cor indica o cobre das trilhas, a fibra do PCB e as capacitâncias parasitas que surgem entre as trilhas de cobre estão representadas.

No caso 1 da figura 20, há uma separação adequada do circuito analógico e digital, pois o ruído gerado no circuito digital não se propaga até o analógico. No entanto, em 2, o ruído gerado no circuito digital se propaga até o circuito analógico provocando ruídos indesejáveis nas linhas de transmissão analógicas do detector.

No desenvolvimento de dispositivos eletrônicos é comum o uso de programas que possibilitem o desenho dos PCBs, como DipTrace (Novarm Limited, Dnipropetrovsk, UA) e Eagle (CadSoft Computer –Newark Corporation, Pembroke Pines, FL). Estes programas permitem desenhar todo o PCB, ligando os componentes através de trilhas com perfis circulares, 45 e 90°, (figura 21-A, B e C, respectivamente).

Figura 21: Perfis de trilhas usadas em roteamento de circuito impressos. (A) perfil circular, (B) 45° e (C) 90°

O *layout* da placa é de fundamental importância no desenvolvimento de um dispositivo eletrônico, no entanto alguns cuidados como conhecimento das possíveis fontes de ruídos, técnicas de roteamento, planos de terra, entre outros devem ser tomados. Os diagramas elétricos, assim como o *layout* da placa de circuito impresso foram desenvolvidos com o auxílio do programa DipTrace 2.0.09.

3.7.4 Blindagens

As blindagens desempenham um papel importante no bloqueio de sinais de rádio frequência (RF) proveniente de meios externos, como rádios, celulares, microondas entre outros. A blindagem é uma Gaiola de Faraday ligada eletricamente ao terra do próprio circuito, ela envolve o dispositivo evitando que ruídos externos resultem em interferências no sinal analítico. Pode ser feita de diversos materiais, como chapas, telas metálicas ou mesmo de materiais poliméricos revestidos com polímeros condutores. O C^4D possui duas placas de circuito impresso que bloqueiam sinais de RF advindos de fontes externas, figura 22.

Figura 22: Blindagens do C^4D confeccionadas e FR-4. A – Blindagem do transdutor;
B – Blindagem do oscilador.

3.7.5 Montagem

Antes do processo de soldagem dos componentes as placas internas do detector são parafusadas de modo que as mesmas estejam perfeitamente alinhadas, em seguida os furos dos eletrodos são feitos simultaneamente nas placas internas, figura 23. A

montagem preliminar à furação para o alojamento dos eletrodos é importante de modo a manter o alinhamento da cela de detecção.

Figura 23: Placas de circuito impresso dos circuitos que compõem o C⁴D Lite.

A – Oscilador senoidal e B – circuito transdutor. Em destaque o local onde são soldados os eletrodos após o processo de furação.

Depois de furadas, as placas são separadas e, em cada uma delas, é soldado um eletrodo como demonstrado na figura 24. Os eletrodos utilizados no detector foram confeccionados a partir de fios de cobre enrolados através da técnica de *wire-up*. Os fios são enrolados em uma cânula de 400 μm de diâmetro externo usada em seringas.

Figura 24: Vista em corte do eletrodo em relação à placa de circuito impresso.

A – placa de circuito impresso a base de fibra de vidro e resina epóxi (FR-4); B – solda;
C – eletrodo de cobre com 2 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro com furo de 400 μm ; D – trilha de cobre.

Após soldados eletrodos e componentes eletrônicos, o detector é montado em camadas. A figura 25 mostra as placas, isolamentos e plano de terra dispostos separadamente na sequência de montagem, finalizando com o C^4D montado.

Figura 25: Montagem das partes do C^4D . A, B, C e D são a vista superior da blindagem, circuito transdutor, isolante de polietileno, plan de terra de cobre, respectivamente. E, F, G são a vista inferior do segundo isolante de polietileno, circuito oscilador e blindagem inferior. H mostra todas as partes anteriormente descritas, o capilar atravessando todas as placas (i) e um cabo (j) que conecta o C^4D ao sistema de aquisição de dados.

Estudos realizados por Brito-Neto e colaboradores [17] demonstraram que o plano de terra entre os eletrodos reduz consideravelmente os ruídos provocados por fugas capacitivas entre os eletrodos. No entanto, surgem fugas capacitivas de parte do sinal para o plano de terra, ocasionando em perda de sensibilidade. Contudo a redução dos ruídos é mais significativa que redução da sensibilidade relativa. Portanto, fez-se o uso de plano de terra entre as placas de circuito impresso e, conseqüentemente, entre os eletrodos (figura 25 – D). O plano de terra foi confeccionado a partir de uma chapa de cobre de 120 μm ligada ao terra do circuito eletrônico. Paralelo ao plano de terra, são colocados dois espaçadores de polietileno de 245 μm , cuja função é isolar e determinar a distância entre as placas e os eletrodos (Figura 25 – C e E).

Placas, espaçadores isolantes e plano de terra são imobilizadas por dois parafusos de 2,5 mm de diâmetro. Estes parafusos são responsáveis por imobilizar as placas entre si e manter o auto-alinhamento entre as mesmas oferecendo, sobre tudo, maior resistência mecânica à montagem. Após montado, os cabos de alimentação e transmissão de dados são soldados às PCB's do detector.

3.8 Interfaceamento do detector condutométrico sem contato ao micromputador

O detector Lite pode ser instalado diretamente à porta paralela de um microcomputador ou através de uma microcontroladora.

A instalação do C⁴D Lite diretamente à porta paralela do computador é possível habilitando seus pinos individualmente através de um programa de aquisição de dados que controle tais pinos como o protocolo observado na figura 26.

Figura 26: Configuração da modulação do pinos da interface SPI do conversor A/D

MCP355. CS, SDO/RDY e SCK são as portas de *Chip Select*, *Data/Ready Data Output* e *Serial Clock*, respectivamente. Valores dos tempos descritos: t_{CSL} : > 50 ns; t_{CSD} : > 90 ns; t_{RDY} : 50 ns;

t_{DIS} : > 20 ns; t_{CSHSD} : 10 μ s; t_{DO} : 90 ns; f_{SCK} : 5 MHz; t_{SU} : > 20 ns; t_{HI} : > 90 ns; t_{LO} : > 90 ns.

Adaptado da referência [41]

Através da modulação dos pinos do conversor A/D MCP3551 (CS, SDO/RDY e SCK), a conversão dos sinais analógicas em digitais podem ser realizadas.

A instalação na porta paralela torna ainda mais minimalista a instalação do C⁴D. No entanto, não é a melhor opção, pois computador além de permanecer dedicado à tarefa pode modular os pinos da porta paralela numa frequência limitada até 20 Hz, ou seja, a cada 50 ms o computador adquire um dado com tal precisão de tempo.

Outra maneira de interfacear o C⁴D Lite é através de uma microcontroladora capaz de gerar intervalos de tempo menores, aumentado, portanto, a resolução em tempo da aquisição de dado. Uma microcontroladora é um circuito integrado que desempenha funções como um pequeno computador. São constituídas de processador interno, memórias e portas de comunicação que podem ser configuradas em entrada ou saída. Além de possuir componentes lógicos e aritméticos comuns aos processadores, as

unidades microcontroladas (MCU) podem apresentar interface de comunicação SPI (*Serial Peripheral Interface*), USB (*Universal Serial Bus*), *Ethernet*, entre outras. O baixo consumo (miliwatts) durante o funcionamento a torna importante em projetos de baixo consumo energético. Geralmente são usadas em dispositivos que necessitam de controle automático, tais como ferramentas, máquinas, brinquedos entre outros.

O uso de microcontroladoras acrescenta mais uma etapa no sistema de detecção, no entanto permite aumentar a resolução em tempo durante a aquisição de dados possibilitando, ainda, instalar outros detectores Lite ou mesmo marcadores térmicos como o descrito por Saito e colaboradores [27].

Uma opção de microcontroladora é a ATmega168 (Atmel, San Jose, CA) que, além de sua simplicidade quanto aos componentes periféricos necessários para seu funcionamento, é amplamente difundida através do projeto de *open hardware* e *open software* Arduino [28].

A ATmega168 possui 16 kBytes de memória *flash*, 512 Bytes de memória EPROM, 1 kBytes de memória SRAM, 20 pinos I/O e *clock* interno que possibilita realizar leituras do conversor A/D com uma precisão de 1 ms.

