Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Aplicações de robótica *open-source* na automatização do preparo de amostras para a análise cromatográfica de compostos orgânicos

Deyber Arley Vargas Medina

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

Julho, 2018

Deyber Arley Vargas Medina

Aplicações de robótica *open-source* na automatização do preparo de amostras para a análise cromatográfica de compostos orgânicos

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obter o título de doutor em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

São Carlos

Julho, 2018

AGRADECIMENTOS

O autor do presente trabalho agradece atentamente:

ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto,

ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças,

ao Prof. Dr. Victor Cerdà Martin,

ao Dr. Fernando Maya Alejandro

aos colegas e amigos do CROMA e do IQSC/USP,

aos colegas e amigos da Universidad de las Islas Baleares,

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ),

à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, processos 2014/03765-0 e 2016/21950-5,

a todo o povo brasileiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

A crescente demanda por análises rápidas, simples e ambientalmente amigáveis tem feito da busca pela miniaturização e automatização dos procedimentos de preparo de amostra uma necessidade permanente na academia e na indústria. Embora existam diversas técnicas miniaturizadas de preparo de amostras, estas ainda são utilizadas de forma manual na maioria das situações, pois o acesso às possibilidades de automatização em muitos laboratórios de química é ainda bastante limitado. Afortunadamente, as plataformas de robótica *open-source* estão se tornando uma alternativa interessante no desenvolvimento *lab-made* de todo tipo de instrumentos e sistemas automatizados. Esta tese apresenta três exemplos de desenvolvimento de sistemas robotizados para a automatização de técnicas miniaturizadas de preparo de amostras. Num primeiro estudo, foi projetado, construído e programado um robô cartesiano capaz de operar simultaneamente seis microseringas de extração. Este sistema foi posto à prova na automatização da microextração por sorvente empacotado (MEPS) e validado na extração de HPAs em amostras de esgoto sanitário, demonstrando alta precisão, exatidão e frequência de análise. Um segundo robô cartesiano, equipado com uma única unidade de extração, foi projetado, construído e programado para conseguir pela primeira vez a integração *on-line* da microextração em gota única (SDME) com a análise mediante cromatografia líquida. Este sistema possibilitou o desenvolvimento de um método para determinação de triazinas, com tempo total de análise de 10 minutos, incluindo o preparo da amostra e a separação/detecção dos analitos. Finalmente, por integração de técnicas em fluxo, ferramentas de robótica *open-source* e impressão 3D, a microextração líquido-líquido dispersiva baseada na solidificação da fase orgânica (DLLME-SFO) foi, pela primeira vez, completamente automatizada. O sistema assim desenvolvido foi validado no desenvolvimento de um método para a determinação de parabenos em produtos de cuidado pessoal, águas, urina e saliva, demonstrando o grande potencial das tecnologias modernas no desenvolvimento de novos, versáteis e eficientes sistemas automatizados nos laboratórios de química.

ABSTRACT

The growing demand for rapid, simple and eco-friendly analyses has made the search for miniaturization and automation of sample preparation procedures a permanent necessity. Although nowadays there are several miniaturized sample preparation techniques, they are used manually in most situations. The access to automation tools is limited yet, in many chemistry laboratories. Fortunately, *open-source* robotic platforms have become an interesting alternative for the lab-made development of instruments and automated systems. This thesis presents three examples of laboratory development of robotic systems for the automation of miniaturized sample preparation techniques. First, a cartesian robot capable of simultaneously operating six extraction microsystems was designed, constructed and programmed. This system was tested for the automation of microextraction by packaged sorbent (MEPS) and validated for the extraction of HPAs in sanitary sewage samples, demonstrating high accuracy and throughput analysis. A second cartesian robot, equipped with a single extraction unit, was designed, constructed and programmed to accomplish for the first time the online integration of the single drop microextraction (SDME) and the liquid chromatographic analysis. This system allowed the development of a method for the determination of triazines, with an analysis time of 10 minutes, including sample preparation and separation / detection of the analytes. Finally, by integrating flow techniques, *open-source* robotic tools and 3D printing, dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop (DLLME-SFO) was completely automated for the first time. The developed system was validated for the determination of parabens in personal care products, water, urine and saliva, thus demonstrating the great potential of modern technologies in the development of new, versatile and efficient automated systems in chemistry laboratories.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 a) Estimativa da fração do tempo total de análise requerida por cada uma das diferentes etapas do processo; b) Contribuição porcentual de cada uma das etapas ao erro total da sequência analítica.	20
Figura 1.2 Esquema ilustrativo das diferentes estratégias de automatização do preparo de amostras mais utilizadas na atualidade.	21
Figura 1.3 a) Distribuição anual das publicações referentes a aplicações de Arduino na química; b) Principais aplicações de Arduino em química analítica.	23
Figura 1.4 Exemplos de uso de Arduino na automatização do preparo de amostra e seu acoplamento on-line com sistemas analíticos. a) Automatização e hifenação de <i>in-tube</i> SPME com GC; b) Automatização e hifenação de microextração sólido-líquido com ESI-MS.	26
Figura 1.5 Exemplos de uso de Arduino na automatização do preparo de amostra mediante o uso de braços robóticos. a) Ilustração do sistema RAMSAY-1; b) Sistema RAMSAY-2.	27
Figura 1.6 Ilustração do funcionamento de um motor de passo com um rotor de 25 dentes, 100 passos por volta, com um ângulo de passo de 3,6 °.	29
Figura 1.7 a) Esquema ilustrativo de um motor de passo bipolar; b) Esquema ilustrativo de um motor de passo unipolar.	30
Figura 1.8 Ilustração da estrutura e funcionamento de um fuso de esferas.	32
Figura 1.9 Esquema ilustrativo da estrutura interna de um microcontrolador.	33
Figura 1.10 Descrição da uma placa comercial de Arduino UNO Revisão 3;	35
Figura 1.11 a) Representação esquemática de um arranjo <i>Darlington</i> ; b) Acoplamento de múltiplos arranjos <i>Darlington</i> .	37

Figura 1.12	Representação esquemática de uma ponte H. a) Todos os interruptores abertos; b) A corrente circula no sentido S1-S3; c) A corrente circula no sentido contrário.	37
Figura 2.1	Esquema geral do dispositivo empregado na extração mediante MEPS.	54
Figura 2.2	Esquema geral do procedimento de extração mediante MEPS.	54
Figura 2.3	Sistemas comercialmente disponíveis para automatização da MEPS. a) Seringa eVOL® (SGE Analytical Science, Melbourne, Austrália); b) CTC PAL-System Autosampler.	59
Figura 2.4	Dispositivo <i>lab-made</i> para microextração por sorvente empacotado.	60
Figura 2.5	Esquema ilustrativo do robô cartesiano multisseringa projetado.	61
Figura 2.6	Fotografia do protótipo construído indicando suas partes principais.	64
Figura 2.7	Fotografias do protótipo construído. a) Plataforma horizontal e eixo X; b) Suportes de vials e amostras acoplados sobre a plataforma horizontal; C) Vista posterior do protótipo, mostrando a grade de suporte vertical, o eixo Z, a fonte de alimentação e a caixa do circuito de controle.	65
Figura 2.8	Fotografia do protótipo construído; a) Um <i>driver</i> de seringa individual; b) Arranjo de seis <i>drivers</i> de seringa acoplados no eixo Z.	67
Figura 2.9	Circuito de controle projetado e desenvolvido.	69
Figura 2.10	Vista da tela de início do programa desenvolvido.	71
Figura 2.11	Esquema da lógica do funcionamento geral do programa.	72
Figura 2.12	Esquema da lógica do funcionamento de cada uma das funções programadas.	73
Figura 2.13	Separação cromatográfica obtida para os cinco hidrocarbonetos poliaromáticos escolhidos como analitos-teste. Solução padrão 500 ng mL ⁻¹ . Volume de injeção 5 µL. Modo isocrático de eluição (H ₂ O:MeCN / 30:70).	74

Figura 2.14	Esquema comparativo dos desvios padrão relativos (DPR) observados para as soluções preparadas de forma manual e automatizada.	76
Figura 2.15	Esquema comparativo das áreas de pico obtidas quando os padrões são preparados de forma manual e automatizada.	78
Figura 2.16	% Acumulada de analitos e interferentes removidos vs porcentagem de acetonitrila.	80
Figura 2.17	Esquema comparativo dos desvios padrão relativos (DPR) observados para as extrações de HPAs manual e automatizada.	82
Figura 2.18	Esquema comparativo das áreas de pico obtidas quando as extrações são realizadas de forma manual e automatizada.	83
Figura 3.1	Representação esquemática da: a) Microextração em fase líquida, LPME; b) Microextração líquido-líquido dispersiva, DLLME; c) Microextração em uma gota única, SDME; d) Microextração em fase líquida assistida por fibra oca, HF-LPME.	89
Figura 3.2	Representação esquemática do <i>autosampler</i> projetado.	91
Figura 3.3	Representação esquemática do procedimento analítico para <i>on-line</i> SDME.	94
Figura 3.4	Fotografia do protótipo construído indicando suas partes principais.	95
Figura 3.5	Fotografias do protótipo desenvolvido. a) Superior do eixo X; b) Inferior e eixo X; c) Lateral do eixo Z e <i>driver</i> da seringa; d) Frontal e eixo Y do suporte vertical e o eixo Z, incluindo os mecanismos de movimento.	96
Figura 3.6	Detalhes da montagem do <i>driver</i> da seringa. a) Guia da agulha suporte do extremo inferior da seringa; b) Suporte da cabeça da seringa e <i>driver</i> do êmbolo; c) Acoplamento das partes. d) <i>Driver</i> completamente montado.	98
Figura 3.7	Detalhes do mecanismo de agitação em seringa. a) Rotor de PTFE; b) Banda elástica; c) Motor DC.	99

Figura 3.8	Detalhes do sistema de acoplamento on-line. a) Diferentes partes do dispositivo de hifenção; b) Dispositivo de hifenção montado.	100
Figura 3.9	Configuração eletrônica para o controle do protótipo desenvolvido. (a) Válvula solenoide; (b-c) Módulos de relê; (d, g-j) Módulos de circuito integrado dupla ponte H L298N; (e) Motor DC; (k-n) Motores de passo.	101
Figura 3.10	Respostas cromatográficas para três réplicas de extrações de HPAs no modo <i>Headspace</i> , mediante SDME dinâmica, em amostras de esgoto sanitário ($25 \mu\text{g L}^{-1}$).	103
Figura 3.11	Respostas cromatográficas para três réplicas de extrações de HPAs em amostras de esgoto sanitário ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) mediante HF-LPME.	103
Figura 3.12	a) Seleção do solvente de extração; b) Seleção do tamanho da gota; c) Efeito do tempo de extração; d) Efeito da adição de sal. e) Efeito da agitação; Eixo Y, é representado como a área de pico normalizada.	106
Figura 3.13	Cromatograma ilustrativo para a injeção direta de uma solução padrão de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ triazinas (linha preta) e o extrato da mesma solução padrão após <i>on-line</i> SDME (linha laranja).	109
Figura 4.1	Representação sistema DLLME-SFO automatizado projetado.	116
Figura 4.2	Procedimento analítico para DLLME-SFO.	121
Figura 4.3	Fotografia do sistema automatizado desenvolvido, composta por um sistema de análise de injeção sequencial hifenizado ao dispositivo de separação de fase montado em um braço robótico multieixo modificado.	123
Figura 4.4	Esquema do circuito eletrônico para o separador de fase baseado em Arduino para acoplar com o sistema DLLME com agitação da seringa. (a-c) Servomotores no robô angular; (d) Arduino UNO; (e) Módulo de relê; (f) Módulo L298N; (g) células <i>Peltier</i> ; (h) RB-Sbo-49 motor DC; (i) <i>Cooler</i> para processador i3.	123

- Figura 4.5** Modelos 3D para separadores de fase. a) Separador de fase baseado em coluna tubular aberta de vidro encapsulada em um suporte impresso 3D, e sua montagem com as células *Peltier* e as chapas de alumínio interna e externa; b) Dispositivo mesofluídico de PMMA com formato de coluna, contendo elementos de mistura internos com base em uma rede de microcanais em forma de cubos pequenos; c) Dispositivo mesofluídico PETG com formato de coluna, contendo uma rede de microcanais de uma única camada; d) Fotografia das diferentes etapas de extração; e-g) Imagens da da separação de fases por solidificação após a DLLME da rodamina-B (fins ilustrativos) utilizando uma mistura de metanol/1-dodecanol (85:15 v/v). 126
- Figura 4.6** Estudo das variáveis influentes no processo. a) Seleção do solvente de extração; b) Seleção do solvente dispersor; c) Efeito da relação extratora/dispersor; d) Efeito da adição de sal; e) Efeito do pH da amostra; f) Efeito da taxa de fluxo de carga da amostra; g) Efeito do tempo de agitação da seringa. Eixo Y, é representado como a área de pico normalizada. 129
- Figura 4.7** Cromatograma ilustrativo para a injeção direta de uma solução padrão de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ parabenos (linha laranja) e o extrato da mesma solução padrão após a DLLME-SFO (linha preta) automatizada. 133

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1.1	Alguns exemplos do uso de Arduino na automatização do preparo de amostra. 25
Tabela 1.2	Sequência binária para controle de um motor de passo bipolar. 31
Tabela 1.3	Sequências binárias para controle de um motor de passo unipolar. 31
Tabela 1.4	Sequência para controle de um motor de passo bipolar em termos da voltagem aplicada. 40
Tabela 1.5	Programa em Arduino para controle de um motor de passo bipolar. 41
Tabela 1.6	Exemplo de programa para controle de motor de passo com Arduino usando a biblioteca <i>Stepper.h</i> . 42
Tabela 2.1	Comparação entre MEPS, SPE e SPME. 54
Tabela 2.2	Resumo de algumas das aplicações da MEPS na análise de diversos tipos de amostras. 59
Tabela 2.3	Áreas observadas nos perfis cromatográficos obtidos para as soluções padrão de HPAs preparadas manualmente. 75
Tabela 2.4	Áreas observadas nos perfis cromatográficos obtidos para as soluções padrão de HPAs preparadas de forma automatizada. 76
Tabela 2.5	Resultados do teste F realizado para comparação entre as variâncias das soluções padrão preparadas de forma manual e automatizada. 77
Tabela 2.6	Resultados do teste t realizado para comparação entre as áreas médias para as soluções preparadas de forma manual e automatizada. 78
Tabela 2.7	Alguns exemplos de extração de HPAs mediante MEPS relatados na literatura. 79
Tabela 2.8	Áreas de pico dos extratos de HPAs obtidos mediante MEPS-manual. 81
Tabela 2.9	Áreas de pico dos extratos de HPAs obtidos mediante MEPS-automatizada. 82
Tabela 2.10	Resultados do teste F realizado para comparação entre as variâncias observadas para as extrações realizadas de forma manual e automatizada. 83
Tabela 2.11	Resultados do teste t realizado para comparação entre as médias observadas para as extrações realizadas de forma manual e automatizada. 84

Tabela 3.1	Figuras de mérito do método <i>on-line</i> SDME automatizado desenvolvido.	108
Tabela 3.2	Comparação do método desenvolvido com procedimentos previamente descritos, usando LPME na determinação de triazinas.	109
Tabela 3.3	Resultados para a determinação de triazinas em amostras de bebidas comerciais pelo método <i>on-line</i> SDME desenvolvido.	110
Tabela 4.1	Figuras de mérito do método DLLME-SFO automatizado desenvolvido.	132
Tabela 4.2	Comparação do método desenvolvido com procedimentos previamente descritos, usando DLLME ou dispositivos impressos 3D para a extração de parabenos e análise mediante HPLC-UV.	133
Tabela 4.3	Determinação de parabenos em produtos de cuidados pessoais automáticos DLLME-SFO.	134
Tabela 4.4	Resultados para a determinação de parabenos em amostras de água pelo método DLLME-SFO automatizado desenvolvido.	135
Tabela 4.5	Resultados para a determinação de parabenos em amostras biológicas pelo procedimento DLLME-SFO desenvolvido.	135

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	<i>Alternating current</i>
AcOEt	Acetato de etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIN	<i>Barril insert and needle</i>
BP	Butilparabeno
CFA	<i>Continuous flow analysis</i>
CPU	<i>Central process unit</i>
DART	<i>Direct analysis in real time</i>
DC	<i>Direct current</i>
DCM	Diclorometano
DI	<i>Direct immersion</i>
DLL	<i>Dynamic-link library</i>
DLLME	<i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DLLME-SFO	<i>Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of a floating organic drop</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DVB	<i>Divinylbenzene</i>
EEC	<i>European Economic Community</i>
EF	<i>Enrichment factor</i>
ESI	<i>Electrospray Mass Spectrometry</i>
ET	Etilparabeno
EU	União Europeia
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i>
FIA	<i>Flow injection analysis</i>
GC	<i>Gas chromatography</i>
HF-LPME	<i>Hollow fiber liquid phase microextraction</i>
HPAs	Hidrocarbonetos poliaromáticos
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HS	<i>Headspace</i>
ICSP	<i>In-circuit serial programming</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LCD	<i>Liquid Crystal Display</i>
LED	<i>Light emission diode</i>
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i>
LLME	<i>Liquid-liquid microextraction</i>
LPME	<i>Liquid phase microextraction</i>
LVI	<i>Large volume injection</i>
m/z	Relação massa/carga

MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MEPS	<i>Microextraction by packed sorbent</i>
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
MM	Massa molar
MP	Metilparabeno
MS	<i>Mass spectrometry</i>
n	Número de experimentos
NACE-ESI-MS	<i>non-aqueous Capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry</i>
NE	Não especificado
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
PA	Grau de pureza analítico
PS	<i>Polyestirene</i>
PEEK	<i>Poly (eter-eter-ketone)</i>
PETG	<i>Polyethylene terephthalate glycol</i>
PMMA	Polimetil-metacrilato
PNs	Produtos naturais
PP	Propilparabeno
PTFE	Politetrafluoretileno
PTV	<i>Programmable temperature vaporization</i>
PWM	<i>Pulse weigh modulation</i>
RAM	<i>Random access memory</i>
RAM	<i>Restrict access material</i>
ROM	<i>Read-only memory</i>
SDME	<i>Single drop microextraction</i>
SIA	<i>Sequential injection analysis</i>
SLA	<i>Stereolithography</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
SPME	<i>Solid phase microextraction</i>
SS-NMR	<i>Solid-state nuclear magnetic resonance</i>
STL	<i>Stereolithographic</i>
TOF	<i>Time of flight</i>
u.m.a.	Unidade de massa atômica
UHPLC	<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
VOCs	<i>Volatile organic compounds</i>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I		Pág
1	NOVAS OPORTUNIDADES DE AUTOMATIZAÇÃO EM QUÍMICA ANALÍTICA	19
1.1	AUTOMATIZAÇÃO E ROBOTIZAÇÃO DO PREPARO DA AMOSTRA	19
1.2	ROBÓTICA <i>OPEN-SOURCE</i> NA QUÍMICA ANALÍTICA	22
1.2.1	Arduino na automatização do preparo de amostra	24
1.3	ALGUMAS CONSIDERAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO <i>LAB-MADE</i> DE SISTEMAS ROBOTIZADOS	27
1.3.1	Aspectos mecânicos	27
1.3.2	Aspectos eletrônicos	32
1.3.3	Aspectos informáticos	38
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
 CAPÍTULO II		
ROBÔ CARTESIANO MULTISSERINGA PARA A AUTOMATIZAÇÃO DA MEPS		
1	INTRODUÇÃO – MEPS	53
1.2	BREVE DESCRIÇÃO DA MEPS	55
1.3	APLICAÇÕES DA MEPS	56
1.4	ANTECEDENTES NA AUTOMATIZAÇÃO DA MEPS	59
2	OBJETIVOS	61
3	PARTE EXPERIMENTAL	62
3.1	PARTES E COMPONENTES DO PROTÓTIPO DESENVOLVIDO	62
3.2	PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES	62
3.3	PROCEDIMENTOS AUTOMATIZADOS DE PREPARO DE AMOSTRAS	63
3.3.1	Preparo de soluções padrão	63
3.3.2	Extração de HPAs a partir de amostras de esgoto sanitário mediante MEPS automatizada	63
3.4	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	CONSTRUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO PROTÓTIPO	64

4.1.1	Projeto mecânico – Montagem do protótipo	65
4.1.2	Projeto eletrônico – Circuito de controle	68
4.1.3	Projeto informático – Programa de controle	70
4.2	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO PROTÓTIPO DESENVOLVIDO	74
4.2.1	Estudo de precisão I: preparo de soluções padrão	74
4.2.2	Estudo de precisão II: extração de HPAS mediante MEPS	78
5	CONCLUSÃO	84
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

CAPÍTULO III

ROBÔ CARTESIANO PARA INTEGRAÇÃO *ON-LINE* DE LPME COM A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

1	INTRODUÇÃO – LPME	89
2	OBJETIVOS	91
3	PARTE EXPERIMENTAL	92
3.1	PARTES E COMPONENTES DO PROTÓTIPO DESENVOLVIDO	92
3.2	PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES	92
3.3	PROCEDIMENTOS AUTOMATIZADOS DE PREPARO DE AMOSTRAS	93
3.3.1	<i>Off-line</i> SDME no modo dinâmico	93
3.3.2	<i>Off-line</i> HFLPME no modo dinâmico	93
3.3.3	<i>On-line</i> SDME no modo estático	93
3.4	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	94
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4.1	CONSTRUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO PROTÓTIPO	95
4.1.1	Projeto mecânico – montagem do protótipo	96
4.1.2	Projeto eletrônico – circuito de controle	100
4.1.3	Projeto informático - software de controle	101
4.2	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO PROTÓTIPO DESENVOLVIDO	102
4.2.1	Ensaio preliminares	102
4.2.2	Desenvolvimento de um método para determinação de triazinas mediante <i>on-line</i> SDME-HPLC	104
5.	CONCLUSÃO	110
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

CAPÍTULO IV

AUTOMATIZAÇÃO DA DLLME-SFO POR INTEGRAÇÃO DE SISTEMAS EM FLUXO, ROBÓTICA *OPEN-SOURCE* E IMPRESSÃO 3D

1	INTRODUÇÃO – DLLME-SFO	114
2	OBJETIVOS	117
3	PARTE EXPERIMENTAL	117
3.1	PARTES E COMPONENTES DO SISTEMA DLLME-SFO AUTOMATIZADO	117
3.2	IMPRESSÃO 3D DE DISPOSITIVOS SEPARADORES DE FASES	118
3.3	PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES	118
3.4	COLETA E PRE-TRATAMENTO DE AMOSTRAS	119
3.5	PROCEDIMENTO DLLME-SFO AUTOMATIZADO	120
3.6	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	121
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
4.1	DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DLLME-SFO AUTOMATIZADO	122
4.1.1	Configuração instrumental	122
4.1.2	Projeto eletrônico – circuito de controle	123
4.1.3	Projeto informático - Software de controle	124
4.2	DESENVOLVIMENTO DO DISPOSITIVO SEPARADOR DE FASES	125
4.3	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO SISTEMA DESENVOLVIDO	127
4.3.1	Desenvolvimento de um método para a extração de parabenos mediante DLLME-SFO automatizada	127
5	CONCLUSÃO	136
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

CONCLUSÃO GERAL	142
------------------------	------------

INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR (CD)

Programa PA1_MEPS 6 amostras simultâneas

Programa PA2_SDME Dinâmico *off-line*

Programa PA3_HF-LPME Dinâmico *off-line*

Programa PA4_SDME estático *on-line*

Programa PA5_HFLPME estático *on-line*

Programa PA6_DLLME-SFO

Modelo separador de fases M1

Modelo separador de fases M2

Modelo separador de fases M3

Novas oportunidades de automatização em química analítica

1. NOVAS OPORTUNIDADES DE AUTOMATIZAÇÃO EM QUÍMICA ANALÍTICA

1.1 AUTOMATIZAÇÃO E ROBOTIZAÇÃO DO PREPARO DA AMOSTRA

A realização de análises químicas com alta frequência analítica é um desafio permanente para pesquisadores tanto na academia, quanto na indústria. Embora enormes desenvolvimentos instrumentais tenham sido alcançados para lidar com as necessidades da química analítica moderna, a laboriosidade intrínseca ao tratamento da amostra continua sendo um gargalo na maioria das situações [1].

Entre as diferentes etapas que compõem a sequência analítica, o tratamento de amostra é frequentemente considerado como o estágio determinante da eficiência produtiva do método analítico. Esta etapa consome até 60% do tempo total da análise e da sua qualidade dependem as figuras de mérito e o bom funcionamento dos instrumentos analíticos (Figura 1.1) [1,2].

Figura 1.1 - a) Estimativa da fração do tempo total de análise requerida por cada uma das etapas do processo analítico; b) Contribuição porcentual de cada uma das etapas ao erro analítico total [2].

O desenvolvimento de métodos modernos de preparo de amostras tem se centrado na miniaturização e na automatização dos procedimentos [3]. A busca pela redução no consumo de amostras e reagentes tem levado ao surgimento de técnicas miniaturizadas tanto em fase sólida, quanto em fase líquida. Atualmente, técnicas como a microextração em fase sólida (SPME), a microextração por sorvente empacotado (MEPS), a microextração em gota única (SDME) e microextração em fase líquida assistida por fibras ocas (HF-LPME), entre outras, fazem parte da rotina analítica em laboratórios da academia e da indústria [4].

Por outro lado, a busca por procedimentos mais rápidos e robustos fez com que os químicos analíticos se interessassem ainda cedo pela automação dos procedimentos [5]. A automatização das múltiplas etapas envolvidas no preparo da amostra pode não apenas acelerar o processo, mas também favorecer a precisão das análises.

Os primeiros métodos automatizados surgiram em meados do século passado [6] e, desde então, várias estratégias de automação de laboratórios têm sido introduzidas (Figura 1.2). Técnicas de análise em fluxo, sistemas microfluídicos, sistemas de placas de multipoços, analisadores centrífugos e as diferentes versões de extração em fase sólida *on-line* (*column switching*) são algumas das estratégias de automatização mais amplamente utilizadas na atualidade [7]. Entre estas, e tema da presente tese, o uso de robôs tem sido uma abordagem

bastante atrativa [8,9]. Robôs podem fornecer flexibilidade, alta produtividade e eficiência operacional [10]. Dependendo, se o robô é programado unicamente para executar as etapas de tratamento da amostra, ou se programado para preparar a amostra e sequencialmente injetar o extrato no instrumento analítico [11], a automatização de protocolos analíticos baseada em robôs, basicamente pode ser de dois tipos: i) *off-line* e ii) *at-line*, respectivamente.

Figura 1.2 – Esquema ilustrativo das diferentes estratégias de automatização do preparo de amostras mais utilizadas na atualidade (Autoria própria).

Os primeiros robôs dedicados à execução de procedimentos multietapas de preparo de amostras foram introduzidos no início dos anos 80 [12] e, embora tenham permanecido um tanto marginalizados nos últimos 30 anos, novos protótipos com alto nível de sofisticação têm aparecido recentemente no mercado [13]. Atualmente, robôs tipo “braços robóticos” e “*autosamplers*” fornecem assistência na execução de múltiplas tarefas em laboratórios de todas as áreas [14].

Os braços robóticos de movimento angular são sistemas de múltiplos eixos capazes de executar movimentos angulares e transportar dispositivos e amostras através do espaço. Este tipo de sistema tem sido útil, por exemplo, na introdução de amostras para a análise por ressonância magnética nuclear (NMR) [15] e espectrometria de massas (MS) [16-18]. De outro lado, os *autosamplers* continuam sendo os robôs mais populares nos laboratórios de química analítica. *Autosamplers* são robôs cartesianos capazes de realizar movimentos lineares nos três eixos coordenados e são utilizados principalmente como injetores automáticos integrados de forma *at-line* com cromatógrafos ou espectrômetros de massas [19]. Contudo, os *autosamplers*

modernos são capazes de realizar outras várias funções, incluindo extração de analitos usando fibras de microextração em fase sólida [20].

Apesar da sua ampla utilidade, o uso de robôs em laboratórios de química continua ainda sendo limitado [21]. Isto, especialmente devido ao seu alto custo, à falta de *know-how*, e ao acesso limitado a ferramentas eletrônicas e informáticas para sua construção de forma *lab-made*. Afortunadamente, essa situação está mudando. O surgimento das ferramentas de robótica e eletrônica *open-source* tem começado a ampliar as possibilidades de desenvolvimento de todo tipo de instrumentos e dispositivos em todas as áreas da ciência, da indústria e até da vida cotidiana. A química analítica não tem sido a exceção.

1.2 ROBÓTICA *OPEN-SOURCE* NA QUÍMICA ANALÍTICA

Designa-se como “ferramentas de robótica *open-source*” a uma série de circuitos impressos genéricos, desenvolvidos para serem facilmente adaptáveis e programáveis por usuários sem conhecimentos especializados de eletrônica ou programação. Entre estes, a plataforma Arduino é talvez a ferramenta mais versátil, a mais amplamente utilizada e, portanto, aquela utilizada no desenvolvimento dos sistemas automatizados construídos durante a execução do projeto de doutorado alvo da presente tese e apresentada nos seguintes capítulos deste documento.

