UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós- Graduação de Química

Juan Claudio Mancilla Gamboa

**Fabricação de sensores eletroquímicos para a
determinação de espécies químicas de relevância
ambiental**

**Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 08/04/2011

Juan Claudio Mancilla Gamboa

**Fabricação de sensores eletroquímicos para a
determinação de espécies químicas de relevância
ambiental**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São
Paulo para obtenção do título como
Doutor em Ciências (Química).*

Orientador: Prof. Dr. Mauro Bertotti.

São Paulo 2011

Aos meus pais Silvia Gamboa e Berlin

Mancilla por todo o apoio, compreensão,

e como me ensinaram a encarar a vida.

Dedico

***Ao meu Orientador Mauro Bertotti
pela orientação, amizade e apoio em
minha formação como Profissional.
Dedico***

AGRADECIMENTO(S)

Ao Prof.Dr. Julian Alonso, pela contribuição e amizade durante no estágio na Universidade Autônoma de Barcelona.

Ao Prof.Dr. Thiago Paixão, pela rica contribuição e ensinamentos proporcionados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof.Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha, pela convivência e conversa ao desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.Dr^a. Denise Freitas Siqueira Petri, por permitir a utilização e o uso de seu laboratório de pesquisa.

Aos demais docentes da Área de Química Analítica (IQ-USP), pelos ensinamentos oferecidos.

À Profa.Dr^a. Wanessa R. Melchert, pela amizade e contribuição.

À Roselyn Millaray Castañeda Peña, pela contribuição, amizade e pelos bons momentos.

Ao Vinicius R. Gonçalves e à Tânia M. Benedetti, pela ajuda e ensinamento do uso da Microscopia de Força Atômica (AFM).

Ao Oriol Ynbern Llorens, pela rica contribuição e amizade durante minha estada na Universidade Autônoma de Barcelona.

A todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela forma eficaz com que realizaram seu trabalho.

Aos colegas de Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos, Alex, Pollyana, Maiara, Ana Paula, Roselyn e Luiza, pela amizade e bons momentos.

Ao meu melhor amigo Igor Murtagh e família por sua amizade incondicional.

À minha família por ajudar que meus sonhos fossem reais.

A todos que de alguma maneira ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, Banco Santander e Pró-Reitoria de Pós Graduação da USP pelo suporte financeiro.

Muito Obrigado.

O que você pensa você consegue.

RESUMO

Gamboa, J.C.M. **Fabricação de sensores eletroquímicos para a determinação de espécies químicas de relevância ambiental**. 2011. 85p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Graduação em Química Analítica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho são apresentados resultados relacionados à determinação de nitrato, nitrito e amônio por técnicas eletroquímicas. Para a determinação de nitrato foi utilizada uma lâmina de cobre cuja superfície é renovada continuamente empregando um processo de ativação (oxidação do cobre e subsequente redução de íons Cu(II)) com potencial controlado em sistema FIA. As condições ótimas foram alcançadas por meio de 60 s para a etapa de ativação, vazão do transportador 3,0 mL min⁻¹ e volume de amostra 150 µL. A repetibilidade foi estimada em 4,7% (n=9) com frequência de amostragem de 60 amostras h⁻¹. Trabalhando nas condições otimizadas um aumento na concentração de nitrato gerou um aumento proporcional na corrente, resultando em curva analítica em um intervalo de 0,1 – 2,5 mmol L⁻¹ ($-I_p$ (µA) = 0,13 + 4,6 [NO₃⁻] (mmol L⁻¹), R² = 0,9991). Os limites de detecção e quantificação foram estimados em 4,2 (S/N = 3) e 14 (S/N = 10) µmol L⁻¹, respectivamente.

O mesmo sensor foi utilizado para determinações de nitrito por voltametria de pulso diferencial e a otimização dos parâmetros relativos ao processo de ativação (tempos de dissolução e redeposição) foi efetuada com o intuito de aumentar a sensibilidade. As condições ótimas foram de 30 s para a etapa de ativação, com uma repetibilidade de 1,9% (n=10), e o aumento nas concentrações de nitrito gerou um aumento proporcional na corrente, resultando em curva analítica em um intervalo de 50 µmol L⁻¹ – 1,44 mmol L⁻¹ ($-I_p$ (µA) = -0,13 + 53,52 [NO₂⁻] (mmol L⁻¹), R² =

0,9996). Os limites de detecção e quantificação foram estimados em 2,8 ($S/N = 3$) e 9,4 ($S/N = 10$) $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

O estudo da morfologia da superfície do eletrodo de cobre durante o processo de ativação foi realizado por AFM com o objetivo de compreender o impacto das mudanças microestruturais no sinal de corrente para nitrato e nitrito. Os resultados indicam que após a ativação do eletrodo a superfície apresenta cristais com uma textura rugosa e ocorre aumento da área superficial, justificando o aumento de sinal de corrente.

Para a determinação de amônio foram fabricados eletrodos íon seletivo (ISE) com membrana polimérica de forma tubular, os quais foram acoplados em um sistema de injeção em fluxo. A influência de parâmetros como vazão do transportador e alça de amostragem foi investigada e melhores resultados foram obtidos em $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e $250 \mu\text{L}$, respectivamente. Nas condições otimizadas a repetibilidade das determinações foi de 1,3 % ($n=10$) com frequência de amostragem de 13 amostras h^{-1} . Tendo em conta as otimizações do sistema FIA, injeções sucessivas de soluções de amônio com concentrações crescentes permitiram obter uma reta com coeficiente angular de 51,2 mV ($R^2 = 0,9836$) no intervalo de $0,2 - 5 \text{ mg L}^{-1}$. Os limites de detecção foram calculados em $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Palavras – Chaves: Nitrato, nitrito, amônio, eletrodo de cobre e eletrodo de íon seletivo.

ABSTRACT

Gamboa, J.C.M. **Fabrication of electrochemical sensors for determination of chemical species of environmental relevance**. 2011. 85p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This paper presents results related to the determination of nitrate, nitrite and ammonium by electrochemical techniques. A copper electrode whose surface is continuously renewed using an activation process with controlled potential in a FIA system was used for nitrate determinations. The optimum conditions were achieved by an activation step of 60 s, carrier stream of 3.0 mL min⁻¹ and sample volume of 150 µL. The repeatability was estimated as 4.7% (n = 9) with a sampling frequency of 60 samples h⁻¹. At these optimized experimental conditions an increase in nitrate concentration caused a proportional increase in current, resulting in an analytical curve in the range from 0.1 to 2.5 mmol L⁻¹ ($-I_p (\mu A) = 0.13 + 4.6 [NO_3^-] (mmol L^{-1})$, $R^2 = 0.9991$). The limits of detection and quantification were estimated as 4.2 (S/N = 3) and 14 (S/N = 10) µmol L⁻¹, respectively.

The same sensor was used for the determination of nitrite by differential pulse voltammetry and the optimization of the parameters involved in the activation process (dissolution and redeposition time) was performed in order to increase the sensitivity. Optimum conditions were established at 30 s for the activation step, with a repeatability of 1.9% (n = 10) and increased concentrations of nitrite generated a proportional increase in current, resulting in an analytical curve in the range from 50 µmol L⁻¹ to 1.44 mmol L⁻¹ ($-I_p (\mu A) = -0.13 + 53.52 [NO_2^-] (mmol L^{-1})$, $R^2 = 0.9996$). The limits of detection and quantification were estimated as 2.8 (S/N = 3) and 9.4 (S/N = 10) µmol L⁻¹, respectively.

The study of the morphology of the copper electrode surface upon the activation process was performed by AFM in order to understand the influence of

microstructural changes in the current signal for nitrate and nitrite. The results indicated that after the activation the electrode surface presented a rough texture with a concurrent increase in the surface area, justifying the current increase.

Ion-selective electrodes (ISE) with a polymeric membrane in a tubular shape were fabricated for the determination of ammonium in a flow injection system. The influence of parameters such as the carrier stream and the sample volume was investigated and best results were obtained at 0.5 mL min^{-1} and 250 mL , respectively. Under optimum conditions the repeatability of the determinations was 1.3% ($n = 10$) with a sampling frequency of $13 \text{ samples h}^{-1}$. Taking into account the optimization of the FIA system, successive injections of solutions with increasing concentrations of ammonium yielded a straight line with slope of 51.2 mV ($R^2 = 0.9836$) in the range 0.2 to 5 mg L^{-1} . The limits of detection were calculated as 0.05 mg L^{-1} , respectively.

Keywords: Nitrate, nitrite, ammonium, copper of electrode, ion selective electrode.

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1. Voltametria.....	13
1.1.1. Determinação de nitrato e nitrito por Voltametria.	18
1.2. Estudos de superfície.	22
1.2.1. Microscopia eletrônica de varredura (SEM).	22
1.2.2. Microscopia de força atômica (AFM).	24
1.3. Determinação de amônio por Potenciometria	28
2. Objetivos.....	33
3. Parte Experimental	34
3.1. Reagentes e Amostras.	34
3.2. Instrumentação.	35
3.3. Construção dos ISEs de configuração tubular.	38
3.4. Construção do microdispositivo de membrana de difusão gasosa.	39
3.4.1. Desenho do sistema microfluidico em CAD.	41
3.4.2. Usinagem das camadas de substrato.	43
3.4.3. Alinhamento e selagem hermética do dispositivo. (laminação)	45
4.1. Determinação de nitrato.....	49
4.2. Determinação de nitrito.....	58
4.3. Estudos da superfície de cobre por AFM e SEM.	66
4.4. Determinação de amônio.....	72
4.4.1. Avaliação do eletrodo de tubular para amônio em sistema de injeção em fluxo.....	72
4.4.2. Avaliação de microdispositivo de membrana de difusão gasosa.	74
5. Conclusões.....	80
6.Referências.....	82

1. Introdução

1.1. Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroquímica em que obtêm-se informações quantitativas ou qualitativas com base no registro de curva corrente em função do potencial aplicado por meio de um potenciostato a um conjunto de eletrodos imersos em uma solução. A curva obtida é denominada voltamograma e a corrente que flui no circuito depende da oxidação ou redução de uma espécie eletroativa presente na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e uma camada fina de solução, adjacente a essa superfície.

A célula eletroquímica é geralmente constituída de 3 eletrodos (referência, trabalho e auxiliar ou contra-eletrodo) (fig.1). No eletrodo de trabalho ocorre a reação de interesse e este é o transdutor de uma informação química em sinal elétrico. O eletrodo de referência tem um potencial estável e é usado para controlar o potencial aplicado à célula. O eletrodo auxiliar é um condutor quimicamente inerte e por ele e pelo eletrodo de trabalho flui a corrente no circuito, de tal forma que, com este recurso, mantém-se a integridade do eletrodo de referência.

Figura 1. Célula eletroquímica.

A corrente que flui na célula depende do transporte do material eletroativo à superfície do eletrodo. Este transporte pode ocorrer por migração, convecção e difusão e para garantir que o fenômeno ocorra apenas pela formação de um gradiente de concentração (difusão), criam-se condições para minimizar a migração (movimento de íons causada pela repulsão ou atração entre as espécies e o eletrodo) pela adição de um eletrólito de suporte, de características inertes, com concentração pelo menos 100 vezes maior que a substância eletroativa. A convecção também deve ser evitada e isso é feito trabalhando-se com soluções em repouso, sem agitação.

A corrente também depende da transferência de carga, relacionada à interação de íons com a superfície do eletrodo. A magnitude de corrente obtida pela transferência de elétrons durante o processo redox pode estar relacionada com a

quantidade de analito presente na interface do eletrodo, após a aplicação de determinado potencial. Esta corrente é denominada faradaica e é proporcional à concentração da espécie no seio da solução. Durante a polarização do eletrodo, ocorre acúmulo de cargas na superfície e forma-se uma dupla camada, a qual origina a corrente denominada capacitiva.

Existem diferentes teorias em relação à dupla camada. Segundo Helmholtz, quando um eletrodo é colocado em uma solução iônica, a interface eletrodo-solução forma um capacitor. O eletrodo encontra-se carregado positiva ou negativamente, e a camada adjacente com íons de carga contrária (fig. 2).(Carrazón, 2003)

Figura 2. Representação esquemática da dupla camada segundo o modelo de Helmholtz.