O circuito da microcontroladora (Anexo A) é baseado no diagrama elétrico descrito pelo próprio fabricante. A figura 27 apresenta o layout da placa de controle e aquisição de dados, aqui denominada por MCU Lite, e suas respectivas portas de comunicação e conectores.

Figura 27: Placa de aquisição e controle MCU Lite. A - Conectores para instalação de 4 detectores Lite; B - *Trigger* externo; C – Porta de comunicação UART; D - Entrada de alimentação Auxiliar (+9 V); E - Entrada de alimentação principal (+9 V); F - Botão de *reset*; G – Strap de comutação para entrada de alimentação destinadas a marcas térmicas; H - Entrada de alimentação Auxiliar (+5 V); I - Linhas digitais disponíveis para uso geral e J – Conectores destinados a ligação de marcadores térmicos.

A placa de aquisição apresentada na figura 27 permite a instalação de até 4 detectores, *trigger* externo, dois *drivers* de marcadores térmicos [27]. Requer entrada de alimentação entre +12 V e +35 V, *reset* da microcontroladora por hardware e comunicação via UART (*Universal Asynchronous Receiver/Transmitter*). Para converter e fazer a comunicação entre o microcomputador e a MCU Lite, foi utilizado o cabo de comunicação *TTL-232R USB to TTL Serial Converter Cable* (FTDI, Hillsboro, OR) que converte as informações de protocolo UART para Serial. No entanto, a comunicação serial se faz através da porta de comunicação USB do microcomputador por meio de um circuito integrado FT232RQ (FTDI, Hillsboro, OR) embutido no próprio conector USB do cabo.

3.9 Softwares

3.9.1 Firmware

Firmware é o programa armazenado diretamente na microcontroladora e que irá determinar seu funcionamento. O firmware da placa MCU Lite foi desenvolvido no ambiente de programação Arduino Software [28] com uma linguagem de programação C++ com pequenas modificações.

O *firmware* de controle do detector e transferência de dados (Anexo B) permite a aquisição de dados de 4 detectores conectados à placa MCU Lite, assim como *trigger* e 2 marcadores térmicos. Através do *firmware*, a microcontroladora lê o conversor A/D (segundo o protocolo demonstrado na figura 26), de modo que todas as instruções necessárias ao procedimento de aquisição de dados são realizadas sem o comando expresso vindo do computador. Ao fim das conversões realizadas pelo conversor A/D MCP3551, o tempo fornecido pela ATmega 168 é associado à respectiva leitura feita pelo detector. Posteriormente, os dados são enviados ao microcomputador através de uma comunicação UART convertida em USB pelo cabo *TTL-232R USB*. Os dados enviados ao microcomputador são constituídos de 5 colunas (quando 4 detectores estiverem instalados): a primeira coluna refere-se ao tempo em milissegundos, a segunda, terceira, quarta e quinta colunas correspondem, respectivamente, aos detectores 1, 2, 3 e 4. Se não houver comandos à espera, o programa atende instruções estabelecidas pelo *frontend* através da rotina “menu” do firmware.

3.9.2 Frontend

O *frontend* é o programa que permite a interação do usuário com o dispositivo a ser controlado ou monitorado. O *frontend* do oC4D Lite (figura 28) foi desenvolvido em um ambiente de programação gráfica em LabView 8 (National Instruments, Austin, TX) compatível com sistemas operacionais Windows. O programa possui funcionalidades como identificação de diâmetro interno e calibração do detector com diferentes diâmetros de capilares (20 a 100 μ m), sincronizar sistema de detecção e equipamento de eletroforese através de trigger externo, resposta em condutividade (mS cm⁻¹) ou valores adimensionais em bits e desvio padrão de linha base, além de exibir o eletroferograma na tela durante a análise e salvar o mesmo. O sinal de resposta é dado em unidades de condutividade, sendo necessário apenas que informe ao software o diâmetro interno do capilar que está utilizando.

Figura 28: Tela principal do programa de aquisição oC4D Lite LV8. A – inicia a aquisição de dados, B – finaliza a aquisição de dados, C – Nome do arquivo a ser salvo.

A figura 28 apresenta a tela principal do programa de aquisição (*Run*) do detector Lite. Esta janela do programa possui o botão que inicia a aquisição de dados (A) e o armazenamento dos mesmos em um arquivo previamente nomeado antes de inicializar a análise (C) e um botão (B) que finaliza a aquisição e o arquivo aberto anteriormente.

O arquivo gerado é nomeado associando-se o nome dado pelo analista antes da análise acrescido pela data, hora e minuto em que o arquivo foi criado, finalizando com a extensão ".dat".

As configurações necessárias para o início aquisição de dados são realizadas na guia *Setup/Exit* (figura 28). Nesta aba, o operador deve informar em qual porta de comunicação do microcomputador o detector está conectado (A). A maneira como será feito o disparo da aquisição de dados (*trigger*) (B) (por *software* sob o comando do próprio analista, ou por *hardware* através de um sinal elétrico enviado pelo próprio equipamento de eletroforese capilar). É possível também determinar o tempo máximo de análise, neste caso, quando o *trigger* for feito por hardware é importante que o tempo máximo (C) seja menor que o programado no equipamento de CE, pois assim a sincronia entre CE e C^4D é mantida sem a intervenção do operador.

Figura 29: Aba de configurações do programa de aquisição. A - Definição da porta de comunicação; B – Trigger externo ou interno; C – Tempo máximo de aquisição de dados; D – Endereço para salvar o arquivo; E – Tipo de resposta do detector; F - Capilar usado na análise; G – Número de detectores utilizados; H – Grava as configurações e continua o programa e I – Sair do programa.

Atualmente o sinal utilizado pela função “*trigger por hardware*” é uma transição do nível lógico alto para o baixo, ou seja, quando o aparelho de eletroforese capilar enviar um sinal com nível lógico baixo (0) o detector iniciará o envio dos dados ao microcomputador, no entanto, o tipo de transição pode ser alterado acessando-se o firmware.

O endereço do local onde os dados serão armazenados deve ser definido através da janela de diálogo. Através do botão E, o sinal analítico pode ser apresentado e arquivado em dois possíveis formatos: condutividade ou valores adimensionais (bits) enviados pelo conversor A/D de 22 bits MCP3551. No entanto, ao escolher a opção de resposta em condutividade, o diâmetro interno do capilar deve ser informado por meio do botão F para que a equação de calibração forneça a resposta correta em condutividade.

Funções adicionais são acessadas através da aba “*Additional*” (Figura 30). Nesta aba são encontradas funções de identificação do diâmetro interno do capilar, desvio-padrão da linha base, versão do *firmware* e informações sobre *frontend*.

Figura 30: Aba de com funções adicionais do programa de aquisição. A - Identificação do diâmetro interno do capilar; B - Desvio-padrão da linha base; C - Versão do *firmware* e D - Informações sobre *front end*.

A identificação do diâmetro (A) interno de capilares pode ser realizada mediante uma calibração prévia com um capilar de 75 µm preenchido com água deionizada. Após a calibração do *software*, o de interesse (preenchido com água deionizada) é inserido detector. Ao realizar a aquisição de dados o software acenderá a luz do LED referente ao diâmetro interno do capilar (20 e 100 µm). Os parâmetros referentes à curva de calibração serão discutidos no capítulo 4 (Caracterização do Detector C⁴D Lite).

Em algumas situações é necessário uma pré-visualização do desvio padrão, portanto, o *frontend* foi desenvolvido com uma ferramenta que calcula o desvio padrão da linha base automaticamente (B). Além da amostragem da linha base ser realizada por intervalo de tempo a mesma não faz nenhum tratamento de sinal prévio, ou seja, o

resultado obtido nos cálculos é susceptível a possíveis instabilidades do sinal de linha base. É importante considerar que, assim como a resposta do sinal analítico pode ser em condutividade ou adimensional, o desvio padrão terá o mesmo tipo de resposta que o definido na aba “*Setup/Exit*”. Nesta aba também se encontra informações sobre o *frontend* (D) e a versão do firmware instalado na MCU Lite (C).

4 – Caracterização do Detector

C⁴D Lite

4.1 Caracterização eletrônica

O monitoramento de alguns pontos de teste do circuito eletrônico de um dispositivo possibilita sua caracterização, ou seja, a verificação do comportamento e o diagnóstico quando o mesmo apresenta comportamentos anômalos.