Arduino e seus similares, junto às ferramentas modernas de fabricação como a impressão 3D e novas correntes de pensamento como a “internet das coisas”, estão transformando as formas de criar e produzir toda classe de instrumentos e dispositivos. Na química analítica estes tipos de ferramentas têm encontrado grande aplicação no desenvolvimento *lab-made* de sistemas de detecção, aquisição de dados e no controle de instrumentação analítica automatizada [22,23].

Embora, a adoção de Arduino nos laboratórios de química analítica possa ser considerada lenta quando comparada com outras áreas, atualmente é possível encontrar na literatura científica um crescente número de descrições do uso de Arduino (e ferramentas similares) no desenvolvimento de *hardware* e *software* destinados à realização de análises químicas. Uma breve pesquisa na base dados *Scopus* [24] revelou a existência de 4258 documentos incluindo a palavra “Arduino” no título, no resumo, nas palavras-chave ou no corpo do texto. Entre estes, apenas 126 documentos são classificados pela *Scopus* no âmbito da

química e sua distribuição histórica demonstra o crescente interesse da comunidade de química na incorporação de Arduino em seus projetos de ensino e pesquisa (Figura 1.3a).

Figura 1.3 - a) Distribuição anual das publicações referentes a aplicações de Arduino na química; b) Principais aplicações de Arduino em química analítica.

A partir do estudo detalhado destes 126 documentos, e por contraste com outras bases de dados, foi possível identificar que só 95 documentos correspondem realmente a trabalhos realizados por químicos, em laboratórios de química ou com destinação específica ao desenvolvimento de instrumentação e automatização de processos no laboratório de química. Esta pequena pesquisa revelou que Arduino tem encontrado uma ampla faixa de aplicabilidade dentro da química analítica, destacando um bom número de publicações dedicadas ao desenvolvimento de detectores, sistemas para monitoramento de processos químicos, sistemas microfluídicos e automatização de laboratórios mediante sistemas em fluxo ou baseados em robôs (Figure 1.3b).

Entre as publicações previamente mencionadas, é importante destacar o bom número de documentos com finalidades pedagógicas e educacionais. Estes são relatos destinados a promover e fortalecer os conhecimentos em eletrônica e programação dos estudantes de graduação em química [25-32]. De fato, alguns cursos em diferentes partes do mundo têm incorporado tópicos específicos de Arduino e eletrônica *Open-source* dentro de suas grades curriculares, seja dentro dos cursos de análise instrumental ou mediante a incorporação de disciplinas específicas, nas quais os alunos fazem uso do Arduino para controlar experimentos, adquirir dados e hifenar instrumentos com seus computadores e/ou telefones [33].

No desenvolvimento de pesquisas em química analítica, Arduino tem encontrando um amplo espectro de aplicações que envolvem desde o desenvolvimento de instrumentos com aplicações concretas como extensores para o estudo de propriedades mecânicas de materiais elásticos [34], sistemas de lavagem de eletrodos [35], agitadores [27], sistemas de refrigeração ou aquecimento [36], detectores espectrofotométricos [28,37-53] e eletroquímicos [54-63], assim como na automatização de métodos de preparo de amostra e sua hifenação/integração com instrumentos analíticos.

1.2.1 Arduino na automatização do preparo de amostra

No referente à automatização do preparo de amostra, tema da presente tese, existem na literatura diversos exemplos que descrevem o uso de Arduino no desenvolvimento de plataformas microfluídicas [64-81], de sistemas em fluxo [82-93] e de sistemas robotizados capazes de manipular, transportar e injetar amostras ou solventes [17,94-96]. A tabela 1.1 sumariza alguns exemplos do uso de Arduino no desenvolvimento *lab-made* de sistemas automatizados de tratamento de amostras e seu acoplamento com os sistemas de separação e detecção.

Verbag et al [67] desenvolveram um sistema microfluídico equipado com um rotor magnético, que permite a extração seletiva e pré-concentração dos analitos de interesse mediante a microextração em fase sólida com partículas magnéticas contidas em um micro canal. Um microcontrolador Arduino foi usado para comandar o sentido do giro de um rotor magnético, de forma que as partículas magnéticas pudessem ser transportadas no contra fluxo, no sentido do fluxo ou ser mantidas fixas em sua posição, segundo o que fosse requerido. Mitchell e colaboradores [74] descreveram um sistema baseado na hibridização de DNA com nanopartículas magnéticas. Neste estudo, os autores empregaram Arduino para controlar a posição dos magnetos e a vazão das bombas por meio de saídas PWM (*pulse with modulation*). Outros *chips* similares foram descritos para determinação de DNA ribossomal de *Escherichia coli* [77].

A maior parte dos exemplos de aplicações de Arduino na automatização de preparo de amostra corresponde ao desenvolvimento de sistemas em fluxo acoplados *on-line* com instrumentos analíticos como espectrômetros de massa por plasma acoplado indutivamente [83], cromatógrafos a gás (GC) ou a líquido (LC) e espectrômetros de massas com fonte de ionização por *electrospray* (ESI-MS).

Tabela 1.2 - Alguns exemplos do uso de Arduino na automatização do preparo de amostra

	Aplicação	Arduino	Operações controladas por Arduino	Ref
Plataformas microfluídica	Extração seletiva de compostos de interesse, remoção da matriz e liberação do extrato num micro canal, mediante partículas magnéticas.	NE*	Controle de um motor na operação de um rotor magnético	[67]
	Plataforma microfluídica para a realização de imunoenaios baseados no uso de partículas magnéticas	NE*	Controle da alta voltagem	[72]
	Detecção e quantificação de RNA ribossomal de <i>Escherichia coli</i>	Arduino UNO	Controle da posição dos magnetos e a vazão das bombas por meio de saídas PWM	[74]
	Detecção de biomarcadores de câncer de próstata	Arduino UNO	Controle de microbombas	[77]
	Determinação de nitrato em águas	Arduino Mega	Controle de LED, fotodiodos, tela LCD, aquisição e representação de dados.	[81]
Sistemas em fluxo	Automatização de SPE e seu acoplamento com ICP-MS para determinação de actinídeos.	NE*	Controle de uma bomba peristáltica	[83]
	Desenvolvimento de um sistema SIA com detecção eletroquímica para determinação de capacidade antioxidante	NE*	Controle de uma bomba peristáltica	[84]
	Automatização e hifenação de <i>in-tube</i> SPME com GC	Arduino UNO	Controle de válvulas solenóide, bomba seringa e comunicação com GC	[87]
	Automatização e hifenação de SPME com GCxGC	Arduino Duemilanove	Controle de válvulas solenóides	[82]
	Automatização e hifenação de microextração assistida por membrana com LC	Arduino Mega	Controle de válvulas solenóide, bomba seringa e comunicação com LC	[86]
	Automatização e hifenação de Microextração sólido-líquido com fluorescência e ESI-MS	NE*	Controle de válvulas solenóide, relês, motores DC, motor de passo, tela tátil e comunicação com MS	[88]
Sistemas robotizados	Injeção sequencial de amostras biológicas em espectrometria de massas, fazendo uso de um braço robótico.	Arduino Mega Arduino UNO Arduino Leonardo	Controle do braço robótico e os sensores adicionados, da tela tátil, comunicação pela internet e comunicação com MS	[17]
	Tratamento e injeção sequencial de amostras biológicas em espectrometria de massas, fazendo uso de dois braços robóticos sincronizados.	Arduino Mega Arduino UNO Arduino Leonardo	Controle do braço robótico e os sensores adicionados, da tela tátil, comunicação pela internet e comunicação com MS	[18]

*NE: Não especificado

Um dos primeiros exemplos de uso de Arduino na automatização do preparo de amostra para análise cromatográfica de compostos orgânicos foi publicado por Ghosh e colaboradores [87]. Os autores relataram um sistema para extração e pré-concentração de compostos orgânicos voláteis (VOCs) numa coluna capilar tubular aberta, recoberta internamente com polidimetilsiloxano (PDMS), seguida de sua dessorção e injeção *on-line* para análise mediante cromatografia gasosa. Os autores usaram um Arduino UNO para controlar (i) uma válvula de seis portas, (ii) uma bomba seringa e (iii) para controlar o acionamento do GC (Figura 1.4a).

Figura 1.4 – Exemplos de uso de Arduino na automatização do preparo de amostra e seu acoplamento *on-line* com sistemas analíticos. a) Automatização e hifenação de *in-tube* SPME com GC [87]; b) Automatização e hifenação de microextração sólido-líquido com ESI-MS [88].

Em outro exemplo, um Arduino Mega foi útil na automatização de um sistema de extração sólido-líquido acoplado *on-line* com espectrometria de massas (Figura 1.4b). Neste caso, o Arduino permitiu controlar todas as partes do sistema de extração, incluindo uma bomba peristáltica, uma válvula solenoide, um motor DC, um motor de passo e uma tela tátil, assim como inicializar a aquisição de dados pelo espectrômetro de massas [88]. Também, usando um Arduino Mega, See e Hauser [86] desenvolveram um sistema automatizado de extração em fase líquida assistida por membrana. O microcontrolador foi responsável pelo controle de uma bomba seringa, uma válvula de seleção, um módulo de alta voltagem e o acionamento do cromatógrafo, numa configuração de acoplamento *on-line* entre o preparo da amostra por microextração em fase líquida assistida por membrana e a análise cromatográfica.

Em 2015 Chiu e Urban apresentaram o RAMSay-1 [17], um sistema para análise mediante espectrometria de massas envolvendo um robô multieixos equipado com sensores de força, acelerômetros, sensores de proximidade e foto-interruptores que permitem obter informação do estado e monitorar o funcionamento do sistema. Esta plataforma envolve quatro Arduinos diferentes comunicados entre eles, para controlar os movimentos do braço robótico, permitir a comunicação com o usuário por tela tátil, permitir a comunicação via internet e processar informações referentes a amostra. Recentemente, os autores apresentaram o RAMSAY-2 [18], incorporaram um braço robótico adicional, vários servomecanismos e várias bombas microfluídicas buscando aumentar a frequência analítica da plataforma desenvolvida. Esta versão melhorada permite acoplar, de forma *at-line*, tratamentos de amostra complexos em várias etapas com a análise mediante espectrometria de massas (Figura 1.5).

Figura 1.5 – Exemplos de uso de Arduino na automatização do preparo de amostra mediante o uso de braços robóticos. a) Ilustração do sistema RAMSAY-1 [17]; b) Sistema RAMSAY-2 [18].

1.3 ALGUMAS CONSIDERAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO *LAB-MADE* DE SISTEMAS ROBOTIZADOS

Em geral, *autosamplers*, e demais sistemas robotizados, podem ser considerados como compostos por três elementos principais: componentes mecânicos, eletrônicos e informáticos.

1.3.1 Aspectos mecânicos

O projeto mecânico em construção de autosamplers e robôs cartesianos, em geral, está composto pelos atuadores, principalmente motores e atuadores lineares. Dependendo das características e requerimentos do sistema a ser desenvolvido, diferentes tipos de cada um destes elementos podem ser utilizados. Algumas considerações referentes à utilização e a cada um destes elementos são apresentadas na sequência.

Motores

Nos sistemas cartesianos modernos os deslizamentos longitudinais são normalmente obtidos graças à utilização de motores acoplados a fusos e guias lineares. Um motor elétrico é

uma máquina rotatória que transforma energia elétrica em energia mecânica de acordo com o princípio da indução magnética. Quando uma corrente elétrica flui através de uma bobina, um campo magnético é gerado em torno desta. Se a bobina é inserida em um campo magnético previamente existente (entre dois magnetos), a bobina é atraída por um dos magnetos e repelida pelo outro, originando o movimento giratório [97].

Em robótica e automatização, os motores principalmente utilizados são de três tipos: motores de rotação contínua (DC, *direct current*), servomotores e motores de passo (*steppers*), sendo os últimos os preferidos em aplicações industriais, pois fornecem maior precisão no seu posicionamento.

O motor DC é o mais simples dos motores elétricos, tem uma única bobina, dois terminais e gira dependendo do sentido em que seja aplicado o potencial. Assim, quando se liga um dos terminais à voltagem e o outro ao aterramento, o motor gira num sentido específico. Quando esta configuração é invertida, o sentido de rotação também é invertido. Desta forma controla-se o sentido de rotação de um motor DC. Adicionalmente, a magnitude da corrente aplicada torna possível controlar a velocidade de rotação. Não é possível controlar o ângulo de rotação destes motores, sem o uso de encoders. É possível controlar o tempo de rotação em um sentido determinado e desta forma tentar controlar a posição, mas a precisão pode ser bastante limitada.

Os servomotores são motores de posição controlada. Estão conformados por um motor DC, uma caixa de redução e um circuito de controle. Estes não giram continuamente, só em um ângulo determinado. Na sua forma mais básica, um servomotor é um moto-reductor (motor DC com caixa de redução) com o eixo acoplado a um potenciômetro, cujo valor de resistência elétrica indica a posição angular do eixo. Por sua vez, este potenciômetro está conectado a um circuito de controle interno, de forma que a posição do eixo pode ser ajustada controlando o tempo em estado *high* de um pulso digital enviado a este circuito. O circuito de controle compara a magnitude da tensão do sinal enviado (sinal de referência) com o sinal de saída do terminal móvel do potenciômetro, de forma que é gerado um sinal de controle correspondente à voltagem que deve ser gerada pelo microcontrolador para anular a diferença entre os sinais de referência e saída. Então o eixo do motor gira até que a posição do potenciômetro seja tal que a diferença entre o sinal de saída e o sinal de referência seja zero. Assim, além dos dois terminais de alimentação que têm os motores DC, os servomotores têm um terminal adicional que é usado como linha de controle digital, para comandar a posição angular do eixo [97].

Motores de passo ou *steppers*

Os *steppers* giram através de movimentos rotacionais discretos (passos) que lhe permitem realizar movimentos angulares fixos com alta precisão. Estes motores não são alimentados de forma contínua, mas sim por pulsos de eletricidade, deslocando-se um passo para cada pulso elétrico aplicado. Assim, controlando o número de pulsos aplicados ao motor é possível controlar o ângulo de giro do motor. Esta característica faz do *stepper* um dispositivo digital, facilmente controlável, especialmente útil quando se requer posicionamento com um elevado grau de exatidão.

Em geral, os *steppers* são mais lentos que os motores DC, já que estão limitados pela velocidade do pulso (5600 pulsos por segundo, tipicamente). No entanto, os *steppers* normalmente proporcionam maior torque, especialmente quando estão parados. De forma que, podem manter sua posição sob a ação de forças externas.

Enquanto que os motores DC têm uma única bobina, os *steppers* podem conter várias bobinas em torno do eixo magnetizado, de forma que estas bobinas são energizadas ou não, criando alternativamente campos magnéticos que repelem ou atraem o eixo causando a rotação por passos.

Estes motores possuem duas partes principalmente:

- **Estator:** Parte fixa que consiste em uma cavidade na qual estão depositadas as bobinas.
- **Rotor:** Parte móvel que é constituída por um ímã permanente.

Este conjunto é montado sobre um eixo suportado por dois rolamentos que lhe permitem rodar livremente. Quando o estator é excitado, são criados os polos N-S, variando assim o campo magnético formado, a resposta do rotor é seguir o movimento do campo, buscando o equilíbrio magnético. Quando o rotor atinge a posição de equilíbrio, o estator altera novamente a orientação dos seus polos e o rotor tentará novamente encontrar a posição de equilíbrio. A repetição desta situação, sequencialmente, leva ao movimento rotativo. O número de graus que o rotor gira, quando há uma mudança na polaridade das bobinas do estator, constitui o ângulo de passo do motor [19]. A Figura 1.6 ilustra o funcionamento de um motor de passo.

Figura 1.6 – Ilustração do funcionamento de um motor de passo com um rotor de 25 dentes, 100 passos por volta, com um ângulo de passo de $3,6^\circ$ [19].

Os motores de passo podem ser de dois tipos: unipolares ou bipolares. Os motores unipolares possuem quatro bobinas e os bipolares duas, sendo possível diferenciar fisicamente entre estes a partir do número de terminais de cada motor. Os motores bipolares normalmente possuem dois terminais para cada bobina (quatro no total), enquanto que os motores unipolares podem chegar a ter 8, 6 ou 5 terminais, uma vez que suas quatro bobinas podem estar agrupadas por pares, com um terminal em comum tal como pode ser observado na Figura 1.7. Em alguns casos, os comuns podem ainda estar unidos entre eles, caso no qual o motor possui cinco terminais.

Figura 1.7 – a) Esquema ilustrativo de um motor de passo bipolar; b) Esquema ilustrativo de um motor de passo unipolar (Autoria própria).

Estes dois tipos de motores se diferenciam também no seu princípio de funcionamento e na forma em que eles são controlados. Os motores unipolares recebem este nome devido ao fato de a corrente circular por suas bobinas em uma única direção. No controle de motores bipolares, a corrente circula pelas bobinas mudando de direção em função da tensão aplicada. Adicionalmente, durante o controle de um motor unipolar ativa-se uma bobina por vez, enquanto em um motor bipolar as duas bobinas podem ser energizadas simultaneamente. Isto faz com que o motor bipolar tenha maior torque [98].

Para controlar um *stepper* deve-se aplicar voltagem em cada uma das bobinas numa sequência específica, a qual normalmente se consegue mediante um circuito *driver*, que permite energizar as bobinas na ordem correta a fim de conseguir o posicionamento desejado. Estas sequências de fases diferem em cada tipo de motor. Assim, um motor bipolar poderia ser controlado segundo a sequência binária descrita na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Sequência binária para controle de um motor de passo bipolar [99]

	Bobina 1A	Bobina 1B	Bobina 2A	Bobina 2B
Passo 1	1	0	1	0
Passo 2	1	0	0	1
Passo 3	0	1	0	1
Passo 4	0	1	1	0

De outra parte, os motores unipolares podem ser controlados por meio de três sequências de pulsos diferentes. A sequência simples, ou *wave drive*, em que se ativa uma bobina por vez, a sequência normal, que é a recomendada pelos fabricantes, que por ativar duas bobinas por vez, fornece maior torque e a sequência de meio passo de oito fases, que permite que o motor avance meio passo por vez, o que confere maior precisão. Estas sequências são descritas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 – Sequências binárias para controle de um motor de passo unipolar [99]

Sequência simples				
	Bobina 1A	Bobina 1B	Bobina 2A	Bobina 2B
Passo 1	1	0	0	0
Passo 2	0	1	0	0
Passo 3	0	0	1	0
Passo 4	0	0	0	1
Sequência normal				
	Bobina 1A	Bobina 1B	Bobina 2A	Bobina 2B
Passo 1	1	1	0	0
Passo 2	0	1	1	0
Passo 3	0	0	1	1
Passo 4	1	0	0	1
Sequência de meio passo				
	Bobina 1A	Bobina 1B	Bobina 2A	Bobina 2B
Passo 1	1	0	0	0
Passo 2	1	1	0	0
Passo 3	0	1	0	0
Passo 4	0	1	1	0
Passo 5	1	0	1	0
Passo 6	0	0	1	1
Passo 7	0	0	0	1
Passo 8	1	0	0	1

Atuadores lineares

Fusos de esferas

São atuadores que permitem converter movimentos rotacionais de um motor em deslocamentos longitudinais. Os fusos de esferas (Figura 1.8) estão constituídos por um parafuso sem fim de rosca esférica ou trapezoidal e uma porca (castanha). Seu funcionamento baseia-se na mudança da posição relativa entre a porca e o fuso quando um destes gira em torno da rosca. Geralmente, podem ser operados em duas formas, dependendo se o movimento circular é aplicado no fuso ou na castanha. No primeiro caso, o fuso é acoplado diretamente ao eixo do motor, enquanto a castanha é mantida fixa. O movimento rotacional do fuso se transforma em deslocamento longitudinal da castanha. Na segunda forma, a rotação é aplicada na castanha, que permanece numa posição longitudinal fixa, enquanto que o fuso pode avançar ou retroceder e dessa forma a porca da casta gira.

Figura 1.8 – Ilustração da estrutura e funcionamento de um fuso de esferas.

1.3.2 Aspectos eletrônicos

Atualmente, a maior parte dos sistemas automatizados está baseada em tecnologias programáveis, tais como os computadores, microprocessadores e microcontroladores. Estes últimos têm sido as melhores alternativas disponíveis para aplicações de robótica e o desenvolvimento de sistemas inteligentes automatizados, dado seu baixo custo, seu tamanho reduzido, seu baixo requerimento de tensão (normalmente 5 V) e a facilidade de seu uso e programação. Adicionalmente, os microcontroladores podem ser programados a partir de qualquer PC e continuar operando independentemente depois de programados [100].

Um microcontrolador é um circuito integrado programável que contém praticamente todas as partes de um computador, capaz de interagir com o ambiente externo e realizar operações lógicas e aritméticas conforme o código inserido nele. Estes dispositivos controlam os circuitos, processam a informação recebida, lêem o estado dos sensores e fazem trabalhar os atuadores do sistema [101].

Um microcontrolador é praticamente um computador completo, só que este está desenhado para controlar objetos (motores, leds, lâmpadas etc) mais do que para interagir com os usuários. Os microcontroladores não possuem sistemas de armazenamento massivo e só podem guardar a programação da tarefa específica para a qual foram programados. No entanto, na atualidade, um mesmo microcontrolador pode ser reprogramado até 100 mil vezes ou mais [102].

Os microcontroladores estão minimamente constituídos por um processador, uma memória de dados e instruções, um *bus* de dados, portas de entrada e saída, além de um oscilador de relógio (*clock*). A Figura 1.9 apresenta o esquema básico e geral de um microcontrolador [102].

Figura 1.9 – Esquema ilustrativo da estrutura interna de um microcontrolador (Autoria própria).

No mercado pode ser encontrada uma grande variedade de microcontroladores. Sua arquitetura varia de um fabricante para outro. Os principais fabricantes e vendedores de microcontroladores no mundo são: Altair, Intel, Siemens, Motorola, MicroChip, Basic Stam e ATmel. Há microcontroladores de vários e diferentes níveis em termos de *hardware* e *software*,

que vão desde os simples encapsulados, programáveis unicamente em linguagem *assembly* até circuito impressos com todos os componentes requeridos para o funcionamento do microcontrolador já soldados e que podem ser programados diretamente em linguagem de alto nível [103].

Microcontroladores de “baixo nível”

Pode-se enquadrar dentro desta categoria a forma mais básica em que se podem encontrar os microcontroladores, constam de um único *chip*, sem elementos adicionais, sempre requerem eletrônica adicional para seu uso e programação. Exemplos destes são as formas básicas dos PIC, produzidos pela MicroChip ou as formas básicas das diferentes versões da ATmel [103].

Microcontroladores “de alto nível”

Poderiam-se denominar desta forma os microcontroladores que têm facilitado e promovido o desenvolvimento da robótica *open-source*. Surgiram 15 anos atrás e atualmente se encontram no mercado na forma de placas impressas com suficientes elementos de *hardware* incorporados para seu uso praticamente imediato. São mais fáceis de usar que os microcontroladores de baixo nível. Não requerem de um programer, e podem ser programados a partir de qualquer computador por meio de uma porta USB (*universal serial bus*). Normalmente contam com um código de programação próprio numa linguagem de alto nível, tal como C, C++, javascript ou python.

Adicionalmente estes microcontroladores tem promovido o surgimento de módulos eletrônicos auxiliares, com os quais podem ser facilmente acoplados, sem necessidade de solda e permitindo controlar uma grande variedade de sensores e atuadores. Exemplos deste tipo de microcontroladores incluem: Arduino, Basic Stamp, Esporuino, Mbed, Netduino, Propeller, Teensy, Raspberry Pi, e BeagleBone entre outros [23].

Microcontroladores Arduino

Arduino é uma plataforma de *hardware e software* “*Open-Source*” [104] desenvolvida em 2005 no Instituto IVREA (Ivrea, Itália) como um projeto acadêmico orientado a facilitar o acesso às ferramentas de eletrônica, robótica e automatização a usuários carentes de conhecimentos prévios nestas áreas. Atualmente, talvez seja a ferramenta de desenvolvimento e prototipagem mais amplamente utilizada [25,26].

O *hardware* Arduino é um circuito impresso com um microcontrolador, uma CPU, com memória RAM, memória de programa (ROM), uma unidade de processamento aritmético e dispositivos de entrada e saída. A placa tem todo o *hardware* requerido para a obtenção e processamento de dados, assim como para permitir o uso desta informação no controle de atuadores.

Arduino usa microcontroladores Atmega da ATMEL. Os mais comuns são os *chips* Atmega162, Atmega328, Atmega1280 e Atmega8. Atualmente é possível encontrar no mercado muitos modelos de Arduino, que diferem na capacidade de memória de programa (ROM) e no número de pinos de entrada e saída disponíveis.

A Figura 1.10 apresenta uma fotografia de uma placa do Arduino UNO, o mais comum e genérico dos microcontroladores Arduino. Este é um circuito impresso numa placa de baquelita de 2,7" (68,50 mm) X 2,1" (53,34 mm) baseado num microcontrolador Atmega 328.

Figura 1.10 – Descrição da uma placa comercial de Arduino UNO, Revisão 3.

O Arduino UNO tem 14 pinos de entrada/saída digitais (1/0), dos quais seis podem ser usados como saídas PWM (*Pulse-Width Modulation*, para simular saídas analógicas), seis entradas analógicas, um oscilador de cristal de 16 MHz, uma porta *USB, entradas de

alimentação (AC/DC), pinos de comunicação serial, um *header* ICSP e um botão de reset, que permite reiniciar o microcontrolador. Praticamente, contém o necessário para dar suporte ao microcontrolador e permitir sua programação com grande facilidade a partir de qualquer computador, por comunicação USB.

Controle de motores de passo com Arduino- hardware

Como foi mencionado anteriormente, para controlar um motor de passo é preciso aplicar voltagem a cada uma de suas bobinas numa sequência determinada. Os primeiros controladores se baseavam em interruptores mecânicos que pulsavam as bobinas do motor sequencialmente. Atualmente, o controle é feito por meios eletrônicos comandados via computador, enviando via *software* a sequência de pulsos requerida [105].

Os dispositivos eletrônicos empregados no controle de motores de passo são denominados *drivers* e são os circuitos responsáveis pelo acionamento das bobinas. Vários tipos de *drivers* podem ser encontrados no mercado para os diversos tipos de motores disponíveis. O *driver* pode controlar tanto a tensão de alimentação das bobinas quanto à corrente que flui através destas.

Adicionalmente, os *drivers* são necessários, uma vez que não é possível conectar o motor aos pinos do microcontrolador. Normalmente a potência fornecida pelo microcontrolador não é suficiente para alimentar um motor, requerendo-se assim uma alimentação externa e separada a estes dispositivos. Também as correntes nas portas do microcontrolador e as requeridas pelas bobinas do motor são incompatíveis. A corrente máxima fornecida pelos pinos do Arduino é 40 mA e um motor pequeno, de baixo torque, pode requerer mais de 300 mA. Assim os *drivers* também exercem funções de acoplamento e proteção tanto do motor como do microcontrolador [106].

Os motores unipolares são controlados por meio de circuitos integrados compostos de múltiplos arranjos de transistores *Darlington*, enquanto que os *drivers* para motores bipolares estão constituídos principalmente por pontes H. O arranjo *Darlington* é a base dos modernos circuitos integrados, foi inventado em 1951 pelo engenheiro Sidney Darlington (laboratórios Bell), e funciona como um dispositivo multiplicador de corrente. Esta configuração permite um grande ganho de corrente, uma vez que em um transistor a corrente no coletor (C) é igual à corrente na base (B) multiplicada por um fator de ganho β (hFE ou parâmetro β do transistor), segundo a equação: $I_E = \beta \times I_B$. Assim uma corrente de 40 mA na saída do microcontrolador

pode ser aumentada até o valor requerido pela bobina do motor. Como exemplo, para um motor unipolar que tem quatro bobinas é necessário o uso de quatro arranjos *Darlington* para seu controle (Figura 1.11).

Figura 1.11 – a) Representação esquemática de um arranjo *Darlington*; b) Acoplamento de múltiplos arranjos *Darlington* [106].

Para controlar um motor bipolar deve-se energizar as bobinas segundo a sequência de passos similares às do motor unipolar. No entanto, em vez de usar quatro bobinas, são utilizados os dois terminais das duas bobinas e se inverte a polaridade da corrente que circula. Isto é possível mediante o uso de circuitos integrados constituídos por pontes H. Uma ponte H é um circuito formado por quatro interruptores (S1, S2, S3 e S4), conectados aos terminais da bobina do motor tal como é apresentado na Figura 1.12.

Figura 1.12 – Representação esquemática de uma ponte H; a) Todos os interruptores abertos. b) A corrente circula no sentido S1-S3; c) A corrente circula no sentido contrário [106].