Segundo a teoria de Gouy- Chapman, considera-se a existência de agitação térmica (fenômeno natural em soluções), indicando que não pode existir uma

camada rígida formada por cargas no eletrodo e a camada adjacente de sinal contrário. Portanto, a camada adjacente estaria formada de forma difusa, com 100 Å de espessura, constituída por íons de carga oposta, cuja concentração diminui em função da distância, até alcançar uma solução homogênea com respeito à distribuição iônica, como é observado na figura 3 .(Carrazón, 2003)

Figura 3. Representação esquemática da dupla camada segundo o modelo de Gouy- Chapman.

Esta corrente capacitiva não tem relação com a concentração da espécie eletroativa, razão pela qual diferentes técnicas voltamétricas têm sido desenvolvidas para minimizar seu efeito, com a finalidade de proporcionar informações analíticas. Neste sentido, a voltametria clássica é muito limitada para fins eletroanalíticos pela maneira como a corrente é medida, de tal forma que o componente capacitivo é relativamente importante em relação ao faradaico para baixas concentrações de espécies eletroativas. Uma melhoria instrumental foi feita pelo desenvolvimento da voltametria de pulso diferencial, em que a discriminação da corrente faradaica em

relação à capacitiva é aumentada. A técnica consiste na aplicação de pulsos em forma de potencial linear em instrumentos analógicos (fig. 4). Assim, a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (S_1) e outra ao final do pulso (S_2). A segunda corrente é instrumentalmente subtraída da primeira, e a diferença das correntes é representada graficamente em função do potencial aplicado. O voltamograma resultante consiste em picos de corrente de forma gaussiana, na qual a área ou altura de pico é diretamente proporcional à concentração da espécie.

Figura 4. Representação esquemática da voltametria de pulso diferencial durante a aplicação de um potencial em função do tempo.

A voltametria de pulso diferencial é uma das técnicas mais usadas para fins eletroanalíticos devido a vantagens como a resolução, a qual pode diferenciar picos

individuais para substâncias com diferença de potencial de 0,04 e 0,05 V, além disso, os limites de detecção para a voltametria de pulso são significativamente menores, na faixa de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹ (Skoog, 1992).

1.1.1. Determinação de nitrato e nitrito por Voltametria.

A crescente preocupação com a qualidade ambiental vem incentivando o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais sensíveis para a quantificação de componentes tóxicos presentes em águas naturais. Neste sentido, diversos grupos de pesquisa têm demonstrado grande interesse no desenvolvimento de métodos analíticos e no monitoramento de compostos nitrogenados como nitrato e nitrito em águas de variadas procedências. Particular interesse é devotado à fabricação de sensores eletroquímicos, eficientes transdutores que respondem a espécies químicas produzindo sinais elétricos proporcionais à concentração. Há inúmeras vantagens no uso destes dispositivos e entre elas pode-se citar a portabilidade, facilidade de automação, possibilidade de miniaturização, baixo custo, viabilidade de medições no campo ou em regiões remotas ou pouco acessíveis e obtenção de dados em tempo real (Bakker e Telting-Diaz, 2002; Stetter, Penrose *et al.*, 2003). Informações obtidas com sensores eletroquímicos podem não ter precisão e exatidão comparáveis às dos métodos instrumentais, mas, em muitas ocasiões, têm-se elementos suficientes para tomadas de decisão.

Um aspecto de fundamental importância na operação dos sensores eletroquímicos amperométricos concerne à seletividade das determinações. Uma vez que este tipo de dispositivo funciona a potencial controlado, em matrizes mais complexas espécies químicas que também são eletroativas no potencial selecionado

constituem-se em possíveis interferentes. Nestes casos, os obstáculos podem ser superados imobilizando-se na superfície eletródica compostos que conduzam a uma melhoria na capacidade de reconhecimento e/ou na amplificação de sinais de corrente, tornando as determinações mais seletivas pelo efeito eletrocatalítico (diminuição da sobretensão dos processos eletródicos), ou que minimizem a passagem de espécies interferentes (membranas seletivas) (Lowinsohn e Bertotti, 2006).

Nitrato e nitrito são compostos de nitrogênio que se encontram no solo, água, vegetais e em alimentos de forma natural e são de interesse em estudos de poluição de águas. Esses compostos constituem-se em parâmetro fundamental para a verificação da qualidade de água para consumo, pois sua presença é um indicativo de contaminação recente, procedente de material orgânico vegetal ou animal. Essas espécies químicas podem ser encontradas na água como produto da decomposição biológica, devido à ação das bactérias ou outros microorganismos sobre o nitrogênio amoniacal. O problema toxicológico está relacionado à formação de n-nitro compostos gerados em reações com aminas e amidas, os quais podem causar câncer ou hipertensão. Em crianças, origina uma doença denominada “blue baby syndrome”, relacionada com a incapacidade de transporte de oxigênio aos tecidos do corpo (Le Goff, Braven *et al.*, 2002; Soropogui, Sigaud *et al.*, 2006). Por esta razão, a World Health Organization (WHO) recomenda que a água potável não contenha nitrito em concentrações superiores a 1 mg L^{-1} ($\text{NO}_2^- - \text{N}$) e nitrato em concentrações não superiores a 10 mg L^{-1} ($\text{NO}_3^- - \text{N}$) (Soropogui, Sigaud *et al.*, 2006; 2007). É, portanto, um importante desafio para as aplicações ambientais o desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos e baratos para a determinação de nitrito e nitrato em baixas concentrações.

Muitos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de nitrito com base em cromatografia, espectroscopia de ressonância Raman e espectrofotometria UV. Esses métodos exigem um alto consumo de tempo, as reações químicas são complicadas e há necessidade de grandes quantidades de reagentes/analito. Entre as técnicas mais amplamente utilizadas para a quantificação desses compostos, a espectrofotometria (reação de Griess) merece especial destaque apesar de apresentar restrições pelo uso de reagentes carcinogênicos, interferência de cor e de outras substâncias oxidantes (Le Goff, Braven *et al.*, 2002). Portanto, técnicas eletroquímicas são uma possível alternativa para suprir os inconvenientes das técnicas convencionais. Existem vários métodos para a determinação de nitrito, baseados geralmente na modificação da superfície do eletrodo, com a finalidade de aumentar a cinética de transferência de elétrons e tendo como consequência um aumento na sensibilidade e maior precisão nos resultados.

Estudos para a quantificação de nitrato são baseados na redução dessa espécie na superfície do eletrodo em diferentes substratos metálicos como cobre (Pletcher e Poorabedi, 1979; Fogg, Scullion *et al.*, 1991; Cattarin, 1992; Carpenter e Pletcher, 1995; Shibata, Yoshida *et al.*, 1995; Tucker, Waite *et al.*, 2004; Paixao, Cardoso *et al.*, 2007), prata (Kim, Goldberg *et al.*, 2007), ouro (Liu e Gu, 2008) ou ligas metálicas como Cu - Cd, Cu-Pt e Ni-Cu (Bodini e Sawyer, 1977; Moorcroft, Davis *et al.*, 2001; Petrii, Akbaeva *et al.*, 2002). Métodos baseados na redução direta de nitrato, ou seja, em eletrodos não modificados, apresentam características de baixa sensibilidade e irreprodutibilidade devido à cinética lenta da transferência de carga e aos efeitos de passivação da superfície do eletrodo (Zhao e Cai, 1988; Horold, Vorlop *et al.*, 1993; Tucker, Waite *et al.*, 2004). Portanto, as estratégias para

determinar nitrato estão geralmente relacionadas à modificação da superfície do eletrodo por deposição de um segundo metal para aumentar as propriedades catalíticas. Assim, um método para a determinação de nitrato utilizando um eletrodo rotativo de carbono vítreo foi relatado na literatura (Carpenter e Pletcher, 1995), em que a superfície do eletrodo foi modificada pela adição de um sal de cobre à amostra líquida.

Sousa e colaboradores (Santos, Sousa *et al.*, 2006) conseguiram determinar nitrito com base na modificação do eletrodo de carbono com um filme de tetrasulfonato de ftalocianina. Embora nitrito seja eletroativo em eletrodos de carbono de vítreo, o processo redox ocorre com baixa sensibilidade. Além disso, a determinação eletroquímica de nitrito é suscetível à interferência de outros compostos prontamente reduzíveis ou oxidáveis, dependendo da rota eletroquímica. Assim, eletrodos modificados são apropriados para melhorar a sensibilidade e seletividade nas determinações dessa espécie. Diferentes filmes têm sido empregados para a determinação de nitrito usando como eletrodo de trabalho o carbono de vítreo como óxidos de molibdênio (Rocha, Kosminsky *et al.*, 2001) e colóides de ouro (Chen, Liu *et al.*, 2008) e todos apresentaram bons resultados analíticos. Davis e colaboradores (Davis, Moorcroft *et al.*, 2000) reportaram bons resultados para a determinação de nitrito e nitrato após a deposição eletroquímica de filme de cobre a partir de solução de CuSO_4 , utilizando cobre como eletrodo de trabalho. A determinação de nitrato foi investigada em uma nova proposta (Paixao, Cardoso *et al.*, 2007), que propôs a modificação da superfície do eletrodo por ativação eletroquímica polarizando o eletrodo de cobre em 0,5 V durante 10 s e, depois, em -0,25 durante 15 s antes de cada medição. Essa abordagem dispensa o uso de sais de cobre para a formação do filme e evita a contaminação da amostra. O

aumento da sensibilidade para a determinação de nitrato ou nitrito em cátodos de cobre está associado com a ativação da superfície do eletrodo (fig. 5C). O processo consiste na aplicação de um potencial positivo e conseqüente geração de cobre (II) na proximidade da superfície do eletrodo (fig. 5A), para posterior redeposição do íon gerado por aplicação de um potencial negativo (fig. 5B). A ativação é feita antes de cada determinação e assim a superfície é renovada continuamente, permitindo a obtenção de dados em uma nova, fresca e reprodutível superfície de cobre.

Figura 5. Esquema do processo de ativação da superfície do eletrodo de cobre: dissolução por aplicação de 0,5 V (A), redeposição por aplicação de -0,25 V (B) e processo de redução do nitrito na superfície ativada (C).

1.2. Estudos de superfície.

1.2.1. Microscopia eletrônica de varredura (SEM).

SEM é utilizada em varias áreas do conhecimento: eletrônica, geologia, engenharia dos materiais, incluindo a eletroquímica. O uso desta técnica vem se

tornando mais freqüente por fornecer informações de detalhe, com aumento de até 300.000 vezes.

A imagem eletrônica de varredura é formada pela incidência de um feixe de elétrons no material. Esta incidência promove a emissão de elétrons secundários, retroespalhados, raios-x característicos, elétrons, fótons, etc. Estas radiações quando são captadas corretamente irão fornecer informações características sobre a amostra. O sinal de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra, estes sinais sofrem modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários (SE) fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução e os retroespalhados (BSE) fornecem imagem característica de variação de composição.

Figura 6. Representação esquemática da região de ionização gerada na interação do feixe de elétrons com a superfície em gema (Duarte, 2003)

A imagem de SE fornece detalhes da superfície ionizada do mineral em tons de cinza. A resolução obtida nas imagens corresponde ao diâmetro do feixe de elétrons incidente (fig. 6), que pode variar de acordo com as especificações do equipamento utilizado. Outro aspecto importante na resolução das imagens são as condições de calibração do aparelho, tal como a intensidade da corrente e condições de vácuo. O aumento máximo conseguido por SEM fica entre os obtidos com o microscópio ótico e o microscópio eletrônico de transmissão. A grande vantagem da SEM é sua alta resolução, na ordem, de 2 a 5 nm e a facilidade de preparo de amostra (Duarte, 2003).

Entretanto, não são apenas estas características que fazem da SEM uma ferramenta tão importante e usada na análise de superfícies. A elevada profundidade de foco (imagem com aparência tridimensional) e a possibilidade de combinar a análise micro estrutural com a microanálise química são fatores que em muito contribuem para o amplo uso desta técnica.

1.2.2. Microscopia de força atômica (AFM).

A microscopia de varredura de força, também conhecida como microscopia de força atômica (AFM), tem sido largamente utilizada no estudo de polímeros (Jandt, 1998; Hodges, 2002), devido à sua capacidade de fornecer informações que não eram possíveis de obter com o uso da SEM. Compreender o princípio de funcionamento do AFM é fundamental para entender sua gama de aplicações.