Os pontos de teste do detector são apresentados na figura 31. Os mesmos foram escolhidos de modo a fornecerem informações sobre o funcionamento de cada uma das sub etapas que compõe o circuito de detector (oscilador, conversor i/V, retificador de onda completa, filtro passivo e conversor A/D).

Figura 31: Circuito eletrônico do detector e os respectivos pontos de teste. A, B e C - saída quadrada, triangular e senoidal, respectivamente; D- saída do conversor i/V; E- saída do amplificador do retificador de onda completa; F e G- saída retificada de semi-ciclo negativo e positivo, respectivamente; H e I- entrada V_{in+} e V_{in-} do conversor A/D, respectivamente.

4.1.1 Oscilador

O oscilador senoidal é a fonte de sinal do C⁴D Lite. Sua caracterização é de grande importância, pois através da mesma pode-se determinar a qualidade do sinal de excitação.

Informações sobre o comportamento da frequência de oscilação e estabilidade da amplitude são de grande importância para a qualidade do sinal, pois variações das mesmas refletem na eficiência do oscilador, e, conseqüentemente, na intensidade do sinal que chega até a cela de detecção. Uma maneira eficiente de verificar a qualidade do sinal com relação às frequências que o compõe é através da Transformada de Fourier.

Avaliando-se os pontos de teste, o ponto A da figura 31 mostra uma onda de perfil quadrado com mesma frequência de oscilação do oscilador, no entanto, o sinal de maior interesse são os pontos B e C, pois através dos mesmos é determinada a frequência e a amplitude do oscilador.

A figura 32-A mostra o sinal triangular obtido através de osciloscópio no ponto B da figura 31. Ao lado, a figura 32-B apresenta a Transformada de Fourier do mesmo sinal, na qual pode ser observada a fundamental em 1.171.875 Hz e um harmônico em 3.710.937 Hz.

Figura 32: A – Sinal triangular obtido a partir do ponto B visualizado na figura 31 e B – sua respectiva Transformada de Fourier.

Pode-se observar que a fundamental apresentada na figura 32-B possui elevada intensidade quando comparada ao terceiro harmônico, no entanto, verifica-se pequenas perturbações no espectro referentes a outros harmônicos.

Ao passar o sinal pelo filtro ativo sintonizado na mesma frequência do oscilador (1,2 MHz) é possível reduzir parte dos harmônicos que compõe o sinal, deixando com características mais próximas de um sinal senoidal.

A figura 33 apresenta o sinal senoidal obtido após a filtragem e a amplificação realizada pelo filtro ativo de segunda ordem.

Figura 33: Sinal senoidal obtido a partir do ponto C visualizado na figura 31 e B – sua respectiva Transformada de Fourier.

Observa-se que, ao se filtrar e amplificar é obtido um sinal com características senoidais (figura 33). Após a filtragem parte dos harmônicos que compunham o sinal triangular foi minimizada (figura 33-B). Como os harmônicos foram minimizados, pode-se introduzir um ganho de 1,2 vezes ao sinal do oscilador de modo a aproveitar a máxima amplitude do sinal do oscilador (aproximadamente 4 Vpp).

Como mencionado anteriormente, a estabilidade da amplitude é de grande importância, pois pequenas variações causam perda de sensibilidade ou mesmo reprodutibilidade.

4.1.2 Conversor i/V

As etapas subsequentes ao oscilador dependem de um capilar inserido na cela de detecção preenchido com uma solução de concentração conhecida.

A avaliação do conversor i/V foi possível utilizando um capilar de diâmetro interno 75 μm e solução de KCl 10 μM . A concentração da solução foi estabelecida de modo que permitisse a determinação e a caracterização do sinal analítico através do circuito sem que houvesse saturação dos amplificadores operacionais.

A figura 34 mostra o sinal obtido através do osciloscópio. Devido ao potencial de referência adotado em todo circuito eletrônico, o sinal obtido tem um potencial de referência de aproximadamente 2,45 V_{rms} , ou seja, o sinal obtido está centrado neste valor de potencial. A estratégia de potencial de referência adotada (utilização de divisor de tensão) minimiza os efeitos de flutuações de tensão da fonte de alimentação do dispositivo.

Figura 34: Saída do conversor i/V (D) com sinal senoidal centrado em aproximadamente 2,45 V_{rms} .

4.1.3 Retificador de onda completa e filtro

O detector Lite utiliza um retificador de onda completa, ou seja, retificação dos dois semi-ciclos do sinal AC. A etapa de retificação é constituída de amplificador operacional IC-5 e diodo D1 que, ao receber polarização inversa, gera ruídos do tipo *flicker*, *popcorn* e *avalanche* [18] que interferem na qualidade do sinal analítico e, consequentemente, na sensibilidade do sistema de detecção.

Assim como as etapas anteriores, foi importante a verificação do sinal na saída do amplificador operacional (ponto E, figura 31), pois a amplificação não deveria provocar a saturação do mesmo, ou seja, que a saída do amplificador operacional atingisse o valor próximo ao de sua alimentação.

Importante também foi a verificação das saídas positivas e negativas do retificador, pontos G e F respectivamente. As observações destes pontos foram importantes para se verificar possíveis deformações e ruídos excessivos. Na figura 35 podem ser observados sinais obtidos através de osciloscópio dos pontos de teste G, D e F do retificador quando se injetou uma solução de KCl 10 μ M em um capilar de diâmetro interno 75 μ m inserido no detector.

Figura 35: Saídas do retificador de onda completa quando injetou-se uma solução de KCl 10 μ M em um capilar de diâmetro interno 75 μ m inserido no detector. G – saída de semi-ciclo positivo, E – saída do amplificador operacional e F – saída de semi-ciclo negativo.

Pode-se observar que, mesmo apresentando ruídos de alta frequência, o sinal obtido na saída do retificador é consideravelmente maior que o ruído observado e centrado no potencial de referência estabelecido por R10 e R11 (aproximadamente +2,5 V), figura 31.

Após a etapa de retificação o sinal foi filtrado por um circuito RC constituído por R16 e C18 (para o semi-ciclo positivo) e R17 e C19 (para o semi-ciclo negativo). A frequência de corte (f_c) do circuito, ou seja, a frequência em que os sinais são atenuados em -3dB foi estabelecida pela equação 16, onde R representa o valor do resistor em Ohms (Ω) e C o valor do capacitor em Farads (F).

$$f_c = \frac{1}{2\pi RC} \quad (16)$$

A figura 36 apresenta os sinais filtrados que são encaminhados ao conversor de sinais analógicos em digitais (H – proveniente do semi-ciclo positivo e I – proveniente

do semi-ciclo negativo). H-I é o sinal a ser digitalizado resultante da diferença entre H e I que será discutido posteriormente em **4.1.4 – Conversor A/D**.

Figura 36: Sinais provenientes da saída de cada filtros passivo obtidos durante uma injeção de solução de KCl 10 μ M em um capilar de diâmetro interno 75 μ m inserido no detector e a diferença entre eles. H – Sinal filtrado proveniente do semi-ciclo positivo, I – sinal filtrado proveniente do semi-ciclo negativo, H-I – sinal a ser digitalizado pelo conversor A/D.

Como pode ser observado na figura 36, o sinal H é um sinal DC de 2,62 V_{rms} e I, um sinal DC de 2,29 V_{rms} com baixo ruído relativo. H e I são encaminhados às entradas V_{in+} e V_{in} do conversor analógico digital IC5, respectivamente, para serem digitalizados. O sinal digitalizado é representado por H-I 0,32 V_{rms} , onde o mesmo é obtido segundo a equação 15 apresentada no capítulo anterior.

4.1.4 Conversor A/D

O conversor A/D utilizado foi o MCP3551 de 22 bits que disponibiliza um dado digitalizado em sua saída a cada 72,73 ms. O MCP3551 é um conversor possui baixo nível de ruído ($2,5 \mu V_{\text{rms}}$) com duas portas diferenciais (V_{in+} e V_{in-}).

No presente detector, apenas 21 bits foram efetivamente usados, pois o sinal digitalizado é sempre positivo, enquanto o MCP3551 uma entrada bipolar. No entanto, esta resolução é suficiente para eliminar o sistema de compensação de linha base. Portanto, utilizando apenas 21 bits do conversor A/D, o mesmo detecta variações de 1 parte em 2.097.152.