Esta configuração de interruptores permite inverter a direção de fluxo da corrente. Quando os interruptores S1 e S4 se encontram fechados e, S2 e S3 abertos, a corrente circulará em um sentido, enquanto que quando S2 e S3 estiverem fechados e S1 e S4 abertos a corrente circulará no sentido inverso. Uma configuração na qual S1 e S3 ou S2 e S4 estejam fechados ocasionará um curto circuito.

As pontes H utilizam transistores como interruptores para controlar o fluxo da corrente. O uso de transistores também possibilitou o desenvolvimento de circuitos integrados contendo várias pontes H num único encapsulado. Atualmente existem vários *drivers* para controle de motores bipolares, tais como os integrados L297D, L298N, L293D, que tem duas pontes H no mesmo *chip*. Também são amplamente utilizados o integrado A4988, que pode ser alimentado com 3 a 5,5 V e os módulos *EasyDriver*, baseados no integrado A3967, que suportam alimentação entre 7 e 30 V. Dado que cada um destes *chips* tem só um par de pontes H, é necessário um destes *drives* por cada motor de passo a ser controlado.

1.3.3 Aspectos informáticos

O programa de controle de um sistema automatizado é basicamente a interface que permite ao operário comunicar-se com a máquina para controlar seu funcionamento. Este é construído a partir de sequências de instruções, confeccionadas em uma linguagem de programação de forma que possam ser interpretadas e transmitidas por um processador.

Na atualidade existe uma grande variedade de linguagens de programação, de diferentes níveis de abstração e complexidade, cada uma delas com características próprias quanto a sua sintaxe e sua gramática. Podem-se distinguir dois níveis de linguagens de programação, dependendo da sua semelhança com a linguagem humana. As linguagens de baixo nível, que são uma representação simbólica da linguagem de máquina e as linguagens de alto nível que possuem macro instruções facilitando enormemente a escrita dos programas.

A linguagem de máquina é o conjunto de códigos que pode ser interpretado diretamente por um circuito digital como o microprocessador de um computador ou o microcontrolador de um sistema automatizado. De outra parte, estes dispositivos só entendem este tipo de código e todo programa escrito em qualquer outro tipo de linguagem requer a interpretação ou compilação para que possa ser executado por um microprocessador. A linguagem de máquina é específica da arquitetura da máquina, mas em geral essas linguagens estão constituídas por

sequências de “1” e “0” que, por abstração, simbolizam os dois únicos níveis de tensão dos circuitos digitais: HIGH/LOW ou, em outras palavras, ligado/desligado.

As linguagens de baixo nível surgiram principalmente devido à complexidade da programação em linguagem de máquina e estão compostas por sinais alfabéticos e palavras que representam sequências completas de 0s e 1s. A linguagem Assembly (ASM) é a mais popular das linguagens de baixo nível para microprocessadores, microcontroladores e qualquer outro tipo de circuito integrado programável. Essa linguagem está constituída por uma série de acrônimos e palavras do inglês que são traduzidas à linguagem de máquina mediante tradutores chamados *assemblers*.

As linguagens de alto nível encontram-se mais próximas da linguagem humana do que da linguagem de máquina. Estão constituídas por instruções nas quais um único comando pode representar dezenas de instruções em linguagem de máquina. Os programas escritos nestas linguagens são traduzidos à linguagem de máquina mediante programas compiladores. Essas linguagens não estão diretamente relacionadas à arquitetura do hardware, podendo funcionar em qualquer circuito programável, com ajuda de um compilador apropriado. Existem várias linguagens de alto nível, tais como ASP, ActionScript, C/C++, C#, Pascal/Object Pascal, Euphoria, Java, Lua, MATLAB, PHP, Python, Ruby, Tcl, Basic/Visual Basic.

Programação de Arduino

Os microcontroladores de Arduino estão pré-gravados com um *bootloader* que permite armazenar novos programas sem uso de um programador externo. Assim, o Arduino conta com um ambiente de desenvolvimento próprio (IDE) disponível de forma livre no site de Arduino, para as diferentes versões de Windows, assim como para Mac e Linux. Este é um ambiente de programação com linguagem própria, baseado em Processing/Wiring (similar a C++) e usa uma interface gráfica construída em Java, que basicamente permite escrever um programa e armazena-o no microcontrolador para sua execução.

Os programas de Arduino estão compostos por três partes principais: definição de objetos e variáveis, o voidSetup e o voidLoop. A definição de variáveis tem a informação referente às bibliotecas a serem utilizadas e variáveis a serem controladas. A função setup serve para configurar o programa e para informar ao microcontrolador quais pinos serão usados como entradas e quais como saídas. A função loop é a que contém a sequência de instruções a serem executadas. Uma vez que a função setup é executada uma única vez, as instruções contidas no

loop serão realizadas indefinidamente, enquanto o sistema se encontre alimentado. Outras funções podem ser criadas e executadas no loop, ou chamadas para execução mediante comunicação serial. Esta foi a estratégia adotada no controle dos protótipos desenvolvidos. O usuário envia comandos mediante comunicação serial e o equipamento executa a ação correspondente a cada comando.

A linguagem do Arduino é baseada em C++, pelo que conta com seus mesmos comandos de controle (*if*, *else*, *while*, *for*), elementos de sintaxe (*#define*, *#include*, {}, etc.), operadores aritméticos (+, -, *, ^, etc.), operadores de comparação (==, !=, <, >, etc.), entre outros.

Controle de motores de passo com Arduino - software

Tal como foi apresentado na Tabela 1.3, o controle de motores de passo requer o acionamento das bobinas mediante uma sequência específica de pulsos aplicada por meio do microcontrolador. De acordo com esta tabela, os motores bipolares são controlados ativando as duas bobinas simultaneamente, invertendo o sentido em que cada uma das bobinas é energizada em cada passo. O código binário descrito na Tabela 1.2 para motores bipolares também poderia ser escrito da forma apresentada na Tabela 1.4 a seguir:

Tabela 1.4 – Sequência para controle de um motor de passo bipolar em termos da voltagem aplicada

	Bobina 1A	Bobina 1B	Bobina 2A	Bobina 2B
Passo 1	+V	-V	+V	-V
Passo 2	+V	-V	-V	+V
Passo 3	-V	+V	-V	+V
Passo 4	-V	+V	+V	-V

Segundo os dados desta tabela, o controle do motor bipolar é obtido aplicando tensões nas bobinas do motor num sentido determinado e posteriormente no sentido inverso. Para programar estas sequências basta imprimir o estado digital HIGH (+) ou LOW (-) segundo seja requerido. Por exemplo, assumindo que os pinos In1 e In2 do L298N, responsáveis pelo acionamento da bobina 1 (ponte H 1), estão conectados nos pinos digitais a e b do Arduino, enquanto que os pinos In3 e In4 do L298N, responsáveis pelo acionamento da bobina 2 (ponte H 2), estão conectados nos pinos digitais c e d do Arduino, a linha 1 da tabela 1.4 seria traduzida na seguinte sequência de código:

`digitalWrite(a, HIGH); digitalWrite(b, LOW); digitalWrite(c, HIGH); digitalWrite(d, LOW);`

Assim, a Tabela 1.5 apresenta um programa com a sequência de instruções completa para controle de um motor de passo utilizando Arduino e um módulo *driver* dupla ponte H tipo A4988.

Tabela 1.5 – Programa em Arduino para controle de um motor de passo bipolar.

<code>#define VELOCIDAD 1700</code>	// A velocidade de funcionamento do motor é definida por default, entre menor o valor designado, maior a velocidade de giro do motor.
<code>int steps = 13;</code> <code>int direction= 9;</code> <code>int reset = 10;</code>	// se definem as variáveis: <i>steps</i> , <i>direction</i> e <i>reset</i> . Neste caso 13, 9 e 10 correspondem aos pinos digitais do Arduino, onde foram conectados os portos de controle STEPS, DIR e RESET do driver A4988.
<code>int passos = 3500;</code>	// se define o número de passos que se deseja fazer avançar o motor.
<code>void setup()</code> { <code>pinMode(steps, OUTPUT);</code> <code>pinMode(direction, OUTPUT);</code> <code>pinMode(reset, OUTPUT);</code> }	// Configuração do programa. Tem todas aquelas instruções que serão executadas uma única vez. // steps, direction e reset são definidos como variáveis de saída, que recebem informações do micro controlador e as enviam aos atuadores.
<code>void loop()</code> { <code>digitalWrite(reset, LOW);</code> <code>delay(100);</code> <code>digitalWrite(reset, HIGH);</code> <code>digitalWrite(direção, HIGH);</code> <code>for (int i = 0; i<passos; i++)</code> { <code>digitalWrite(steps, HIGH);</code> <code>digitalWrite(steps, LOW);</code>	// Tem a sequência de instruções das tarefas a serem realizadas. // Se reset está em LOW o motor permanecerá apagado. O chip não lerá comandos. // Delay indica uma pausa de 100 microssegundos // Quando reset se encontre em HIGH o motor iniciara e lerá os comandos enviados. // Indica uma direção de giro para o motor. // a seguinte sequência de instruções será executada sempre que o valor da variável i seja menor do que 3500 (número de passos inicialmente definido). // Esta sequência indica ao A4988 avançar uma vez por cada pulso de energia recebido.

<code>delayMicroseconds(VELOCIDAD);</code>	<code>// Regula a velocidade, de envio de pulsos, neste caso será</code>
<code>}</code>	<code>1700 (definido inicialmente).</code>
<code>digitalWrite(reset, LOW);</code>	<code>// Se reset está em LOW o motor permanecerá apagado. O</code>
<code>delay(100);</code>	<code>chip não lerá comandos.</code>
<code>digitalWrite(reset, HIGH);</code>	<code>// Delay indica uma pausa de 100 microssegundos</code>
<code>digitalWrite(direção, LOW);</code>	<code>// Inverterá o sentido de giro do motor.</code>
<code>for (int i = 0; i<passos; i++)</code>	<code>// Sequência de giro do motor.</code>
<code>{</code>	<code>// Esta sequência indica ao A4988 avançar uma vez por</code>
<code>digitalWrite(steps, LOW);</code>	<code>cada pulso de energia recebido.</code>
<code>digitalWrite(steps, HIGH);</code>	
<code>delayMicroseconds(VELOCIDAD);</code>	<code>// Regula a velocidade, de envio de pulsos, neste caso será</code>
<code>}</code>	<code>1700 (definido inicialmente).</code>
<code>}</code>	<code>// Fim do programa.</code>

Adicionalmente, o ambiente de desenvolvimento de *software* do Arduino conta com a biblioteca *stepper.h* que já contém toda esta sequência de passos, e permite escrever programas para controle de motores de passo bipolares de forma resumida, especificando unicamente o número de passos por volta do motor empregado e os pinos do Arduino correspondentes a cada motor. Estas bibliotecas permitem usar funções diretas e específicas para indicar o número de passos que se requer, assim como a velocidade de funcionamento do motor. A Tabela 1.6 apresenta o programa para o acionamento da unidade de extração A usando a biblioteca *stepper.h*.

Tabela 1.6 – Exemplo de programa para controle de motor de passo com Arduino usando a biblioteca *Stepper.h*

	<code>// Definição de variáveis</code>
<code>#include<Stepper.h></code>	<code>// Importar biblioteca para controle de motores de passo</code>
<code>#define passos 200</code>	<code>// Número de passos por volta do motor, depende das</code>
	<code>especificações de cada motor.</code>
<code>Stepper motorA(200, 16,17,18,19);</code>	<code>// Dar nome ao motor, especificar número de passos por</code>
	<code>giro e indicar os pinos do Arduino nos quais foram</code>
	<code>conectados as entradas do driver. Steppernomedomotor</code>
	<code>(passos, pin1, pin2, pin3, pin4)</code>
<code>void setup()</code>	<code>// Configuração do programa. Tem todas aquelas</code>
<code>{</code>	<code>instruções que serão executadas uma única vez.</code>

<code>Serial.begin(9600);</code>	//Esta linha inicia a comunicação serial. Executar funções específicas enviando comando via teclado.
<code>motorA.setSpeed(90);</code> <code>}</code>	// Configura a velocidade de rotação do motor em RPM
<code>void loop()</code> <code>{</code> <code>}</code>	// Tem a sequência de instruções das tarefas a serem realizadas indefinidamente. Neste caso esta função está vazia porque a operação do motor foi definida em funções independentes que se executarão só quando forem chamadas via teclado.
<code>void subirA(){</code> <code>motorA.step(2000);</code> <code>delay(1000);</code> <code>}</code>	Esta função, quando chamada, faz com que o êmbolo da seringa na unidade de extração suba. Neste caso subirá uma distância equivalente a 2000 passos do motor
<code>void descerA(){</code> <code>motorA.step(-2000);</code> <code>delay(1000);</code> <code>}</code>	Esta função, quando chamada, faz que o êmbolo da seringa na unidade de extração desça. Neste caso descera uma distância equivalente a 2000 passos do motor
<code>void serialEvent() {</code> <code>if(Serial.available()>0){</code> <code>switch(Serial.read()){</code> <code>case'u':</code> <code>case'U':</code> <code>bajarA();</code> <code>break;</code> <code>case'T':</code> <code>case'i':</code> <code>subirA();</code> <code>break;</code> <code>}</code> <code>}</code> <code>}</code>	Esta sequência de código junto com o Serial.begin definido no set up, executa as funções de subida ou descida só quando estas são chamadas via teclado. A primeira parte do código é encarregada por reconhecer se foi introduzida alguma informação via teclado através do motor serial do Arduino. Os diferentes casos permitem executar as funções específicas, assim quando uma “u” é digitada no monitor serial o êmbolo da seringa na unidade de extração A descera, enquanto que se uma “i” é digitada este subirá.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LCGC. Overview of sample preparation. **LCGC:Liquid Chromatography, Gas Chromatography North America**, v. 33, n. Special, p. 1–7, 2015.
2. MAJORS, R.E. **Sample preparation fundamentals for chromatography**. Santa Clara: Agilent, 2013. 364 p.
3. RAYNIE, D. E.; MAJORS, R. E. Trends in sample preparation. **LCGC**, v. 29, n. 3, p. 142–154, 2016.
4. KOLE, P. L.; VENKATESH, G.; KOTECHEA, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 1, p. 199–217, 2011.
5. BURNS, A. Automated sample preparation. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 1403–1418, 1981.
6. OLSEN, K. The first 110 years of laboratory automation. **Journal of Laboratory Automation**, v. 17, n. 6, p. 469–480, 2012.
7. PRABHU, G. R. D.; URBAN, P. L. The dawn of unmanned analytical laboratories. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 88, p. 41–52, 2017.
8. DESSY, R. Robots in the laboratory: Part II. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 1232A–1264A, 1983.
9. DESSY, R. Robots in the laboratory: Part I. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1100–1114, 1983.
10. ISENHOUR, T. L.; ECKERT, S. E.; MARSHALL, J. C. Intelligent robots: the next step in laboratory automation. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 13, p. 805 A–814 A, 1989.
11. VERAART, J. . R.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, U. A. T. A. Coupling of biological sample handling and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 1–2, p. 483–514, 1999.
12. OWENS, G. D.; ECKSTEIN, R. J. Robotic sample preparation station. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 2347–2351, 1982.
13. YACHIE, N.; CONSORTIUM, R. B.; NATSUME, T. Robotic crowd biology with Maholo LabDroids. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 310–312, 2017.
14. PFANNKOECH, E. Sample preparation for chromatography: how much can be automated? **LCGC**, v. 31, n. 3, p. 34–39, 2013.
15. MACCIO, M. A.; BELL, D. H.; DAVOLOS, D. Modular automation platforms: a case study of a flexible NMR sample preparation robot. **Journal of Laboratory Automation**, v. 11, n. 6, p. 387–398, 2006.
16. BENNETT, R. V; MORZAN, E. M.; HUCKABY, J. O.; MONGE, M. E.;

CHRISTENSEN, H. I.; FERNÁNDEZ, F. M. Robotic plasma probe ionization mass spectrometry (RoPPI-MS) of non-planar surfaces. **The Analyst**, v. 139, n. 11, p. 2658–62, 2014.

17. CHIU, S. H.; URBAN, P. L. Robotics-assisted mass spectrometry assay platform enabled by *open-source* electronics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 64, p. 260–268, 2014.

18. CHEN, C. L.; CHEN, T. R.; CHIU, S. H.; URBAN, P. L. Dual robotic arm "production line" mass spectrometry assay guided by multiple Arduino-type microcontrollers. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 239, p. 608–616, 2017.

19. KRONKVIST, K.; GUSTAVSSON, M.; WENDEL, A. K.; JAEGFELDT, H. Automated sample preparation for the determination of budesonide in plasma samples by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n. 1–2, p. 401–9, 1998.

20. ALEXOVIČ, M.; DOTSIKAS, Y.; BOBER, P.; SABO, J. Achievements in robotic automation of solvent extraction and related approaches for bioanalysis of pharmaceuticals. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1092, p. 402–421, 2018.

21. MAJORS, R.E. Overview of sample preparation. **LCGC**, v. 33, n. 11, p. 46–51, 2015.

22. DRYDEN, M. D. M.; FOBEL, R.; FOBEL, C.; WHEELER, A. R. Upon the shoulders of giants: *open-source* hardware and software in analytical chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 8, p. 4330–4338, 2017.

23. URBAN, P. L. Universal electronics for miniature and automated chemical assays. **The Analyst**, v. 140, n. 4, p. 963–975, 2015.

24. PEARCE, J. M. Impacts of *open-source* hardware in science and engineering., v. 47, n. 3, p. 24–31, 2017.

25. PAPADOPOULOS, N. J.; JANNAKOUDAKIS, A. A chemical instrumentation course on microcontrollers and op amps. construction of a pH meter. **Journal of Chemical Education**, v. 93, n. 7, p. 1323–1325, 2016.

26. ZHANG, Q.; BRODE, L.; CAO, T.; THOMPSON, J. E. Learning laboratory chemistry through electronic sensors, a microprocessor, and student enabling software: A preliminary demonstration. **Journal of Chemical Education**, v. 94, n. 10, p. 1562–1566, 2017.

27. MERCER, C.; LEECH, D. Inexpensive miniature programmable magnetic stirrer from reconfigured computer Parts. **Journal of Chemical Education**, v. 94, n. 6, p. 816–818, 2017.

28. WANG, J. J.; RODRÍGUEZ NÚÑEZ, J. R.; MAXWELL, E. J.; ALGAR, W. R. Build your own photometer: a guided-inquiry experiment to introduce analytical instrumentation. **Journal of Chemical Education**, v. 93, n. 1, p. 166–171, 2016.

29. FAMULARO, N.; KHOLOD, Y.; KOSENKOV, D. Integrating chemistry laboratory instrumentation into the industrial internet: building, programming, and experimenting with an automatic titrator. **Journal of Chemical Education**, v. 93, n. 1, p. 175–181, 2016.
30. WALKOWIAK, M.; NEHRING, A. Using chemduino, excel, and powerpoint as tools for real-time measurement representation in class. **Journal of Chemical Education**, v. 93, n. 4, p. 778–780, 2016.
31. BUI, D. A.; HAUSER, P. C. Analytical devices based on light-emitting diodes - A review of the state-of-the-art. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, n. 1, p. 46–58, 2015.
32. KUBÍNOVÁ, Š.; ŠLÉGR, J. Chemduino: adapting Arduino for low-cost chemical measurements in lecture and laboratory. **Journal of Chemical Education**, v. 92, n. 10, p. 1751–1753, 2015.
33. BROX, P.; HUERTAS-SÁNCHEZ, G.; LÓPEZ-ANGULO, A.; ÁLVAREZ-MORA, M.; HAYA, I. Design of sensory systems using the platform Arduino by undergraduate Physics students. **Technologies Applied to Electronics Teaching**, p. 1–6, 2016.
34. ARRIZABALAGA, J. H.; SIMMONS, A. D.; NOLLERT, M. U. Fabrication of an economical arduino-based uniaxial tensile tester. **Journal of Chemical Education**, v. 94, n. 4, p. 530–533, 2017.
35. ROSA, T. R.; BETIM, F. S.; FERREIRA, R. DE Q. Development and application of a labmade apparatus using open-source "arduino" hardware for the electrochemical pretreatment of boron-doped diamond electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 231, p. 185–189, 2017.
36. HANTAO, L. W.; ALEME, H. G.; PASSADOR, M. M.; FURTADO, E. L.; RIBEIRO, F. A. DE L.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F. Determination of disease biomarkers in Eucalyptus by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate data analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1279, p. 86–91, 2013.
37. SANTOS DE PONTES, Aline. **Desenvolvimento de um fotometro LED-Vis portatil e micorontrolado por Arduino**. 2014.167 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Univeridade Federal da Paraiba, João Pessoa, 2014.
38. ANZALONE, G. C.; GLOVER, A. G.; PEARCE, J. M. *Open-source* colorimeter. **Sensors (Switzerland)**, v. 13, n. 4, p. 5338–5346, 2013.
39. NG, S. M.; WONG, D. S. N.; PHUNG, J. H. C.; CHUA, H. S. Integrated miniature fluorescent probe to leverage the sensing potential of ZnO quantum dots for the detection of copper (II) ions. **Talanta**, v. 116, p. 514–519, 2013.
40. BOND, M.; ELGUEA, C.; YAN, J. S.; PAWLOWSKI, M.; WILLIAMS, J.; WAHED, A.; ODEN, M.; TKACZYK, T. S.; RICHARDS-KORTUM, R. Chromatography paper as a low-cost medium for accurate spectrophotometric assessment of blood hemoglobin concentration. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 12, p. 2381, 2013.

41. VELUSAMY, V.; ARSHAK, K.; KOROSTYNSKA, O.; AL-SHAMMA'A, A. A novel handheld electrochemical analyzer system interfaced to a smartphone. **Key Engineering Materials**, v. 543, p. 47–50, 2013.
42. YANG, B.; PATSAVAS, M. C.; BYRNE, R. H.; MA, J. Seawater pH measurements in the field: A DIY photometer with 0.01 unit pH accuracy. **Marine Chemistry**, v. 160, p. 75–81, 2014.
43. EHGARTNER, J.; WILTSCHE, H.; BORISOV, S. M.; MAYR, T. Low cost referenced luminescent imaging of oxygen and pH with a 2-CCD colour near infrared camera. **The Analyst**, v. 139, n. 19, p. 4924–4933, 2014.
44. AWQATTY, B.; SAMADDAR, S.; CASH, K. J.; CLARK, H. A.; DUBACH, J. M. Fluorescent sensors for the basic metabolic panel enable measurement with a smart phone device over the physiological range. **The Analyst**, v. 139, n. 20, p. 5230–5238, 2014ar.
45. MCCLAIN, R. L. Construction of a photometer as an instructional tool for electronics and instrumentation. **Journal of Chemical Education**, v. 91, n. 5, p. 747–750, 2014.
46. DUY, J.; SMITH, R. L.; COLLINS, S. D.; CONNELL, L. B. A field-deployable colorimetric bioassay for the rapid and specific detection of ribosomal RNA. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 52, p. 433–437, 2014.
47. LI, B.; YANG, S.; AKKUS, O. A customized Raman system for point-of-care detection of arthropathic crystals in the synovial fluid. **The Analyst**, v. 139, n. 4, p. 823, 2014.
48. DE MORAIS, C.; CARVALHO, J. C.; SANT'ANNA, C.; EUGÊNIO, M.; GASPAROTTO, L. H. S.; LIMA, K. M. G. A low-cost microcontrolled photometer with one color recognition sensor for selective detection of Pb²⁺ using gold nanoparticles. **Analytical Methods**, v. 7, n. 18, p. 7917–7922, 2015.
49. SILVA, D. S.; REIS, B. F. Evaluation of the schlieren effect employing a LED-based photometer with a long-pathlength flow cell for reagentless photometric determination of ethanol in distilled ethanolic beverages. **Microchemical Journal**, v. 129, p. 325–331, 2016.
50. HOSSAIN, M. A.; CANNING, J.; YU, Z.; AST, S.; RUTLEDGE, P. J.; WONG, J. K.-H.; JAMALIPOUR, A.; CROSSLEY, M. J. Time-resolved and temperature tuneable measurements of fluorescent intensity using a smartphone fluorimeter. **The Analyst**, v. 142, n. 11, p. 1953–1961, 2017.
51. CHUDOBOVA, D.; CIHALOVA, K.; SKALICKOVA, S.; ZITKA, J.; MERLOS, M.A.R.; MILOSAVLJEVIC, V.; HYNEK, D.; KOPEL, P.; VESELY, R.; ADAM, V.; KIZEK, R. 3D-printed chip for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* labeled with gold nanoparticles. **Electrophoresis**, v.36, p. 457-466, 2015.
52. WILSON, M. V.; WILSON, E. Authentic performance in the instrumental analysis laboratory: Building a visible spectrophotometer prototype. **Journal of Chemical Education**, v. 94, n. 1, p. 44–51, 2017.

53. CABRERA, H.; AKBAR, J.; KORTE, D.; RAMÍREZ-MIQUET, E. E.; MARÍN, E.; NIEMELA, J.; EBRAHIMPOUR, Z.; MANNATUNGA, K.; FRANKO, M. Trace detection and photothermal spectral characterization by a tuneable thermal lens spectrometer with white-light excitation. **Talanta**, v. 183, p. 158–163, 2018.
54. LONCARIC, C.; TANG, Y.; HO, C.; PARAMESWARAN, M. A.; YU, H. Z. A USB-based electrochemical biosensor prototype for point-of-care diagnosis. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 161, n. 1, p. 908–913, 2012.
55. GAUDRY, A. J.; BREADMORE, M. C.; GUIJT, R. M. In-plane alloy electrodes for capacitively coupled contactless conductivity detection in poly(methylmethacrylate) electrophoretic chips. **Electrophoresis**, v. 34, n. 20–21, p. 2980–2987, 2013.
56. TSENG, H. Y.; ADAMIK, V.; PARSONS, J.; LAN, S. S.; MOLFESI, S.; LUM, J.; SHANNON, L.; GRAY, B. Development of an electrochemical biosensor array for quantitative polymerase chain reaction utilizing three-metal printed circuit board technology. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 204, p. 459–466, 2014.
57. DREVINSKAS, T.; KALJURAND, M.; MARUŠKA, A. Capacitance-to-digital: A single chip detector for capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 35, n. 16, p. 2401–2407, 2014.
58. DF ROBOT. **Arduino based pHmeter**. 2018. Disponível em: <[https://www.dfrobot.com/wiki/index.php/PH_meter\(SKU:_SEN0161\)](https://www.dfrobot.com/wiki/index.php/PH_meter(SKU:_SEN0161))>. Acesso em: 14 maio 2018.
59. SALVADOR, C.; MESA, M. S.; DURÁN, E.; ALVAREZ, J. L.; CARBAJO, J.; MOZO, J. D. Open ISEmeter: An open hardware high-impedance interface for potentiometric detection. **Review of Scientific Instruments**, v. 87, n. 5, p. 2–7, 2016.
60. MELONI, G. N. Building a microcontroller based potentiostat: A inexpensive and versatile platform for teaching electrochemistry and instrumentation. **Journal of Chemical Education**, v. 93, n. 7, p. 1320–1322, 2016.
61. BÜRCEL, S. C.; DIENER, L.; FREY, O.; KIM, J.-Y.; HIERLEMANN, A. Automated, multiplexed electrical impedance spectroscopy platform for continuous monitoring of microtissue spheroids. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 22, p. 10876–10883, 2016.
62. LUO, T.; LI, L.; GHORBAND, V.; ZHAN, Y.; SONG, H.; CHRISTEN, J. B. A portable impedance-based electrochemical measurement device. **Proceedings - IEEE International Symposium on Circuits and Systems**, v. 2016, p. 2891–2894, 2016.
63. JIN, H.; QIN, Y.; PAN, S.; ALAM, A. U.; DONG, S.; GHOSH, R.; DEEN, M. J. *Open-source* low-cost wireless potentiometric instrument for ph determination experiments. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 326–330, 2018.
64. BENITO-LOPEZ, F.; COYLE, S.; BYRNE, R.; SMEATON, A.; O'CONNOR, N. E.; DIAMOND, D. Pump less wearable microfluidic device for real time ph sweat monitoring. **Procedia Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1103–1106, 2009.