Trabalha-se de forma semelhante a uma agulha de toca-disco (vinil), onde, no lugar da agulha (probe), se encontra o cantilever, que consiste em uma haste flexível em cuja parte inferior é crescida uma ponta com dimensão de poucos micrometros. Para percorrer a amostra de forma de obter uma imagem, é utilizado um sistema de posicionamento que utiliza cerâmicas piezoelétricas, capazes de realizar movimentos nas três direções (xyz), com precisão de angstroms. Durante esta varredura, é utilizado um sistema de alinhamento, em que um feixe de laser incide sobre o cantilever e reflete em um sensor de quatro quadrantes, o qual fornece informação da posição do sistema de realimentação e controle. Este corrige a posição do cantilever de forma a manter o contato com a amostra durante a varredura e permite a obtenção da imagem (fig. 7)

Figura 7. Diagrama de funcionamento do microscópio de força atômica.

Durante a varredura da amostra podem atuar forças de atração ou repulsão, que variam em função da distância cantilever - amostra. Forças de atração podem ter origem tanto em fatores físicos, como a capilaridade, ou químicos, como afinidade entre o cantilever e a amostra.

A imagem obtida em AFM é resultante da convolução da topografia real da amostra com a forma da agulha do cantilever. Os diferentes modos de obtenção da imagem variam em função de vários fatores: amostra, tipo de cantilever e tipo de varredura. A primeira informação que deve ser obtida sobre a amostra é se ela é rígida ou não e isto vai determinar se será utilizado o modo de contato, contato intermitente ou não contato (Meyer, 1992).

a) Modo contato

Neste modo de operação é utilizado um cantilever com baixa constante de mola, na faixa de 0,02 a 2 N/m. A imagem é obtida com a agulha tocando suavemente a amostra. Durante esta varredura o sistema realimentação/controle monitora o feixe de laser refletido pelo cantilever, mantendo constante a força exercida pelo cantilever sobre a amostra. Esta forma de obtenção de imagens é mais indicada para amostras rígidas, onde a varredura de agulha do cantilever não danifica a amostra. Outra informação importante é a deposição de água sobre a superfície da amostra, que pode causar efeito de capilaridade, fixação do cantilever na amostra. Nesta situação não se obtém imagem.

b) Modo não contato e contato intermitente

Neste modo de operação é utilizado o cantilever bem mais rígido do que o utilizado para o modo contato e para este tipo de varredura a constante de mola varia de 10 a 80 N/m. No caso do modo contato intermitente a agulha do cantilever vibra em alta frequência (dezenas a centenas de kilohertz) sobre a amostra, tocando-a suavemente durante a varredura, podendo ocorrer contaminação do cantilever com material retirado da amostra, durante o contato. Quanto maior a constante de mola mais rígido o cantilever e, conseqüentemente, maior será a frequência de oscilação deste durante a varredura.

No caso do modo não contato o cantilever oscila sobre a amostra, sem tocá-la. Neste caso, não há contaminação da agulha pela retirada de material da amostra. Nesta situação as imagens obtidas apresentam menos detalhes que as obtidas nos modos contato ou contato intermitente, pelo fato de a varredura ocorrer com a agulha mais afastada da amostra.

Normalmente, as imagens da amostra de filmes imobilizados na superfície do eletrodo, como é o caso do cobre, são obtidas por contato intermitente ou não contato. As interações do cantilever com a amostra são menos severas, o que diminui a possibilidade de danos tanto na amostra como na agulha.

AFM apresenta várias vantagens em relação à SEM e entre elas pode-se destacar a dispensa do uso de vácuo ou de recobrimento da amostra e a possibilidade de se realizar medidas diretas de rugosidade e área. Apesar da versatilidade da técnica de AFM, deve-se salientar que a informação obtida é

sempre da superfície e não sobre camadas internas do material (Paulo S.P. Herrmann, 1997).

1.3. Determinação de amônio por Potenciometria.

Os eletrodos íon-seletivos (ISEs) têm uma história relativamente longa. Desde o primeiro eletrodo desenvolvido para o íon hidrogênio, há quase cem anos, diversos outros dispositivos foram desenvolvidos para a análise de diversas espécies químicas. Durante os anos estes eletrodos passaram por uma série de modificações e melhorias, na procura de estabilidade, robustez, reprodutibilidade e eficiência.

Os ISEs são talvez os dispositivos mais usados em qualquer laboratório de análise ou pesquisa, pois são uma ferramenta fundamental nas medidas de pH, por exemplo (para este controle é usado o eletrodo de membrana de vidro que é o indicador mais usado para medidas de pH). Os ISEs de boas características apresentam resposta rápida, estabilidade de potencial ao longo do tempo e baixo custo. Além disto, respondem em uma ampla faixa de concentração.

A aplicação de eletrodos íon-seletivo foi por muitos anos focada na área clínica, para a qual existem inúmeros métodos reportados. A aplicação na área alimentícia e ambiental foi restrita principalmente devido a problemas de efeito de matriz e insuficientes limites de detecção. As análises na área industrial requerem metodologias rápidas e simples, pois muitas delas são feitas em processos em linha. Portanto, para suprir este inconveniente, a análise por injeção em fluxo (FIA) é uma opção atraente.

ISEs são sensores eletroquímicos que monitoram atividade iônica em solução (Morf, 1981), ou seja, convertem a atividade iônica de uma espécie em solução em um sinal de potencial elétrico, o qual pode ser medido com um potenciômetro. A diferença de potencial, em relação a um eletrodo de referência, é dependente do logaritmo da atividade iônica segundo a equação de Nernst (Janata, 1989).

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln a_1$$

sendo R, F e T a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), constante de Faraday ($96485,31 \text{ C mol}^{-1}$) e a temperatura absoluta em Kelvin, respectivamente, e a_1 a atividade da espécie iônica.

Os eletrodos de íon seletivos têm como vantagem o fato de não serem afetados pela cor ou turvação das amostras e normalmente não necessitam da adição de reagentes específicos. Na maioria dos casos estes eletrodos são de fácil operação e, assim, estas características tornam a sua aplicação muito abrangente para a química analítica.

Em vista destas características, os ISEs têm um grande potencial para uso em sistemas automatizados de análises. Dentro os procedimentos de automação, a análise por injeção em fluxo (FIA) tem sido muito utilizada, pois associa versatilidade, simplicidade e baixo custo das montagens (Ruzicka e Hansen, 1975; Ferreira e Lima, 1993). Nos primeiros trabalhos empregando eletrodos em sistemas FIA, as aplicações foram feitas em eletrodos convencionais (Ruzicka, Hansen *et al.*, 1977; Slanina, Lingerak *et al.*, 1980; Opdycke, Parks *et al.*, 1983; Ferreira e Lima, 1993), o que originava o acoplamento dificultoso e pouco robusto. Para superar estas dificuldades e obter um melhor aproveitamento das potencialidades do FIA,

foram desenvolvidos eletrodos de geometria mais apropriada. Dentre as geometrias propostas, a tubular permite a construção do eletrodo com diâmetro igual ao percurso analítico e com isto evita-se a diminuição do sinal analítico por dispersão no detector e não se alteram as características hidrodinâmicas do fluxo.

A parte sensível e mais importante de um eletrodo tubular é a membrana íon – seletiva. Esta é como uma chave, pois estabelece a preferência do sensor pelo analito de interesse na presença de vários outros íons, que são chamados interferentes.

Para a determinação de amônio uma membrana de vidro seletivo tem sido usada na fabricação de sensores, em cujo interior existe uma solução de cloreto de amônio com atividade fixa em contato com um eletrodo de referência apropriado; a diferença de potencial através da membrana se dá pela variação da atividade iônica na solução externa. As diferentes composições da membrana de vidro (mistura de óxidos de silício, alumínio e metais alcalinos) refletem a seletividade do sensor (Junior, Neto *et al.*, 1996).

Eletrodos sensores a amônia, devido à presença de uma membrana de permeação gasosa, apresentam alta seletividade às espécies iônicas presentes em solução, respondendo à variação na pressão parcial de amônia. Porém, o tempo de resposta é relativamente longo, sobretudo para soluções muito diluídas.

A construção de eletrodos tubulares de íon-seletivo de membranas poliméricas surge como alternativa para suprir os inconvenientes dos sensores de amônio de uso comum. Buhrer (Buhrer, Peter *et al.*, 1988) constatou que a nonactina é um ionóforo de grande seletividade frente ao íon NH_4^+ , podendo ser usada em determinações potenciométricas.

O termo ionóforo é usado para descrever ligantes que seletivamente associam-se a íons. Tipicamente são moléculas com um íon ligado numa cavidade bem definida. A seletividade está relacionada às dimensões do íon primário com o sítio do ligante, discriminando-o dos íons interferentes. Os ionóforos contêm anéis macrocíclicos de heteroátomos ou grupos funcionais que são capazes de complexar o íon primário. Desta forma, a diferença de potencial está associada à interação entre o íon de interesse com o sítio ativo do ligante (fig. 8).

Figura 8. Estrutura da nonactina usada para a fabricação da membrana líquida para o eletrodo de amônio (Ferraz e Payret-Arrua, 1998).

Além da grande seletividade, ionóforos neutros usados em eletrodos de íon-seletivo não estão sujeitos à protonação e, assim, têm constantes de equilíbrio para o íon ligante que não são afetadas pelo pH. Desta forma, é possível determinar amônio em um intervalo amplo de pH. Todavia, o uso do sensor é limitado em meio muito alcalino pela conversão de amônio a amônia segundo o equilíbrio:

Vários autores (Thaneiwyss, Morf *et al.*, 1983; Buhrer, Peter *et al.*, 1988; Debeer e Vandenheuvel, 1988; Ghauri e Thomas, 1994; Junior, Neto *et al.*, 1996) utilizam uma extensão da equação de Nernst para definir a seletividade do eletrodo baseado na nonactina. O coeficiente de seletividade potenciométrico é uma medida da contribuição do íon interferente ao potencial medido e quanto menor é este valor, mais seletivo será o sensor para o íon primário (amônio). Os dados mostram interferência de vários íons como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Li^+ , Rb^+ e K^+ , sendo que este último tem o coeficiente mais alto em relação aos outros íons, ou seja, o potássio é um grande interferente para a determinação de amônio. Isto pode ser explicado pelo fato de o potássio e o amônio possuírem raios iônicos semelhantes (1,43 Å e 1,33 Å), e assim apresentam competitividade para com o ionóforo. Desta forma, o eletrodo acaba respondendo tanto para o íon primário quanto para a espécie interferente.

Para minimizar a interferência do K^+ e de outros interferentes, Salvador, Alegret e colaboradores (Alegret, Alonso *et al.*, 1989) incorporaram ao eletrodo tubular de membrana polimérica uma membrana difusora em um sistema FIA, eliminando satisfatoriamente os problemas. Entretanto, há desvantagens relacionadas ao tamanho do sistema, que se torna muito mais complexo.

2. Objetivos

- Utilizar como eletrodo de trabalho uma lâmina de cobre cuja superfície é renovada continuamente empregando um potencial de pré-tratamento. Isso é realizado por dissolução eletroquímica e imediata redução catódica de íons de cobre. A novidade da metodologia proposta é utilizar um programa de potencial de pré-tratamento acoplado a um sistema em injeção em fluxo, com a finalidade de automatização do sistema e, como consequência, aumentar a frequência de análises em relação à metodologia anteriormente descrita (Paixao, Cardoso *et al.*, 2007). A aplicabilidade analítica do sistema foi pesquisada em amostras de água mineral e refrigerantes. A quantidade de nitrato foi avaliada por meio de metodologia padrão (UV) e comparada com o método proposto.
- Propor nova metodologia para a determinação de nitrito com base no mesmo conceito de ativação. A aplicabilidade analítica do sistema foi pesquisada em amostras de água. A quantidade de nitrito foi avaliada por meio de metodologia padrão (método de Griess) e comparada com o método proposto.
- Compreender a correlação entre as modificações microestruturais da superfície de cobre originadas pelo programa de ativação e a melhoria do processo de redução catódica de nitrato e nitrito.