Na figura 37 é apresentado um eletroferograma de uma solução padrão de KCl, NaCl, BaCl₂, MgCl₂, CaCl₂ e LiCl 100 μ M obtidos da Sigma (St. Louis, USA) utilizando tampão MES/His 30 mM. A separação foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida de 75 μ m de diâmetro interno e 375 μ m de diâmetro externo, comprimento 80 cm (70 cm efetivos) a uma temperatura de 28 °C.

O eletroferograma foi obtido utilizando é representado pela figura 37-C utilizando um conversor A/D de 22 bits (21 bits efetivos). As figuras 37-A e 37-B representam o mesmo eletroferograma sob os aspectos de conversores A/D de 12 e 16 bits, respectivamente.

Os conversores A/D de 12 e 16 (A e B respectivamente) conseguem obter o sinal analítico de interesse, no entanto, em alguns casos a variação do sinal é superior ao fundo de escala disponibilizado por estes conversores, o que leva a necessidade da implementação de sistemas de ajuste de linha base [16].

Figura 37: Comparação entre eletroferogramas visualizados sob as condições de um conversor A/D de 12 bits (A) 16 bits (B) e 22 bits (C) considerando apenas valores positivos

Através desta figura pode-se perceber que a vantagem do uso do conversor de 22 bits frente ao de 12 e 16 bits refere-se ao fato de que em análises onde o ajuste de linha base não deve ocorrer durante a separação, como por exemplo, em isotacoforese. Na isotacoforese há a injeção de diferentes eletrólitos com condutividades distintas entre si e o ajuste de linha base durante a separação inviabilizaria a análise.

Utilizando conversor de 22 bits (C) o detector Lite pode realizar uma aquisição de dados sem a necessidade de ajustes de linha base e com uma elevada resolução (1 parte em 2 097 152). Esta resolução é necessária, pois os sinais obtidos representam pequenas variações de corrente em uma elevada linha base, devido ao eletrólito sempre presente.

4.2 Estabilidade em tempo (ATmega168)

O detector Lite pode ser interfaceado diretamente ao computador ou mesmo a um sistema microcontrolado. O computador apresentou uma resolução em tempo de aproximadamente 50 ms. No entanto, utilizando um sistema constituído de uma microcontroladora ATmega168, a resolução em tempo foi de aproximadamente 1 ms, ou seja, um ganho aproximado de 50 vezes.

O teste de estabilidade de tempo foi obtido realizando uma aquisição de dados durante 25 min e, posteriormente, avaliando-se o intervalo de tempo entre cada medida. O resultado obtido pode ser visualizado na figura 38.

Figura 38: Frequência em que ocorre a mudança de intervalo de tempo em função do intervalo de tempo entre cada dado obtido pelo sistema de amostragem. Em destaque, o intervalo de tempo entre cada dado amostrado em função do tempo total de aquisição de dados.

Como pode ser observado na figura 38, 74% dos dados são obtidos com intervalo de tempo de 1 ms e 36% em 2 ms. Em destaque, o primeiros 37 s que representam o padrão de tempo dos dados adquiridos pelo sistema de aquisição de dados.

Através da figura 38, pode se concluir que a resolução de tempo de um sistema de aquisição de dados utilizando a microcontroladora ATmega168 é satisfatória e superior à resolução de 50 ms estabelecida pela porta paralela de um computador.

4.3 Fonte de alimentação

A escolha do tipo de fonte de alimentação é fundamental, pois as variações de potencial observadas na fonte de alimentação podem contribuir diretamente para o aumento do ruído de linha base durante o funcionamento do sistema de detecção.

O sistema de aquisição constituído de sistema microcontrolado e o detector foram submetidos à alimentação de dois tipos de fonte: fonte chaveada (a redução de potencial se dá por meio de sistema PWM - *Pulse-Width Modulation*) e fonte linear (a redução de potencial se dá por meio de transformador). A tabela II exhibe os desvios padrão de linha base adquiridos durante 5 min medidos em triplicata.

Tabela II: Desvio padrão de linha base em função do tipo de fonte de alimentação

Tipo de fonte	Desvio padrão* (mS/cm ²)		
	1	2	3
Chaveada	0,0096	0,0092	0,0088
Linear	0,0067	0,0079	0,0074

*N=3951

Como pode ser observado na tabela II, os desvios obtidos com uma fonte linear de 9 V x 500 mA foi inferior ao de uma fonte chaveada de mesmas características. A diferença observada entre os valores é considerável quando o detector deve obter resultados próximos ao ruído intrínseco à eletrônica que o compõe. No entanto, em condições onde a aquisição de dados não necessita de valores próximos ao ruído

eletrônico do detector (aproximadamente 16 bits) a fonte chaveada torna-se uma boa opção na instalação C⁴D Lite.

4.4 Estabilidade Térmica

Durantes os experimentos, foi observada uma sensibilidade com relação à convecção de ar na superfície do detector. Quando o detector ficava exposto, o desvio padrão da linha base alcançava valores de 180 unidades. Após isolar o dispositivo com fita adesiva, o valor do desvio padrão foi reduzido para 140 unidades.

Este comportamento era esperado, pois os componentes utilizados possuem encapsulamento SMD, o que lhes confere uma baixa capacidade de dissipação térmica. Os amplificadores operacionais possuem inúmeras de junções *pn* internamente que, assim como nos diodos, são sensíveis a variações de temperatura. Ao receber uma pequena corrente de ar, os componentes momentaneamente se resfriavam provocando perturbações na linha base. Fracassi da Silva e do Lago observaram o mesmo comportamento no detector desenvolvido por eles em 2002 [16]. Uma forma de controlar tais perturbações térmicas foi descrita por Fracassi e do Lago: envolver o circuito eletrônico em silicone aumentando a massa e, conseqüentemente, sua capacidade de estabilização térmica.

A figura 39 apresenta a estabilidade do ruído de linha base em função do tempo após cobrir o circuito eletrônico com silicone. Foi injetada uma solução de KCl 100 μ M em um capilar de 75 μ m de diâmetro interno e 360 μ m de diâmetro externo. A análise foi realizada sob a temperatura ambiente de 26 °C.

Figura 39: Curva de desvio padrão da linha base em função do tempo.

Como se pode observar, o ruído de linha base do detector tornou-se mais estável depois de 15 minutos ligado, isto se deve, pois a massa de silicone requer maior tempo de estabilização térmica.

4.5 Calibração

Atualmente as medições com os detectores condutométricos sem contato têm sido expressados em Volts, enquanto o correto seriam respostas em condutividade. No entanto, devido à maior simplicidade de correlacionar a resposta do conversor A/D a um valor de potencial justifica a convenção, pois a resposta em condutividade deve considerar o diâmetro interno do capilar utilizado.

O detector Lite foi otimizado para condições usuais de eletroforese capilar. Utilizando colunas capilares de sílica fundida com 375 μm de diâmetro externo e diâmetro interno de 20, 50, 75 e 100 μm . Durante a calibração as colunas foram preenchidas com soluções de KCl variando de $2,44 \cdot 10^{-6}$ até $1,40 \cdot 10^{-2}$ S/cm. A faixa de condutividade mencionada é de fato superior à de interesse em experimentos reais de eletroforese capilar. A faixa útil de condutividade de uma solução em eletroforese capilar compreende a faixa que varia entre 0,2 até 1,2 mS/cm como descrito por Brito-Neto *et al* [14].

A figura 40 apresenta os resultados da leitura do conversor A/D em função do valor de condutividade obtido com colunas capilares de diferentes diâmetros internos. O modelo matemático a ser considerado é proposto por Brito-Neto *et al.* [17]. Brito-Neto considera também fugas capacitivas do sinal para o plano de terra localizado entre os eletrodos [18], o que torna o sinal progressivamente reduzido à medida que se eleva a condutividade da solução. No entanto, a utilização do detector não é comprometida, como pode ser observado na figura 40.

Figura 40: Correlação entre a resposta do conversor A/D e a condutividade da solução utilizando colunas capilares de 100 (a), 75 (b), 50 (c) e 20 μm (d) de diâmetro interno.

Resultado experimental utilizando para a obtenção da equação de calibração 17. A região delimitada pelas linhas pontilhadas representa a faixa de condutividade comumente utilizada nos eletrólitos em eletroforese capilar.