65. WANG, H.; LIU, Y.; LI, M.; HUANG, H.; XU, H. M.; HONG, R. J.; SHEN, H. Multifunctional TiO₂nanowires-modified nanoparticles bilayer film for 3D dye-sensitized solar cells. **Optoelectronics and Advanced Materials, Rapid Communications**, v. 4, n. 8, p. 1166–1169, 2010.
66. CURTO, V. F.; COYLE, S.; BYRNE, R.; DIAMOND, D.; BENITO-LOPEZ, F. Real-time sweat analysis: Concept and development of an autonomous wearable micro-fluidic platform. **Procedia Engineering**, v. 25, p. 1561–1564, 2011.
67. VERBARG, J.; KAMGAR-PARSI, K.; SHIELDS, A. R.; HOWELL, P. B.; LIGLER, F. S. Spinning magnetic trap for automated microfluidic assay systems. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 10, p. 1793, 2012.
68. CZUGALA, M.; GORKIN III, R.; PHELAN, T.; GAUGHRAN, J.; CURTO, V. F.; DUCRÉE, J.; DIAMOND, D.; BENITO-LOPEZ, F. Optical sensing system based on wireless paired emitter detector diode device and ionogels for lab-on-a-disc water quality analysis. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 23, p. 5069, 2012.
69. CURTO, V. F.; COYLE, S.; BYRNE, R.; ANGELOV, N.; DIAMOND, D.; BENITO-LOPEZ, F. Concept and development of an autonomous wearable micro-fluidic platform for real time pH sweat analysis. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 175, p. 263–270, 2012.
70. YAFIA, M.; NAJJARAN, H. High precision control of gap height for enhancing principal digital microfluidics operations. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 186, p. 343–352, 2013.
71. FOBEL, R.; FOBEL, C.; WHEELER, A. R. DropBot: An *open-source* digital microfluidic control system with precise control of electrostatic driving force and instantaneous drop velocity measurement. **Applied Physics Letters**, v. 102, n. 19, p. 101-106, 2013.
72. CHOI, K. et al. Automated digital microfluidic platform for magnetic-particle-based immunoassays with optimization by design of experiments. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 20, p. 9638–9646, 2013.
73. GALAS, J.-C.; HAGHIRI-GOSNET, A.-M.; ESTÉVEZ-TORRES, A. A nanoliter-scale open chemical reactor. **Lab Chip**, v. 13, n. 3, p. 415–423, 2013.
74. MITCHELL, K. A.; CHUA, B.; SON, A. Development of first generation in-situ pathogen detection system (Gen1-IPDS) based on NanoGene assay for near real time E. coli O157: H7 detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p. 229–236, 2014.
75. SÁIZ, J.; KOENKA, I. J.; GARCÍA-RUIZ, C.; MÜLLER, B.; CHWALEK, T.; HAUSER, P. C. Micro-injector for capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 36, n. 16, p. 1941–1944, 2015.
76. CHEN, H.; PETKOVIC-DURAN, K.; BEST, M.; ZHU, Y. Bubble-induced acoustic mixing in a microfluidic device. **Proceedings of SPIE**, v. 9668, p. 966812, 2015.

77. KADIMISETTY, K.; MALLA, S.; SARDESAI, N. P.; JOSHI, A. A.; FARIA, R. C.; LEE, N. H.; RUSLING, J. F. Automated multiplexed ecl immunoarrays for cancer biomarker proteins. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 8, p. 4472–4478, 2015.
78. KOENKA, I. J.; KÜNG, N.; KUBÁŇ, P.; CHWALEK, T.; FURRER, G.; WEHRLI, B.; LLER, B.; HAUSER, P. C. Thermostatted dual-channel portable capillary electrophoresis instrument. **Electrophoresis**, v. 37, n. 17–18, p. 2368–2375, 2016.
79. RUSLING, J. F. Low-cost microfluidic arrays for protein-based cancer diagnostics using ecl detection. **The Electrochemical Society Interface**, p. 47–51, 2016.
80. OBORNY, N. J.; COSTA, E. E. M.; SUNTORNSUK, L.; ABREU, F. C.; LUNTE, S. M. Evaluation of a portable microchip electrophoresis fluorescence detection system for the analysis of amino acid neurotransmitters in brain dialysis samples. **Analytical Sciences : the International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 35–40, 2016.
81. KHANFAR, M. F.; AL-FAQHERI, W.; AL-HALHOULI, A. Low cost lab on chip for the colorimetric detection of nitrate in mineral water products. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 10, p. 1–9, 2017.
82. BOGUSZ, S.; HANTAO, L. W.; BRAGA, S. C. G. N.; DE MATOS FRANÇA, V. D. C. R.; DA COSTA, M. F.; HAMER, R. D.; VENTURA, D. F.; AUGUSTO, F. Solid-phase microextraction combined with comprehensive two-dimensional gas chromatography for fatty acid profiling of cell wall phospholipids. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 18, p. 2438–2444, 2012.
83. CHARLTON, J. J.; SEPANIAK, M. J.; SIDES, A. K.; SCHAAFF, T. G.; MANN, D. K.; BRADSHAW, J. A. The automation and optimization of solid phase extraction inductively coupled plasma mass spectrometry analysis for the high throughput determination of aqueous levels of U, Th, Np, Pu, and Am. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, n. 5, p. 711, 2013.
84. KONGKEDSUK, J.; HONGWITAYAKORN, A.; BOOTNAPANG, W.; BOONTO, N.; CHAISUKSANT, R. Development of sequential injection analysis using peristaltic pump and electrochemical detection for antioxidant capacity test by AB2 assay. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 40, n. 2, p. 224–231, 2013.
85. KAMOGAWA, M. Y.; MIRANDA, J. C. Uso de hardware de código fonte aberto “Arduino” para acionamento de dispositivo solenoide em sistemas de análises em fluxo. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1232–1235, 2013.
86. SEE, H. H.; HAUSER, P. C. Automated electric-field-driven membrane extraction system coupled to liquid chromatography – Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 8665–8670, 2014.
87. GHOSH, A.; SEELEY, S. K.; SEELEY, J. V. Iterative trapping of gaseous volatile organic compounds in a capillary column. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 14, p. 6993–7000, 2014.

88. HU, J.-B.; CHEN, S.-Y.; WU, J.-T.; CHEN, Y.-C.; URBAN, P. L. Automated system for extraction and instantaneous analysis of millimeter-sized samples. **RSC Advances**, v. 4, n. 21, p. 10693, 2014.
89. MIRANDA, J. C.; KAMOGAWA, M. Y.; REIS, B. F. Development of a portable setup and a multicommuted flow analysis procedure for the photometric determination of Fe(III) and Fe(II) in fresh water. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 207, n. PartA, p. 811–818, 2015.
90. HSIEH, K.-T.; LIU, P.-H.; URBAN, P. L. Automated on-line liquid–liquid extraction system for temporal mass spectrometric analysis of dynamic samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 894, p. 35–43, 2015.
91. LIU, P.; URBAN, P. L. Plug-volume-modulated dilution generator for flask-free **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 23, p. 11663–11669, 2016.
92. CHEN, S. Y.; WU, C. Y.; CHEN, Y. C.; URBAN, P. L. One-step detection of major lipid components in submicroliter volumes of unpurified liposome and cell suspensions. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 14, p. 7337–7343, 2016.
93. BARBESI, D.; VICENTE VILAS, V.; MILLET, S.; SANDOW, M.; COLLE, J. Y.; ALDAVE DE LAS HERAS, L. A LabVIEW®-based software for the control of the AUTORAD platform: a fully automated multisequential flow injection analysis Lab-on-Valve (MSFIA-LOV) system for radiochemical analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 313, n. 1, p. 217–227, 2017.
94. HARSHMAN, D. K.; REYES, R.; PARK, T. S.; YOU, D. J.; SONG, J. Y.; YOON, J. Y. Enhanced nucleic acid amplification with blood in situ by wire-guided droplet manipulation (WDM). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 53, p. 167–174, 2014.
95. CHEN, C.-L.; CHEN, T.-R.; CHIU, S.-H.; URBAN, P. L. Dual robotic arm “production line” mass spectrometry assay guided by multiple Arduino-type microcontrollers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 239, n. Supplement C, p. 608–616, 2017.
96. CARVALHO, M. C.; MURRAY, R. H. Osmar, the *open-source* microsyringe autosampler. **HardwareX**, v. 3, p. 10–38, 2018.
97. SCHERZ, P. **Practical electronics for inventors**. New York: McGraw-Hill, 2002. 952 p.
98. SCARPINO, M. **Motors for makers: A guide for steppers, servos another electrical machines**. Indianapolis: Que Publishing, 2015. 317 p.
99. KENJO, T.; SUGAWARA, A. **Stepping motors and their microprocessor controls**. Oxford: Clarendon Press, 1984. 252 p.
100. McCOMB, G. **Robot builder's bonanza**. New York: McGraw-Hill, 2002. 768 p.
101. CODE, CIRCUITS, & CONSTRUCTION. **All about microcontrollers**. 2014. Disponível em: <<http://www.tigoe.com/pcomp/code/controllers/all-about-microcontrollers/>>. Acesso em: 02 abr. 2015.

102. CRISP, J. **Introduction to microprocessors and microcontrollers**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2044. 278 p.
103. PEARCE, J.M. ***Open-source lab, how to build own hardware and reduce research cost***. Oxford: Elsevier, 2014. 274 p.
104. **ARDUINO home**, 2006. Disponível em: <<https://www.arduino.cc/>>. Acesso em 02 abr. 2018
105. WARREN, J.D.; ADAMS, J.; MOLLE, H. **Arduino robotics**. New York: Apress, 2011. 628 p.
106. THE UNIVERSITY OF IOWA. Department of Computer Science. **Control of stepping motors a tutorial**. 2014. Disponível em: <<http://homepage.cs.uiowa.edu/~jones/step/>>. Acesso em: 02 abr. 2015.

Robô cartesiano multisseringa para a automatização da MEPS

1. INTRODUÇÃO - MEPS

A microextração por sorvente empacotado (MEPS) é uma forma miniaturizada da extração em fase sólida convencional (SPE) que utiliza quantidades de sorvente da ordem de poucos miligramas. Esse sorvente é preenchido junto à agulha ou no interior do corpo de uma microsseringa. Os volumes de eluição utilizados são próximos a 50 μL , sendo, em alguns casos, aproveitados em sua totalidade para injeção no sistema cromatográfico [1-3].

A MEPS foi desenvolvida no ano de 2003 nos laboratórios da AstraZeneca (Södertälje, Suécia) por Mohamed Abdel-Rehim [4-6]. Inicialmente, a técnica foi projetada para a análise de fármacos em sangue a partir de pequenos volumes de amostra (μL). No entanto, desde o início de sua comercialização até hoje, tem se difundido amplamente para a análise de um grande número de analitos e em diversas matrizes.

Diversos fatores têm contribuído para o incremento da popularidade da MEPS como técnica de extração, ante técnicas como a SPE convencional em cartuchos ou a extração líquido-líquido (LLE), entre eles podem-se mencionar: facilidade de uso, possibilidade de automatização, rapidez, alta preconcentração, redução no consumo de solventes e o baixo custo por amostra [7].

Adicionalmente, alguns autores têm apontado algumas vantagens da MEPS frente a outras técnicas de microextração como a SPME. Por exemplo, a MEPS é uma técnica mais robusta quanto à resistência mecânica do cartucho frente às fibras, além de permitir a extração exaustiva dos analitos [8]. Outras características da MEPS frente à SPE e à SPME podem ser encontradas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Comparação entre MEPS, SPE e SPME [8]

	MEPS	SPME	SPE
Quantidade de sorvente	2-4 mg	<2 mg	50- 2000 mg
Tempo de manipulação	1 - 2 min	20 - 40 min	15 - 20 min
Reuso	100 extrações	50 extrações	1 extração
% de recuperação	Alta	Baixa	Alta
Sensibilidade	Alta	Baixa	Alta

1.2 BREVE DESCRIÇÃO DA MEPS

O preparo de amostras por MEPS é realizado mediante um dispositivo denominado no sistema comercial como BIN (*barrel insert and needle assembly*), preenchido com aproximadamente 2 mg de fase extratora e acoplado na parte superior da agulha removível de uma microseringa analítica (100 – 250 μ L), tal como é esquematizado na Figura 2.1. Cada BIN pode ser reutilizado por até cerca de 100 vezes, dependendo do tipo de amostra, o que permite a análise de uma sequência de amostras [9].

Figura 2.1 – Esquema geral do dispositivo empregado na extração mediante MEPS [9].

O procedimento geral de extração por MEPS consta basicamente de quatro etapas: amostragem, lavagem, eluição e injeção; tal como representado na Figura 2.2.

Figura 2.2 – Esquema geral do procedimento de extração mediante MEPS (Autoria própria).

- ***Amostragem***

Durante a amostragem, com ajuda do êmbolo da seringa, a amostra é puxada através do dispositivo de extração, os analitos são retidos no sorvente empacotado e a matriz remanescente é descartada. A eficiência da extração durante essa etapa depende principalmente do volume da amostra, o número de vezes que a amostra passa através do dispositivo, e da natureza e quantidade de sorvente empacotado.

Geralmente a recuperação aumenta com o número de ciclos de amostragem (aspirar/dispensar) até: (i) saturar a fase extratora, (ii) exaurir o analito presente na amostra, ou (iii) atingir o equilíbrio de distribuição entre as duas fases. O número de ciclos de amostragem é próprio de cada método. O fator de maior importância para obter altas recuperações é a escolha adequada do sorvente. Comercialmente se encontram disponíveis algumas fases: sílica, C₁₈, C₈, C₂ e C₈+SCX.

Também se têm descrito o emprego de materiais de acesso restrito (RAM), copolímeros de poliestireno-divinibenzeno (PS-DVB) ou polímeros molecularmente impressos (MIP), entre outros [1,10]. Porém, em dispositivos indisponíveis comercialmente. Fases estacionárias do tipo C₂-C₁₈ são adequadas para analitos lipofílicos, enquanto que as fases poliméricas (PS-DVB) ou de troca iônica são adequadas para a extração de compostos polares ou com características ácido/base.

- ***Lavagem***

A seletividade da extração depende dessa etapa, pois o seu objetivo é eliminar interferentes da matriz que eventualmente podem ficar retidos no sorvente durante a amostragem sem perdas do analito. Fatores como pH, composição e volume do solvente de lavagem devem ser otimizados. São recomendados volumes de água entre 50 e 100 µL contendo 5 a 10% de solvente orgânico (metanol, isopropanol ou acetonitrila, principalmente).

Frequentemente é aconselhado secar a fase extratora após a lavagem, porém, devido à pequena quantidade de sorvente e alguns tipos de materiais, em algumas situações essa etapa não se faz necessária.

- ***Eluição***

A escolha do solvente de eluição deve garantir que o analito extraído na fase extratora possa ser recuperado quantitativamente. Nessa etapa, as variáveis importantes são a natureza e

o volume de solvente empregado, o número de ciclos de eluição, assim como o controle do pH na eluição de analitos ionizáveis.

Geralmente são utilizados solventes orgânicos em teor superior a 60% (metanol, isopropanol ou acetonitrila), puros ou misturados com solução de ácido ou base (0,1 – 3%). Comumente a recuperação analítica aumenta quando o volume de solvente de eluição aumenta, e esse volume pode variar usualmente entre 20 e 200 µL.

- ***Dessorção e injeção***

O solvente empregado deve ser compatível com o sistema cromatográfico. Geralmente, os volumes de eluição empregados são maiores que o volume de injeção suportado pelo sistema cromatográfico, de maneira que só uma parte do analito recuperado poderá ser analisado o que, eventualmente, pode diminuir a sensibilidade do método.

Quando os volumes de eluição são muito grandes, pode ser incluída uma etapa de focalização dos analitos, mediante o emprego de sistemas de *column switching* em HPLC e injeção de grande volume (LVI, *large volume injection*) em GC ou HPLC.

Finalmente, para evitar efeitos de memória (*carry over*) em posteriores extrações que impliquem a reutilização do BIN, é recomendado lavar a fase extratora por 3 a 4 vezes. Duas soluções de lavagem são recomendadas: uma de “lavagem forte”, constituída por um solvente orgânico como metanol, isopropanol ou acetonitrila, com uma pequena quantidade de ácido ou base (dependendo da natureza do analito) e, uma solução de “lavagem fraca” composta por água pura ou de 5% de metanol em água. A solução de eluição pode ser empregada também como solução de lavagem forte, seguida de lavagem com água pura. Essa última solução tem por finalidade recondicionar a fase para a próxima extração.

Cumprе ressaltar que, em alguns casos, como durante a extração de fármacos a partir de amostras de sangue, é necessário um pré-tratamento da amostra que implica sua diluição para prevenir o entupimento do BIN, a eliminação de macro partículas mediante centrifugação, ajuste do pH e correção da força iônica.

1.3 APLICAÇÕES DA MEPS

Na literatura científica pode-se encontrar descrita a utilização da MEPS para a extração de um grande número de fármacos e seus metabólitos a partir de amostras biológicas, como sangue, plasma, urina ou cabelo. Outras aplicações incluem diversos poluentes em amostras de

interesse ambiental, assim como vários analitos de interesse no controle de qualidade na indústria de bebidas e alimentos. A Tabela 2.2 sumariza algumas das aplicações da MEPS para a extração de diversos analitos em matrizes de interesse biológico, ambiental, alimentar e inclusive na área de produtos naturais (PNs).

Tabela 2.2 - Resumo de algumas das aplicações da MEPS na análise de diversos tipos de amostras.

	Matriz	Analito	Sorvente	Método analítico	Ref.
Amostras de origem biológica	Sangue	Antipsicóticos (clozapina e seus metabólitos)			[11]
		Imunossupressores (ciclosporina, everolimus, sirolimus, outros)	C8, C18	LC-MS/MS	[12]
		Anestésicos locais (lidocaína, ropivacaína, bupivacaína)	C18	LC-MS/MS	[13]
	Plasma	Acebutolol e metoprolol	PS	LC-MS/MS	[14]
		Anticancerígenos (AZD3409)	PS	LC-MS/MS	[15]
	Urina	Antidepressivos (dopamina, serotonina)	C8	GC-MS LC-MS/MS	[16]
		Drogas de abuso (cocaína e metabolitos)	C8, ENV, MCX	DART-TOF	[17]
		Antibióticos fluoroquinolonas	C18	NACE-MS	[18]
	Saliva	Anestésicos locais (lidocaína)	C8	LC-MS/MS	[19]
		Antipsicóticos (risperidona)	C8	LC-UV	[20]
Amostras ambientais	Água	Clorobenzenos	C18	LVI-GC-MS	[21]
		Estrógenos	ZIF-8	UPLC-MS/MS	[22]
		Nitro e policíclicos almíscares	C18	LVI-GC-MS	[23]
		Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	C18	LVI-GC-MS	[24]
		Antibacterianos (parabeno, triclosan)	C18	LVI-GC-MS	[25]
Bebidas e alimentos	Vinho	Ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico	C2, C8, C18,	UHPLC-DAD	[26]
		Flavonóides	C8	UHPLC	[27]
	Leite	Melamina	PMME	HPLC	[28]
	Ovos	Antibióticos sulfonamidas	C8, SCX	LC-DAD	[29]
PNs	Extrato (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Ácido rosmarínico	CMK-3	LC-UV	[30]

1.4 ANTECEDENTES NA AUTOMATIZAÇÃO DA MEPS

A MEPS foi inicialmente desenvolvida como uma técnica de preparo de amostra miniaturizada e passível de automação de forma *at-line* [9]. No entanto, tal acoplamento não é sempre possível porque os volumes de eluição são frequentemente maiores que os suportados pelo sistema de injeção dos sistemas cromatográficos convencionais [31].

Na literatura é possível encontrar um bom número de relatos referentes à descrição de sistemas automatizados de MEPS, associados à GC ou LC (HPLC, UPLC e μ LC) de forma *at-line* e *off-line* (Figura 2.3).

Figura 2.3 – Sistemas comercialmente disponíveis para automatização da MEPS. a) Seringa eVOL[®] (SGE Analytical Science, Melbourne, Austrália). b) CTC PAL-System Autosampler.

A forma de automatização *at-line* é a mais frequentemente relatada para esta técnica de extração. Neste caso, o preparo e a injeção da amostra são realizados pelo injetor automático do sistema cromatográfico. Atualmente encontra-se comercialmente disponível uma gama razoável desse tipo de equipamentos, podendo o custo superar a casa de 50 mil dólares, dependendo do modelo e do fabricante. Por exemplo, recentemente foi descrito o uso de um amostrador automático multipropósito MPS2 (Gerstel, Alemanha), para a análise completamente automatizada por GC de clorobenzenos em um conjunto de amostras de água de rio. Os autores ressaltaram a reprodutibilidade do método proposto ($RSD \leq 12\%$) [21].

O acoplamento *at-line* à GC requer o uso de sistemas de injeção do tipo LVI ou PTV (*programmable temperature vaporization*) que permitem a injeção de grandes volumes de

amostra (10 - 50 μL). No caso do acoplamento com a LC tem sido relatada a injeção de volumes de eluição de até 50 μL [6,25].

No caso da automatização *off-line*, recentemente foi relatada a utilização de uma seringa eVOL[®] controlada digitalmente (SGE *Analytical Science*, Melbourne, Austrália) associada com UHPLC, aplicada à análise de biomarcadores em amostras de urina [32] e de prenilflavonóides em amostras de cerveja [33]. Os autores destacaram a rapidez, robustez, exatidão e precisão da análise.

Convém, todavia, destacar que com o uso de colunas de altíssima eficiência em HPLC e UHPLC requer-se uma limitação no volume máximo a ser injetado, sob o risco de perda significativa da eficiência cromatográfica. De maneira análoga à GC com o uso de colunas capilares, o volume também costuma ser limitado a poucos microlitros, a menos que estratégias de LVI ou PTV sejam usadas.

As duas principais desvantagens da MEPS são atribuíveis ao reduzido número de fases estacionárias disponíveis nos dispositivos comerciais e a laboriosidade dos procedimentos. Para resolver a carência em variabilidade de fases estacionárias, em anos anteriores nosso grupo de pesquisa desenvolveu dispositivo para MEPS, facilmente desmontável e acoplável em seringas de agulha removível [34]. Este dispositivo apresenta a grande vantagem de ser facilmente preenchível com qualquer fase estacionária comercial ou *lab-made* (Figura 2.4).

Figura 2.4 – Dispositivo *lab-made* para microextração por sorvente empacotado [34].

Com o intuito de continuar promovendo os avanços no desenvolvimento de MEPS, esta parte da presente tese de doutorado se propôs a construção e desenvolvimento de um sistema tipo robô cartesiano capaz de operar um arranjo de múltiplas seringas, de forma que seja passível de preparar um conjunto de amostras de forma simultânea, porém conservando a independência nos parâmetros em cada um dos procedimentos (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Esquema ilustrativo do robô cartesiano multisseringa projetado (Autoria própria).

2. OBJETIVOS

- Desenvolver um sistema tipo robô cartesiano capaz de operar um arranjo de múltiplas seringas de forma simultânea e independente, para o preparo automatizado de um conjunto de amostras mediante microextração por sorvente empacotado (MEPS).
- Validar o desempenho, funcionamento e aplicabilidade do protótipo construído, avaliando sua precisão e exatidão no manuseio de alíquotas de amostras e solventes, assim como sua capacidade para executar protocolos de extração por MEPS, com alta reprodutibilidade e produtividade.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 PARTES E COMPONENTES DO PROTÓTIPO DESENVOLVIDO

Perfis estruturais de alumínio T-Slot, porcas T, fusos T e placas de união para montagem da estrutura metálica foram adquiridos da Gjr Com Ind (São Carlos, SP-Brasil). Atuadores lineares constituídos por fusos de esferas com castanha (16 x 460 mm, passo: 0,5 mm) e eixos lineares (16 x 460 mm) suportados em rolamentos, mancais, e *pillow blocks* e motores de passo bipolares Nema 17, passo: 1,8 °, torque: 0,5 Nm, 1,6 A foram adquiridos da Kalatec automação industrial (Campinas, SP-Brasil). Serviços mecânicos adicionais, como montagem, usinagem fabricação de peças sob medida em alumínio ou poliacetal foram contratados com a Gjr Com Ind (São Carlos, SP-Brasil).

Microcontrolador Arduino Mega 2560, módulos de circuito integrado dupla ponte H L298N e A4988, fonte AC/DC 12V 10 A, módulos relê e implementos eletrônicos adicionais (conectores, solda, etc) foram adquiridos da Ca & Ma componentes eletrônicos (São Carlos, SP-Brasil).

Programas para operação do protótipo desenvolvido, assim como programas específicos para execução controlada dos experimentos para diferentes procedimentos de extração foram escritos no ambiente de desenvolvimento de Arduino (Arduino IDE, *integrated development environment*). Uma cópia do programa desenvolvido para o controle do protótipo desenvolvido nesta parte do trabalho se encontra disponível na documentação suplementar (Programa PA1).

3.2 PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Padrões analíticos de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Soluções estoque (500 mg.L⁻¹) foram preparadas a partir do reagente analítico sólido em MeOH:DCM (1:1) grau HPLC (Fairfield, OH, EUA) e armazenadas a 4 °C. Os solventes diclorometano (DCM), metanol (MeOH) e acetonitrila (MeCN) grau de análise cromatográfica, foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.3 PROCEDIMENTOS AUTOMATIZADOS DE PREPARO DE AMOSTRAS

3.3.1 Preparo de soluções padrão

Soluções padrão de HPAs foram preparadas programando o protótipo para que, operando uma seringa de 250 μL , tomasse uma alíquota de 25 μL de uma solução estoque de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ em MeOH:DCM (1:1) e os transferisse a um segundo frasco contendo 975 μL de água ultrapura.

Procedimento idêntico de preparo de soluções padrão foi realizado manualmente utilizando uma micropipeta de 100 μL . Todas as amostras foram preparadas em triplicata, os dois grupos de soluções foram injetadas no sistema cromatográfico (5 μL) e a reprodutibilidade das áreas dos picos cromatográficos foi calculada.

3.3.2 Extração de HPAs a partir de amostras de esgoto sanitário mediante MEPS automatizada

Uma amostra de 10 mL de esgoto sanitário coletado na entrada da planta de tratamento Monjolinho (São Carlos, SP), foi enriquecida com 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos HPAs avaliados como analitos modelo. Desta, tomaram-se seis alíquotas de 1,0 mL. O protótipo foi programado para realizar a sequência de etapas de condicionamento, amostragem, lavagem e eluição segundo os parâmetros programados, operando uma seringa de 250 μL equipada com um dispositivo comercial para extração mediante MEPS empacotado com fase estacionária C-18 (~ 2 mg). Procedimentos similares foram executados de forma manual. Os extratos assim obtidos foram injetados no sistema cromatográfico (5 μL).

3.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As análises foram realizadas utilizando um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu (20A Prominence), dotado de duas bombas LC-20AD, um *autosampler* SIL-20A, um forno para coluna CTO-20A e um detector UV/Vis SPD 20A. Empregou-se uma coluna analítica Poroshell 120 EC-C-18 (3,0 x 100 mm; 2,7 μm) da Agilent

Technologies. As análises foram realizadas no modo isocrático de eluição, empregando como fase móvel H₂O:MeCN (30:70).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONSTRUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO PROTÓTIPO

De acordo com as etapas do procedimento genérico de MEPS, o sistema para automatização *off-line* desta técnica requer um sistema capaz de posicionar cada uma das microseringas corretamente em cada uma das etapas e manipular seu êmbolo com adequada precisão.

O sistema cartesiano desenvolvido é basicamente constituído por um suporte para amostras e solventes com deslocamento horizontal e um braço mecânico dotado de um dispositivo de movimentação na direção vertical, que por sua vez suporta um arranjo de atuadores lineares capaz de operar seis microseringas de forma simultânea, tal como é representado na fotografia apresentada na Figura 2.6.

Figura 2.6 – Fotografia do protótipo construído indicando suas partes principais (Autoria própria).

4.1.1 Montagem do protótipo

Como apresentado previamente na Figura 2.6, o protótipo consiste de uma estrutura em perfil de alumínio extrudado, equipado com mecanismos de posicionamento espacial horizontal (X), e vertical (Z), comandados por motores de passo e fusos de esferas que possibilitam a execução sequencial e sincronizada de movimentos, transportando as microseringas através da plataforma horizontal de suporte de vias e amostras.

Na construção deste protótipo foram empregados seis motores de passo bipolares KTC-5017-010 de 0,5A e 1 kg cm⁻¹ de torque (Kalatec automação, Campinas SP), para o acionamento das unidades de extração e, dois motores 17HS2408 de 1,7A e 5 kg cm⁻¹ para o acionamento dos eixos X e Z dos mecanismos cartesianos de posicionamento.

No eixo X, o protótipo foi equipado com uma plataforma de alumínio, onde *racks* com recipientes de amostras e solventes são alojados. A plataforma horizontal (Figura 2.7a) foi construída a partir de quatro perfis estruturais de 40 x 40 x 500 mm e 40 x 40 x 400 mm, unidos por conectores universais em aço galvanizado para perfil estrutural de alumínio e placas de união.

Figura 2.7 – Fotografias do protótipo construído. a) Plataforma horizontal e eixo X; b) suportes de *vials* e amostras acoplados sobre a plataforma horizontal; C) vista posterior do protótipo mostrando a grade de suporte vertical, o eixo Z, a fonte de alimentação e a caixa do circuito de controle (Autoria própria).

A base horizontal foi equipada com quatro bases de nivelamento anti-vibração. O mecanismo de movimento do eixo X foi montado usando um fuso de esferas com porca, operado por um motor de passo Nema 17, e duas guias lineares que suportam a plataforma horizontal (Figura 2.7a) mediante *pillow blocks*. Esta plataforma horizontal é responsável pelo transporte de amostras no plano XY, permitindo o adequado posicionamento dos frascos justamente embaixo das unidades de extração, segundo demande a execução da sequência condicionamento, amostragem, lavagem e eluição, do procedimento de MEPS.