- Construir um eletrodo tubular segundo o processo descrito na literatura (Alegret, Alonso *et al.*, 1989) para a determinação de amônio. Para tanto, desenhou-se um micro sistema em fluxo mais simples, incorporando em um só dispositivo a câmara para mistura dos reagentes e a membrana de difusão gasosa para a eliminação de interferências.

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes e Amostras.

Todos os sólidos foram reagentes de grau analítico e foram usados sem purificação prévia. Soluções foram preparadas por dissolução dos reagentes em água deionizada processada por meio de um sistema de purificação (Nanopure Infinity, Barnstead). H_2SO_4 , Na_2SO_4 , KNO_3 , NaNO_2 foram de procedência Merck (Darmstadt, Alemanha). O eletrólito suporte para os experimentos de voltametria com nitrato e nitrito foi uma solução de Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0 (ajustado com H_2SO_4). A solução de NaNO_2 foi preparada e padronizada de acordo com procedimentos descritos na literatura (Vogel, 1978). Águas minerais (Aquana, Lindoya e Schincariol) e refrigerantes (Soda Antarctica, Tônica Antarctica e Sprite) foram empregados no estudo para a determinação de nitrato e obtidas em um supermercado local. A determinação de nitrito foi realizada com amostras de água naturais obtidas por coleta de água de chuva (2 amostras) e de água mineral obtida em supermercado. As amostras de água de chuva foram filtradas ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$) e preservadas a 4° C . Como as amostras não continham nitrito em quantidade

detectável, estas foram analisadas após a adição do analito, resultando em concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (limite permissível de nitrito = $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$).

As análises da morfologia da superfície de cobre foram feitas usando lâmina de cobre de 1 cm^2 . As lâminas foram pré-tratadas e colocadas em garrafas de plásticos purgadas com argônio para prevenir a oxidação de cobre com oxigênio do ar antes da microscopia.

. A solução padrão de cloreto de amônio foi preparada por diluição a partir da solução estoque, feita por pesagem do sal correspondente. A solução transportadora foi composta por 2 soluções: Trishidroximetilaminometano (TRIS) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ajustada com HCl (pH=7,4) como solução doadora e hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} como solução aceptora. Preparou-se a solução do ionóforo de nonactina com 65,5 % de plastificante BBPA (adipato de bis (1-butilpentilo), 1% de nonactina, 35% de PVC (cloreto de polivinila) (Fluka) dissolvidos em THF (tetrahidrofurano). O suporte condutor onde a membrana é aplicada foi preparado misturando 1,4 g de grafite, 1g de araldite e 0,4 g de endurecedor HR (álcool benzil isoforonediamina). Esta quantidade foi suficiente para preparar 5 eletrodos tubulares.

3.2. Instrumentação.

As análises de nitrato e nitrito foram realizadas empregando-se um bipotenciostato da Autolab PGSTAT 30 (Eco Chemie) com um software para aquisição dos dados disponibilizado pelo fabricante (GPES versão 4.8), e uma célula eletroquímica com 3 eletrodos: cobre como trabalho, platina como auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl (KCl sat.) como referência. O eletrodo de trabalho foi feito de cobre, em diferentes dimensões: lâmina de cobre com área de 56 mm^2 para a

determinação de nitrato em FIA (fig. 9), disco de cobre com área de 3 mm² para a determinação de nitrito e uma placa de cobre com 1 cm² para as análises de morfologia. Um potencial seqüencial foi empregado para obter uma superfície de cobre renovável e para assegurar a reprodutibilidade das medições. Assim, o eletrodo de cobre foi ativado por polarização em 0,50 V (dissolução de cobre) e -0,25 V (redeposição de cobre) em diferentes tempos antes de cada medição. No sistema FIA para a determinação de nitrato as soluções foram impulsionadas por pressurização, utilizando uma bomba de aquário de ar para evitar as indesejáveis pulsações observadas nas bombas peristálticas. O controle da vazão do transportador foi realizado pela adaptação de uma válvula da saída do aquário. As soluções foram desoxigenadas com argônio por 5 minutos antes de cada experimento.

Figura 9. Sistema em FIA para a determinação de nitrato. Descarte (1), Célula eletroquímica (2), Comutador (3), Alça de amostragem com volume de 150 µL (4), Amostra (5), Solução transportadora de Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0) (6), Bomba de aquário com vazão da solução transportadora de 3,0 mL min⁻¹ (7).

Os resultados obtidos para a determinação do nitrito e nitrito com o sensor foram comparados com os obtidos pelo método de Griess (espectrofotométrico). As medidas foram feitas em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 de percurso ótico de 1,00 cm. O fundamento da técnica é baseado na diazotação da sulfamida em meio ácido e sua copulação com dicloridrato de N -(1-naftil)-etilendiamina (diclorato de NED), formando-se um complexo de cor púrpura adequado para a determinação de nitrito em um comprimento de onda de 540 nm. Para a determinação de nitrato se utilizou uma coluna de cádmio para reduzir quantitativamente o nitrato a nitrito.

Imagens topográficas de AFM foram obtidas para superfícies de cobre com o sistema de imagens Pico SPM-LE Molecular, usando o cantilever operando no modo contato intermitente (AAC), ligeiramente abaixo da frequência de ressonância de aproximadamente 305 kHz no ar. Áreas de $(25 \times 25) \mu\text{m}^2$ com uma resolução de 512×512 pixels foram obtidas. O processamento da imagem e a determinação da rugosidade quadrada média (RMS) foram realizados utilizando o software de digitalização. Pelo menos três filmes de mesma composição foram analisados em diferentes posições topográficas da superfície. A morfologia das superfícies de cobre foi analisada usando um Field Emission Gun Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV FEG) JEOL JSM-7401F. Com o intuito de calcular a espessura da película de cobre, os eletrodos foram inclinados em 90° para que o feixe de elétrons atingisse a interface da placa de cobre / resina fenolítica.

Para a determinação de amônio o módulo de análise foi constituído por uma bomba peristáltica modelo Gilson 3 minipulse e uma válvula de injeção de 6 vias Hamilton. As medidas de diferença de potencial foram obtidas com um potenciômetro e software Tomas Martinez Instruments (TMI). O eletrodo de

referência utilizado foi de Ag/AgCl saturado com KCl e o eletrodo tubular de amônio construído foi o indicador.

3.3. Construção dos ISEs de configuração tubular.

Na construção do eletrodo tubular foi empregado um cilindro de metacrilato, com diâmetro interno de 5 mm e externo 12 mm. Através do orifício lateral foi inserido um condutor central. A pasta grafite – epóxi foi inserida no interior do cilindro de metacrilato. Após um período de 24 h a 70 °C para secagem, os dois lados do cilindro foram lixados sobre uma superfície plana e, em seguida, recobertos com uma camada de resina epóxi não condutora (Araldite) para evitar o aparecimento de potenciais mistos causados pelo escoamento das soluções por capilaridade. Após a secagem, fez-se um furo de 1,5 mm de diâmetro no centro do cilindro. Neste canal foi colocada, gota a gota, a membrana sensora esponjosa com uma leve corrente de ar. Este último processo é repetido várias vezes até recobrimento total da superfície do canal (esperando-se 30 minutos entre cada aplicação, para eliminar o solvente). Após a modificação com a membrana sensora o diâmetro interno foi de aproximadamente 1,3 mm (fig. 10).

Figura 10. Eletrodo tubular para a determinação de amônio.

Após completar estas operações, deixou-se o eletrodo em repouso em temperatura ambiente por 24 horas para garantir a evaporação total do solvente (tetrahidrofurano). O eletrodo foi encaixado em um suporte de acrílico para acoplamento ao módulo de análise (fig. 11)

Figura 11. Suporte de acrílico

3.4. Construção do microdispositivo de membrana de difusão gasosa.

O dispositivo microfluídico foi feito com ciclo olefin co-polímero (COC), construído em diferentes etapas: desenho em CAD , fabricação, alinhamento e laminação. O sistema foi desenhado com 3 entradas e 2 saídas de fluxo. As entradas foram divididas para a injeção da amostra, e das soluções de NaOH e TRIS. A amostra e a solução de hidróxido entram juntas para o misturador de canal em serpentina a fim de promover uma mistura total e uniforme das duas soluções. Neste canal com formato de serpentina ocorre basificação do amônio e sua conversão em amônia dissolvida na solução. As dimensões do canal de mistura foram de 250 μm de largura e 250 mm de profundidade. A segunda parte do processo de fabricação do dispositivo foi a integração da membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Foi desenhado um canal de fluido no fundo da membrana (largura de 1 mm e altura de 100 μm de profundidade), o qual entra em contato com a membrana. Neste canal localizado sobre a membrana, foi necessário desenhar um perfil com forma de serpentina com a finalidade de aumentar o tempo de residência da amostra. Depois de concluído o curso sobre a membrana, o menor canal do dispositivo deixa um escoamento de fluidos para o descarte. A última parte do processo de fabricação consiste na construção do canal de entrada para o transporte superior da solução de TRIS, que acidifica a amônia transferida através da membrana para conversão em amônio e posterior detecção. Este canal é geometricamente idêntico ao canal inferior em contato com a membrana, a 100 μm de profundidade e 1 mm de largura. Esta configuração distribui o canal do dispositivo em dois canais de fluxo separados, apenas juntando a membrana hidrofóbica que permite a transferência das substâncias gasosas.

Figura 12. dispositivo A: Completo e B: detalhe do canal de transferência no interior da membrana integrada.

3.4.1. Desenho do sistema microfluidico em CAD.

O sistema microfluídico foi desenhado usando um software de CAD (Computer Aided Design). O projeto foi planejado levando em conta o material do substrato e as características do dispositivo. Utilizou-se o ciclo olefin co-polimero (COC, Topas, Topas Advanced Polymers Inc., Florence, KY), sob a forma de camadas rígidas. O projeto foi montado em um formato de multi-camadas desenhadas em CAD. As camadas são posteriormente usinadas com diferentes brocas por um processo chamado de microusinagem. As diferentes camadas do dispositivo podem ser vistas na figura 13.

Figura 13. Desenhos em CAD das 5 camadas da construção do dispositivo.

Observa-se na primeira camada da figura 13 uma lâmina que é utilizada como base com 152,4 μm de espessura. A camada 2, de 1 mm de espessura, possui na parte inferior o corte do canal de mistura e o canal de descarte (2A). A parte superior da camada 2 contém o canal de transferência que entra em contato com a membrana difusora (2B). A camada 3 tem espessura de 50 μm , com um compartimento para se ajustar à membrana. A camada 4, de 1 mm de espessura, possui na parte superior o canal de entrada da solução de Tris e saída para o detector (4A). A parte inferior contém o canal de transferência que entra em contato com a membrana difusora (4B). Finalmente, a camada 5 superior de 1 mm de espessura conecta todos os canais com os conectores dos fluidos.

3.4.2. Usinagem das camadas de substrato.

Os arquivos de desenho de CAD são transferidos para o computador de moagem de micro-CNC (controle numérico por computador). As camadas de substrato são colocadas na microfresadora (ProtoMat C100/HF, LPKF Laser & Electronics, Alemanha) e cortadas de acordo com sua espessura e profundidade, utilizando brocas de diferentes diâmetros (fig.11). Na construção de dispositivos têm sido usadas basicamente brocas de superfície com perfil plano de corte (End Mill Tools), utilizados para corte, perfuração (broca espiral Tools) e ligações dos canais do dispositivo (fig. 14)

Figura 14. Esquema dos diferentes tipos de broca de superfície com perfil plano de corte.

Figura 15. A: equipamentos de usinagem COC. B: detalhe de microcanais de perfil de corte simples feitos com broca de 0,25 mm de diâmetro.

As diferentes lâminas são usinadas e distribuídas em baixo relevo, tendo em conta a largura determinada pelo diâmetro da broca e profundidade (fig. 16A). As conexões dos fluidos entre as camadas são usinadas no substrato perfurado de um lado para o outro (fig. 16B).

Figura 16. A) canal de serpentina e B) Detalhe das dimensões do canal da serpentina.

O desafio mais importante na construção do dispositivo foi a integração da membrana hidrofóbica ao sistema (fig. 17). Para tanto, furos circulares de 800 μm de diâmetro foram feitos com a finalidade de evitar vazamento de fluidos e permitir uma melhor selagem com as camadas adjacentes.