Apesar da resposta não ser linear para toda faixa de resposta do detector, o mesmo é suficientemente sensível para pequenas variações de condutividade. Uma maneira de se manter linearidade e sensibilidade a elevadas condutividades é utilizar colunas capilares de diâmetros menores. A eletroforese capilar comumente utiliza esta prática a fim de se reduzir o efeito Joule no processo de separação, portanto, este comportamento do C⁴D está em perfeita concordância com a prática.

A figura 41 apresenta as curvas de calibração do detector para diferentes diâmetros internos de colunas capilares. As curvas correlacionam a resposta do conversor A/D (r) com a resposta equivalente em condutividade (ms.cm^{-1}).

As curvas de calibração são baseadas na seguinte equação:

$$k(r) = \frac{(r+a)}{b_0+b_1(r+a)+b_2(r+a)^2} \quad (17)$$

onde a, b_0 , b_1 e b_2 parâmetros são obtidos por ajuste não linear.

Figura 41: Correlação entre a resposta do conversor A/D e a condutividade da solução utilizando colunas capilares de 100 (a), 75 (b), 50 (c) e 20 μm (d) de diâmetro interno.

Resultado experimental utilizando a equação 17. A região delimitada pelas linhas pontilhadas representa a faixa de condutividade comumente utilizada nos eletrólitos em eletroforese capilar.

5 – Aplicações

5.1 Introdução

O desenvolvimento de uma nova versão sistema de detecção, antes de ser utilizado rotineiramente em análises, deve passar por diversas etapas como a caracterização eletrônica e de funcionamento. Assim, é de grande importância demonstrar a funcionalidade do mesmo em análises e ensaios reais, nos quais o dispositivo é submetido às condições reais de trabalho.

Algumas aplicações são abordadas no presente capítulo, com a finalidade de demonstrar a funcionalidade do Detector Condutométrico Sem Contato Capacitivamente Acoplado. Foram realizados experimentos de determinação de metais alcalinos em meio aquoso, determinação de cafeína em café regular e descafeinado e identificação de diâmetro interno de colunas capilares.

5.2 Determinação de metais alcalinos em meio aquoso

Diversos trabalhos utilizam a separação de metais alcalinos para qualificar o funcionamento dos detectores propostos [12, 13, 16, 19] quanto a sensibilidade, resolução e previsão do comportamento dos respectivos sinais analíticos. Neste experimento foi realizada a determinação de K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} e Li^+ em um tampão de MES/His 10 mM. O experimento de determinação de metais alcalinos e alcalino-terrosos foi baseado no realizado por Fracassi da Silva e do Lago [13] que utilizaram a versão anterior do detector desenvolvido no presente trabalho. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (Barnsted, Dubuque, IA, EUA). O sistema foi mantido a 28 °C e, durante a separação, aplicou-se +30 kV nas extremidades da coluna capilar.

As soluções padrão utilizadas foram preparadas por diluição de soluções estoque 100 mM de KCl, BaCl₂, CaCl₂, NaCl, MgCl₂, e LiCl obtidas a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) nas concentrações 2, 4, 8 e 16 μ M de cada analito. O eletrólito foi preparado com 10 mM de MES/His (pH 6,0) obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.). Amostras e padrões foram introduzidos hidrodinamicamente por uma diferença de pressão de 18 mbar durante 17 s em um capilar de sílica fundida (J & W Scientific, Folsom, CA, EUA) com 75 cm de comprimento (63 cm efetivos) e 75 e 375 μ m de diâmetro interno e externo, respectivamente. A figura 42 mostra um dos eletroferogramas obtidos experimentalmente.

Figura 42: Eletroferograma de uma solução 16 μ M de cada cátion com resposta em condutividade. O detalhe mostra o mesmo eletroferograma com resposta em valores correspondentes à resposta do conversor A/D de 22-bits.

O eletroferograma mostrado na figura 42 é apresentado sem qualquer tipo de filtragem digital. No detalhe o mesmo eletroferograma é apresentado com resposta em valores adimensionais referentes ao conversor A/D de 22 bits. Como pode ser observado o eletroferograma tem como destaque a proporção entre os picos dos analitos e o EOF (fluxo eletrosmótico). Os picos representam apenas 2,2% da faixa dinâmica de

resposta do detector, enquanto que o pico do EOF pode ser visualizado completamente sem a necessidade de ajustes de linha base.

A tabela III apresenta os limites de detecção e quantificação obtidos no presente experimento comparados com os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos por Fracassi da Silva e do Lago [13].

Tabela III: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para metais alcalinos e alcalino-terrosos.

Analito	Fracassi da Silva e do Lago		C ⁴ D Lite		Ganho relativo
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	
K⁺	1,1	3,3	0,6	1,8	1,8
Ba²⁺	1,2	3,6	0,4	1,2	3,0
Ca²⁺	1,4	4,2	0,3	0,9	4,7
Na⁺	2,4	7,3	0,5	1,5	4,8
Mg²⁺	1,2	3,6	0,6	1,8	2,0
Li⁺	1,5	4,6	0,8	2,42	1,9

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com Collins [33]. O limite de quantificação é 10 vezes a relação sinal ruído (S/N) e o cálculo do limite de detecção é semelhante ao anteriormente mencionado, no entanto, o fator de multiplicação é 3,3.

O detector Lite não apresentou elevado ganho relativo quando comparado ao detector apresentado por Fracassi da Silva e do Lago. No entanto, características como

compactação do sistema de detecção, atualização eletrônica do dispositivo e independência do uso de geradores de função comerciais mostram que o mesmo apresentou consideráveis avanços como sistema de detecção.

5.3 Determinação de cafeína em café

O café está entre as bebidas mais apreciadas em todo o mundo devido ao seu aroma e sabor. Por se tratar de um produto largamente consumido, instituições reguladoras como a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabelecem normas a serem seguidas pelos fabricantes e revendedores a fim de garantir um produto de qualidade para consumo. Alguns métodos foram desenvolvidos para determinar cafeína em cafés regulares e descafeinados [29-32].

O presente estudo tem como referência o método desenvolvido por Nogueira e do Lago [32] que se baseia na formação de complexos π entre a cafeína e o ácido 3,4-dimetoxicinâmico.

Para este estudo foram analisadas em triplicata soluções padrão 50, 100, 200, 300 e 400 mg L⁻¹ de cafeína obtidas a partir de Sigma (St. Louis, EUA). As amostras foram preparadas com alíquotas de 1,000 g de café instantâneo e 0,500 g de café instantâneo descafeinado, ambos obtidos no mercado local. As amostras de café instantâneo extra-forte e café instantâneo descafeinado foram preparadas adicionando 10 mL e 5 mL, respectivamente, de água deionizada sob agitação e aquecimento a 90 °C em banho-maria por 10 min. Após a preparação das amostras apenas a de café extra forte apresentou a necessidade de diluição na proporção de 1:9 em água. Após preparadas, as amostras foram filtradas em filtro de membrana 0,22 μ m para evitar entupimentos do

capilar com particulados. O eletrólito foi constituído de 20 mM de ácido 3,4-dimetoxycinâmico obtidos a partir de Sigma (St. Louis, EUA), cujo pH foi ajustado para 8,5 com Tris (Tris (Hidroximetil) Aminometano) obtido a partir de Sigma (St. Louis, EUA).

Amostras e padrões foram introduzidos hidrodinamicamente por uma pressão de 18 mbar durante 12 s em um capilar de sílica fundida (J & W Scientific, Folsom, CA, EUA) com 80 cm de comprimento (70 cm efetivos) e 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo. A figura 43 mostra um dos eletroferogramas obtidos experimentalmente sem qualquer filtragem digital de linha base.

Figura 43: Os eletroferogramas *b*, *c*, *d*, *e* e *f* representam respectivamente os padrões de 50, 100, 200, 300 e 400 mg L^{-1} de cafeína; *a* e *g* representam amostras de café Taeq® Descafeinado e café solúvel Nescafé® Original, respectivamente.

Diferentemente do apresentado por Nogueira e do Lago, no experimento em questão não houve uma perfeita reprodutibilidade nos tempos de migração [32]. Isto se deve à elevada força iônica das amostras. Outro motivo para Nogueira e do Lago terem obtido melhor reprodutibilidade em relação ao tempo de migração é o fato de terem

realizado extração líquido-líquido com diclorometano, evaporado o solvente orgânico e solubilizado o precipitado em água deionizada. Desta maneira a força iônica diminuiu e o tempo de migração entre as análises tornou-se reprodutível.