Foram construídos, suportes para frascos (*vials*) de diferentes tamanhos. O fundo destes suportes foi equipado com molas flexíveis, permitindo a operação com recipientes de diferente volume. As molas permitem encostar a ponta da agulha no fundo do *vial* sem danificar o sistema (Figura 2.7b).

O suporte vertical (Figura 2.7c) está conformado por uma grade em forma de H, construída a partir de quatro perfis estruturais de alumínio de 40 x 40 x 500 mm e 40 x 40 x 400 mm, acoplada perpendicularmente à base horizontal, mediante conectores universais em aço galvanizado para perfil estrutural de alumínio e placas triangulares de união de alumínio. O mecanismo de posicionamento do eixo X está alojado na base horizontal, enquanto o suporte vertical segura o mecanismo de posicionamento no eixo Z, responsável pelo movimento vertical do arranjo de microseringas.

Acoplado no eixo Z, um arranjo linear de múltiplos *drivers* de microseringa, equipados cada um com o seu próprio mecanismo de acionamento, e sendo comandados de forma independente, permitem a operação controlada e independente das seringas na pipetagem de amostras e solventes. O arranjo de múltiplos *drivers* de seringa foi montado sobre uma placa de alumínio suportada por guias lineares apoiadas em quatro mancais e segurada por quatro *pillow blocks*. Um atuador linear, conformado por um fuso de esferas com porca, operado por um motor de passo Nema 17, e duas guias lineares, permite o deslocamento lateral do arranjo de múltiplos *drivers* de seringa no eixo.

Inicialmente uma única unidade de *driver* da seringa foi montada (Figura 2.8a). Este é um sistema montado a partir de uma estrutura em acrílico e é composto por um sistema guia de agulha, um sistema de suporte da seringa, e um atuador linear composto por motor de passo, fuso sem fim e guias lineares. A guia permite alinhar a agulha com o centro dos recipientes de amostra e solvente, evitando acidentes por choque nas bordas e paredes dos recipientes.

Figura 2.8 – Fotografias do protótipo construído. a) Um *driver* de seringa individual; b) Arranjo de seis *drivers* de seringa acoplados no eixo Z (Autoria própria).

A guia é composta por um *holder* com furo, onde se encaixa o extremo inferior da agulha. Este *holder*, por sua vez, é segurado por um par de guias lineares equipadas com molas de compressão. As guias lineares são apoiadas pelo suporte do extremo inferior da seringa e sua altura pode ser regulada pelo ajuste de uma trava metálica incorporada na sua parte superior.

A cabeça da seringa é alojada em uma peça de acrílico com design específico e segura por uma porca de poliacetal. O êmbolo é alojado e acionado com ajuda de um suporte de poliacetal equipado com um parafuso de ajuste e acoplado ao mecanismo de movimento axial composto por guias lineares e parafuso sem fim acoplado e acionado por um motor de passo Nema 17. Com base neste mecanismo, o arranjo de múltiplos drivers para operação simultânea e independente de um conjunto de seringas foi construído (Figura 2.8b).

Sobre uma placa de alumínio foram acoplados seis sistemas guias de agulha, seis sistemas de suporte da seringa e seis atuadores lineares, para movimentação dos êmbolos. Cada um destes atuadores composto por motor de passo, fuso sem fim e guias lineares e um *holder* de êmbolo. Este mecanismo permite a operação de até seis seringas simultaneamente, mantendo a independência no volume pipetado e o número de ciclos de aspirar/dispensar.

4.1.2 Circuito de controle

O circuito para controle do protótipo de sistema cartesiano multisseringa desenvolvido é apresentado na Figura 2.9 e brevemente explicado na sequência.

O protótipo é acionado por oito motores de passo Nema 17 controlados por um microcontrolador Arduino Mega 2560 através de circuitos integrados dupla ponte H. Para satisfazer os requerimentos em consumo de corrente dos motores usados, foram empregados seis módulos de circuitos integrados com dupla ponte H tipo L298N para controle dos motores KTC-5017-010 (0,5A), dos *driver* de seringa nas unidades de extração independentes e dois módulos de circuitos integrados com dupla ponte H tipo A4988 para controle dos motores 17HS2408 dos eixos X e Z dos mecanismos cartesianos do protótipo.

Cada um dos motores é controlado e alimentado desde seu correspondente circuito dupla ponte H. O circuito integrado L298N contém duas pontes H de transistores. Pode ser usado para controlar simultaneamente dois motores DC ou um motor de passo. O circuito integrado A4988 é também uma dupla ponte H que opera com uma tensão de 8 a 35 V e pode fornecer aproximadamente 1 A por fase sem a necessidade de um dissipador, ou 2 A por bobina com refrigeração adicional.

Com motores cujo consumo é maior do que 1 A, o L298N pode se aquecer excessivamente, o que leva a perda de passos no controle do motor, enquanto que o A4988 produz menos calor e conta com um pino Vref que permite controlar a corrente de saída proporcionada ao motor, evitando desta forma o aquecimento excessivo do circuito. A arquitetura interna do A4988 é diferente da apresentada para o L298N, de maneira que seus esquemas de conexão e controle mediante Arduino podem resultar ligeiramente diferentes.

Cada um destes módulos conta com bornes para conexão das bobinas do motor, alimentação entre 5 e 12 V, conexão a terra (GND) e quatro entradas lógicas, correspondentes a cada um dos terminais das bobinas. O Arduino controla os motores de passo por meio de saídas digitais ligadas às entradas lógicas dos L298N e A4988 mediante o envio de pulsos digitais.

Finalmente todo o circuito foi alimentado com uma fonte chaveada 12V,10A - 110/220V bivolt (Lednovo) acionada mediante um interruptor unipolar luminoso (*on*, *off*).

Figura 2.9 – Circuito para controle do protótipo de sistema cartesiano multisseringa desenvolvido (Autoria própria).

4.1.3 Programa de controle

O *software* para o controle completo do protótipo desenvolvido é constituído por programas para controle independente para cada um dos motores e um grupo de sequências lógicas para o acionamento coordenado e simultâneo das unidades de extração e dos mecanismos cartesianos. Foram escritos programas para o posicionamento cartesiano e funções complexas que abrangem o acionamento simultâneo e coordenado das unidades de extração. Cada uma das etapas de um procedimento de extração por MEPS é realizada através de cada uma destas funções.

A Figura 2.10 é uma vista da tela de início do programa final na interface Arduino. Ao abrir o programa o usuário encontra três abas: “procedimento de extração”, “funções” e “variáveis”. A aba “variáveis” contém todas as instruções para que o usuário possa operar o equipamento. É nesta aba que se deve especificar o volume e o número de ciclos de cada uma das etapas do procedimento a executar.

Na aba “funções” encontram-se todas as funções e programas criados. Nesta aba estão os programas para os movimentos cartesianos, a operação individual de cada uma das unidades de extração, as funções para cada uma das etapas do protocolo MEPS e as sequências lógicas para sua coordenação. Esta aba não deve ser modificada pelo usuário. Qualquer alteração em alguma das funções contidas aqui pode prejudicar o funcionamento do protótipo.

A aba “procedimento de extração” contém uma função criada para programar o procedimento de extração a ser realizado. Nesta aba o usuário deve chamar as funções de condicionamento, lavagem, amostragem, secagem e eluição, segundo aquilo que seja requerido. Uma vez que o usuário tenha criado seu método de extração na aba “procedimento de extração”, este pode ser executado mediante a porta de comunicação serial de Arduino (lupa na parte superior direita) enviando o comando “E” (Extrair).

O programa começará a ser executando, primeiro a partir das operações de posicionamento cartesiano. Uma vez posicionado, executará a função correspondente à primeira etapa do procedimento de extração. Quando esta terminar, ocorrerá novamente o posicionamento e logo a função correspondente à segunda etapa e assim, sucessivamente, até realizar todo o procedimento programado. A Figura 2.11 é uma representação da lógica de funcionamento do programa global.

Permite programar o procedimento de extração, segundo a sequência de etapas requeridas.

Permite programar o número de ciclos e volumes segundo o procedimento de extração

Permite a comunicação com o equipamento através do envio de comandos

Contém o código interno de funcionamento das diferentes funções.

```
// Procedimento_de_extra_o | Arduino 1.0.6
File Edit Sketch Tools Help

Procedimento_de_extra_o Funções Variáveis

// INSTRUÇÕES GERAIS DE OPERAÇÃO
// mantenha o equipamento desligado enquanto programa.
// indique cada um dos valores correspondentes ao número de ciclos e volume de cada uma das etapas de extração.
// Abra o porto serial com o equipamento desligado.
// digite a letra G
// ligue o equipamento.
// clique em enviar para começar a extração.
// uma vez o equipamento entre em funcionamento não interrompa sua operação.
// tome cuidado de não apagar/modificar nenhum caracter diferente aos correspondentes aos volumes e os números de ciclos do processo de extração.

// VARIÁVEIS DE CALIBRAÇÃO
// Estas são usadas para ajustar individualmente a posição de cada um dos atuadores.
// Digite o valor correspondente ao deslocamento desejado e posteriormente mediante comunicação serial insira o comando correspondente à operação requerida.

// Avançar - digite A - Enviar
// Retroceder - Digite R - Enviar
// Subir - Digite s - Enviar
// Subir A - Digite U - Enviar
// Bajar A - Digite I - Enviar
// Subir B - Digite M - Enviar
// Bajar B - Digite M - Enviar
// Subir C - Digite K - Enviar
// Bajar C - Digite L - Enviar
```

Figura 2.10 – Vista da tela de início do programa final desenvolvido na interface de Arduino (Autoria própria).

Figura 2.11 – Esquema da lógica do funcionamento geral do programa (Autoria própria).

De outra parte, as funções correspondentes a cada uma das etapas do método de extração contêm sequências de código organizadas logicamente de forma que permitem o acionamento simultâneo de todas as unidades de extração, mantendo a independência quanto ao volume e ao número de ciclos de aspirar/dispensar realizados por cada unidade. Estas funções são programas mais complexos que os requeridos para o acionamento individual de cada motor. Estas incluem contadores individuais e globais para controlar o volume e o número de ciclos em cada unidade e em cada etapa.

Na Figura 2.12 pode-se observar uma representação da lógica de funcionamento de cada uma destas funções.

4.2 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO PROTÓTIPO DESENVOLVIDO

Uma vez construído e programado o protótipo, iniciou-se a etapa de validação de operação experimental. Para isto, selecionou-se uma mistura de cinco hidrocarbonetos poliaromáticos, dada sua facilidade de análise, rápida eluição e adequada separação cromatográfica ($R_s > 2$). A Figura 2.13 apresenta o perfil cromatográfico para a injeção de uma mistura destes analitos em água ultrapura, numa concentração de 500 ng mL^{-1} .

Figura 2.13 – Separação cromatográfica obtida para os cinco hidrocarbonetos poliaromáticos escolhidos como analitos-teste. Solução padrão $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Volume de injeção $5 \mu\text{L}$. Modo isocrático de eluição, composição da fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (30:70) (Autoria própria).

4.2.1 Estudo de precisão I: preparo de soluções padrão

Uma primeira avaliação do desempenho do protótipo foi obtida mediante a comparação da reprodutibilidade dos perfis cromatográficos obtidos para soluções padrão dos PAHs selecionados (500 ng mL^{-1}) preparadas de forma manual e automatizada. Prepararam-se manualmente três soluções pipetando-se $25 \mu\text{L}$ de uma solução estoque de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ em $\text{MeOH}:\text{DCM}$ (1:1) e transferindo-os a um frasco com $975 \mu\text{L}$ de água ultrapura. Para preparo manual das soluções foi empregado um pipetador para volumes de até $100 \mu\text{L}$.

Posteriormente, três soluções com as mesmas características das anteriores foram preparadas de forma automatizada. Para isto, foi criado um programa, de forma que uma das unidades de extração, operando uma seringa de 250 μL , tomasse 25 μL da solução estoque de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os transferisse a um segundo frasco contendo 975 μL de água ultrapura, previamente pipetados manualmente com um pipetador de 100-1000 μL .

Os dois grupos de soluções foram injetadas em triplicata no sistema cromatográfico (5 μL) e a precisão das áreas dos picos cromatográficos foi calculada. As Tabelas 2.3 e 2.4 mostram os resultados observados, assim como os cálculos da média e o desvio padrão relativo (DPR), tanto entre injeções da mesma amostra, quanto entre amostras de grupos diferentes.

Tabela 2.3 – Áreas observadas nos cromatogramas obtidos para as soluções padrão de HPAs preparadas de forma manual

	Analitos	inj 1	inj 2	inj 3	Média	<i>s</i>	DPR	<i>s</i> ²
Amostra 1	Naftaleno	10860	11176	11190	11075,33	186,62	1,6850	34825,33
	Acenaftileno	11012	10510	10692	10738,00	254,14	2,3668	64588,00
	Fluoreno	41718	41501	41853	41690,67	177,58	0,4260	31536,33
	Antraceno	262000	261070	261465	261511,67	466,75	0,1785	217858,33
	Fluoranteno	47969	48802	47756	48175,67	552,78	1,1474	305562,33
Amostra 2	Naftaleno	11204	10990	11081	11091,67	107,40	0,9683	11534,33
	Acenaftileno	10486	10758	10799	10681,00	170,11	1,5927	28939,00
	Fluoreno	41870	41675	41592	41712,33	142,71	0,3421	20366,33
	Antraceno	259688	259968	259598	259751,33	192,96	0,0743	37233,33
	Fluoranteno	47153	47891	46412	47152,00	739,50	1,5683	546861,00
Amostra 3	Naftaleno	10713	10607	10594	10638,00	65,28	0,6136	4261,00
	Acenaftileno	10391	10121	10222	10244,67	136,42	1,3316	18610,33
	Fluoreno	39780	40144	40089	40004,33	196,22	0,4905	38500,33
	Antraceno	250967	251424	251386	251259,00	253,59	0,1009	64309,00
	Fluoranteno	47891	46108	46500	46833,00	936,98	2,0007	877939,00
Média		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	<i>s</i>	DPR	<i>s</i> ²
	Naftaleno	11075,33	11091,67	10638,00	10935,00	257,34	2,3534	66223,44
	Acenaftileno	10738,00	10681,00	10244,67	10554,56	269,88	2,5570	72835,59
	Fluoreno	41690,67	41712,33	40004,33	41135,78	979,92	2,3822	960242,26
	Antraceno	261511,67	259751,33	251259,00	257507,33	5482,33	2,1290	30055945,44
	Fluoranteno	48175,67	47152,00	46833,00	47386,89	701,48	1,4803	492068,04

Tabela 2.4 – Áreas observadas nos cromatogramas obtidos para as soluções padrão de HPAs preparadas de forma automatizada

	Analitos	inj 1	inj 2	inj 3	Média	s	DPR	s ²
Amostra 1	Naftaleno	12465	12546	12513	12508	40,73	0,3256	1659,00
	Acenaftileno	11979	11660	11424	11687,67	278,53	2,3831	77580,33
	Fluoreno	46589	46470	46366	46475	111,58	0,2401	12451,00
	Antraceno	284545	282771	284991	284102,3	1174,34	0,4133	1379065,33
	Fluoranteno	54856	54977	54727	54853,33	125,02	0,2279	15630,33
Amostra 2	Naftaleno	12199	12105	12147	12150,33	47,09	0,3875	2217,33
	Acenaftileno	11900	11636	11847	11794,33	139,66	1,1841	19504,33
	Fluoreno	45403	45302	45137	45280,67	134,28	0,2965	18030,33
	Antraceno	275306	275045	277019	275790	1072,32	0,3888	1149861,00
	Fluoranteno	53512	53191	52896	53199,67	308,09	0,5791	94920,33
Amostra 3	Naftaleno	12325	12300	12311	12312	12,53	0,1018	157,00
	Acenaftileno	12048	11783	11907	11912,67	132,59	1,1130	17580,33
	Fluoreno	46043	46031	45845	45973	111,01	0,2415	12324,00
	Antraceno	279286	280653	282072	280670,3	1393,08	0,4963	1940674,33
	Fluoranteno	54221	54193	54002	54138,67	119,18	0,2201	14204,33
Média		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	s	DPR	s ²
	Naftaleno	12508	12150,333	12312	12323,44	179,11	1,4534	32079,59
	Acenaftileno	11687,667	11794,333	11912,6667	11798,22	112,55	0,9540	12667,59
	Fluoreno	46475	45280,667	45973	45909,56	599,69	1,3062	359626,93
	Antraceno	284102,33	275790	280670,333	280187,6	4177,14	1,4908	17448527,15
	Fluoranteno	54853,333	53199,667	54138,6667	54063,89	829,37	1,5340	687847,15

De acordo com estes resultados, a automatização conduz à obtenção de menores DPRs. No caso do fluoranteno observou-se um desvio sutilmente (não estatisticamente significativo) maior no lote de amostras preparadas de forma automatizada. A Figura 2.14 apresenta um esquema comparativo entre os DPRs observados para os lotes de amostras preparadas de forma manual e automatizada.

Figura 2.14 – Esquema comparativo dos desvios padrão relativos (DPR) observados para as soluções preparadas de forma manual e automatizada (Autoria própria).

Para estabelecer se a diferença entre as variâncias dos dois grupos de amostras é estatisticamente significativa foi aplicado um teste F ao nível de confiança de 95%. Esta prova de hipóteses mostrou que as variâncias dos dois grupos de amostras são equivalentes para todos os analitos. Em todos os casos, o valor de F observado (quociente entre as variâncias) foi menor que o F crítico. Também, a probabilidade de que o valor de F observado seja menor que F crítico foi menor que a probabilidade uni-caudal com a que o teste foi realizado (5%). Os resultados desta prova de hipóteses encontram-se apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Resultados do teste F realizado para comparação entre as variâncias das soluções padrão preparadas de forma manual e automatizada

		Média	Variância	Observações	gl	F Observado	P(F<=f) uni-caudal	F crítico uni-caudal
Naftaleno	Manual	10935	66223	3	2	2,064	0,326	19
	Automatizado	12323	32080	3	2			
Acenaftileno	Manual	10555	72836	3	2	5,75	0,148	19
	Automatizado	11798	12668	3	2			
Fluoreno	Manual	41136	960242,26	3	2	2,67	0,272	19
	Automatizado	45909	12667,593	3	2			
Antraceno	Manual	257507,3	30055945,44	3	2	1,723	0,367	19
	Automatizado	280187,6	17448527,15	3	2			
Fluoranteno	Manual	47386,89	492068,037	3	2	1,398	0,417	19
	Automatizado	54063,89	687847,1481	3	2			

Os valores médios das áreas dos picos cromatográficos obtidas para cada grupo de amostras se mostraram diferentes. A Figura 2.15 apresenta um esquema comparativo entre estes valores médios. Segundo estes dados para todos os analitos foram obtidas maiores áreas de pico quando as amostras foram preparadas de forma automatizada.

Um teste t aplicado sobre estes dados permitiu observar que as diferenças entre as médias observadas não são estatisticamente significativas. De acordo com o teste, a probabilidade de que a diferença entre as médias seja devida a fatores aleatórios é maior que 5% (Tabela 2.6).

Em conclusão o equipamento desenvolvido demonstrou ser capaz de manipular volumes com tanta precisão como a atingida manualmente. Incluso, tratando-se de solventes de difícil pipetagem como uma mistura MeOH:MeCN (1:1), ou utilizando instrumentos de pipetagem menos precisos, tal como é o caso da seringa de 250 µL, quando comparada com um pipetador

de 20-100 μL . A vantagem adicional do protótipo desenvolvido é que este permite preparar até seis soluções em uma única operação.

Figura 2.15 – Esquema comparativo das áreas de pico obtidas quando os padrões são preparados de forma manual e automatizada (Autoria própria).

Tabela 2.6 – Resultados do teste t realizado para comparação entre as áreas médias para as soluções preparadas de forma manual e automatizada

		Média	Variância	gl	Stat t	P(T<=t) uni-caudal	t-crítico uni-caudal	t-crítico bi-caudal
Naftaleno	Manual	10935	66223	4,00	-8,32	0,0006	2,13	2,78
	Automatizado	12323	32080					
Acenaftileno	Manual	10555	72836	4,00	-8,48	0,0006	2,13	2,78
	Automatizado	11798	12668					
Fluoreno	Manual	41136	960242,26	4,00	-7,48	0,0009	2,13	2,78
	Automatizado	45909	12667,593					
Antraceno	Manual	257507,3	30055945,44	4,00	-5,98	0,0029	2,13	2,78
	Automatizado	280187,6	17448527,15					
Fluoranteno	Manual	47386,89	492068,037	4,00	-12,89	0,0001	2,13	2,78
	Automatizado	54063,89	687847,1481					

4.2.2 Estudo de precisão II: extração de HPAs mediante MEPS

Foi planejado e realizado um experimento de extração de HPAs em esgoto sanitário. Para isso, uma amostra de 10 mL de esgoto, coletado na entrada da planta de tratamento Monjolinho (São Carlos, SP), foi enriquecida com $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos HPAs selecionados

como analitos teste. A partir desta solução, tomaram-se seis alíquotas de 1,0 mL. Todas as amostras foram extraídas mediante MEPS (C-18, 2 mg), três de forma manual e três restantes de forma automatizada. Os extratos assim obtidos foram injetados no sistema cromatográfico (5 µL).

Método MEPS para extração de HPAs

Para a extração, foi planejado um procedimento relativamente rápido baseado em antecedentes de extração de HPAs mediante MEPS consultados na literatura. A Tabela 2.7 resume os procedimentos de extração relatados em algumas das referências consultadas.

Tabela 2.7 – Alguns exemplos de extração de HPAs mediante MEPS relatados na literatura

Analitos	Extração		Análises	Ref.
	Fase sólida	Procedimento		
Antraceno, criseno, fluoranteno, fluoreno, pireno e ropivacaina	C-8	Seringa de 250 µL Condicionamento 1: metanol, 50 µL x 1 Condicionamento 2: água, 50 µL x 1 Amostragem: 50 µL x 60 Eluição: metanol, 30 µL x 1, (40 °C) Lavagem: metanol 50 µL x 5 Extração automatizada através do <i>autosampler</i> do GC.	GC-MS	[35]
Naftaleno, pireno, antraceno, acenaftileno, fenenatreno e fluoranteno	C-18	Seringa de 100 µL Condicionamento 1: metanol, 80 µL x 1 Condicionamento 2: água, 100 µL x 1 Amostragem: 50 µL x 40 Lavagem: água, 100 µL x 1 Secagem: ar, 100 µL x 10 Eluição: metanol, 50 µL x 1 Lavagem: metanol 80 µL x 8 Extração automatizada através do <i>autosampler</i> do GC.	GC-MS	[36]
HPAs	C-8	Condicionamento 1: metanol, 100 µL x 1 Amostragem: 50 µL x 90 Eluição: metanol, 50 µL x 25 Lavagem 1: metanol, 50 µL x 1 Lavagem 1: água, 50 µL x 1		

Antes de definir o procedimento de extração a ser utilizado, e levando-se em conta que a eluição cromatográfica é realizada em modo isocrático com 70 % de acetonitrila, foi realizado

um teste de eluição contínua parcial, avaliando a remoção dos interferentes provenientes da matriz e dos analitos em função do percentual de acetonitrila usado na eluição. Este teste foi realizado de forma automatizada, utilizando o protótipo desenvolvido. Para isto, foi programado um procedimento com duas etapas de condicionamento, com 250 μL x 1, água e metanol respectivamente; uma etapa de amostragem, 250 μL x 5; e 10 etapas diferentes de eluição com 50 μL x 1 de soluções água:acetonitrila. A porcentagem de acetonitrila em cada eluição variou entre 0 e 90 %. Os resultados deste teste são apresentados na Figura 2.16.

Figura 2.16 – Porcentagem acumulada de analitos e interferentes removidos vs porcentagem de acetonitrila (Autoria própria).

A partir destes resultados, definiu-se o uso de uma solução $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (95:5) na etapa de lavagem, esperando desta forma remover os interferentes sem remover os analitos. De outra parte, uma mistura $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (30:70) foi definida para a etapa de eluição, esperando remover eficientemente os analitos. Adicionalmente, sua composição coincide com a da fase móvel usada na eluição cromatográfica, evitando problemas de incompatibilidade.

O procedimento de extração finalmente empregado foi:

- Condicionamento 1: metanol, 250 μL x 5
- Condicionamento 2: água, 250 μL x 5
- Amostragem: 250 μL x 5
- Lavagem: $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (95:5) x 5

- Secagem: ar, 250 μ L x5
- Eluição: H₂O:MeCN (30:70), 50 μ L x 5.

Este procedimento foi replicado nas extrações, tanto manuais quanto nas automatizadas. Cada extrato foi injetado em triplicata (5 μ L). A precisão das duas formas de extração foi estudada mediante a determinação dos desvios padrão relativos (DPR) e a realização dos correspondentes testes F para comparação das variâncias entre os dois grupos de amostras. As Tabelas 2.8 e 2.9 apresentam as áreas dos picos cromatográficos obtidas para os grupos de amostras preparadas de forma manual e automatizada.

Tabela 2.8 – Áreas de pico dos extratos de HPAs obtidos mediante MEPS-manual

	Analitos	inj 1	inj 2	inj 3	Média	s	DPR	s ²
Amostra 1	Naftaleno	7120	7026	7153	7099,67	65,90	0,9282	4342,33
	Acenaftileno	8679	8713	8808	8733,33	66,86	0,7656	4470,33
	Fluoreno	23903	24015	24098	24005,33	97,86	0,4077	9576,33
	Antraceno	87048	87315	87575	87312,67	263,51	0,3018	69436,33
	Fluoranteno	16088	16101	16311	16166,67	125,17	0,7742	15666,33
Amostra 2	Naftaleno	5380	5274	5375	5343,00	59,81	1,1194	3577,00
	Acenaftileno	7674	7706	7516	7632,00	101,73	1,3329	10348,00
	Fluoreno	22734	22526	22576	22612,00	108,57	0,4802	11788,00
	Antraceno	89089	89081	89331	89167,00	142,08	0,1593	20188,00
	Fluoranteno	15985	15972	15461	15806,00	298,85	1,8907	89311,00
Amostra 3	Naftaleno	5346	5349	5334	5343,00	7,94	0,1486	63,00
	Acenaftileno	7831	7404	7793	7676,00	236,32	3,0787	55849,00
	Fluoreno	23016	23001	22980	22999,00	18,08	0,0786	327,00
	Antraceno	92727	92720	92819	92755,33	55,25	0,0596	3052,33
	Fluoranteno	17257	17203	17326	17262,00	61,65	0,3572	3801,00
Média		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	s	DPR	s ²
	Naftaleno	7099,67	5343,00	5334,00	5925,56	1016,82	17,16	1033922,93
	Acenaftileno	8733,33	7632,00	7793,00	8052,78	594,85	7,39	353847,15
	Fluoreno	24005,33	22612,00	22980,00	23199,11	722,05	3,11	521351,70
	Antraceno	87312,67	89167,00	92819,00	89766,22	2801,65	3,12	7849227,15
	Fluoranteno	16166,67	15806,00	17326,00	16432,89	794,20	4,83	630755,70

Tabela 2.9 – Áreas de pico dos extratos de HPAs obtidos mediante MEPS-automatizada

	Analitos	inj 1	inj 2	inj 3	Média	s	DPR	s ²
Amostra 1	Naftaleno	5007	5031	5009	5015,67	13,32	0,2655	177,33
	Acenaftileno	7393	7553	7399	7448,33	90,69	1,2176	8225,33
	Fluoreno	21987	22072	22023	22027,33	42,67	0,1937	1820,33
	Antraceno	90794	90901	90075	90590,00	449,20	0,4959	201781,00
	Fluoranteno	16305	16262	16136	16234,33	87,83	0,5410	7714,33
Amostra 2	Naftaleno	5124	5148	5192	5154,67	34,49	0,6690	1189,33
	Acenaftileno	7564	7709	7398	7557,00	155,62	2,0593	24217,00
	Fluoreno	21874	21842	21816	21844,00	29,05	0,1330	844,00
	Antraceno	88387	88236	88180	88267,67	107,07	0,1213	11464,33
	Fluoranteno	11907	11982	11976	11955,00	41,68	0,3486	1737,00
Amostra 3	Naftaleno	4998	5376	5351	5241,67	211,39	4,0329	44686,33
	Acenaftileno	6733	7720	8096	7516,33	703,95	9,3657	495552,33
	Fluoreno	20929	22568	23544	22347,00	1321,43	5,9132	1746187,00
	Antraceno	82350	91105	94904	89453,00	6437,98	7,1971	41447557,00
	Fluoranteno	13782	15187	15986	14985,00	1115,80	7,4461	1245007,00
Média		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	s	DPR	s ²
	Naftaleno	5015,67	5154,67	5255,33	5141,89	120,34	2,34	14482,48
	Acenaftileno	7448,33	7557,00	7612,33	7539,22	83,43	1,11	6961,04
	Fluoreno	22027,33	21844,00	22268,00	22046,44	212,65	0,96	45217,93
	Antraceno	90590,00	88267,67	89644,00	89500,56	1167,79	1,30	1363740,26
	Fluoranteno	16234,33	11955,00	14977,33	14388,89	2199,52	15,29	4837873,59

Em ambos os casos, os DPR observados se encontram dentro das porcentagens aceitáveis (< 20 %). A Figura 2.17 apresenta um esquema comparativo entre os DPR obtidos para os grupos de extrações realizadas de forma manual e automatizada.