Figura 17. Membrana PVDF cortada. A: orifícios circulares usinados adjacentes à membrana. B: detalhe da membrana integrada no dispositivo.

3.4.3. Alinhamento e selagem hermética do dispositivo. (laminação)

As camadas se alinham com 4 furos pré-usinados em cada uma delas. Os 4 furos são montados em uma superfície de alumínio para posterior processo de selagem alcançado por fusão térmica e compressão (fig. 18A). O dispositivo de alinhamento de camadas é colocado em uma prensa hidráulica, como observa-se na figura 18 B.

Figura 18 A: sistema de alumínio com 4 pinos para alinhamento. B: prensa hidráulica usada durante a compressão térmica.

A selagem foi realizada a 108 °C com pressão de 4-6 bar. Após atingir a temperatura de 108 °C, esta é mantida por 10-15 min para posterior redução à temperatura ambiente.

Figura 19. Processo de compactação das camadas de selagem do dispositivo.

A principal desvantagem dos dispositivos poliméricos para o processo de selagem com temperatura é a possibilidade de oclusão do sistema microfluídico pela fusão do substrato. Temperaturas ligeiramente superiores à temperatura de transição vítrea (T_g) do material de construção do dispositivo podem causar problemas de fusão e oclusão dos canais. Nesse sentido, o material de construção usado no dispositivo atual fornece uma vantagem. Existem diferentes graus de substrato (temperatura de fusão) dos materiais COC, oferecendo uma ampla gama de recursos pelas diferentes temperaturas de transição de vidro (T_g). Para este dispositivo foram utilizados para a construção: TOPAS 6013 e 5013S filme TOPAS-04 que têm T_g de 134°C , e TOPAS 8007 filme, que tem uma T_g de 78°C .

Figura 20. Esquema que exemplifica a construção de múltiplas camadas seladas com um dispositivo fabricado com COC.

Esta técnica permite que a laminação a uma temperatura de trabalho evite a deformação e fusão das camadas estruturadas. O processo de compressão térmica é realizado abaixo da T_g das camadas estruturadas (134°C) e acima da T_g do TOPAS filme 8007 (utilizado como um selo de alumínio entre camadas do dispositivo), como observa-se na figura 16. Este processo de selagem não cria distorções nos microcanais, permitindo a integração sem danificar a membrana de PVDF. Na figura 21 observa-se que o processo de selagem para o dispositivo foi construído de forma ótima.

Figura 21. Vista lateral do dispositivo construído.

4. Discussão e Resultados

4.1. Determinação de nitrato

Estudos anteriores (Paixao, Cardoso *et al.*, 2007) têm demonstrado que a redução de nitrato pode ser feita em uma superfície fresca de cobre de acordo com a equação:

Tendo em conta a necessidade de uma camada recente de cobre, os procedimentos para aumentar a sensibilidade em cátodos de cobre estão associados com a ativação da superfície.

A figura 22 mostra a influência da etapa de ativação para a determinação de nitrato em voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de cobre. Um pico bem definido em torno de -0,48 V é notado quando a voltametria é feita com eletrodo ativado, enquanto um sinal muito menos bem definido é obtido sem modificar a superfície do eletrodo. Estes resultados indicam a importância da renovação da superfície do eletrodo de cobre para a redução catódica do nitrato.

Para a determinação de nitrato em amperometria foi necessário utilizar uma lâmina de cobre acoplada em sistema em injeção em fluxo. Um programa de pré-tratamento foi utilizado com a tentativa de modificar a superfície do eletrodo fazendo paradas de fluxo. A partir dos resultados obtidos no voltamograma (fig. 19), o valor

do potencial de trabalho foi mantido em $-0,48\text{ V}$ vs Ag / AgCl por ser este o mais adequado para as determinações de nitrato em FIA.

Figura 22. Voltamogramas de pulso diferencial em solução de NO_3^- $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ em Na_2SO_4 $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) antes (A) e depois (B) da ativação. Velocidade de varredura: $0,1\text{ V s}^{-1}$. Amplitude: $0,03\text{ V}$.

Como se observa na figura 23, o cobre (II) gerado pelo processo de dissolução permanece na proximidade da superfície da lâmina de cobre para a posterior redução catódica. Com um fluxo contínuo esse processo de deposição é inviável, uma vez que o cobre (II) gerado seria arrastado pela solução carregadora.

Figura 23. Representação esquemática da ativação da superfície do eletrodo de cobre e medição de nitrato. a) dissolução do cobre b) redeposição do cobre e c) redução do nitrato.

A otimização dos parâmetros do programa de pré-tratamento (tempo dos processos de dissolução e deposição) foi realizada com o objetivo de melhorar a sensibilidade nas determinações de nitrato. As condições ótimas foram alcançadas por meio de 30 s para as etapas de dissolução (fig. 24A) e deposição (fig. 24B), respectivamente. Este procedimento foi utilizado para a ativação da lâmina de cobre para as determinações analíticas.

Figura 24. Corrente de pico obtida no estudo da influência do tempo de dissolução (A) e deposição (B) por amperometria, para solução de NO_3^- $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), usando uma lâmina de cobre ($A = 56 \text{ mm}^2$). O tempo de deposição foi de 30 s para o experimento (A) e o tempo de dissolução foi de 30 s para o experimento (B). Solução transportadora: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ (pH 2,0). Alça de amostragem: $150 \mu\text{L}$. Potencial aplicado: $-0,48 \text{ V}$.

A influência de parâmetros como vazão do transportador e alça de amostragem em um sistema de injeção em fluxo também foi investigada. O volume de amostra empregado tem relação com o comprimento da alça de amostragem. Assim, como observa-se na figura 25, um aumento na alça de amostragem tende a resultar em aumento no sinal de corrente. Isso se deve à maior quantidade de material que chega à superfície do eletrodo e por causa da menor dispersão da amostra no percurso analítico. Portanto, o valor escolhido foi $150 \mu\text{L}$ para uma solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrato em solução transportadora de Na_2SO_4 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,0).

Figura 25. Efeito do volume de amostra no sinal para experimentos realizados em solução de NO_3^- $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($n=3$) em Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), em FIA-amperometria usando uma lâmina de cobre ($A= 56 \text{ mm}^2$), com uma vazão de 2 mL min^{-1} . Potencial: $-0,48 \text{ V}$.

Como se apresenta na figura 26, um aumento na vazão tende a aumentar o sinal de corrente devido a um transporte de massa mais eficiente. Vazões muito altas podem ocasionar um efeito prejudicial na sensibilidade, situações provocadas no caso de processos de transferência eletrônicos mais lentos. A resposta ótima da vazão foi de 3 mL min^{-1} para uma solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrato em solução transportadora de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 (pH 2,0).

Figura 26. Efeito da vazão no sinal para experimentos realizados em solução de NO_3^- $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($n=3$) em Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), em FIA-amperometria usando uma lâmina de cobre ($A= 56 \text{ mm}^2$), com um volume de $150 \mu\text{L}$. Potencial: -0,48 V.

A repetibilidade das determinações de nitrato pelo método em fluxo proposto foi avaliada e os resultados são mostrados na figura 27. Trabalhou-se com uma solução de nitrato $0,476 \text{ mmol L}^{-1}$, empregando-se dois procedimentos diferentes. No primeiro (curva A), o processo de ativação foi feito no início da determinação. Com esse procedimento, obteve-se uma repetibilidade insatisfatória, (S.D. = 15,2 %, $N = 10$) e, além disso, observou-se uma diminuição progressiva no sinal de corrente. No segundo procedimento (curva B), a renovação da superfície da lâmina de cobre foi feita a cada 3 injeções, conseguindo-se uma resposta reprodutível conforme pode ser atestado pela análise do desvio padrão (S.D. = 4,7 %, $N = 10$). Não se utilizou o critério de fazer uma ativação por medida para não prejudicar a frequência de amostragem.

Figura 27. Efeito da ativação no sinal para experimentos realizados em solução de NO_3^- $0,476 \text{ mmol L}^{-1}$ em Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), em FIA-amperometria usando uma lâmina de cobre ($A = 56 \text{ mm}^2$) com uma única ativação da superfície da lâmina de cobre feita no início do experimento (A) e com renovação feita a cada três medidas (B). Potencial aplicado = $-0,48 \text{ V}$.

Tendo em conta as otimizações descritas anteriormente, um aumento na concentração de nitrato gerou um aumento proporcional na corrente, dando como resultado uma curva analítica em um intervalo de $0,1$ a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, descrita pela equação: $-I_p (\mu A) = 0,13 + 4,6 [\text{NO}_3^-] (\text{mmol L}^{-1})$, $R^2 = 0,9991$ (fig. 25). Os limites de detecção e quantificação foram estimados em $4,2$ ($S/N = 3$) e 14 ($S/N = 10$) $\mu\text{mol L}^{-1}$, com frequência de amostragem de 60 determinações por hora.

Figura 28. Picos registrados para injeções de soluções padrão de nitrato em condições ótimas em FIA ($0,1 - 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$). As pausas (//) representam a parada de fluxo (60 s). A figura inserida mostra a curva analítica. Potencial aplicado $-0,48 \text{ V}$. Volume de amostra $150 \mu\text{L}$. Vazão do carregador $3,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Um dos objetivos principais do presente trabalho consistiu na proposição de procedimentos que permitissem a melhoria nos parâmetros analíticos em relação ao procedimento “em batelada” já desenvolvido no laboratório (Paixao, Cardoso *et al.*, 2007), em que as determinações eram feitas por técnica de varredura de potencial com o eletrodo de cobre ativado. Como observa-se na Tabela 1, os parâmetros analíticos obtidos com o sistema FIA foram muito bons, com destaque para a frequência de amostragem, limite de detecção e volume de amostra. Fazendo-se uma comparação geral com outros métodos eletroquímicos, o procedimento

proposto tem como vantagens a utilização da lâmina de cobre de baixo custo e a simplicidade do processo de ativação, em que se consegue uma renovação contínua da superfície do eletrodo sem a necessidade de adição de sal de cobre.

As técnicas convencionais e mais tradicionais para a determinação de nitrato apresentam desvantagens em relação à metodologia proposta, pois requerem a utilização de reagentes perigosos como (1-naphthyl)-ethylenediamina para o método de Griess ou 10 mL de solução de ácido sulfúrico 13 mol L⁻¹ para o método da Brucina (J. Fries, 1977). A metodologia proposta utiliza só um reagente (Na₂SO₄), o qual não é irritante, corrosivo, tóxico e perigoso para o ambiente. Assim, nossa proposta pode ser vista como alternativa atraente para a determinação de nitrato.

Tabela 1. Comparação de parâmetros analíticos para a determinação de nitrato com técnica de pulso diferencial (Paixao, Cardoso *et al.*, 2007) e o método FIA proposto.

Parâmetros analíticos	Pulso	
	Diferencial	Método proposto
Frequência de amostragem (h ⁻¹)	25	60
Limite de detecção (μmol L ⁻¹)	11,6	4,2
Limite de quantificação (μmol L ⁻¹)	38,7	14
Faixa de resposta (mmol L ⁻¹)	0,1 – 2,5	0,05 – 2,5
Volume de amostra (mL)	10	0,15

A fim de avaliar a confiabilidade do método eletroquímico proposto, determinações de nitrato em águas minerais e refrigerante também foram feitas utilizando a metodologia oficial (L.S. Clescerl, 1999). Os resultados apresentados na tabela 2 indicam que as concentrações de nitrato não são significativamente diferentes comparando-se as metodologias em um nível de confiabilidade de 95 %

(t-Student). Confirmam, também, a ausência de interferentes nas amostras estudadas.

Tabela 2. Concentração de nitrato (N-NO_3^-) em amostras de água mineral e refrigerante.

Amostra	Método de Griess (mg/L)	Método Proposto (mg/L)
Aquana ¹	11,03 ± 0,04	11,3 ± 0,1
Schincariol ¹	10,49 ± 0,07	10,6 ± 0,1
Lindoya ¹	5,16 ± 0,02	5,7 ± 0,2
Soda Antarctica ²	6,30 ± 0,01	6,1 ± 0,1
Tônica Antarctica ²	17,60 ± 0,01	18,0 ± 0,2
Sprite ²	15,27 ± 0,09	14,7 ± 0,6

N= 3; 1= Água Mineral, 2= Refrigerante.