Nogueira e do Lago demonstraram que não há interferentes para o método considerando possíveis interferentes presentes nas amostras de café [32]. Portanto, mesmo com a variação do tempo de migração, os resultados demonstraram a possibilidade de se utilizar o presente detector para quantificar espécies em baixas concentrações em matrizes complexas sem a necessidade de pré-concentrações. O método original demonstrado por Nogueira e do Lago necessitou de pré-concentração das amostras de café descafeinado para alcançar o LOQ do detector utilizado por eles. Já no presente experimento, obtivemos resultados satisfatórios sem a necessidade de pré-concentrações.

Como pode ser observado na figura 44, a adaptação do método utilizado por Nogueira e do Lago apresentou uma boa linearidade, $R = 0,99995$. Foi obtido um baixo limite de quantificação e detecção, $LOQ = 16 \text{ mg L}^{-1}$ e $LOD = 5,4 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 44: Curva de calibração das soluções padrão de cafeína 50, 100, 200, 300 e 400 mg L^{-1} analisadas em triplicata.

A tabela IV apresenta as concentrações obtidas experimentalmente assim como os limites estabelecidos pela Anvisa através da Resolução RDC n ° 277 de 22 de setembro de 2005 - Brasil.

Tabela IV: Concentrações obtidas experimentalmente e limites estabelecidos pela Anvisa

Padrões	Área de Pico	Concentração obtida mg/g	Concentração obtida % (m/m)	Concentração limite Anvisa % (m/m)
Café regular	0,1549	26,7	2,67	3,0% (máx.)
Café descafeinado	0,1355	2,34	0,23	0,3% (máx.)

O LOD obtido com o detector atendeu às normas brasileiras sobre o café de qualidade (Anvisa Resolução RDC n ° 277 de 22 de setembro de 2005 - Brasil). Foram obtidas concentrações de 26,7 mg/g, e 2,3 mg/g em amostras de café solúvel e café descafeinado.

5.4 Determinação de diâmetro interno de capilares

Elevados potenciais de separação permitem maior eficiência no método de separação, no entanto aumentam consideravelmente o Efeito Joule. A escolha adequada do diâmetro interno (i.d) da coluna capilar permite a redução dos efeitos do aumento de temperatura da coluna conferindo maior eficiência e reprodutibilidade do método. Canais de pequena seção circular conferem melhor dissipação de calor, portanto a escolha adequada do i.d da coluna capilar permite melhor desempenho do método adotado [9].

Há situações em que o capilar não se encontra devidamente identificado com suas dimensões, nestes casos, para se escolher o capilar de i.d correto, lança-se mão de visualizações do mesmo através de lupas, microscópios ou outros meios que lhes permitam uma identificação.

Apesar do C⁴D Lite ser considerado um detector de condutividade, o mesmo responde a variações de admitância (Y):

$$Y = G + jB \quad (18)$$

onde, G representa a condutância, B a susceptância, e j a unidade imaginária.

Nos estudos relacionados à detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada, apenas a o módulo da admitância é considerado [14], pois o aumento da concentração da solução é proporcional à condutância e não à resistência:

$$|Y| = \sqrt{G^2 + B^2} \quad (19)$$

Quando o capilar é preenchido com um meio não condutivo ($G = 0$), o C⁴D se comporta como um detector de susceptância, ou seja, respondendo à variações da parte imaginária da admitância.

Foram injetados segmentos de água deionizada em capilares com diâmetro interno de 20, 50, 75 e 100 μm inseridos no presente detector. A figura 45 mostra registros obtidos experimentalmente com o C⁴D Lite.

Figura 45: Registros de calibração do C⁴D Lite para identificação de diâmetros internos de capilares. Em destaque a curva de calibração utilizada nas identificações de i.d. A – capilar com id = 20 μm , B – capilar com id = 50 μm , C – capilar com id = 75 μm e D – capilar com id = 100 μm . Δ – diferença entre a linha base e o patamar obtido no deslocamento da linha base em bits.

Quando o capilar foi preenchido com água deionizada o mesmo apresentou um deslocamento de linha base, retornando ao valor inicial após a passagem do segmento de água. Os capilares de i.d menor apresentam maiores espessuras de sílica fundida, resultando em diferentes valores de linha base entre A, B, C e D como observado na figura 45. Quando os capilares são preenchidos com água deionizada sua constante dielétrica (80,0) é considerada juntamente com as constantes da sílica fundida e da camada de polimida (3,7 e 3,5 , respectivamente), resultando no aumento do sinal analítico (Leitura do conversor A/D – Leitura ADC). Ao secar as paredes internas do capilar, a constante dielétrica da água é substituída pela do ar ($\cong 1,00$). Estas variações de dielétricos resultam em variações nos valores de admitância obtidos e, conseqüentemente, nos valores do sinal ADC.

O detalhe na figura 45 mostra a curva de calibração obtida considerando a diferença Δ entre a linha base e o patamar obtido no deslocamento da linha base. Apesar da variação não se apresentar linear, foi possível obter um bom coeficiente de correlação ($R^2 = 0,99999$, $N = 4$) utilizando a equação de similar à de Hill:

$$d(\Delta) = \frac{a\Delta^b}{c + \Delta^b} \quad (20)$$

onde $a = 123,5 \mu\text{m}$, $b = 0,846$ e $c = 4909$. Através da equação 20 foi possível obter resultados confiáveis da identificação de capilares de 20, 50, 75 e 100 μm . No entanto, para colunas capilares com valores de i.d diferentes dos anteriormente mencionados e de outras composições a calibração deve ser reavaliada.

6 – Conclusões e Perspectivas Futuras

6.1 Conclusões

Como foi observado nos capítulos anteriores, o presente trabalho teve seu objetivo de contribuir para o desenvolvimento da detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada.

A compactação do dispositivo foi alcançada permitindo sua instalação em dispositivos comerciais e a detecção simultânea através do C⁴D Lite e o detector do próprio equipamento.

Foi desenvolvido um oscilador local interno de boa qualidade com a frequência fundamental definida através de estudos baseados na configuração de cela. A fixação da frequência e amplitude de oscilação nem sempre é a melhor opção, pois dependendo do eletrólito utilizado pode-se obter melhores resultados em outras frequências, no entanto, baseando-se em estudos realizados por Brito-Neto *et al.*[17], acredita-se que a frequência e a amplitude utilizada permite a obtenção de bons resultados para diferentes eletrólitos.

A filtragem do sistema de detecção do Lite foi otimizada. O ruído de linha base detector que afeta o detector corresponde a 4 bits menos significativos dos 21 disponíveis, o que representa um valor próximo ao ruído apresentado pelo próprio conversor A/D MCP3551. O presente nível de ruído também se deve à digitalização da saída de sinal do detector, no qual, em condições de saída analógica, os sinais de RF gerados no interior do equipamento representam consideráveis fontes de ruídos visualizados no sinal analítico. Uma forma adicional de reduzir este nível de ruído seria adotar outro modelo de conversor A/D que apresente ruído inferior ao MCP3551.

O uso da microcontroladora ATmega168 contribuiu amplamente para o aumento da resolução em tempo do sistema de aquisição, além de permitir o interfaceamento do mesmo através de computadores que apresentem portas USB. O uso da

microcontroladora contribuiu, também, para a implementação de *trigger* externo o qual permite o acionamento remoto do detector pelo próprio equipamento em que ele está instalado e a aquisição de dados simultânea utilizando mais detectores em uma mesma análise.

O software de aquisição de dados desenvolvido em LabView 8 apresentou desempenho satisfatório durante as aquisições de dados, no entanto o mesmo pode ser otimizado de modo a facilitar ainda mais a utilização do mesmo pelo usuário final.

Devido à sua sensibilidade, o presente detector favorece desenvolvimentos e otimizações de métodos que usualmente necessitam de pré-concentração, como o estudo de cafeína em café apresentado no capítulo anterior.

O detector apresentou grande flexibilidade permitindo não apenas sua utilização convencional em eletroforese capilar, mas também como importante ferramenta na identificação de capilares.

Diferente dos atuais detectores comercializados e publicados, o C⁴D Lite possibilita ao analista realizar registros diretamente em condutividade, sem a necessidade de calibrações recorrentes.