Figura 2.17 – Esquema comparativo dos desvios padrão relativos (DPR) observados para as extrações de HPAs mediante MEPS realizadas de forma manual e automatizada (Autoria própria).

Tal como no caso das soluções padrão, os DPRs mostraram-se menores para as extrações automatizadas em todos os casos exceto para o fluoranteno. O teste F mostrou que as variâncias foram estatisticamente diferentes para o naftaleno e acenafteno, sendo o método automatizado o mais preciso. Para os outros analitos o teste não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre as variâncias dos grupos de amostras. A Tabela 2.10 resume os resultados desta prova de hipóteses.

Tabela 2.10 – Resultados do teste F realizado para comparação entre as variâncias observadas para as extrações realizadas de forma manual e automatizada

		Média	Variância	Observações	gl	F Observado	P(F<=f) uni-caudal	F crítico uni-caudal
Naftaleno	Manual	5925,55	1033922,92	3	2	71,39	0,013	19
	Automatizado	5141,88	14482,48	3	2			
Acenaftileno	Manual	8052,77	353847,14	3	2	50,83	0,019	19
	Automatizado	7539,22	6961,03	3	2			
Fluoreno	Manual	23199,11	521351,70	3	2	11,52	0,079	19
	Automatizado	22046,44	45217,92	3	2			
Antraceno	Manual	89766,22	7849227,14	3	2	5,75	0,14	19
	Automatizado	89500,55	1363740,25	3	2			
Fluoranteno	Manual	16432,88	630755,70	3	2	7,66	0,11	19
	Automatizado	14388,88	4837873,59	3	2			

As médias dos dois grupos de amostras foram comparadas mediante um teste t, encontrando que as médias obtidas são estatisticamente equivalentes, para todos os analitos exceto fluoreno. A Figura 2.18 apresenta um esquema comparativo entre as médias observadas e a Tabela 2.11 contém os resultados do teste t realizado.

Figura 2.18 – Esquema comparativo das áreas de pico obtidas quando as extrações de HPAs mediante MEPS são realizadas de forma manual e automatizada (Autoria própria).

Tabela 2.11 – Resultados do teste t realizado para comparação entre as médias observadas para as extrações realizadas de forma manual e automatizada

		Média	Variância	gl	Stat t	P(T<=t) uni-caudal	t-crítico uni-caudal	t-crítico bi-caudal
Naftaleno	Manual	5925,56	1033922,93	4,00	1,33	0,12	2,13	2,78
	Automatizado	5141,89	14482,48					
Acenafteno	Manual	8052,78	353847,15	4,00	1,48	0,11	2,13	2,78
	Automatizado	7539,22	6961,04					
Fluoreno	Manual	23199,11	521351,70	4,00	2,65	0,03	2,13	2,78
	Automatizado	22046,44	45217,93					
Antraceno	Manual	89766,22	7849227,15	4,00	0,15	0,44	2,13	2,78
	Automatizado	22046,44	45217,93					
Fluoranteno	Manual	16432,89	630755,70	4,00	1,51	0,10	2,13	2,78
	Automatizado	7539,22	6961,04					

O protótipo desenvolvido mostrou-se capaz de replicar procedimentos de extração mediante MEPS, com qualidade adequada para ser usado rotineiramente no desenvolvimento de métodos analíticos. Há também uma vantagem adicional do aumento da produtividade, uma vez que o protótipo desenvolvido pode preparar até seis amostras em uma única operação, inclusive, com a possibilidade de usar procedimentos diferentes para cada uma das amostras.

5. CONCLUSÃO

Nesta parte do trabalho um robô cartesiano com capacidade para operar simultaneamente seis seringas de extração foi planejado, construído, programado e posto à prova na execução automatizada de microextrações por sorvente empacotado.

O protótipo desenvolvido mostrou alta precisão e exatidão na medição e pipetagem de alíquotas de amostras e solventes, assim como na execução de procedimentos complexos multietapas característicos do preparo de amostra mediante MEPS.

Atualmente o protótipo desenvolvido está auxiliando o desenvolvimento de outras pesquisas e projetos no nosso grupo de pesquisa, relacionados com o desenvolvimento de métodos mediante MEPS.

Trabalhos futuros poderão explorar a acoplamento do protótipo desenvolvido com instrumentos analíticos, mediante a incorporação de válvulas de seleção e solenoides, permitindo a injeção sequencial e automatizada dos extratos de cada uma das seringas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. YANG, L.; SAID, R.; ABDEL-REHIM, M. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): a review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1043, p. 33–43, 2017.
2. MOEIN, M. M.; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 34–44, 2015.
3. PŁOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 19–38, 2015.
4. ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 801, n. 2, p. 317–321, 2004.
5. ABDEL-REHIM, M.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L. Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gas chromatographic applications. Part II - Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 12, p. 1488–1493, 2004.
6. ALTUN, Z.; ABDEL-REHIM, M.; BLOMBERG, L. G. New trends in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications: Part III: Determination and validation of local anaesthetics in human plasma samples using a cation-exchange sorbent, and MEPS-LC-MS-MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 813, n. 1–2, p. 129–135, 2004.
7. PEREIRA, J.; GONÇALVES, J.; ALVES, V.; CÂMARA, J. S. Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: Recent applications and future trends. **Sample Preparation**, v.1, p. 38-53, 2013.
8. ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 2, p. 119–128, 2011.
9. ALVES, G.; RODRIGUES, M.; FORTUNA, A.; FALCÃO, A.; QUEIROZ, J. A critical review of microextraction by packed sorbent as a sample preparation approach in drug bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 5, n. 11, p. 1409–1442, 2013.
10. FUMES, B. H.; SILVA, M. R.; ANDRADE, F. N.; NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 9-25, 2015.

11. SARACINO, M. A.; DE PALMA, A.; BONCOMPAGNI, G.; RAGGI, M. A. Analysis of risperidone and its metabolite in plasma and saliva by LC with coulometric detection and a novel MEPS procedure. **Talanta**, v. 81, n. 4–5, p. 1547–1553, 2010.
12. MUELLER, D. M.; RENTSCH, K. M. Sensitive quantification of sirolimus and everolimus by LC-MS/MS with online sample cleanup. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 13–14, p. 1007–1012, 2010.
13. SAID, R.; KAMEL, M.; EL-BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent for LC–MS/MS determination of drugs in whole blood samples. **Bioanalysis**, v. 2, n. 2, p. 197–205, 2010.
14. EL-BEQQALI, A.; KUSSAK, A.; BLOMBERG, L.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction in packed syringe/liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry for quantification of acebutolol and metoprolol in human plasma and urine samples. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 30, n. 4, p. 575–586, 2007.
15. ABDEL-REHIM, M.; ANDERSSON, A.; BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A.; SANDBERG-STÄLL, M.; BRUNFELTER, K.; PETTERSSON, K. J.; NORSTEN-HÖÖG, C. MEPS as a rapid sample preparation method to handle unstable compounds in a complex matrix: Determination of AZD3409 in plasma samples utilizing MEPS-LC-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. 6, p. 518–523, 2008.
16. EL-BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Quantitative analysis of methadone in human urine samples by microextraction in packed syringe-gas chromatography-mass spectrometry (MEPS-GC-MS). **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 15, p. 2501–2505, 2007.
17. JAGERDEO, E.; ABDEL-REHIM, M. Screening of cocaine and its metabolites in human urine samples by direct analysis in real-time source coupled to time-of-flight mass spectrometry after online preconcentration utilizing microextraction by packed sorbent. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 5, p. 891–899, 2009.
18. MORALES-CID, G.; GEBEFUGI, I.; KANAWATI, B.; HARIR, M.; HERTKORN, N.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Automated microextraction sample preparation coupled on-line to FT-ICR-MS: Application to desalting and concentration of river and marine dissolved organic matter. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 3, p. 797–807, 2009.
19. ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. Screening and determination of drugs in human saliva utilizing microextraction by packed sorbent and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 9, p. 1188–1191, 2013.
20. MANDRIOLI, R.; MERCOLINI, L.; LATEANA, D.; BONCOMPAGNI, G.; RAGGI, M. A. Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 2, p. 167–173, 2011.

21. GRUEIRO NOCHE, G.; FERNÁNDEZ LAESPADA, M. E.; PÉREZ PAVÓN, J. L.; MORENO CORDERO, B.; MUNIATEGUI LORENZO, S. Determination of chlorobenzenes in water samples based on fully automated microextraction by packed sorbent coupled with programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 21, p. 6739–6748, 2013.
22. WANG, Y.; JIN, S.; WANG, Q.; LU, G.; JIANG, J.; ZHU, D. Zeolitic imidazolate framework-8 as sorbent of micro-solid-phase extraction to determine estrogens in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1291, p. 27–32, 2013.
23. CAVALHEIRO, J.; PRIETO, A.; MONPERRUS, M.; ETXEBARRIA, N.; ZULOAGA, O. Determination of polycyclic and nitro musks in environmental water samples by means of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 773, p. 68–75, 2013.
24. QUINTO, M.; AMODIO, P.; SPADACCINO, G.; CENTONZE, D. Development of a mathematical model for online microextraction by packed sorbent under equilibrium conditions and its application for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in water by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 19–26, 2012.
25. GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; QUINTANA, J. B.; RODRÍGUEZ, I.; SCHRADER, S.; MOEDER, M. Fully automated determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in wastewater by microextraction by packed sorbents and gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 684, n. 1–2, p. 59–66, 2011.
26. GONÇALVES, J.; MENDES, B.; SILVA, C. L.; CÂMARA, J. S. Development of a novel microextraction by packed sorbent-based approach followed by ultrahigh pressure liquid chromatography as a powerful technique for quantification phenolic constituents of biological interest in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1229, p. 13–23, 2012.
27. SILVA, C. L.; GONÇALVES, J. L.; CÂMARA, J. S. A sensitive microextraction by packed sorbent-based methodology combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a powerful technique for analysis of biologically active flavonols in wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 739, p. 89–98, 2012.
28. PENG, X. T.; SHI, Z. G.; FENG, Y. Q. Rapid and high-throughput determination of cationic surfactants in environmental water samples by automated on-line polymer monolith microextraction coupled to high performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 23, p. 3588–3594, 2011.
29. SALAMI, F. H.; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for determination of sulfonamides in egg samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 9, p. 1656–1661, 2011.

30. RAHIMI, A.; HASHEMI, P.; BADI EI, A.; SAFDARIAN, M.; RASHIDIPOUR, M. Microextraction of rosmarinic acid using CMK-3 nanoporous carbon in a packed syringe. **Chromatographia**, v. 76, n. 13–14, p. 857–860, 2013.
31. VLČKOVÁ, H.; SOLICHOVÁ, D.; BLÁHA, M.; SOLICH, P.; NOVÁKOVÁ, L. Microextraction by packed sorbent as sample preparation step for atorvastatin and its metabolites in biological samples-Critical evaluation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 2, p. 301–308, 2011.
32. MENDES, B.; SILVA, P.; AVEIRO, F.; PEREIRA, J.; CÂMARA, J. S. A Micro-extraction technique using a new digitally controlled syringe combined with UHPLC for assessment of urinary biomarkers of oxidatively damaged DNA. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–9, 2013.
33. GONÇALVES, J. L.; ALVES, V. L.; RODRIGUES, F. P.; FIGUEIRA, J. A.; CÂMARA, J. S. A semi-automatic microextraction in packed sorbent, using a digitally controlled syringe, combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a new and ultra-fast approach for the determination of prenylflavonoids in beers. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 42–51, 2013.
34. SANTOS-NETO, A. J; LANÇAS, F. M.; CONTADORI, A. ; ORTEGA, S. N.; AMPARO, M. R. **Microdispositivo de extração desmontável para adaptação a microseringas de agulha removível**. BR n. PI 102013025451-7, 14 jan. 2015.
35. EL-BEQQALI, A.; KUSSAK, A.; ABDEL-REHIM, M. Fast and sensitive environmental analysis utilizing microextraction in packed syringe online with gas chromatography-mass spectrometry. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, n. 2, p. 234–238, 2006.
36. FU, S.; FAN, J.; HASHI, Y.; CHEN, Z. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using online microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 94, p. 152–157, 2012.

Robô cartesiano para a integração *on-line* da LPME e a cromatografia líquida

1. INTRODUÇÃO – LPME

O surgimento da microextração em fase sólida (SPME), no começo dos anos 90, promoveu o rápido desenvolvimento de uma série de novas formas miniaturizadas das técnicas clássicas de preparo de amostra. Assim, nos últimos 20 anos, diferentes tipos de microextrações em fase líquida têm sido descritas [1,2] (Figura 3.1). Entre estas, além da microextração em fase líquida *per se* (LPME, *liquid phase microextraction*), destacam-se abordagens, como a incorporação de solventes dispersantes que permitem aumentar o contato efetivo entre as fases e, portanto, acelerar a transferência dos analitos (DLLME, *dispersive liquid-liquid microextraction*) [3].

O uso de uma gota única suspensa no seio ou no *headspace* da amostra, é uma técnica que permite obter altos fatores de enriquecimento, enquanto facilita a recuperação do extrato enriquecido (SDME, *single drop microextraction*) [2,4]. A incorporação de membranas porosas para mediar a transferência dos analitos entre as fases tem sido uma estratégia exitosa na discriminação de macromoléculas (HF-LPME, *hollow fiber liquid phase microextraction*) [5].

Todas estas técnicas caracterizam-se pelo baixo consumo de amostras e solventes, característica que representa uma grande vantagem em termos econômicos e ambientais. Além disso, essas técnicas são altamente dependentes de automatização, pois demandam alta destreza e cuidado no manuseio das pequenas alíquotas empregadas.

Figura 3.1 – Representação esquemática da: a) Microextração em fase líquida, LPME; b) Microextração líquido-líquido dispersiva, DLLME; c) Microextração em uma gota única, SDME; d) Microextração em fase líquida assistida por fibra oca, HF-LPME. (Autoria própria).

Várias estratégias para automatização destas técnicas foram previamente relatadas. Configurações instrumentais em fluxo, como sistemas SIA (*sequential injection analysis*) equipados com mecanismos de agitação magnética dentro da seringa (*in-syringe*), têm sido úteis na automatização da microextração em fase líquida [6-8]. Estes são sistemas nos quais, por operação automática do êmbolo da seringa (5 ou 10 mL) e mediante uma válvula de seleção, as fases aquosa e orgânica são sequencialmente carregadas na seringa, misturadas por agitação magnética e, após sedimentação, coletadas [9,10].

Sistemas em fluxo também têm sido úteis na automatização de algumas versões da microextração assistida por membrana, especialmente em configurações em *chip* [8] e, mais recentemente, na automatização de microextrações em *headspace* mediante SDME *in-syringe* [11-13].

De outra parte, técnicas como SDME e HF-LPME têm sido automatizadas principalmente mediante sistemas tipo robô cartesianos, comumente denominados *autosamplers* [14], sistemas passíveis de serem operados no modo *stand-alone*, ou acoplados de forma *at-line* com instrumentos analíticos, funcionando simplesmente como injetores automáticos, ou realizando tarefas próprias do preparo de amostra mediante técnicas de microextração como MEPS, SPME, SDME e HF-LPME [15,16]. No entanto, a versatilidade e

aplicabilidade dos sistemas comerciais estão limitadas pelas capacidades e funções pré-programadas pelo fabricante.

Neste trabalho foi desenvolvido um *autosampler* capaz de se adaptar à execução de diversos procedimentos de preparo de amostra, mediante diferentes técnicas (Figura 3.2). Seu planejamento, construção e operação serão apresentados nas seguintes seções do presente capítulo.

Figura 3.2 – Representação esquemática do *autosampler* projetado (Autoria própria).

2. OBJETIVOS

- Desenvolver um sistema tipo robô cartesiano multipropósito para a automatização de diferentes formatos da microextração em fase líquida, tais como a microextração em gota única (SDME) ou a microextração assistida por fibra óptica (HF-LPME).
- Validar o desempenho do protótipo mediante o desenvolvimento de um método para extração de triazinas a partir de amostras aquosas mediante SDME em modo estático, automatizada e hifenada de forma *on-line* com a determinação por HPLC

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 PARTES E COMPONENTES DO PROTÓTIPO DESENVOLVIDO

Perfis estruturais de alumínio T-Slot, porcas T, fusos T e placas de união para montagem da estrutura mecânica foram adquiridos da Gjr Com Ind (São Carlos, SP-Brasil). Atuadores lineares constituídos por fusos de esferas com castanha (16 x 460 mm, passo: 0,5 mm) e eixos lineares (16 x 460 mm) suportados em rolamentos, mancais, e *pillow blocks* e motores de passo bipolares Nema 17, passo: 1,8 °, torque: 0,5 Nm, 1,6 A foram adquiridos da Kalatec automação industrial (Campinas, SP-Brasil).

Serviços mecânicos adicionais, como montagem, usinagem fabricação de peças sob design, em alumínio ou poliacetal foram contratados com a Gjr Com Ind (São Carlos, SP-Brasil).

Microcontrolador Arduino Mega 2560 módulos dupla ponte H L298N, fonte AC/DC 12V 10 A, módulos relê e implementos eletrônicos adicionais (conectores, solda, etc) foram adquiridos da Ca & Ma componentes eletrônicos (São Carlos, SP-Brasil).

Programas para execução controlada de diferentes procedimentos de extração foram escritos no entorno de desenvolvimento de Arduino (Arduino IDE, *integrated development environment*), usando a biblioteca *<stepper.h>*.

3.2 PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Padrões analíticos de simazina, atrazina e propazina foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Soluções estoque (500 mg L⁻¹) foram preparadas a partir do reagente sólido em metanol grau HPLC (Fairfield, OH, EUA) e armazenadas a 4 °C. Estas soluções foram diluídas com água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore (18,2 M-cm, Millipore, Bedford, MA, EUA) e utilizadas para preparar uma solução mista de triazinas usada para preparar amostras enriquecidas. Todas as soluções foram armazenadas a 4 ° C e a mistura foi preparada a cada semana.

Os solventes metanol (MeOH), acetonitrila (MeCN), 1-octanol, 1-nonanol e 1-dodecano, grau de análise cromatográfica, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). NaCl 99% w/w de pureza foi adquirido de J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA).

3.3 PROCEDIMENTOS AUTOMATIZADOS DE PREPARO DE AMOSTRAS

3.3.1 SDME *Off-line* no modo dinâmico

Uma primeira avaliação do desempenho do protótipo foi obtida mediante a comparação da reprodutibilidade dos perfis cromatográficos obtidos para a extração de HPAs no *headspace* de uma amostra de 4 mL de esgoto sanitário, na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, mediante SDME no modo dinâmico. O protótipo equipado com uma seringa de 250 μL foi programado para formar gotas de 60 μL ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ 30:70), executando 50 ciclos de exposição/retração da gota em intervalos de 5 s cada. O programa para execução deste procedimento pode ser consultado na informação suplementar (Programa PA2).

3.3.2 HFLPME *Off-line* no modo dinâmico

Numa segunda etapa de avaliação, o protótipo foi programado para executar um procedimento de microextração mediante HF-LPME dinâmico. Neste caso, um segmento de fibra tubular porosa de 5 cm de comprimento (diâmetro interno: 200 μm ; tamanho do poro 0,2 μm), foi inicialmente recoberta por imersão em undecano (C11), lavada interna e externamente com água, e usada na extração de HPAs por imersão direta em amostras de esgoto sanitário (2 mL, $25 \mu\text{g L}^{-1}$). Uma das extremidades da fibra foi conectada na agulha de uma seringa de microextração (250 μL), operada pelo protótipo, e a outra a um sifão de PEEK (170 μm de diâmetro) com o extremo final imerso em 100 μL de MeCN. O programa para execução deste procedimento pode ser consultado na informação suplementar (Programa PA3).

3.3.3 SDME *On-line* no modo estático

Para validação da operação e desempenho do protótipo foi desenvolvido um método para extração de triazinas a partir de amostras aquosas, mediante SDME por imersão direta da

gota em modo estático e acoplado de forma *on-line* com a análise mediante HPLC. O procedimento automatizado está esquematizado na Figura 3.3.

Figura 3.3 – Representação esquemática do procedimento analítico para *on-line* SDME (Autoria própria).

Inicialmente, 60 μL de solvente de extração são carregados na seringa. Então, a posição *off* da válvula solenoide é ativada, o braço do robô introduz a agulha no recipiente, equipado com um suporte para gotas de grande porte, e o *driver* da seringa dispensa a quantidade de solvente programada permitindo a exposição da gota de extração. Neste caso, dado que a extração é realizada com todo solvente carregado na seringa não são necessários ciclos de exposição/retração da gota.

Assim, uma vez o tempo de exposição programado transcorre, o *driver* recolhe a gota, a posição *on* na válvula é ativada e o driver conduz o extrato enriquecido para a alça de amostragem. Mediante um relê, é ativado o HPLC, dando passo à separação e determinação dos analitos extraídos. O programa para execução deste procedimento pode ser consultado na informação suplementar (Programa PA4).

3.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A separação cromatográfica foi realizada usando um sistema Shimadzu LC incluindo um módulo de barramento de comunicação CBM-20A, um degaseificador DGU-20AS, duas bombas LC 20-AD, um forno de coluna CTO-20A e um detector SPD-20A UV-Vis,

monitorando a 220 nm. A separação, após o procedimento SDME, foi realizada em modo isocrático, empregando como fase móvel água e uma mistura de MeCN:MeOH (50:50 v/v), com 54 % na composição de orgânico, vazão de 0,220 mL min⁻¹. As separações foram realizadas através de uma coluna NST-C18 (2,1 x 150 mm, 2,7 µm) de Nano Separation Technologies (São Carlos, SP), mantida a uma temperatura de 45 °C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONSTRUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO PROTÓTIPO

O protótipo foi construído a partir de uma estrutura em perfil em de alumínio extrudado, equipado com mecanismos de posicionamento espacial horizontal (X), lateral (Y) e vertical (Z), comandados por motores de passo e fusos de esferas, que possibilitam a execução sequencial e sincronizada de movimentos transportando a microseringa através da plataforma cartesiana. Acoplada no eixo Z, a microseringa é operada por um atuador linear próprio (*driver*) que permite a operação controlada do êmbolo na pipetagem de amostras e solventes. Finalmente, no eixo X, o *autosampler* foi equipado com uma plataforma de alumínio capaz de alojar racks com recipientes de amostras, assim como, mantas de agitação/aquecimento (Figura 3.4).

Figura 3.4 – Fotografia do protótipo construído indicando suas partes principais (Autoria própria).

4.1.1 Montagem do protótipo

A plataforma horizontal (Figura 3.5) foi construída a partir de quatro perfis estruturais de 40 x 40 x 600 mm e 40 x 40 x 400 mm, unidos por conectores universais em aço galvanizado para perfil estrutural de alumínio e placas de união. O marco horizontal foi equipado com quatro bases de nivelamento anti-vibração. O mecanismo de movimento do eixo X foi montado usando um fuso de esferas com porca, operado por um motor de passo Nema 17, e duas guias lineares que suportam a plataforma horizontal mediante *pillow blocks*.

O suporte vertical está conformado por uma grade em forma de H, construída a partir de quatro perfis estruturais de 40 x 40 x 600 mm e 40 x 40 x 400 mm, acoplada perpendicularmente à base horizontal, mediante conectores universais em aço galvanizado para perfil estrutural de alumínio e placas de união de alumínio. O mecanismo de posicionamento do eixo X está alojado na base horizontal, enquanto o suporte vertical segura os mecanismos de posicionamento nos eixos Y e Z.

Figura 3.5 – Fotografias do protótipo desenvolvido. a) Superior e eixo X; b) Inferior e eixo X; c) Lateral do eixo Z e *driver* da seringa; d) Frontal do eixo Y, do suporte vertical e do eixo Z, incluindo os mecanismos de movimento (Autoria própria).

Acoplado no suporte vertical, o mecanismo de movimento lateral (eixo Y) foi montado sobre uma placa de alumínio suportada por guias lineares apoiadas em quatro mancais e segurada por quatro *pillow blocks*. Um ajuste manual de altura foi adicionado. Um atuador linear, compreendido por um fuso de esferas com porca, operado por um motor de passo Nema 17, e duas guias lineares, permite o deslocamento lateral no eixo Z, por sua vez fixado mediante *pillow blocks* ao eixo Y.

Da mesma forma que com os eixos X e Y, o mecanismo de movimento no eixo Z foi montado utilizando um atuador linear composto por um fuso de esferas (de 8 x 380 mm) com porca, um motor de passo Nema 17 e duas guias lineares fixadas por mancais e equipadas com *pillow blocks*.

Driver da seringa

Sobre o eixo Z, um mecanismo para acionamento automatizado da seringa foi incorporado (Figura 3.6). Este mecanismo aloja a seringa e é responsável pelo acionamento vertical do êmbolo.

O *driver* da seringa foi montado a partir de uma estrutura em acrílico e é composto por um sistema guia de agulha (Figura 3.6a), um sistema de suporte da seringa (Figura 3.6b), e um atuador linear composto por motor de passo, fuso sem fim e guias lineares (Figura 3.6c). O guia da agulha permite conduzir e alinhar a agulha com o centro dos recipientes de amostra e solvente, evitando acidentes por choque nas bordas e paredes dos recipientes. A guia é composta por um *holder* com furo onde se encaixa o extremo inferior da agulha. Este *holder*, por sua vez é segurado por um par de guias lineares equipadas com molas de compressão. As guias lineares são apoiadas pelo suporte do extremo inferior da seringa e sua altura pode ser regulada pelo ajuste de uma trava metálica incorporada na sua parte superior.

A cabeça da seringa é alojada numa peça de acrílico com desenho específico e segurada por uma porca de poliacetal, enquanto o êmbolo é alojado e acionado com ajuda de um suporte de poliacetal equipado com um parafuso de ajuste e acoplado ao mecanismo de movimento axial E composto por guias lineares e parafuso sem fim acoplado e acionado por um motor de passo Nema 17.

Finalmente, as partes anteriormente descritas são acopladas através de um suporte vertical, por sua vez acoplável diretamente no eixo Z do protótipo.

Figura 3.6 - Detalhes da montagem do *driver* da seringa. a) Guia da agulha suporte do extremo inferior da seringa; b) Suporte da cabeça da seringa e *driver* do êmbolo; c) Acoplamento das partes; d) *Driver* completamente montado (Autoria própria).

Mecanismo de agitação in-syringe

Para aplicações específicas, como a automação da microextração em fase líquida dispersiva, o *driver* da seringa pode ser equipado com um mecanismo de agitação magnética, construído a partir de um par de ímãs de neodímio alojados em um rotor de PTFE de 3 cm od x 0,9 cm id x e 1,0 cm h (Figura 3.7a), acoplável ao redor da seringa, e acionado mediante uma banda elástica (Figura 3.7b) por um motor DC (Figura 3.7c).

Figura 3.7 – Detalhes do mecanismo de agitação em seringa. a) Rotor de PTFE; b) Banda elástica; c) Motor DC (Autoria própria).

Mecanismo para hifenização on-line com instrumentos analíticos

A hifenização *on-line* com instrumentos analíticos, como cromatógrafos de líquidos ou espectrômetros de massas, é possibilitada mediante a incorporação de uma válvula solenoide de três vias com suporte de PTFE (Figura 3.8).

A válvula é conectada ao extremo inferior da seringa, mediante uma porca metálica de ajuste 4-28, fabricada sob desenho específico para garantir o ajuste entre as roscas da seringa e a válvula. Adaptadores adicionais para acoplamento da agulha metálica com uma das portas da

válvula foram construídos em PTFE, reduzindo o diâmetro do canal interno com ajuda de um tubo de PEEK.

Figura 3.8 – Detalhes do sistema de acoplamento *on-line*. a) Diferentes partes do dispositivo de hifenização; b) Dispositivo de hifenização montado (Autoria própria).

4.1.2 Circuito de controle

A Figura 3.9 apresenta o circuito de controle para o protótipo desenvolvido. Um microcontrolador Arduino Mega 2560 (f) controla simultaneamente os motores de passo (k-n) nos mecanismos de posicionamento, o motor DC no dispositivo de agitação da seringa (e), a válvula solenoide de três vias (a) para a hifenização *on-line* e seu relê (b) de controle, assim como um relê adicional (c) que permite o acionamento automático do instrumento analítico na configuração *on-line*, permitindo o acoplamento sequencial das tarefas realizadas pelo protótipo e o instrumento analítico.