4.2. Determinação de nitrito

.

A figura 29 mostra a influência da etapa de ativação para a determinação de nitrito em eletrodo de cobre. Um pico bem definido ao redor de - 0,15 V é notado quando a voltametria é feita com eletrodo ativado, enquanto um sinal menor é obtido sem modificação da superfície do eletrodo de cobre. Estes resultados indicam a importância da renovação da superfície do eletrodo de cobre para a redução catódica do nitrito.

Figura 29. Voltamogramas de pulso diferencial registrados em solução de Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) (A) e em solução de Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) + NO_2^- $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ antes (B) e depois (C) da ativação.

A redução de nitrato e nitrito em superfícies de cobre está relacionada à adsorção específica destas espécies, provenientes da solução, e átomos de hidrogênio produzidos pela redução catódica de prótons (Simpson e Johnson, 2004). Um mecanismo para explicar o aumento da sensibilidade para nitrito em eletrodos de cobre ativados (fig. 29) está proposto a seguir, levando-se em consideração que o nitrito é protonado em condições ácidas moderadas ($\text{pH} < 4,0$) (Stedman, 1979) e que o HNO_2 decompõe-se em uma reação rápida.

O mecanismo proposto é sustentado por trabalhos feitos anteriormente (Simpson e Johnson, 2004; Wang, Huang *et al.*, 2004) e é consistente com os resultados sobre a influência do pH no processo eletrocatalítico. Para tanto, foram registrados voltamogramas de pulso diferencial com eletrodo de cobre ativado em soluções com diferentes pHs, em um intervalo de 1 – 5. A figura 30 mostra que em pH superior a 3 a redução catódica de nitrito não ocorre, mas a situação é diferente em meio mais ácido, de acordo com o mecanismo proposto. Além disso, em pH 1 observa-se uma queda no sinal e uma possível explicação para este comportamento relaciona-se à adsorção de átomos de hidrogênio, favorecida à medida que o meio se torna mais ácido. A competição pelos sítios ativos do eletrodo de cobre entre nitrito e átomos de hidrogênio explicaria a perda de sinal ao se aumentar a acidez (de pH 2 para pH 1).

Figura 30. Voltamogramas de pulso diferencial registrados em solução de Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ antes (A) e após adição de nitrito (concentração final $= 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) (B-F) em diferentes valores de pH: 1,0 (B); 2,0 (C); 3,0 (D); 4,0 (E); 5,0 (F). Velocidade de varredura: $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Amplitude: $0,03 \text{ V}$.

A otimização dos parâmetros relativos ao processo de ativação (tempos de dissolução e redeposição) foi efetuada com o intuito de aumentar a sensibilidade nas determinações de nitrito. As condições ótimas foram alcançadas em 15 s para a etapa de dissolução (fig. 31A) e 15 s para a etapa de redeposição (fig. 31B).

Figura 31. Influência do tempo de dissolução (A) e deposição (B) na corrente de pico obtida em experimento de voltametria de pulso diferencial em solução de NO_2^- $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$ em Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) usando eletrodo de cobre ($A = 3 \text{ mm}^2$). O tempo de deposição foi de 15 s para o experimento (A) e o tempo de dissolução foi de 10 s para o experimento (B). Velocidade de varredura: $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Amplitude: $0,03 \text{ V}$.

Com a finalidade de estudar o efeito da ativação do eletrodo de cobre nas determinações de nitrito, avaliou-se a repetibilidade das medições. Como observa-se na Figura 32, as medições foram feitas em solução de nitrito $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando dois protocolos diferentes. Empregando-se eletrodo não ativado observa-se uma pobre repetibilidade nas determinações ($\text{DP} = 6,6 \%$, $N=10$). De maneira contrária, a

contínua renovação da superfície do eletrodo pelo processo de ativação conduziu a excelentes resultados, conforme indicado pelo baixo desvio padrão (DP = 1,9 %, N=10). Além disso, observou-se um aumento no sinal de corrente, favorecendo a sensibilidade.

Figura 32. Efeito da ativação no sinal para experimentos realizados em solução de NO_2^- $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ + Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), usando eletrodo de cobre ($A = 3 \text{ mm}^2$), sem (A) e com (B) ativação da superfície de cobre feita antes de cada determinação. Velocidade de varredura: $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Amplitude: $0,03 \text{ V}$.

Nas condições experimentais otimizadas, alíquotas de solução de nitrito foram adicionadas à célula eletroquímica (fig. 33). Nota-se um aumento proporcional nas correntes referentes ao processo de redução do nitrito, resultando em uma curva analítica com intervalo de $0,05 - 1,44 \text{ mmol L}^{-1}$ ($-I_p (\mu\text{A}) = -0,13 + 53,52 [\text{NO}_2^-]$

$](\text{mmol L}^{-1})]$, $R^2 = 0,9993$. Os limites de detecção e quantificação foram calculados como 2,8 (S/N =3) e 9,4 (S/N =10) $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 33. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução de Na_2SO_4 0,1 mol L^{-1} (pH 2,0) usando um eletrodo de cobre ($d=3\text{ mm}$) após adições de nitrito (0,05 – 1,44 mmol L^{-1}). Velocidade de varredura: 0,1 V s^{-1} . Amplitude: 0,03 V.

A avaliação da confiabilidade do método eletroquímico foi feita determinando-se a concentração de nitrito pelo método proposto e pelo recomendado na literatura (L.S. Clescerl, 2005). Os resultados apresentados na tabela 3 indicam que as concentrações de nitrito não são significativamente diferentes comparando-se as metodologias em um nível de confiabilidade de 95 % (t-Student). Confirmam, também, a ausência de interferentes nas amostras estudadas.

Tabela 3. Concentração de nitrito em amostras de águas (n = 3)

Amostra	Nitrito adicionado (mmol/L)	Nitrito encontrado método Griess (mmol/ L)	Nitrito encontrado método proposto (mmol/ L)	recuperação(%)
Água Mineral	0,10	(0,10 ± 0,01)	(0,11 ± 0,01)	113
	-	ND	ND	-
Água de Chuva 1	0,10	(0,10 ± 0,01)	(0,11 ± 0,03)	110
	-	ND	ND	-
Água de Chuva 2	0,10	(0,10 ± 0,01)	(0,11 ± 0,03)	110
	-	ND	ND	-

Experimentos anteriores (Paixao, Cardoso *et al.*, 2007) com eletrodo de cobre ativado demonstraram uma boa resolução entre os picos de redução para nitrato e nitrito trabalhando-se com voltametria de pulso diferencial, -0,48 e -0,20 V, respectivamente. Com o objetivo de investigar a possibilidade de determinar nitrito em presença de nitrato usando o método FIA proposto, soluções de nitrito foram injetadas nas condições ótimas para a determinação de nitrato, mas em potencial de -0,20 V. Um sinal é observado após da injeção de nitrito (fig. 34A) e a injeção posterior de solução de nitrato (fig. 34B) não forneceu resposta. Ao se adicionar mistura contendo nitrato e nitrito (fig. 34C) obteve-se sinal parecido com o obtido após adição de nitrito (fig. 34B), indicando que o nitrato não interfere na determinação de nitrito em potencial -0.20 V. Este experimento demonstra que o detector é seletivo para nitrito e que é possível discriminar o sinal do nitrito do de nitrato. Portanto, é possível fazer a determinação simultânea de nitrito e nitrato em 2

potenciais diferentes: em -0,20 V o sinal obtido refere-se somente ao nitrito e -0,48 V obtém-se a soma de nitrito e nitrato. Por diferença, se consegue determinar a concentração de nitrato.

Figura 34. Picos registrados durante injeções de soluções de nitrito 1 mmol L^{-1} (A), nitrato 1 mmol L^{-1} (B) e nitrito 1 mmol L^{-1} + nitrato 1 mmol L^{-1} (C) na presença de Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). Potencial aplicado -0,2 V. Volume de amostra $150 \text{ }\mu\text{L}$. Vazão do carregador $3,0 \text{ mL min}^{-1}$.

4.3. Estudos da superfície de cobre por AFM e SEM.

Imagens de AFM foram feitas para avaliar o efeito do tempo de ativação na morfologia e na superfície da camada de cobre. A figura 35 apresenta imagens de AFM antes da polarização do eletrodo de cobre e após 10, 20 e 30 s de ativação de acordo com o procedimento descrito na seção experimental. Como pode ser visto, a superfície do eletrodo apresenta uma morfologia bastante heterogênea após a ativação e o aparecimento de protuberâncias é notado à medida que se aumenta o tempo de ativação de 10 até 30 s.

Figura 35. Imagens de AFM do eletrodo de cobre obtidos antes (A) e depois da ativação usando o protocolo de pré-tratamento por tempo de 10 (B), 20 (C), 30 (D) s em área de $(25 \times 25) \mu\text{m}^2$.

Imagens obtidas com SEM para o eletrodo de cobre antes da ativação revelam uma superfície homogênea (fig. 36A). Após a ativação por 10 s (fig. 36B) a formação de filamentos bem definidos é observada, evidenciando a nucleação de depósitos de cobre formados pelo processo eletroquímico. Com o aumento do tempo de ativação (fig. 2C e D) observa-se uma mudança importante na morfologia da superfície do eletrodo, destacando-se a formação de cristais de cobre em forma piramidal na totalidade da área modificada.

Figura 36. Imagens SEM do eletrodo de cobre obtidas antes (A) e depois da ativação usando o protocolo de pré-tratamento por tempo de 10 (B), 20 (C), 30 s (D).

A influência do procedimento de ativação na espessura do filme foi avaliada por SEM, em experimento realizado com um eletrodo de cobre colocado em posição vertical. A camada de cobre não modificada apresenta uma superfície muito lisa (fig.

37A), enquanto uma textura muito mais rugosa foi obtida após o procedimento de ativação. A espessura do filme gerado pela ativação foi calculada em $\approx 10 \mu\text{M}$, comparando a superfície antes (fig. 37A) e depois da ativação (fig. 34B). A formação de poros pode ser atribuída à presença de cristais piramidais e à adsorção de possíveis bolhas de hidrogênio na estrutura, o que pode explicar a formação de buracos, como observa-se na figura 37 B. O desprendimento de hidrogênio depende do pH da solução (Simpson e Johnson, 2004) e acontece em potenciais negativos devido à interação de átomos de hidrogênio adsorvidos em sítios específicos com prótons que difundem do seio da solução, de acordo com a seguinte equação:

Figura 37. Imagens de SEM do eletrodo de cobre obtidas antes (A) e depois da ativação (B) por 30 s usando o protocolo de pré-tratamento. a) resina fenolítica, b) camada de cobre, c) suporte

As imagens mostradas nas figuras 35-37 mostram que o processo de deposição de cobre afeta fortemente a morfologia da superfície do eletrodo. A fim de avaliar a existência de correlação entre a morfologia da superfície e a resposta eletroquímica, foram medidos valores de rugosidade média (RMS) para a superfície de cobre após 10, 20 e 30 s de ativação em área de (25 X 25) e (80 x 80) μm^2 .

Figura 38. Gráfico da rugosidade medida por AFM em função do tempo de ativação para superfície de cobre.

Levando em consideração o erro experimental, os valores de RMS não apresentaram correlação com o tempo de ativação (fig. 38). Esta falta de correlação pode ser explicada tendo em conta o procedimento utilizado para o cálculo de RMS, que considera o desvio padrão das alturas de uma determinada área do filme a qual

está diretamente relacionada com a topografia da superfície, como observa-se na seguinte equação (Adamson, 1990).

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_i^N (Z_i - Z_m)^2}{N}}$$

onde,

N: número de pontos de uma determinada área.

Z_i : uma altura determinada.

Z_m : média das alturas.

Assim, o RMS tem certa desvantagem pela falta de informação sobre a superfície porque não considerada a geometria da superfície. Portanto, superfícies com geometrias diferentes podem apresentar alturas de pico parecidas, obtendo-se valores semelhantes de RMS (fig.39) .

Figura 39. Esquema para a determinação de RMS.