Comparando seu desempenho com o detector desenvolvido por Fracassi e do Lago em 2002 [19], o mesmo não apresentou consideráveis reduções do LOD (aproximadamente 1,6 vezes menor que o LOD do detector apresentado por Fracassi e do Lago). No entanto, considerando o nível de compactação e investimento na montagem do sistema desenvolvido em 2002 (interface de aquisição de dados e gerador de funções), o detector Lite se torna uma opção mais compacta e de custo atraente.

6.2 Perspectivas futuras

Apesar das consideráveis contribuições à detecção condutométrica sem contato através do C⁴D Lite, o presente dispositivo ainda pode ser otimizado. Através do uso placas do tipo multicamadas a montagem ficaria mais simples e menos passível de erros na fase de montagem.

Eletronicamente é possível otimizar algumas etapas, por exemplo, substituindo o conversor analógico/digital MCP3551 por outro de maior taxa de amostragem e de menor ruído.

Um ponto importante é a possibilidade de tornar o C⁴D em *openC⁴D* devido às suas características e potenciais de *open hardware*, assim como os projetos que incorporaram a mesma família de microcontroladoras (ATmega) que compõe o sistema de detecção [28, 39 e 40]. Sua classificação como *open hardware* poderia tornar a detecção condutométrica sem contato ainda mais popular, o que permitiria o desenvolvimento continuado do modo de detecção por diferentes grupos de pesquisa. Para isto, seria necessária a divulgação do mesmo através de *site* próprio e eventos, entre outros, juntamente com toda a documentação necessária para que qualquer pessoa interessada possa montar, desenvolver, otimizar e utilizar o presente sistema de detecção.

7– Referências Bibliográficas

- (1) Skoog, D. A. H., F. J.; Nieman, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*, 1998.
- (2) Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, P. E. M. *Journal of Chromatography* **1979**, 169, 1-10
- (3) Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, P. E. M. *Journal of Chromatography* **1979**, 169, 11-20
- (4) Everaerts, F. M., Beckers J. L., Verheggen, P. E. M. *Journal of Chromatography Library*, **1976**.
- (5) Kekwick, R. A. P., K. O. **1974**, 20, 401- 428.
- (6) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Analytical Chemistry* **1981**, 53, 1298-1302.
- (7) Thangadurai, S. *Analytical Sciences* **2004**, 20, 595-601.
- (8) Kuban, P.; Hauser, P. C. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 607, 15-29.
- (9) Tavares, M. F. M. *Quimica Nova* **1996**, 19, 173-181.
- (10) Kappes, T.; Hauser, P. C. *Journal of Chromatography A* **1999**, 834, 89-101.
- (11) Gas, B.; Demjanenko, M.; Vacik, J. *Journal of Chromatography* **1980**, 192, 253-257.
- (12) Zemmann, A. J.; Schnell, E.; Volgger, D.; Bonn, G. K. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 563-567.
- (13) da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 4339-4343.
- (14) Pumera, M. *Talanta* **2007**, 74, 358-364.
- (15) Gas, B.; Zuska, J.; Coufal, P.; van de Goor, T. *Electrophoresis* **2002**, 23, 3520-3527.

- (16) Macka, M.; Hutchinson, J.; Zemmann, A.; Zhang, S. S.; Haddad, P. R. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 2144-2149.
- (17) Brito-Neto, J. G. A.; da Silva, J. A. F.; Blanes, L.; do Lago, C. L. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1198-1206.
- (18) Brito-Neto, J. G. A.; da Silva, J. A. F.; Blanes, L.; do Lago, C. L. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1207-1214.
- (19) da Silva, J. A. F.; Guzman, N.; do Lago, C. L. *Journal of Chromatography A* **2002**, *942*, 249-258.
- (20) Tanyanyiwa, J.; Galliker, B.; Schwarz, M. A.; Hauser, P. C. *Analyst* **2002**, *127*, 214-218.
- (21) Mancini, R. *Op Amp for Everyone, Design Reference*, Texas Instruments **2002**.
- (22) Sedra, A. S.; Smith, K. C. *Microelectronic Circuits*, 5ª ed., 2007.
- (23) Vidal, D. T. R.; *Elaboração de um sistema de controle externo do fluxo eletrosmótico para eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato* - Dissertação de Mestrado pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo, **maio/2008**.
- (24) Blanes, L.; *Inovação em sistemas de eletroforese capilar com detecção eletroquímica e aplicação em análises de mono e oligossacarídeos, aminoácidos e proteínas* - Tese de Doutorado pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo, **março/2008**.
- (25) Lopes, F. S. ; Vidal, D. T. R. ; Lago, C. L. ; Blanes, L. ; Minoru, G.; *Um equipamento de eletroforese capilar (CE) com oito detectores condutométricos sem contato (C^4D) e eletrólise separada*. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, **2007**, João Pessoa. Livro de Resumos.

- (26) Francisco, K. J. M. ; Vidal, D. T. R. ; Lopes, F. S. ; Lago, C. L. .
Caracterização de detector condutométrico sem contato multicanal. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, **2007**, João Pessoa. Livro de Resumos.
- (27) Saito, R. M.; Neves, C. A.; Lopes, F. S.; Blanes, L.; Brito, J. G. A.; do Lago, C. L. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 215-223.
- (28) www.arduino.cc - Acessada em 12/11/2009.
- (29) Burton, D. E.; Powell, L. L.; Xi, X. B. *Journal of Microcolumn Separations* **1994**, 6, 5-10.
- (30) Hyotylainen, T.; Siren, H.; Riekkola, M. L. *Journal of Chromatography A* **1996**, 735, 439-447.
- (31) Huang, H. Y.; Lien, W. C.; Chiu, C. W. *Journal of Separation Science* **2005**, 28, 973-981.
- (32) Nogueira, T.; do Lago, C. L. *Electrophoresis* **2007**, 28, 3570-3574.
- (33) Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. *Quim. Nova* **2004**, 5, 771-780.
- (34) Matysik, F. M., *Microchim. Acta* **2008**, 160, 1-14.
- (35) Guijt, R. M., Evenhuis, C. J., Macka, M., Haddad, P. R., *Electrophoresis* **2004**, 25, 4032-4057.
- (36) Souza, M. A. M., Nieman, T. A. *Eletreônica: Todos os componentes*, Ed. Hemus **2004**.
- (37) Floyd, T., *Sistemas Digitais: Fundamentos e Aplicações*, Ed. Bookman, **1998**.
- (38) Carter, B., Brown, T. R., *Handbook of operational Amplifier Applications*, Texas Instruments, **2001**.
- (39) www.ladyada.net/make/boarduino - Acessada em 12/11/2009.

(40) www.moderndevise.com/products/rbbb-kit - *Acessada em 12/11/2009.*

(41) www1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/21950e.pdf - *Acessada em 12/11/2009*

Anexo A: Diagramas Eléctricos

Diagrama elétrico do Detector Condutométrico Sem Contato

Capacitivamente Acoplado – C^4D

Figura 46: Diagrama elétrico do C^4D . Os valores dos componentes são: C1, C2 e C15 1nF; C3 10pF; C4, C10 e C17 10 μ F; C5, C7, C8, C9, C11, C13, C14, C16 e C20 100nF; C6, C12, C18, C19 e C21 1 μ F. R1 243 Ω ; R2 910 Ω ; R3 649 Ω ; R4 1k Ω ; R5 390 Ω ; R6 e R18 1k2 Ω ; R7, R8, R10, R11, R16 e R17 10k Ω ; R9 1M Ω ; R12 150 Ω ; R13 e R14 499 Ω ; R15 820 Ω ; R19 10 Ω ; R20, R21 and R22 100 Ω ; Aqui todos resistores possuem tolerância $\pm 1\%$. L1 e L2 100 μ H; D1 BAR43S (STMicroelectronics, Switzerland); IC1 OPA2822 (Texas Instruments Inc., Texas); IC2 OPA354 (Texas Instruments Inc., Texas); IC3 NCV7805 (ON Semiconductor Components Ind., Arizona); IC4 and IC5 OPA380 (Texas Instruments Inc., Texas); IC6 MCP3551(Microchip Technology Inc.,USA). GB representa a placa onde se encontra o oscilador local e PB a placa onde se encontra o circuito responsável pelo tratamento do sinal analítico obtido pela cela de detecção.

Diagrama elétrico da placa de controle MCU Lite

Figura 47: Diagrama elétrico da microcontroladora MCU Lite. Os valores dos componentes são: R1 10 kΩ; C1, C2, C4 e C5 47μF; C3 100nF; K1 PinHead; IC1 ATmega168 ATmega168 (Atmel, San Jose, CA); IC2 LM7805 (Fairchild Semiconductor Corporation, Califórnia); IC3 LM7809 (Fairchild Semiconductor Corporation, Califórnia).