O acionamento dos atuadores lineares nos mecanismos de posicionamento axiais é levado a cabo por motores de passo comandados mediante circuitos de dupla ponte H L298N (g-h) acionados pelo microcontrolador Arduino (f). As bobinas dos motores de passo Nema 17 foram ligadas em configuração bipolar, resultando em duas bobinas ligadas nos bornes dos circuitos L298N. O Arduino controla os motores de passo por meio de saídas digitais, ligadas às entradas lógicas dos L298N.

O dispositivo de agitação na seringa foi operado por um motor RB-Sbo-49 DC (e), e comandado através de um modulo dupla ponte H L298N (d). Dois módulos relê 10 A (Songle®, 5 V) (b, c) foram usados para controlar a válvula solenoide de três vias (a) e para ativar o acionamento automático do instrumento analítico nas aplicações *on-line*. Finalmente, todo o circuito foi alimentado por uma fonte chaveada AC/DC de 12 V, 10 A.

Figura 3.9 - Configuração eletrônica para o controle do protótipo desenvolvido. a) Válvula solenoide; b-c) Módulos de relê; d, g-j) Módulos de circuito integrado dupla ponte H L298N; e) Motor DC; k-n) Motores de passo (Autoria própria).

4.1.3 Software de controle

O protótipo desenvolvido é controlado a partir de um computador utilizando comunicação via USB. Os programas para execução dos diferentes procedimentos de preparo de amostras foram escritos no ambiente de desenvolvimento de Arduino (IDE) usando a biblioteca `<stepper.h>`. Os programas foram escritos utilizando lógica baseada em funções.

Para cada tarefa executável pelo protótipo, incluindo o movimento de cada mecanismo de posicionamento, acionamento da seringa, ativação da válvula e comunicação com o

instrumento analítico, foi criada uma função específica. Assim, um procedimento de extração determinado é programado pela organização sequencial de todas as funções individuais que compõem o procedimento. A execução de cada uma das funções individuais, incluindo o procedimento geral de extração, é controlada por comandos individuais introduzidos via comunicação serial.

Na informação suplementar encontram-se disponíveis *Sketches* de Arduino para operação do protótipo durante a execução de microextrações mediante SDME e HF-LPME, tanto no modo *dynamic*, quanto no modo estático, assim como exemplos de programas para procedimentos acoplados *on-line* com cromatografia líquida (Programa PA3- PA4).

4.2 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO PROTÓTIPO DESENVOLVIDO

4.2.1 Ensaios preliminares

Tal como no desenvolvimento do protótipo do robô cartesiano multisseringa para MEPS (Capítulo 2), uma vez construído e programado o protótipo de *autosampler*, procedeu-se a avaliar seu desempenho na realização de procedimentos de microextração em fase líquida. Para isto, foram planejados e realizados experimentos para extração de hidrocarbonetos poliaromáticos mediante formas dinâmicas da SDME e a HF-LPME.

Uma primeira avaliação do desempenho do protótipo foi obtida mediante a comparação da reprodutibilidade dos perfis cromatográficos obtidos para a extração de HPAs no *headspace* de uma amostra de 4 mL de esgoto sanitário. O protótipo foi programado para formar gotas de 60 μ L (H₂O:MeCN 30:70), executando 50 ciclos de exposição/retração da gota intervalos de 5 s cada.

A realização de extrações mediante o procedimento proposto pode resultar desafiante e seu sucesso depende do controle adequado de variáveis tais como temperatura, velocidade de agitação e especialmente, estabilidade das gotas empregadas, do tempo de exposição das mesmas e seu volume.

As extrações foram realizadas em triplicata e o protótipo demonstrou alta precisão, permitindo executar réplicas dos experimentos com erros relativos inferiores a 20 % (Figura 3.10).

Figura 3.10 - Respostas cromatográficas para três réplicas de extrações de HPAs no modo *headspace*, mediante SDME dinâmica, em amostras de esgoto sanitário ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) (Autoria própria).

Numa segunda etapa de avaliação o protótipo foi programado para executar um procedimento de microextração mediante HF-LPME dinâmico. Neste caso, um segmento de fibra tubular porosa de 5 cm de comprimento (diâmetro interno: $200 \mu\text{m}$; tamanho do poro $0,2 \mu\text{m}$) foi inicialmente recoberto por imersão em undecano (C_{11}), lavado interna e externamente com água, e usado na extração de HPAs em amostras de esgoto sanitário (2 mL , $25 \mu\text{g L}^{-1}$). Uma das extremidades da fibra foi conectada na agulha de uma seringa de microextração ($250 \mu\text{L}$), operada pelo protótipo, e a outra a um sifão de PEEK ($170 \mu\text{m}$ de diâmetro) com o extremo final imerso em $100 \mu\text{L}$ de MeCN, tal como ilustrado na Figura 3.11.

Figura 3.11 - Respostas cromatográficas para três réplicas de extrações de HPAs em amostras de esgoto sanitário ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) mediante HF-LPME (Autoria própria).

Por programação do protótipo, 75 μL de MeCN foram continuamente reciclados através da fibra tubular porosa, desde o recipiente de MeCN e para o interior da microsseringa. Com ciclos de recirculação, com uma vazão de $0,65 \text{ mL min}^{-1}$, permitiram obter suficiente recuperação e pré-concentração sem perdas significativas de solvente de extração e com adequada reprodutibilidade. A automatização do procedimento, utilizando o protótipo desenvolvido, permitiu realizar réplicas do procedimento com erros relativos inferiores a 20 %.

4.2.2 Desenvolvimento de um método para determinação de triazinas mediante SDME acoplada *on-line* coma HPLC

Neste estudo, a microextração em gota única (SDME) e a cromatografia líquida (HPLC) foram integradas *on-line* pela primeira vez em uma configuração totalmente automatizada. A SDME é realizada como descrita na Seção 3.3.3. Simazina, atrazina e propazina, herbicidas do grupo das triazinas, foram empregadas como compostos modelo para avaliar o desempenho do sistema desenvolvido, incluindo estudo das variáveis influentes no processo, determinação das figuras de mérito do método proposto e aplicação na análise de amostras reais.

Seleção dos solventes de extração e dispersão

Em SDME, a seleção do solvente de extração é um parâmetro determinante da eficiência da extração. Neste caso, o solvente de extração deve ser compatível com a análise por HPLC, imiscível em água e ter alta afinidade pelos analitos de interesse, de forma que seja possível obter suficiente seletividade e eficiente enriquecimento dos compostos alvo.

Triazinas têm sido extraídas por diferentes versões de microextração em fase líquida [16], incluindo SDME. Solventes clorados, solventes supramoleculares, líquidos iônicos e álcoois graxos encontram-se entre os solventes mais empregados pelos pesquisadores na extração de triazinas em fase líquida [17].

Assim, as eficiências de extração de 1-octanol, 1-nonanol e 1-dodecano foram estudadas (Figura 3.12a). 1-octanol e 1-nonanol se mostraram mais eficientes do que o 1-decanol sob as condições experimentais estudadas. Diferenças entre as respostas cromatográficas obtidas em extrações realizadas empregando 1-octanol e 1-nonanol não foram estatisticamente

significativas e 1-octanol foi selecionado como solvente de extração para os posteriores experimentos.

Efeito do volume da gota

De acordo com Jeanot e Cantwell [18], tal como em todos os formatos de extrações em fase líquida, em SDME a quantidade de analito extraído é diretamente proporcional ao volume de fase orgânica empregado, pois a concentração no equilíbrio está dada pela relação:

$$C_{oeq} = KC_{weq} = \frac{KC_w^o}{1 + KV_o/V_w}$$

Sendo K a constante de distribuição no equilíbrio, C_{weq} a concentração da fase aquosa no equilíbrio, C_w^o a concentração inicial da fração aquosa e V_o e V_w os volumes das frações orgânica e aquosa respectivamente [19].

Adicionalmente, em SDME gotas maiores têm maior área superficial, que eventualmente podem proporcionar maiores superfícies de contato entre as fases, favorecendo desta forma a transferência dos analitos entre as fases. No entanto, maiores volumes de extração também implicam maiores tempos para atingir o equilíbrio. Assim, o emprego de gotas grandes pode resultar em altos fatores de enriquecimento, quanto à extração é seguida pela secagem e ressuspensão do extrato enriquecido em uma proporção menor do solvente de injeção. Enquanto que, gotas menores resultam em maiores fatores de enriquecimento, tal como no caso de acoplamento *at-line* da SDME com a análise mediante cromatografia gasosa. Neste caso, por se tratar de uma extração acoplada de forma on-line com HPLC, na qual a totalidade do extrato é injetada no sistema cromatográfico, é desejável usar o volume mínimo possível de extração.

A eficiência de extração para diferentes volumes de gotas foi estudada entre 30-100 μL (Figura 3.12b). Embora o volume do loop de injeção usado foi de 2 μL , a linha do acoplamento gerou volume morto em torno dos 30 μL , o que terminou afetando a resposta analítica e sua reprodutibilidade, quando uma gota de 30 μL foi usada na extração. As melhores respostas cromatográficas foram obtidas usando gotas de 60 μL , sendo este o volume selecionado para a execução dos consequentes experimentos.

Figura 3.12 – Efeito das variáveis influentes do processo. a) Seleção do solvente de extração. b) Seleção do volume da gota. c) Efeito do tempo de extração. d) Efeito da adição de sal. e) Efeito da agitação. Eixo Y é representado como a área de pico normalizada (Autoria própria).

Efeito do tempo de extração

O modelo cinético geral para microextrações em fase líquida tem descrito a relação entre a concentração da fase orgânica (C_o) em função do tempo (t), como seguindo um modelo de

primeira ordem. Dependendo da constante de distribuição e da relação de fases, em SDME o tempo necessário pode chegar a ser da ordem de horas, resultando em procedimentos lentos.

O estudo da influência do tempo de exposição da gota sobre a eficiência da extração mostrou que maiores tempos de exposição da gota geram maiores fatores de enriquecimento do extrato orgânico (Figura 3.12c). Assim, buscando a maior frequência analítica possível, mediante a adequada sincronização dos tempos de extração e análise cromatográfica, um tempo de extração máximo de 10 min foi selecionado para a realização dos posteriores experimentos.

Efeito do ajuste da força iônica

O efeito da adição de sal depende do analito e do tipo de sal utilizado e efeitos positivos e negativos da adição de sal têm sido relatados. Em extrações em fase líquida, o aumento da concentração de espécies carregadas na fase aquosa normalmente diminui a solubilidade dos analitos, promovendo a extração pela fase orgânica. De outra parte, a adição de sal também incrementa a viscosidade da fase aquosa, afetando a taxa de transferência dos analitos entre as fases.

Para avaliar o efeito da força iônica, foram realizadas extrações com diferentes concentrações de sal (0,0 %, 2,0 % e 5,0 % de NaCl, Figura 3.12d). Não foi observado nenhum impacto significativo na eficiência de extração devido a adição de sal. Portanto, os experimentos posteriores foram realizados sem ajuste da força iônica da solução.

Efeito da agitação

A agitação é um parâmetro simples que permite incrementar a taxa de transferência de analitos entre as fases e, portanto incrementar a eficiência da extração, tal como foi constatado mediante a realização de extrações com e sem agitação (Figura 3.12e). Em LPME, maiores velocidades de agitação normalmente reduzem o tempo requerido para atingir o equilíbrio. No entanto, em SDME, excessiva velocidade de agitação pode afetar a estabilidade das gotas, inviabilizando o procedimento. Neste caso, foram estabelecidos 600 rpm como taxa de agitação máxima possível sem prejuízo da estabilidade da gota de extração.

Figuras de mérito do método desenvolvido

Sob as condições experimentais selecionadas, o desempenho analítico do método automatizado *on-line* SDME foi avaliado (Tabela 3.1). Os limites de detecção (LODs) foram determinados como a concentração mínima para a qual se obteve uma relação sinal/ruído ≥ 3 e variaram de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 3.1 – Figuras de mérito do método *on-line* SDME automatizado desenvolvido

Analito	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente angular ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	Intercepto	r^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intradia RSD, %	Interdias RSD, %	EF
Simazina	5-250	2735,5	760,25	0,9942	2,5	13,46	13,67	11
Atrazina	5-250	2353,2	917,18	0,9933	2,5	12,03	11,32	17
Propazina	10-250	4224,9	888,93	0,9917	5,0	11,13	10,58	18

As curvas de calibração foram obtidas a partir dos limites de quantificação (sinal/ruído ≥ 10) até 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada triazina, medindo 6 níveis de concentração em triplicata. Foi obtida uma resposta linear com coeficientes de variação (r^2) entre de 0,991 e 0,994. As precisões intradia e interdias como RSD (%) foram avaliadas para 6 repetições a um nível de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, no mesmo dia e em dois dias consecutivos. Os RSDs intradia foram $<13,5\%$, e os RSD interdias foram $<13,7\%$, mostrando adequada reprodutibilidade do procedimento de preparação de amostras automatizado desenvolvido.

Os fatores de enriquecimento (EF) foram calculados como a relação entre a concentração de analito na gota injetada e na amostra original. A concentração na fase coletada foi obtida a partir da curva de calibração de uma injeção direta de uma solução padrão de triazinas em 1-octanol. EFs entre 11-18 foram obtidos nas condições selecionadas (Tabela 3.1).

A Figura 3.13 mostra, a modo de exemplo, um dos cromatogramas obtidos para a injeção direta de uma solução padrão de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de triazinas e uma injeção do extrato obtido após *on-line* SDME automatizada de uma amostra de água ultrapura enriquecida com 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos. A produtividade nas condições de extração selecionadas e aplicando todo o procedimento, incluindo etapas de lavagem, permitiram a extração de 4 amostras por hora.

Figura 3.13 – Cromatograma ilustrativo para a injeção direta de uma solução padrão de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ triazinas (linha preta) e o extrato da mesma amostra padrão após *on-line* SDME (linha laranja) (Autoria própria).

O desempenho do método desenvolvido foi comparado com outros métodos para extração de triazinas mediante SDME seguida da análise cromatográfica (Tabela 3.2). Até o melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro relato referente à automatização/hifenação de SDME e a análise mediante HPLC, fato que representa uma grande vantagem ante os métodos previamente relatados na literatura. Em comparação com a SDME manual de triazinas, a abordagem relatada neste trabalho mostrou-se mais rápida, resultando em maior frequência analítica.

Tabela 3.2 – Comparação do método desenvolvido com procedimentos previamente descritos, usando SDME na determinação de triazinas.

Método	Solvente	Volume da gota	Volume da amostra	Tempo de extração	Análises	EFs	Ref.
SDME manual	1-octanol	20 μL	5 mL	40 min	HPLC-UV-Vis	60 - 90	[17]
SDME manual	Acetato de butila	3 μL	1 mL	15 min	GC-MS	40 - 180	[20]
SDME manual	1-octanol	3 μL	5 mL	20 min	HPLC-DAD	5 - 25	[21]
SDME manual	Tolueno	3 μL	3 mL	20 min	GC-MS	19 - 42	[22]
SDME automatizado	1-octanol	8 μL	8 mL	10 min	HPLC-UV-Vis	12-18	Este trabalho

Aplicação do método desenvolvido à análise de amostras reais

O procedimento automatizado SDME *on-line* foi aplicado à extração e determinação de triazinas em amostras comerciais de água mineral, água de coco e chá de pêssego (Tabela 3.3). Todos os produtos foram adquiridos no mercado local e nenhum procedimento prévio de preparo das amostras foi realizado. Nenhum dos analitos foi detectado por análise direta de alíquotas de 8 mL de cada um dos produtos.

Então amostras de cada produto foram enriquecidas com uma solução padrão de triazinas ($25 \mu\text{g L}^{-1}$). Os valores de recuperação das amostras de água de mineral variaram entre 89 e 91 %, mostrando a adequabilidade do método para este tipo de amostra.

Com o incremento na complexidade das amostras, maiores efeitos de matriz foram observados e menores recuperações foram obtidas. Em água de coco as recuperações oscilaram entre 64 e 67 %, entanto que, para as amostras de chá a atrazina foi detectada em concentração abaixo do limite de quantificação.

Tabela 3.3 – Resultados para a determinação de triazinas em amostras de bebidas comerciais pelo método *on-line* SDME desenvolvido

Analitos	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra					
		Água mineral		Água de coco		Chá de pêssego	
		Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Simazina	20	$17,8 \pm 1.1$	89	$13,3 \pm 0.4$	67	$7,7 \pm 1.0$	38
Atrazina	20	$16,2 \pm 1.4$	81	$12,8 \pm 0.6$	64	< LQ --	--
Propazina	20	$18,2 \pm 1.3$	91	$12,8 \pm 0.8$	64	$5,4 \pm 0.9$	27

5. CONCLUSÃO

Um sistema tipo robô cartesiano dedicado à automatização de técnicas miniaturizadas de preparo de amostra foi desenvolvido. Este é um sistema de baixo custo, baseado em ferramentas de hardware e software *open-source*, facilmente replicável em outros laboratórios de química analítica.

O protótipo desenvolvido se mostrou eficiente na execução de procedimentos de microextração empregando técnicas como HF-LPME e SDME. Igualmente, a integração *on-*

line de uma microextração em fase líquida com análise mediante cromatografia líquida foi conseguida pela primeira vez.

O procedimento *on-line* SDME desenvolvido foi aplicado satisfatoriamente à análise de amostras complexas, mostrando-se altamente produtivo, com a frequência analítica de até 4 amostras por hora, de forma completamente automatizada.

Atualmente, o protótipo desenvolvido está auxiliando o desenvolvimento de outras pesquisas e projetos no nosso grupo de pesquisa, fornecendo novas possibilidades no desenvolvimento de métodos automatizados.

Trabalhos futuros poderão explorar a acoplamento *on-line* do protótipo desenvolvido com a análise mediante espectrometria de massas, permitindo o desenvolvimento de métodos automatizados para determinações não mediante LC-MS, com alta seletividade e sensibilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SARAFAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 1–14, 2010.
2. HE, Y.; LEE, H. K. Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 22, p. 4634–4640, 1997.
3. ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; GRZEŚKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 1382–1399, 2011.
4. JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 2236–2240, 1996.
5. PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650–2656, 1999.
6. ALEXOVIČ, M.; HORSTKOTTE, B.; ŠRÁMKOVÁ, I.; SOLICH, P.; SABO, J. Automation of dispersive liquid–liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow-batch and in-syringe modes. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 86, p. 39–55, 2017.
7. ALEXOVIČ, M.; HORSTKOTTE, B.; SOLICH, P.; SABO, J. Automation of static and dynamic non-dispersive liquid phase microextraction. Part 1: Approaches based on extractant drop-, plug-, film- and microflow-formation. **Analytica Chimica Acta**, v. 906, p. 22–40, 2016.
8. ALEXOVIČ, M.; HORSTKOTTE, B.; SOLICH, P.; SABO, J. Automation of static and dynamic non-dispersive liquid phase microextraction. Part 2: Approaches based on impregnated membranes and porous supports. **Analytica Chimica Acta**, v. 907, p. 18–30, 2016.
9. MAYA, F.; HORSTKOTTE, B.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, V. Automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 1–8, 2014.
10. CLAVIJO, S.; AVIVAR, J.; SUÁREZ, R.; CERDÀ, V. Analytical strategies for coupling separation and flow-injection techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 26–33, 2015.
11. ŠRÁMKOVÁ, I.; HORSTKOTTE, B.; SOLICH, P.; SKLENÁŘOVÁ, H. Automated in-syringe single-drop head-space micro-extraction applied to the determination of ethanol in wine samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 828, p. 53–60, 2014.

12. ŠRÁMKOVÁ, I.; HORSTKOTTE, B.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P.; KOLEV, S. D. A novel approach to Lab-In-Syringe Head-Space Single-Drop Microextraction and on-drop sensing of ammonia. **Analytica Chimica Acta**, v. 934, p. 132–144, 2016.
13. ŠRÁMKOVÁ, I. H.; HORSTKOTTE, B.; FIKAROVÁ, K.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P. Direct-immersion single-drop microextraction and in-drop stirring microextraction for the determination of nanomolar concentrations of lead using automated Lab-In-Syringe technique. **Talanta**, v. 184, p. 162–172, 2018.
14. OUYANG, G.; ZHAO, W.; PAWLISZYN, J. Automation and optimization of liquid-phase microextraction by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1138, n. 1–2, p. 47–54, 2007.
15. PFANNKUCH, E. Sample preparation for chromatography: how much can be automated? **LCGC North America**, v. 31, n. 3, p. 34–39, 2013.
16. ABBAS, H. H.; ELBASHIR, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Chromatographic methods for analysis of triazine herbicides. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 226–240, 2015.
17. YE, C.; ZHOU, Q.; WANG, X. Improved single-drop microextraction for high sensitive analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, n. 1, p. 7–13, 2007.
18. JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 235–239, 1997.
19. JEANNOT, M. A.; PRZYJAZNY, A.; KOKOSA, J. M. Single drop microextraction-Development, applications and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2326–2336, 2010.
20. BAGHERI, H.; KHALILIAN, F. Immersed solvent microextraction and gas chromatography-mass spectrometric detection of s-triazine herbicides in aquatic media. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, n. 1–2, p. 81–87, 2005.
21. YOHANNES, A.; TOLESA, T.; MERDASSA, Y.; MEGERSA, N. Single drop microextraction analytical technique for simultaneous separation and trace enrichment of atrazine and its major degradation products from environmental waters followed by liquid chromatographic determination. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**. 2016, <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000330>.
22. SHEN, G.; HIAN, K. L. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 648–654, 2002.

Automatização da DLLME–SFO por integração de sistemas em fluxo, robótica *open–source* e impressão 3D

Este capítulo é uma adaptação de um artigo publicado na revista Talanta, como produto da estância de investigação do autor na Universidad de las Islas Baleares – UIB [1].

1. INTRODUÇÃO – DLLME-SFO

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) é uma técnica de preparo de amostras na qual, o solvente de extração é injetado rapidamente na amostra em presença de um solvente dispersor que aumenta a área de contato entre as fases e, portanto, incrementa a eficiência da extração [2].

Desde a sua primeira aplicação em 2006 [3], a DLLME tem resultado em alta eficiência de extração, amplo escopo de aplicação e baixo consumo de solventes orgânicos [4]. No entanto, a separação e coleta da fase orgânica e a automação do procedimento são ainda algumas das desvantagens mais citadas desta técnica [5].

Nos últimos anos, vários esforços têm sido feitos para automatizar a DLLME [6,7]. Amostradores automáticos têm sido usados como plataformas instrumentais para a automação em *batch* da DLLME usando solventes de baixa densidade e análise por GC-MS [8-10].

Também, as técnicas de análise em fluxo têm demonstrado ser ferramentas versáteis para a automação DLLME [11], incluindo os modos *on-line* [12,13], *flow-batch* [14,15], *in-syringe* [16,17] e abordagens de extração com agitação magnética dentro da seringa [18-21].

Uma abordagem interessante para superar as limitações na separação de fases é a DLLME com solidificação da fase orgânica flutuante (DLLME-SFO) [22,23]. Na DLLME-SFO, um solvente de baixa densidade com um ponto de fusão próximo da temperatura ambiente (10 - 25 °C) é usado como fase extratora. Após a separação de fases, a mistura é arrefecida num banho de gelo, permitindo a recuperação da fase orgânica solidificada.

Múltiplos métodos analíticos têm sido desenvolvidos usando DLLME-SFO no modo manual [24,25], mas sua automação ainda não tem sido relatada. A automação de DLLME-SFO poderia melhorar a repetibilidade, a reprodutibilidade da técnica, minimizar a contaminação cruzada, facilitar a manipulação de solventes orgânicos, bem como aumentar a frequência de extração, evitando a centrifugação e as etapas manuais de solidificação/fusão que retardam o processo.

Intentos para coletar a fase orgânica por solidificação após a DLLME, usando dispositivos comerciais com temperatura programável, têm sido previamente relatados [26].

De outra parte, a robótica *open-source* está se tornando um tópico de grande interesse no desenvolvimento de ferramentas automatizadas para análises químicas [27,28], incluindo, o uso de braços robóticos multieixos em ensaios por espectrometria de massas [29,30]. Os braços robóticos multieixo têm um alto grau de liberdade e flexibilidade. No entanto, seu uso para a automação de métodos analíticos pode resultar limitado dado a grande quantidade de operações mecânicas necessárias.

De outro lado, a hifenização da robótica com técnicas em fluxo poderia permitir aumentar a frequência de análise, minimizar a produção de resíduos e evitar a contaminação cruzada da amostra. O principal impedimento para alcançar a integração sinérgica da robótica *open-source* com técnicas em fluxo é o design preciso de interfaces apropriadas que permitam sua hifenação.

A impressão em 3D é uma técnica de fabricação emergente, que tem demonstrado ser uma ferramenta versátil para a fabricação de dispositivos fluídicos em aplicações analíticas, especialmente em extrações em fase sólida [31-33]. Contudo, a impressão 3D ainda não foi explorada para projetar dispositivos dedicados à separação de fases em técnicas de extração líquido-líquido.

Um parâmetro crítico de aplicação de dispositivos impressos em 3D é a limitada compatibilidade dos materiais poliméricos disponíveis para impressão com alguns solventes orgânicos utilizados em extrações em fase líquida.

Nesta última parte da tese do doutorado foi desenvolvido um novo conceito de automação baseado na hifenização de ferramentas de robótica *open-source* com técnicas de análise de fluxo usando interfaces impressas em 3D, explorando o desenvolvimento de novas estratégias analíticas.

A DLLME com agitação *in-syringe* foi automatizada com base em um sistema de análise por injeção sequencial (SIA) [34,35]. Após a DLLME, a solidificação e recuperação da fase orgânica foram realizadas com ajuda de um braço robótico multieixo, equipado com um dispositivo separador de fases impresso em 3D, dotado com um circuito de aquecimento/resfriamento utilizando um set de pastilhas termoeletrônicas *Peltier* e controlado via Arduino (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Representação do sistema DLLME-SFO automatizado projetado [1].

O *sketch* Arduino foi incorporado ao software *AutoAnalysis* através de uma DLL específica, integrando as ações do sistema de fluxo e o braço robótico em um método operado por um único pacote de software. Como resultado, a técnica DLLME-SFO foi automatizada completamente pela primeira vez.

Como prova de conceito, o sistema desenvolvido foi aplicado à extração de ésteres de alquila do ácido 4-hidroxibenzóico (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno), tipicamente utilizados como agentes antimicrobianos.

A determinação dos parabenos selecionados foi realizada em produtos de cuidado pessoal, água, urina e saliva, mostrando a ampla aplicabilidade do sistema desenvolvido.

2. OBJETIVOS

- Desenvolver um sistema para a automatização do preparo de amostras mediante microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante, baseado na integração de ferramentas de robótica *open-source*, técnicas em fluxo e impressão 3D.
- Validar o sistema desenvolvido por meio de um método para extração e determinação de parabenos em produtos de cuidado pessoal, assim como em matrizes de interesse ambiental e biológico.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 PARTES E COMPONENTES DO SISTEMA DLLME-SFO AUTOMATIZADO

No desenvolvimento do sistema automatizado foram empregados uma bomba de seringa (módulo de bureta multissegmentada, BU4S, Crison Instruments, SA, Alella, Barcelona, Espanha), uma válvula de seleção multiposições de oito portas (Sciware systems SL, Palma de Maiorca, Espanha) e um robô Arduino® Braccio modificado (loja online Arduino) equipado com um separador de fases *lab-made*. A bomba de seringa foi equipada com uma seringa de vidro de 5 ml (Hamilton, Bonaduz, Suíça).

Componentes eletrônicos, tais como, microcontrolador Arduino UNO, módulo dupla ponte H L298N, pastilhas termoeletrônicas *Peltier* (TEC1-12705A), módulo relê (Songle®, 5V) e motor DC (RB-Sbo-49) foram comprados na Mallorca electrónica componentes (Palma de Maiorca, Espanha). Um *cooler* para ventilação do sistema foi reciclado a partir do processador de uma CPU em desuso.

O software *AutoAnalysis* 5.0 foi utilizado no controle da bomba de seringa e da válvula de seleção, assim como do microcontrolador Arduino. O microcontrolador foi previamente programado para comandar a temperatura das pastilhas *Peltier*, o movimento do braço robótico e o procedimento de agitação na seringa.

3.2 IMPRESSÃO 3D DE DISPOSITIVOS SEPARADORES DE FASES

Dispositivos para separação de fases impressos em 3D foram projetados usando o *software* de modelagem 3D Rhinoceros 5.0 e impressos a partir do arquivo de estereolitografia (STL).

Peças de PMMA foram fabricadas por impressão 3D estereolitográfica com uma resolução de 0,05 mm. Foi utilizada resina Clear Photoactive composta por monômeros e oligômeros de PMMA e uma Impressora 3D Form + 1 (Formlabs Inc., Somerville, EUA). Após impressas, as peças foram lavadas com álcool isopropílico, secas e curadas por irradiação UV a 254 nm durante 4 horas em uma câmara de polimerização ultravioleta CL-1000.

Peças de polietileno tereftalato glicol (PETG) foram impressas pela técnica de modelagem de deposição fundida (FDM) usando um filamento transparente PETG (1,75 mm) em uma impressora Sigma BCNED usando os seguintes parâmetros: altura da camada de 200 μm , taxa de fluxo de material de $\sim 60\%$, temperatura do leito 90 °C e temperatura da extrusora de 240 °C.