Neste caso, o RMS não é um parâmetro confiável para diferenciar duas superfícies e a determinação da área superficial foi uma alternativa considerada mais apropriada. A determinação da área superficial foi feita com base em imagens obtidas por AFM, empregando-se o software Gwyddion. O efeito do tempo de ativação na superfície é apresentado na figura 40. Um aumento na área superficial do eletrodo com o aumento do tempo de ativação até 20 s é evidente. O ajuste sigmoidal dos dados experimentais mostra que, para o processo de ativação, mais de 20 s são suficientes para se atingir uma magnitude máxima ou com taxa de aumento modesta. A figura inserida na figura 40 mostra a influência do tempo de ativação na resposta voltamétrica para nitrito usando um eletrodo de cobre. O sinal eletroquímico aumenta linearmente com o tempo de ativação até 30 s, quando o valor máximo atual parece ser alcançado. Portanto, a área superficial é aumentada e acompanhada de uma adsorção favorável de nitrito e hidrogênio, facilitando a redução catódica de nitrito. Ambos comportamentos indicam que a resposta

eletroquímica está relacionada ao tempo de ativação e obtenção de máxima área superficial.

Figura 40. Dependência da área superficial com o tempo de ativação. Os valores de corrente foram medidos por voltametria de pulso diferencial em solução de NO_2^- $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$ + Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) (gráfico inserido).

4.4. Determinação de amônio.

4.4.1. Avaliação do eletrodo de tubular para amônio em sistema de injeção em fluxo.

Inicialmente avaliou-se a resposta do eletrodo tubular em FIA. Soluções contendo amônio em diferentes concentrações foram injetadas no percurso analítico via solução transportadora até o detector. A influência de parâmetros como volume de amostra e a vazão do transportador foi avaliada com a finalidade de aumentar a

sensibilidade das determinações de amônio (fig. 41). As condições ótimas foram de (fig. 38A) $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e 500 uL (fig. 41B) para vazão do transportador e volume de amostra, respectivamente.

Figura 41. Efeito da vazão do transportador (A) (Volume: $250 \mu\text{L}$) e do volume de amostra (B) (Vazão: $1,5 \text{ mL min}^{-1}$) para injeções de solução de amônio $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ em solução de Tris $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}=7,4$).

Tendo em conta as otimizações realizadas, injeções sucessivas de soluções de amônio com concentração crescente forneceram uma reta com coeficiente angular de Nernst de $58,9 \text{ mV}$ ($R^2 = 0,9991$). O coeficiente angular permaneceu invariável após 2 meses de trabalho experimental, indicando a estabilidade do eletrodo tubular.

4.4.2. Avaliação do microdispositivo de membrana de difusão gasosa.

O desafio da construção do microdispositivo está relacionado à incorporação da membrana como um sistema único e a escolha do material era determinante, já que este tinha que ter como característica um ponto de fusão menor que 500 °C para não ocorrer a degradação da membrana de difusão gasosa. O material escolhido foi o COC, cuja temperatura de transição vítrea é 135 °C. Com a finalidade de não deformar os canais do microdispositivo durante a laminação, adicionou-se entre cada superfície outra lâmina com ponto de transição de 78° C e, assim, a selagem foi realizada a 100 °C.

A integração da membrana de difusão tem como finalidade isolar a espécie de interesse (íon amônio) dos possíveis interferentes (K^+ , Rb^+ , Li^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) de uma amostra complexa. Antes de passar pela etapa de difusão (fig. 39C), a amostra de interesse é injetada no canal A, para se encontrar em um ponto de confluência com a solução de hidróxido de sódio, injetada em B. Desta forma, é gerada a espécie amônia, que vai difundir através da membrana de difusão. O misturador foi desenhado conforme mostrado na figura 42, para uma melhor conversão de amônio a amônia no menor tempo possível. A espécie amônia gerada é recebida do outro lado da membrana com uma solução aceptora (fig. 42D) de Tris (pH= 7,4), em que a amônia é transformada a amônio para sua detecção (fig. 42G). A solução restante que não foi transformada na espécie gasosa é transportada ao canal de descarte (fig. 42F).

Figura 42. Dispositivo de difusão gasosa. A) Amostra, B) Solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, C) Membrana de difusão gasosa, D) Solução de Tris $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}=7,4$), F) Descarte, G) Detector.

O sistema de fluxo empregado é mostrado na figura 43. O dispositivo consiste em 3 entradas, conectadas à válvula injetora. Amostra e água entram nesta configuração pelo mesmo canal e as duas entradas restantes são reservadas para as soluções de NaOH e Tris. Só uma bomba peristáltica foi conectada ao sistema, considerando um fluxo da solução doadora/aceptora em contracorrente para limitar a pressão da membrana.

Figura 43. Diagrama esquemático do sistema de injeção em fluxo para determinação de amônio: Eletrodo tubular de íon seletivo ISE, R eletrodo de referência Ag/AgCl (s), Descarte D.

Com base nos resultados obtidos (fig. 44), calculou-se o desvio padrão de 1,3 % (n=10) e uma frequência de amostragem de 13 amostras por hora.

Figura 44. Registro de potencial em função do tempo durante injeções de solução de amônio 5 mg L⁻¹ (N=10) em sistema de injeção em fluxo.

A influência de parâmetros como volume de amostra e a vazão do transportador foi avaliada com a finalidade de aumentar a sensibilidade das determinações de amônio (fig. 45) feitas com o dispositivo de difusão gasosa. As condições ótimas foram de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ (fig. 45A) e $250 \text{ }\mu\text{L}$ (fig. 45B) para vazão do transportador e volume de amostra, respectivamente. Um fato importante a ser discutido foi o perfil da vazão do dispositivo diferente à figura 41 A (sem membrana). Isto pode ser explicado pelo maior tempo requerido para transformar o amônio em amônia, ou, pelo tempo necessário para transferência de gás na membrana difusora, com conseqüente maior quantidade da espécie transferida.

Figura 45. Efeito da vazão do transportador (A) (Volume: $250 \text{ }\mu\text{L}$) e volume de amostra (B) (Vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$) para experimentos realizados com solução de amônio $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

Tendo em conta as otimizações descritas, injeções sucessivas de soluções de amônio (fig. 46) com concentrações diferentes permitiram a obtenção de uma reta com coeficiente angular de Nernst de $51,2 \text{ mV}$ ($R^2 = 0,9836$) com intervalo de $0,2 - 5 \text{ mg L}^{-1}$. O limite de detecção foi calculado em $0,05 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 46. Curva analítica para determinação de amônio.

Para avaliar o dispositivo de difusão gasosa no que diz respeito à eliminação de interferências, foi projetado um experimento que consistiu na adição de uma solução de amônio $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e com elevada concentração de íons potássio (1 mg L^{-1}), principal interferente na determinação de amônio. Na figura 47, o pico A refere-se à solução de amônio. Ao se adicionar a solução contendo a mesma quantidade de amônio e mais o interferente (K^+), obtém-se o sinal B, que é semelhante ao obtido na ausência do interferente, indicando que o potássio é separado do amônio pelo uso da membrana de difusão.

Figura 47. Registro de potencial em função do tempo durante injeções de soluções contendo NH_4^+ $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (A) e NH_4^+ $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ + K^+ $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (B).

5. Conclusões

Esta investigação demonstrou a potencialidade da metodologia amperométrica proposta, na qual uma lâmina de cobre ativada adequadamente é usada como detector em um sistema de injeção em fluxo para análise de nitrato em amostras de água mineral e refrigerante. O rápido tempo de análise (60 amostras por hora) e o baixo consumo de amostras indicam certamente que a técnica foi aperfeiçoada em relação ao procedimento anteriormente proposto por nosso grupo. Estas características, somadas à simplicidade do sistema, repetibilidade, baixo custo, uso de reagente não tóxico e perigoso ao ambiente, recomendam o método proposto como uma alternativa para a determinação de nitrato.

A redução do nitrito em cátodo de cobre é facilitada em superfícies ativadas pela redeposição de íons cobre no eletrodo. O processo de ativação tem a vantagem de aumentar a sensibilidade e a estabilidade das determinações. Além disso, dispensa-se a adição de sais de cobre e com esta abordagem evita-se a contaminação da amostra. O intervalo linear obtido ($0,05 - 1,44 \text{ mmol L}^{-1}$) possibilita a determinação de nitrito em águas. Estas características, somadas à simplicidade e baixo custo, indicam que a metodologia proposta pode ser uma alternativa viável para a quantificação desta espécie química.

A textura mais áspera da camada de cobre após a ativação é responsável pelo grande aumento da área superficial em comparação com eletrodos de cobre sem modificação. Portanto, o aumento da área tem um impacto significativo no aumento da corrente em condições ótimas de ativação. Um considerável aumento de espessura $\approx 10 \text{ }\mu\text{m}$ foi observado como consequência da formação de cristais piramidais e da adsorção provável de bolhas de hidrogênio na estrutura. A textura

rugosa produzida pelo tratamento eletroquímico é muito similar à obtida por eletrodeposição de cobre a partir de soluções contendo Cu(II), um procedimento usualmente empregado. Portanto, a estratégia proposta para a modificação da superfície de cátodos de cobre por um processo de ativação eletroquímica gera plataformas muito favoráveis para a redução catódica de ânions como nitrato e nitrito.

O eletrodo tubular proposto para a determinação de amônio foi adaptado adequadamente a um sistema de injeção em fluxo. O tempo de vida do eletrodo é elevado e tal característica é vantajosa para aplicações industriais. O sistema FIA acoplado ao dispositivo permite a análise de amostras coloridas, turvas e de matrizes complexas sem a necessidade de um tratamento prévio. Além disso, é possível miniaturizar o sistema, acoplando-o a membranas de difusão como um sistema único, viabilizando trabalhos com volume reduzido de amostra e baixo limite de detecção.

6.Referências

Adamson, W. Physical chemistry of surface. Toronto. 1990

Alegret, S., J. Alonso, *et al.* Flow-injection system for online potentiometric monitoring of ammonia in fresh-water streams. Analyst, v.114, n.11, p.1443-1447. 1989.

Bakker, E. e M. Telting-Diaz. Electrochemical sensors. Analytical Chemistry, v.74, n.12, p.2781-2800. 2002.

Bodini, M. E. e D. T. Sawyer. Voltammetric determination of nitrate ion at parts-per-billion levels. Analytical Chemistry, v.49, n.3, p.485-489. 1977.

Buhrer, T., H. Peter, *et al.* NH_4^+ ion-selective microelectrode based on the antibiotics nonactin monactin. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology, v.412, n.4, p.359-362. 1988.

Carpenter, N. G. e D. Pletcher. Amperometric method for the determination of nitrate in water. Analytica Chimica Acta, v.317, n.1-3, p.287-293. 1995.

Carrazón, J. M. P. Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones. Madrid. 2003

Cattarin, S. Electrochemical reduction of nitrogen oxyanions in 1-m sodium-hydroxide solutions at silver, copper and cuinse2 electrodes. Journal of Applied Electrochemistry, v.22, n.11, Nov, p.1077-1081. 1992.

Chen, Y. P., S. Y. Liu, *et al.* Simultaneous determination of nitrate and dissolved oxygen under neutral conditions using a novel silver-deposited gold microelectrode. Environmental Science & Technology, v.42, n.22, Nov, p.8465-8470. 2008.

Davis, J., M. J. Moorcroft, *et al.* Electrochemical detection of nitrate and nitrite at a copper modified electrode. Analyst, v.125, n.4, p.737-741. 2000.

Debeer, D. e J. C. Vandenheuvel. Response of ammonium-selective microelectrodes based on the neutral carrier nonactin. Talanta, v.35, n.9, p.728-730. 1988.

Duarte, L. C. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sistema de energia dispersiva (EDS) no estudo de gemas: exemplos brasileiros. Pesquisas em Geociências, v.30, n.2, p.3-15. 2003.

Ferraz, H. M. C. e M. E. Payret-Arrua. Synthetic strategies for nonactic acid. Química Nova, v.21, n.5, Sep-Oct, p.597-607. 1998.

Ferreira, I. M. P. L. V. O. e J. L. F. C. Lima. Tubular electrodes and other devices for potentiometric detection in FIA. J. Flow Injection Anal., v.10, p.17-32. 1993.

Fogg, A. G., S. P. Scullion, *et al.* Direct reductive amperometric determination of nitrate at a copper electrode formed insitu in a capillary-fill sensor device. Analyst, v.116, n.6, p.573-579. 1991.