Anexo B: *Firmware e Frontend*

Firmware de controle da placa de controle MCU Lite

```
// openC4D-LITE
// file name: openC4D Lite.pde
// Firmware to control the Lite detector
// version 0.1-20080925
// author Copyright 2008 - Claudimir Lucio do Lago <claudemi@iq.usp.br>
//                               - Kelliton J. M. Francisco <kelliton@usp.br>
// MCU : Arduino/Freduino
// Compiler: Arduino Software version 0010

unsigned long antigo = 0;
unsigned long alto = 0;
unsigned long tempo()
{
    long t = millis() & 0x0000FFFF;    // Prevents the restart of Millis function
    if (t < antigo)
    {
        alto++;
    }
    antigo = t;
    return (alto << 16) | t;
}

#define NUMDET 0                // number of detectors - 1
#define TG 2                    // External trigger
#define SCK 4                   // Serial Clock ADC MCP3551
#define CS 5                    // Chip selecte ADC MCP3551
int SDO[] = {                   // Array of serial data for two detectors ADC MCP3551
    3};
long ad[] = {                   // Array of detectors Lite
    0,0};
unsigned long tempoad;
unsigned long tempoadconv;
volatile boolean continuo = false;

void envia()                    // Send data to serial output
{
    Serial.print(tempoad);
    for (int i = 0; i <= NUMDET; i++){
        Serial.print(' ');
        Serial.print(ad[i]);
    }
    Serial.print("\n");
}
```

```

void menu()                                // Menu of options
{
    int opcao;
    if (Serial.available()) {
        opcao = Serial.read();
        switch (opcao){
            case 'S':                        // Send data to computer
                {
                    continuo = true;
                }
                break;
            case 'N':                        // Interrupt the send of data to computer
                {
                    continuo = false;
                }
                break;
            case 'V':                        // Send version firmware
                {
                    Serial.print("oC4D-LITE Versao-0.1\n");
                }
                break;
        }
    }
};
}

boolean notend()
{
    digitalWrite(CS,HIGH);
    delayMicroseconds(1);
    digitalWrite(CS,LOW);
    delayMicroseconds(1);
    boolean continua = false;
    for (int i = 0; i <= NUMDET; i++)
    {
        continua = continua || digitalRead(SDO[i]);
    }
    return continua;
}

void ADConv()                             // Configure the startup of ADC MCP3551
{
    tempoadc = tempo();
    digitalWrite(CS,HIGH);                 // Startup the ADC MCP3551
    delayMicroseconds(1);
    digitalWrite(SCK,HIGH);
    delayMicroseconds(1);
    digitalWrite(CS,LOW);
    delayMicroseconds(1);
    digitalWrite(CS,HIGH);

```

```

digitalWrite(TG,HIGH);          // Define the state initial of Trigger

if (continuo){
    envia();
}

do                                // Awaiting the end of conversion
{
    menu();
    delay(1);
}
while ((tempoadconv - tempo()) <= 20); // Pick up the menu by 20 ms

do
{
    delay(1);
}
while (notend());

tempoad = tempo();
int i = 24;                        // Read data of 24 bits
for (int j = 0; j <= NUMDET; j++)
{
    ad[j] = 0;
}
do
{
    i--;
    delayMicroseconds(1);
    digitalWrite(SCK,LOW);
    delayMicroseconds(1);
    for (int j = 0; j <= NUMDET; j++)
    {
        ad[j] = (ad[j] << 1) | digitalRead(SDO[j]);
    }
    digitalWrite(SCK,HIGH);
}
while (i > 0);
digitalWrite(CS,HIGH);
}

void dispara()                    // startup aquisition by external trigger
{
    continuo = true;
}

```

```

void setup()                // Setup of pin ATmega168, Baud rate and Trigger
{
    Serial.begin(115200);
    pinMode(TG, INPUT);
    digitalWrite(TG,HIGH);
    attachInterrupt(0,dispara,RISING);
    pinMode(SCK, OUTPUT);
    pinMode(CS, OUTPUT);
    for (int i = 0; i <= NUMDET; i++)
    {
        pinMode(SDO[i], INPUT);
    }
    digitalWrite(CS,HIGH);
}

void loop()                 // Main Program: Working full time
{
    ADConv();
}

```

Fluxograma do Front end para controle e aquisição de dados

Figura 48: Fluxograma do programa de aquisição de dados oC4D Lite LV8.

Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Kelliton José Mendonça Francisco

Data de nascimento: 05/05/1983

Naturalidade: Brasileiro

EDUCAÇÃO

Escola Estadual Dilermando Costa Cruz, Juiz de Fora – MG, 2000 – Ensino Médio;

Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG, 2007 – Bacharelado e Licenciatura em Química;

Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2010 – Mestrado em Química Analítica.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Manutenção de sistemas para vácuo, Alcatel Vacuum Technology, Annecy, FR, 2009;

Capacitação Pedagógica. Prefeitura Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG, 2006

Tornearia Mecânica, Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, Juiz de Fora – MG, 1999.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2007 – 2009;

Especialista em Laboratório, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 2010 – atual.

PUBLICAÇÕES

Artigos Completos:

- 1- FRANCISCO, Kelliton José Mendonça ; DO LAGO, Claudimir Lucio . A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. Electrophoresis (Weinheim. Print), 2009.

Resumos em Congressos:

- 1- FRANCISCO, Kelliton José Mendonça ; VIDAL, Denis Tadeu Rajh ; LOPES, F. S. ; DO LAGO, Claudimir Lucio . Caracterização de detector Condutométrico sem contato multicanal C4D. In: 14º ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. 14º ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007.
- 2- LOPES, F. S. ; FRANCISCO, Kelliton José Mendonça ; VIDAL, Denis Tadeu Rajh ; BLANES, L. ; HOTTA, G. M. ; DO LAGO, Claudimir Lucio . Um equipamento de eletroforese capilar (CE) com oito detectores condutométricos sem contato (C4D) e eletrólise separada. In: 14º ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. 14º ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007.

- 3- VIDAL, Denis Tadeu Rajh; LOPES, F. S. ; FRANCISCO, Kelliton José Mendonça ; DO LAGO, Claudimir Lucio . Sistema para controle de fluxo eletrosmótico (EOF) em eletroforese capilar (CE) com detecção condutométrica sem contato (C4D). In: 14º ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. 14º ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007.
- 4- BLANES, L. ; LOPES, F. S. ; FRANCISCO, Kelliton José Mendonça ; VIDAL, Denis Tadeu Rajh ; Dos Santos, T. G. ; DO LAGO, Claudimir Lucio . Development of a multi-capillary electrophoresis instrument with contactless conductivity detection and a module for separated electrolysis. In: 13th LACE - 13th Latin-American Capillary Electrophoresis, 2007, Santiago. 13th LACE - 13th Latin -American Capillary Electrophoresis, 2007.
- 5- FRANCISCO, Kelliton José Mendonça; MATOS, R. C.; CONDE, C. P. K. . Construção e aplicação de válvulas solenóide de baixo custo para análise on-line de pH e condutividade em amostras de água de chuva. In: 46º Congresso Brasileiro de Química, 2006, Salvador. Anais do 46º Congresso Brasileiro de Química, 2006.
- 6- FRANCISCO, Kelliton José Mendonça; MATOS, R. C.; CONDE, C. P. K. . Construção de Coletores Pluviométricos Automáticos Utilizando Sensor Condutométrico a Base de Cd's Graváveis de Platina. In: 13º ENQA – 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói. Anais do 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005.

ATUAÇÕES EM MONITORIAS

- 1- Monitor nas aulas teóricas de Licenciatura em Química do curso de Licenciatura em Química da Universidade de São Paulo - USP. Estagiário do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE-USP), 2008.
- 2- Monitor nas aulas práticas de Química Analítica Instrumental do curso de graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP. Estagiário do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE-USP), 2008.
- 3- Estagiário do Curso Pré-Vestibular Comunitário da Prefeitura de Juiz de Fora, Secretaria de Política Social Prefeitura de Juiz de Fora, 2006.
- 4- Monitor nas aulas práticas de Química Analítica Qualitativa do curso de graduação em Química Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, 2005.