Ghauri, M. S. e J. D. R. Thomas. Direct reductive amperometric determination of nitrate at a copper electrode formed insitu in a capillary-fill sensor device. Analyst, v.119, n.11, p.2323-2326. 1994.

Hodges, C. S. Measuring forces with the AFM: polymeric surfaces in liquids. Advances in Colloid and Interface Science, v.99, n.1, p.13-75. 2002.

Horold, S., K. D. Vorlop, *et al.* Development of catalysts for a selective nitrate and nitrite removal from drinking-water. Catalysis Today, v.17, n.1-2, p.21-30. 1993.

J. Fries, H. G. H. organic reagents for trace analysis 1977. 278 p.

Janata, J. Principles of chemical sensor. New York. 1989

Jandt, K. D. Developments and perspectives of scanning probe microscopy (SPM) on organic materials systems. Materials Science & Engineering R-Reports, v.21, n.5-6, p.221-295. 1998.

Junior, L. R., G. D. Neto, *et al.* Construction and evaluation of an ammonium tubular ion-selective electrode with ionophore nonactin. Quimica Nova, v.19, n.5, p.549-553. 1996.

Kim, D., I. B. Goldberg, *et al.* Chronocoulometric determination of nitrate on silver electrode and sodium hydroxide electrolyte. Analyst, v.132, n.4, p.350-357. 2007.

L.S. Clescerl, A. E. G., A.D. Eaton,. Standart methods for the examination of water and wastewater, method 4500 B NO₂⁻Washington. 2005

L.S. Clescerl, A. E. G., A.D. Eaton, . Standard methods for examination of water and wastewater, method 4500 - NO₃⁻. Washington. 1999

Le Goff, T., J. Braven, *et al.* An accurate and stable nitrate-selective electrode for the in situ determination of nitrate in agricultural drainage waters. Analyst, v.127, n.4, p.507-511. 2002.

Liu, Y. e H. Y. Gu. Amperometric detection of nitrite using a nanometer-sized gold colloid modified pretreated glassy carbon electrode. Microchimica Acta, v.162, n.1-2, p.101-106. 2008.

Lowinsohn, D. e M. Bertotti. Electrochemical sensors: Fundamentals and applications in microenvironments. Quimica Nova, v.29, n.6, p.1318-1325. 2006.

Meyer, E. Atomic force microscopy. Progress in Surface Science, v.41, n.1, Sep, p.3-49. 1992.

Moorcroft, M. J., J. Davis, *et al.* Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. Talanta, v.54, n.5, Jun, p.785-803. 2001.

Morf, W. E. The principles of ion-selective and of membrane transport. New York. 1981

Opdycke, W. N., S. J. Parks, *et al.* Polymer-membrane ph electrodes as internal elements for potentiometric gas-sensing systems. Analytica Chimica Acta, v.155, n.DEC, p.11-20. 1983.

Paixao, T., J. L. Cardoso, *et al.* Determination of nitrate in mineral water and sausage samples by using a renewable in situ copper modified electrode. Talanta, v.71, n.1, p.186-191. 2007.

Paulo S.P. Herrmann, M. A. P. D. S., Rubens Bernardes, Aldo E. Job, Luiz A. Colnago, Jane E. Frommer, Luiz H.C. Mattoso. Scanning force microscopy: a powerful tool on the study of polymers. SciELO, v.7, n.4 . 1997.

Petrii, O. A., Y. A. Akbaeva, *et al.* Intensification of the nitrate anion reduction on a membrane palladium electrode. Russian Journal of Electrochemistry, v.38, n.2, p.220-223. 2002.

Pletcher, D. e Z. Poorabedi. Reduction of nitrate at a copper cathode in aqueous acid. Electrochimica Acta, v.24, n.12, p.1253-1256. 1979.

Rocha, J. R. C., L. Kosminsky, *et al.* Anodic oxidation of nitrite at a molybdenum oxide layer. Electroanalysis, v.13, n.2, p.155-160. 2001.

Ruzicka, J. e E. H. Hansen. Flow injection analyses.1. New concept of fast continuous-flow analysis. Analytica Chimica Acta, v.78, n.1, p.145-157. 1975.

Ruzicka, J., E. H. Hansen, *et al.* Flow injection analysis.7. Use of ion-selective electrodes for rapid analysis of soil extracts and blood-serum - determination of potassium, sodium and nitrate. Analytica Chimica Acta, v.88, n.1, p.1-16. 1977.

Santos, W. J. R., A. L. Sousa, *et al.* Amperometric sensor for nitrite using a glassy carbon electrode modified with alternating layers of iron(III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin and cobalt(II) tetrasulfonated phthalocyanine. Talanta, v.70, n.3, p.588-594. 2006.

Shibata, M., K. Yoshida, *et al.* Electrochemical synthesis of urea on reduction of carbon-dioxide with nitrate and nitrite ions using cu-loaded gas-diffusion electrode . Journal of Electroanalytical Chemistry, v.387, n.1-2, May, p.143-145. 1995.

Simpson, B. K. e D. C. Johnson. Electrocatalysis of nitrate reduction at copper-nickel alloy electrodes in acidic media. Electroanalysis, v.16, n.7, p.532-538. 2004.

Skoog, D. A. Principios de analisis instrumental. United States 1992

Slanina, J., W. A. Lingerak, *et al.* The use of ion-selective electrodes in manual and computer-controlled flow-injection systems. Analytica Chimica Acta, v.117, n.JUN, p.91-98. 1980.

Soropogui, K., M. Sigaud, *et al.* Alert electrodes for continuous monitoring of nitrate ions in natural water. Electroanalysis, v.18, n.23, Dec, p.2354-2360. 2006.

_____. A cobalt film electrode for nitrite determination in natural water. Electroanalysis, v.19, n.24, Dec, p.2559-2564. 2007.

Stedman, G. Adv. Inorg. Chem. Rad., v.22, p.113. 1979.

Stetter, J. R., W. R. Penrose, *et al.* Sensors, chemical sensors, electrochemical sensors, and ECS. Journal of the Electrochemical Society, v.150, n.2, p.S11-S16. 2003.

Thaneiwyss, U., W. E. Morf, *et al.* Determination of urea in 10- μ -l blood-serum samples with a urease reactor ion-selective electrode cell. Mikrochimica Acta, v.3, n.1-2, p.135-147. 1983.

Tucker, P. M., M. J. Waite, *et al.* Electrocatalytic reduction of nitrate on activated rhodium electrode surfaces. Journal of Applied Electrochemistry, v.34, n.8, Aug, p.781-796. 2004.

Vogel, A. I. Textbook of quantitative inorganic analysis. New York. 1978. 412 p.

Wang, H. Y., Y. G. Huang, *et al.* Fabrication and characterization of copper nanoparticle thin-films and the electrocatalytic behavior. Analytica Chimica Acta, v.526, n.1, Nov, p.13-17. 2004.

Zhao, Z. F. e X. H. Cai. Determination of trace nitrite by catalytic polarography in ferrous iron thiocyanate medium. Journal of Electroanalytical Chemistry, v.252, n.2, p.361-370. 1988.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Juan Claudio Mancilla Gamboa

Local e data de nascimento: Tocopilla, 24 de março de 1977

EDUCAÇÃO

Liceo Domingo Santa María, Arica, Chile, 1994.

Universidad de Tarapacá de Arica, Chile, 2002.
Graduação (Químico Laboratorista)

Universidad de Tarapacá de Arica, Chile, 2002.
Graduação (Licenciado em Química)

Formação Complementar

Simpósio de acreditação de Referência, 15º Encontro Nacional de Química Analítica, 2009.

Validação de Métodos Analíticos, Congresso Iberoamericano de Química – XXIV Congresso Peruano de Química, 2008.

Curso de primeros auxílios, CIMM S.A., Chile, 2006.

Curso de seguridad en Laboratorio, Asociación Chilena de Seguridad, Chile, 2005.

Curso de ISO 14000, CIMM S.A., Chile, 2005.

Curso de ISO 9000 – 14000, Riagui S.A., Chile, 2004.

Curso de Incendios y manejo de extintores, Asociación Chilena de Seguridad, Chile, 2004.

Estágio de 5 meses durante o doutoramento na Universidade Autônoma de Barcelona. Espanha, no laboratório do Prof. Julián Alonso.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Direto, CAPES, 10/ 03/ 2007

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

1. Roselyn C.Peña, Juan C.M.Gamboa, Thiago R.L.C.Paixão, Mauro Bertotti.
Studies on the electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide on a glassy carbon electrode modified with a ruthenium oxide hexacyanoferrate film. International Journal Electrochemical Science. 6, 394-403, 2011.
2. Juan C.M.Gamboa, Roselyn C.Peña, Thiago R.L.C.Paixão, Mauro Bertotti.
Activated copper cathodes as sensors for nitrite analysis. Electroanalysis. 22, 2627-2632, 2010.
3. Roselyn C.Peña, Juan C.M.Gamboa, Thiago R.L.C.Paixão, Mauro Bertotti.
Flow injection amperometric determination of hydrogen peroxide in household commercial products with a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified electrode. Microchimica Acta. 166, 277-281, 2009.
4. Juan C.M.Gamboa, Roselyn C.Peña, Thiago R.L.C.Paixão, Mauro Bertotti. A Renewable copper electrode as an amperometric flow detector for nitrate determination in mineral water and soft drink samples. Talanta. 80, 581-585, 2009.

5. Juan C.M.Gamboa, Thiago R.L.C Paixão, Mauro Bertotti. Determination of nitrite in water samples by using an activated copper electrode. Pittcon Conference & Expo. Orlando, Florida, 2010.
6. Juan C.M.Gamboa, Denise F.S. Petri, Roselyn C.Peña, Tânia M.Benedetti, Vinicius R.Gonçales, Mauro Bertotti. Morphology changes of copper surfaces after potential activation. Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry. Nice, France, 2010.
7. Roselyn C.Peña, Juan C.M.Gamboa, Thiago R.L.C.Paixão, Mauro Bertotti. Estudio de la morfología de electrodos de carbono vitro modificados con filme de RuOHCF. IV Congreso Iberoamericano de Química Analítica. Concon, Chile, 2010.
8. Juan C.M.Gamboa, Roselyn C.Peña, Thiago R.L.C Paixão, Mauro Bertotti. Determinação de nitrato em refrigerante usando eletrodo de cobre ativado acoplado a um sistema FIA. 15º Encontro nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009.
9. Roselyn C.Peña, Juan C.M.Gamboa, Thiago R.L.C Paixão, Mauro Bertotti. Avaliação da interferência de ferro(III) na determinação amperométrica de hidrogênio em efluentes industriais. 15º Encontro nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009.

10. Juan C.M.Gamboa, Roselyn C.Peña, Thiago R.L.C Paixão, Mauro Bertotti.
Desenvolvimento de método analítico para a determinação de nitrito utilizando eletrodo de cobre ativado. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 19 a 23 de Abril de 2009.
11. Roselyn C.Peña, Juan C.M.Gamboa, Thiago R.L.C Paixão, Mauro Bertotti.
Determinação de peróxido de hidrogênio em amostras comerciais de anti-séptico bucal e alvejante utilizando sistema em injeção em fluxo com detecção amperométrica. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009.
12. Juan C.M.Gamboa, Roselyn C.Peña, Thiago R.L.C Paixão, Mauro Bertotti.
Desenvolvimento de un electrodo de cobre acoplado a um sistema FIA para la determinación de nitrato em aguas minerales. Congreso Iberoamericano de Química – XXIV Congreso Peruano de Química. Cusco, Peru, 2008.
13. Roselyn C.Peña, Juan C.M.Gamboa, Thiago R.L.C Paixão, Mauro Bertotti.
Desenvolvimento de electrodo modificado para la determinación amperométrica de peróxido de hidrogeno em muestras de tratamientos de efluentes. Congreso Iberoamericano de Química – XXIV Congreso Peruano de Química. Cusco, Peru, 2008.
14. Juan C.M.Gamboa, Denise Lowinsohn, Mauro Bertotti. Avaliação do uso de biossensor para o monitoramento de lactato em urina. 14º Encontro nacional de Química Analítica, 2007.

15. Juan C.M.Gamboa, J.Acarapi. Ácido Humico: Caracterización y estudios de algunas variables que influyen en la interacción AH-Pb. VII Encuentro de Química analítica y Ambiental. Serena, Chile, 2002.