Os arquivos .STL para todas as peças impressas em 3D estão disponíveis na informação suplementar (Modelos M1-M3).

3.3 PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q - Millipore (18,2 M Ω · cm, Millipore, Bedford, MA, EUA). Soluções de estoque (500 mg L⁻¹) foram preparadas a partir de metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno (Fluka, Madrid, Espanha) sólidos de grau analítico em acetonitrila grau HPLC (Scharlau, Barcelona, Espanha) e armazenadas a 4 °C.

As soluções de trabalho foram preparadas por diluição em água e armazenadas a 4 °C. Isopropanol (99%, Domotek) foi utilizado para a limpeza dos dispositivos impressos em 3D.

Metanol (MeOH), acetona, tetra-hidrofurano (THF), acetato de etila (AcEOt) e isopropanol (i-Pro) grau HPLC foram adquiridos da Scharlau (Barcelona, Espanha). Os solventes de extração, 1-undecanol e 1-dodecanol, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). NaCl (99,5%) e Na₂SO₄ (99%) foram adquiridos de Scharlau (Barcelona, Espanha).

3.4 COLETA E PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS

A determinação de parabenos foi realizada em água de torneira, água de mar, água de piscina, urina, saliva humana e produtos de higiene pessoal (gel de banho, creme para as mãos, creme de cabelo e talco corporal).

As amostras de água de torneira foram coletadas no laboratório de química analítica, automatização e meio ambiente da Universidade de las Islas Baleares (Palma de Maiorca, Espanha). Amostras de água de mar foram coletadas no verão de 2017 na praia de Palma de Mallorca (Espanha). As amostras de água da piscina foram obtidas de uma piscina residencial. As amostras de água foram enriquecidas com 25 µg L⁻¹ de cada analito e a extração por DLLME-SFO automatizada foi realizada sem qualquer tratamento prévio.

As amostras de urina, fornecidas por voluntários saudáveis, foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5,0 min e 1,5 mL de sobrenadante foram diluídos até 50,0 mL com água ultrapura. Esta solução final foi enriquecida com 25 µg L⁻¹ dos analitos.

Amostras de saliva humana foram coletadas de voluntários no laboratório, após a lavagem da cavidade oral com 100,0 mL de água ultrapura. As amostras de saliva foram preparadas por diluição de 1,0 mL de saliva com 4,0 mL de água ultrapura. A mistura foi agitada em vortex durante 2,0 minutos e centrifugada a 3000 rpm durante 5,0 min. O sobrenadante foi enriquecido com 25 µg L⁻¹ dos analitos e analisadas de acordo com o procedimento desenvolvido para DLLM-SFO automatizado.

Os produtos de higiene pessoal foram analisados após diluição do produto comercial com água ultrapura. O gel de banho foi diluído cinquenta mil vezes. Um grama (1,0 g) de produto comercial foi dissolvido em 1,0 L de água ultrapura sob agitação suave (para evitar a formação excessiva de espuma) durante 20 min. Um mililitro (1,0 mL) da solução anterior foi

diluído para 50,0 mL e a solução resultante foi utilizada na determinação do conteúdo de parabenos mediante DLLME-SFO automatizado.

Creme de mãos foi diluído mil vezes. Um grama (1,0 g) de produto comercial foi diluído em 1,0 L de água ultrapura. Para a análise do creme para o cabelo, 1,0 g de produto comercial foi diluído em 1,0 L de água ultrapura e 1 mL dessa solução foi diluída novamente até 100,0 mL com água ultrapura. As amostras de talco corporal foram preparadas por suspensão de 1,0 g do produto em 1,0 L de água ultrapura. A mistura resultante foi sonicada por 15 minutos, centrifugada durante 10 minutos e filtrada utilizando uma membrana de 0,22 µm. Finalmente, 1,0 mL de sobrenadante foi diluído para 50,0 mL com água ultrapura e a solução resultante foi usada para DLLME-SFO automatizada.

3.5 PROCEDIMENTO DLLME-SFO AUTOMATIZADO

O procedimento desenvolvido para a automatização da DLLME-SFO inclui oito etapas (Figura 4.2). Na etapa 1, a válvula de seleção está conectada à posição # 4 e 1,0 mL da mistura contendo os solventes de extração e dispersão (1-dodecanol: MeOH, 15:85, v/v) é carregado lentamente na seringa (0,9 mL min⁻¹).

Na Etapa 2, a válvula de seleção é conectada à posição # 3 e 4,0 mL de amostra são carregados a alta vazão, para facilitar a formação da dispersão dentro da seringa (20,0 mL min⁻¹). Esta mistura é agitada magneticamente durante 5,0 s para melhorar o processo de dispersão e separação de fases (Etapas 3-4).

A mistura aquosa/orgânica permanece dentro da seringa enquanto as pastilhas *Peltier* são ativadas e o separador de fases é enfriado (Etapa 4). Após 1,0 min de resfriamento, a válvula de seleção conecta à posição # 2 e o robô move-se para o estado de carregamento, com o separador de fase na posição horizontal (Etapa 5).

Figura 4.2 – Procedimento analítico para DLLME-SFO [1].

O primeiro 1,0 mL da mistura de extração na seringa, contendo a fase orgânica parcialmente separada, é bombeada lentamente através do separador de fases com a vazão mínima permitido pela bomba da seringa ($0,9 \text{ mL min}^{-1}$). Os 4,0 mL de líquido remanescente na seringa são descartados ao reservatório de resíduos localizado na posição *Off* da válvula solenoide na cabeça da seringa.

Uma vez que o extrato orgânico estiver completamente solidificado, o braço robótico coloca o separador de fase na posição vertical direcionada sobre um reservatório de resíduos, e o separador de fase é seco passando 3 x 5,0 mL *plugs* de ar a alta vazão (Etapa 6).

Na etapa 7, o braço robótico move-se em direção a um frasco vazio e o separador de fase é aquecido permitindo a coleta da fase orgânica previamente solidificada. Finalmente, para evitar o efeito de memória, o separador de fase se move novamente para a posição do reservatório de resíduos, onde o separador de fase é lavado com $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (20:80, v/v) seguido de secagem ao ar (Etapa 8).

3.6 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A análise cromatográfica foi realizada utilizando um instrumento de HPLC Jasco, equipado com uma bomba de alta pressão (PU-4180) e um detector de arranjo de diodos UV-Vis (MD-4017). A separação foi realizada a temperatura ambiente (25°C) numa coluna

analítica Phenomenex® Kinetex EVO C18 ($4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$), precedida de uma coluna de proteção C18 ($4,6 \times 5$ mm).

Cinquenta microlitros ($50 \mu\text{L}$) do extrato recuperado de 1-dodecanol foram injetados manualmente (volume do loop, $20 \mu\text{L}$), usando uma fase móvel de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (40:60) a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ no modo isocrático. Os analitos foram detectados a 254 nm .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DLLME-SFO AUTOMATIZADO

4.1.1 Configuração instrumental

A automação de DLLME-SFO foi realizada por hifenização de um sistema de análise por injeção sequencial (SIA), equipado com um mecanismo de agitação *in-syringe*, a um dispositivo de separação de fases *lab-made* montado em um braço robótico multieixo modificado, tal como ilustrado na Figura 4.3.

Três servomecanismos do robô multieixos foram usados. Na parte superior do robô foi adaptado o sistema de separação de fases composto por um sistema de ventilação (*cooler* e radiador), quatro pastilhas termoeletrônicas *Peltier* encapsuladas dentro do dispositivo separador de fases fabricado por impressão 3D, conectado ao sistema em fluxo pela a válvula de seleção.

A válvula solenoide de duas vias da bomba da seringa do sistema SIA, foi conectada a um recipiente para coleta de resíduos (posição *Off*) e à porta central da válvula de seleção (posição *On*) através da qual é possível o carregamento e direcionamento de solventes e amostras nas linhas do sistema.

A eficiência da solidificação, discriminação e recuperação por fusão depende da posição em que o braço robótico contém o separador de fases. Cada uma das posições angulares no servomecanismo no braço robótico, para cada uma das etapas no procedimento DLLME-SFO, foram definidas com precisão. Estas informações são detalhadas no *sketch* de Arduino para o controle do robô fornecido nos anexos.

Figura 4.3 – Fotografia do sistema automatizado desenvolvido, composta por um sistema de análise por injeção sequencial hifenizado ao dispositivo de separação de fase montado em um braço robótico multieixo modificado [1].

4.1.2 Circuito de controle

A Figura 4.4 apresenta um esquema do circuito de controle desenvolvido para automatização do sistema proposto.

Figura 4.4 – Esquema do circuito eletrônico para o separador de fase baseado em Arduino para acoplar com o sistema DLLME com agitação da seringa. (a-c) Servomotores no robô angular; (d) Arduino UNO. (e) Módulo de relê; (f) Módulo L298N; (g) Células *Peltier*; (h) RB-Sbo-49 motor DC; (i) *Cooler* para processador i3 [1].

O dispositivo de agitação em seringa foi operado por um motor de corrente contínua RB-Sbo-49, como relatado em trabalhos anteriores [18]. O mecanismo de agitação e a temperatura do dispositivo de separação de fases foram controladas por um mesmo *driver* dupla ponte H L298N (f). Um microcontrolador Arduino UNO controlou simultaneamente todos os componentes eletrônicos do circuito.

O Arduino permitiu a automação dos três servomotores do braço robótico (a-c), das células *Peltier* (g), um módulo relê (e), do sistema de agitação magnética na seringa (h) e o sistema de refrigeração/aquecimento (i).

Os servomotores no braço robótico foram alimentados com fonte de alimentação de 5V (2A) enquanto, as células *Peltier* e o motor de agitação com uma fonte de alimentação de 12V (2A).

A temperatura de resfriamento alcançada no separador de fases dependeu da eficiência do radiador utilizado, do número de células *Peltier* incorporadas e do circuito de conexão (série ou paralelo). Neste caso, quatro células *Peltier* foram suficientes para obter temperaturas inferiores a 15 °C, empregando um refrigerador de processador i7. Este sistema automatizado permitiu a solidificação de solventes orgânicos tipicamente utilizados em DLLME-SFO, tais como álcoois graxos. Além disso, foi corroborado que a conexão elétrica em série das pastilhas *Peltier* atingiu temperaturas mais baixas em um tempo menor do que a conexão em paralelo.

4.1.3 Software e controle

Um *sketch* de Arduino, desenvolvido com base em programação por funções, controlou o aquecimento, o resfriamento, a agitação e os movimentos do robô. Foi criada uma função para a execução de cada uma destas tarefas individuais. Cada função é executada pela introdução do comando apropriado através de comunicação serial. Um comando alfabético foi criado para a execução de cada uma das funções mencionadas. Uma cópia do programa Arduino desenvolvido pode ser consultada na informação suplementar (Programa PA5).

O software *AutoAnalysis* 5.0 (Sciware) foi utilizado para controlar a bomba multisseringa e o módulo de válvula de seleção através de bibliotecas dedicadas (DLLs) (<https://www.sciware-sl.com/products/available-dlls>). Uma DLL adicional foi escrita para acionar as funções programadas no Arduino desde o *AutoAnalysis* 5.0.

4.2 DESENVOLVIMENTO DO DISPOSITIVO SEPARADOR DE FASES

A eficiência na solidificação da fase orgânica após DLLME depende da área de contato efetiva da fase orgânica com a superfície fria. Foi relatado anteriormente o uso de colunas empacotadas com esferas de vidro ou partículas de sílica C18 para melhorar a área efetiva de contato, garantindo assim a solidificação da fase orgânica. Nesses casos a eluição com um solvente adicional foi necessária para a recuperação da fase orgânica [26].

Um separador de fases ideal deve ter a alta eficiência de separação dos dispositivos empacotados, mas não requerer solventes adicionais para evitar a diluição do extrato. Nesse sentido, a impressão em 3D permite a fabricação de objetos sofisticados para aplicações analíticas específicas [37,38].

No preparo de amostras, diferentes exemplos de uso de técnicas de impressão em 3D na fabricação de dispositivos para extração em fase sólida têm sido recentemente reportados [39-48]. No entanto, dispositivos impressos 3D para separação de fases em DLLME ainda não têm sido relatados.

Diferentes configurações de separação de fases foram projetadas, fabricadas e avaliadas (Figura 4.5). As dimensões detalhadas dos separadores de fase impressos 3D estão disponíveis nos anexos, assim como os arquivos .STL para facilitar sua replicação e fabricação (Modelos M1-M3).

Inicialmente, o desempenho do separador de fases mostrado na Figura 4.5a foi avaliado. Este dispositivo baseia-se em um suporte de impressão em 3D com um tubo de vidro encapsulado (0,55 x 100 mm), permitindo a conexão da coluna de vidro com o sistema de fluxo. O suporte de coluna de vidro impresso em 3D foi equipado com um revestimento de alumínio anodizado em forma de canal retangular, facilitando a transferência de calor. Apesar de sua simplicidade e da relativa baixa condutividade térmica do vidro, este dispositivo foi efetivo na separação de fases por solidificação da fase orgânica (Figura 4.5e).

A viabilidade de um separador de fases totalmente impresso 3D também foi avaliada. Este dispositivo é baseado em uma câmara hexagonal alongada (volume interno de 1,5 mL) contendo uma rede integrada de pequenos cubos (Figura 4.5b). Os cubos têm borda de 1,0 mm e são justapostos 0,1 mm com cavidades cúbicas de 0,8 mm de borda, obtendo uma configuração intermediária entre coluna aberta e empacotada. A câmara hexagonal foi selada hermeticamente com uma folha de alumínio anodizado, colada aplicando uma camada fina de

resina Clear FormLabs e curada por radiação UV (254 nm). Conforme mostrado na Figura 4.5f, a separação completa de fases também foi alcançada quando este dispositivo foi utilizado.

Figura 4.5 – Modelos 3D para separadores de fase. a) Separador de fase baseado em coluna tubular aberta de vidro encapsulada em um suporte impresso 3D, e sua montagem com as células *Peltier* e as chapas de alumínio interna e externa; b) Dispositivo mesofluídico de PMMA com formato de coluna, contendo elementos de mistura internos com base em uma rede de microcanais em forma de cubos pequenos; c) Dispositivo mesofluídico PETG com formato de coluna, contendo uma rede de microcanais de uma única camada. d) Fotografia das diferentes etapas de extração; e-g) Imagens da separação de fases por solidificação após a DLLME da rodamina-B (fins ilustrativos) utilizando uma mistura de metanol/1-dodecanol (85:15 v/v) [1].

No entanto, dependendo da natureza dos solventes de extração/dispersão utilizados, podem aparecer bandas adicionais no cromatograma, interferindo na análise. Efeitos devidos à degradação do polímero foram observados e descritos anteriormente, como no caso do uso de dispositivos impressos 3D para a extração de parabenos mediante SPE [41].

A lixiviação de polímeros a partir do dispositivo impresso 3D pode interferir na quantificação dos analitos e também diminuir a vida útil do dispositivo. Neste caso, o uso de separadores de fases totalmente impressos 3D com base em estereolitografia, embora seja viável, está limitado pelos solventes utilizados nos métodos DLLME e pelos analitos selecionados.

PETG tem sido descrito como um polímero para impressão 3D com alta inércia química. Os objetos PETG são normalmente fabricados mediante modelagem de deposição fundida (FDM), que é um modo de impressão menos preciso do que a impressão 3D estereolitográfica. Não foi possível imprimir o separador de fases anteriormente descrito com PETG. Assim, foi necessário adaptar o design para permitir a sua fabricação utilizando FDM.

No dispositivo replanejado, a câmara hexagonal alongada contém uma única camada de prismas hexagonais de 3 mm de altura x 3 mm de borda, separados 1,5 mm (Figura 4.5c). O dispositivo foi selado com uma folha de alumínio anodizado presa com parafusos (Figura 4.5g). Este dispositivo mostrou excelente desempenho para a separação de fases, tal como os dois dispositivos anteriores e nenhum efeito de lixiviação de polímero foi observado ao usar misturas de 1-dodecanol/metanol como fase orgânica.

A principal limitação deste tipo de impressão em 3D (FDM) é sua resolução limitada para criar intrincadas estruturas fluídicas sem vazamento. Isso devido à formação de pequenos poros entre as camadas de material depositadas durante o processo de impressão.

A impressão 3D estereolitográfica foi uma ferramenta de fabricação altamente eficiente para criar dispositivos de separação de fases, com designs altamente sofisticados. No entanto este tipo de impressão requer de novos materiais de impressão inertes. De outra parte, se bem a tecnologia FDM permite criar objetos em materiais quimicamente inertes, tais como o PETG, a resolução desta técnica de impressão pode limitar a confecção de peças destinadas a aplicações micro ou mesofluídicas.

Finalmente, para experimentos posteriores foi selecionado o separador de fases com base em uma coluna tubular aberta em vidro suportada em um suporte impresso em 3D (Figura 4.5a).

4.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO SISTEMA DESENVOLVIDO

4.3.1 Desenvolvimento de um método para a extração de parabenos mediante DLLME-SFO automatizada

Com o intuito de avaliar o desempenho do sistema desenvolvido, um procedimento para extração de parabenos a partir de amostras aquosas foi planejado, programado e aprimorado.

Uma visão geral do método para DLLME-SFO automatizada foi descrita na seção 3.5 é representado na Figura 4.2.

Seleção dos solventes de extração e dispersão

Um solvente de extração apropriado para DLLME-SFO deve possuir uma alta capacidade de extração para os analitos selecionados e um ponto de fusão próximo da temperatura ambiente, que permita a separação eficiente de fases por solidificação. Parabenos foram previamente extraídos por meio da técnica DLLME usando 1-octanol [43], ácido decanóico [45], 1-decanol [47] ou clorobenzeno [49]. Além disso, 1-undecanol e 1-dodecanol são mais adequados para a extração de parabenos no modo DLLME-SFO [50].

Estes dois solventes foram testados usando metanol como dispersor, em uma porcentagem de extrator/dispersor de 15:85 (v/v). Em ambos os casos, a separação de fases foi conseguida usando um tempo de agitação de 5 s seguido por 10 s de espera para quebrar a dispersão. Aproximadamente 110 μL do solvente de extração foram recuperados em todos os casos. O solvente 1-dodecanol mostrou a melhor eficiência de extração (Figura 4.6a). Usando 1-undecanol, a porcentagem de parabenos extraídos foi 20-44% menor, em comparação com os obtidos com 1-dodecanol.

O metanol foi comparado com outros solventes dispersantes, tais como acetona, THF e AcOEt. Em todos os casos, uma dispersão turva após mistura com a fase aquosa, e a subsequente separação de fase foi conseguida. O metanol foi mantido como solvente dispersante, pois apresentou os melhores resultados em termos de eficiência de extração e reprodutibilidade (Figura 4.6b).

O metanol proporcionou uma área de pico 10-40% maior em relação à acetona, ou AcOEt. Quando comparado com THF, não foram observadas diferenças na eficiência de extração. No entanto, apenas com metanol foi conseguida uma DLLME altamente reproduzível obtendo valores de RSD ($n = 3$) na faixa de 2-5%, enquanto com o uso de THF, a RSD variou de 16-17%.

Figura 4.6 - Estudo das variáveis influentes no processo. a) Seleção do solvente de extração; b) Seleção do solvente dispersor; c) Efeito da relação volumétrica extratora/dispersor; d) Efeito da adição de sal; e) Efeito do pH da amostra; f) Efeito da vazão de carga da amostra; g) Efeito do tempo de agitação. Eixo Y, é representado como a área de pico normalizada [1].

A proporção de 1-dodecanol/MeOH na mistura extrator/dispersor também foi estudada. Inicialmente, observou-se que a quantidade mínima de 1-dodecanol na mistura para obter uma recuperação reprodutível da fase orgânica era de 15%. Foram testadas percentagens maiores de 1-dodecanol na mistura (30%, 50%). Esperava-se que um maior volume de solvente de extração aumentasse a eficiência de extração. No entanto, devido à diminuição concomitante do volume de solvente de dispersão, o contato efetivo entre as fases diminuiu, em detrimento da eficiência de extração (Figura 4.6c). Portanto, uma mistura de 1-dodecanol/metanol 15:85 (v:v) foi selecionada para os experimentos posteriores.

Efeito do ajuste da força iônica

Em extrações em fase líquida, o aumento da concentração de espécies carregadas na fase aquosa normalmente diminui a solubilidade dos analitos, promovendo a extração pela fase orgânica. Em DLLME-SFO, o efeito da adição de sal depende do analito e do tipo de sal utilizado [25]. Na extração de parabenos por DLLME, efeitos positivos e negativos da adição de sal têm sido relatados [47,51].

Para avaliar o impacto da força iônica, foram realizadas extrações com diferentes concentrações de sal (1,0% e 3,0%), avaliando o efeito de NaCl e Na₂SO₄. Não foi observado nenhum impacto significativo na eficiência de extração devido à adição de sal. Por tanto, os experimentos adicionais foram realizados sem ajuste da força iônica da solução. A tolerância do método relatado ao sal é adequada para aplicação em diferentes tipos de amostras com conteúdo salino diferente, sem exigir o ajuste das condições de extração (Figura 4.6d).

Efeito do ajuste do pH

O pH da amostra desempenha um papel crucial na extração de analitos com caráter ácido ou básico mediante DLLME. Devido ao caráter hidrofóbico do 1-dodecanol, os parabenos podem ser extraídos em sua forma neutra. Parabenos têm valores de *pKa* entre 8,2 e 8,4, pelo que podem ser extraídos em forma neutra a pH <8.

O efeito do pH foi investigado a partir de quatro soluções padrão com valores de pH de 2,0, 4,0, 6,4 e 10. A extração de parabenos permaneceu constante, exceto para pH 10, condição na qual a quantidade de analito extraído foi desprezível. Isso devido a que neste valor de pH,

os parabenos estão na forma iônica e não podem ser extraídos utilizando solventes hidrofóbicos. O pH da amostra foi mantido em 6,4 (valor medido para água ultrapura) nos experimentos posteriores (Figura 4.6e).

Efeito da vazão de carregamento da amostra

Na DLLME automatizada em seringa, a vazão de carga da amostra é controlada pela velocidade do motor da bomba da seringa. Uma vez que a fase orgânica é carregada na seringa, a fase aquosa é carregada utilizando uma vazão elevada, favorecendo o processo de dispersão.

Foram testadas vazões de carga da amostra de 10,0, 20,0 e 30,0 mL min⁻¹. Os melhores resultados foram alcançados usando 10,0 mL min⁻¹ e 20,0 mL min⁻¹ (Figura 4.6f), selecionando 20,0 mL min⁻¹ para a execução dos experimentos posteriores. A eficiência de extração mais baixa foi obtida usando uma vazão de 30,0 mL min⁻¹, fato explicável devido à formação de vácuo dentro da seringa, limitando o volume de amostra carregada e, portanto, a eficiência de extração.

Efeito do tempo de agitação

A eficiência de extração DLLME foi melhorada incorporando um sistema de agitação na seringa. O tempo de agitação é um parâmetro simples para modular a eficiência de extração como mostrado na Figura 4.6g.

A velocidade de agitação foi ajustada usando o software Arduino a 5000 rpm (5V no motor) e cinco tempos de agitação diferentes foram avaliados: 0, 5; 10, 30 e 120 s (Figura 4.6g). O melhor desempenho de extração foi obtido após 30 s de agitação, selecionando esta condição para a execução dos experimentos posteriores.

Figuras de mérito do método desenvolvido

Nas condições experimentais selecionadas, o desempenho analítico do método automatizado DLLME-SFO foi avaliado (Tabela 4.1). Os limites de detecção (LODs) foram determinados como a concentração mínima para a qual se obteve uma relação Sinal/ruído ≥ 3 e variaram de 0,2 µg L⁻¹ a 1,3 µg L⁻¹. As curvas de calibração foram obtidas a partir dos limites

de quantificação ($3.3 \times \text{LODs}$) até $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada parabeno, medindo 5 níveis de concentração em triplicata.

Tabela 4.1 – Figuras de mérito do método DLLME-SFO automatizado

Analito	Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente angular (L μg^{-1})	Intercepto	r^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intradia RSD, %	Interdias RSD, %	EF
MP	3-100	935,0	-2131,5	0,997	1,3	5,8	7,6	11
EP	2-100	1129,5	-1530,7	0,994	0,8	4,9	8,6	17
PP	2-100	1236,2	-1211,7	0,994	0,2	4,6	7,5	18
BP	7-100	1282,2	2518,1	0,994	0,3	4,7	5,6	22

Foi obtida uma resposta linear com coeficientes de variação (r^2) variando de 0,994 a 0,997. A precisão intradia e interdias como RSD (%) foi avaliada para 6 repetições a um nível de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, no mesmo dia e em 6 dias consecutivos. Os RSDs intradia foram $<5,8\%$, e os RSD interdias foram $<8,6\%$, mostrando a reprodutibilidade do procedimento de preparação de amostras automatizado desenvolvido.

Os fatores de enriquecimento (EF) foram calculados como a relação entre a concentração de analito na fase coletada e na amostra original. A concentração na fase coletada foi obtida a partir da curva de calibração de uma injeção direta de uma solução padrão de parabenos em 1-dodecanol. Além da remoção automatizada da matriz, EFs entre 11-22 foram obtidos nas condições selecionadas. Se necessário, poderiam ser obtidas melhorias adicionais na EF usando uma seringa de extração com um volume de 10 mL e incrementando o volume de amostra extraída.

A Figura 4.7 mostra a modo de exemplo um dos cromatogramas obtidos para a injeção direta de uma solução padrão de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ parabenos e uma injeção do extrato obtido após DLLME-SFO automatizado da mesma solução padrão. A produtividade nas condições de extração selecionadas e aplicando todo o procedimento, incluindo etapas de lavagem, permitiram a extração de quatro amostras por hora.

Figura 4.7 – Cromatograma ilustrativo para a injeção direta de uma solução padrão de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ parabenos (linha laranja) e o extrato da mesma solução padrão após a DLLME-SFO (linha preta) automatizada [1].

O desempenho do método desenvolvido combinando técnicas de fluxo e robótica *open-source* mediante interfaces impressas em 3D foi comparado com outros métodos para extração de parabenos e sua determinação por HPLC-UV (Tabela 4.2). Até o melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro relato referente à extração de parabenos mediante DLLME-SFO automatizada.

Tabela 4.2 – Comparação do método desenvolvido com procedimentos previamente descritos, usando DLLME ou dispositivos impressos 3D para a extração de parabenos e análise HPLC-UV

Método	Volume de amostra (mL)	Fase de extração	LOD ^s ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Efs	Frequência de análises (h ⁻¹)	Ref.
DLLME Manual	10	1-octanol:acetona (0,1:1) / 1,1 mL	0,5-0,8	38-88	--	[43]
DLLME-SFO Manual	24	Vesículas de ácido decanóico:tetrabutyl amônio:água / 0,030 mL	0,2-0,5	--	--	[45]
DLLME-SFO Manual	6,0	1-Dodecanol: metanol (7:50) / 0,57 mL	0,2-1,6	84-126	--	[50]
MSPE in 3D printed device automatizada	1,0	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PANI}$ / $32,5 \pm 3,8$ mg	1,1-4,5	16-25	3	[41]
DLLME-SFO automatizada	4,0	1-Dodecanol: metanol (15:/85) / 1mL	0,3-1,3	11-22	4	Presente trabalho [1]

Em comparação com os resultados relatados para DLLME manual de parabenos [43], incluindo a DLLME-SFO manual, a abordagem proposta no nosso trabalho possui LODs comparáveis, exigindo menos volume de amostra. Em comparação com a extração em fase sólida com partículas magnéticas usando um sistema de injeção de micro-fluxo impresso em 3D [41], foram obtidos LODs e EF semelhantes.

Além disso, o DLLME-SFO automatizado permitiu a manipulação automatizada para a limpeza de amostras biológicas complexas sem problemas de obstrução devido ao uso de fases sólidas, ele usa solventes de extração com baixa toxicidade e baixo custo, e não requer o uso de sorventes caros ou a síntese de novos sorventes.

Aplicação do método desenvolvido à análise de amostras reais

O procedimento automatizado DLLME-SFO foi aplicado à extração e determinação de parabenos em amostras de produtos de cuidado pessoal, água, urina e saliva. Foram analisados quatro produtos de cuidado pessoal diferentes (Tabela 4.3).

As amostras foram preparadas por diluição do produto comercial como descrito na seção 3.4. O MP foi detectado em todas as amostras. O EP foi detectado em talco corporal e PP em gel de banho. O BP não foi detectado em nenhuma das amostras selecionadas. Estes achados se encontram em concordância com as especificações do rótulo dos produtos analisados. O conteúdo de parabenos em todas as amostras esteve abaixo da concentração máxima permitida pela diretiva cosmética 76/768/CEE, que estabeleceu uma concentração máxima de 0,8% (p/p) para a mistura de parabenos em produtos comerciais. Os valores medidos encontrados estão em boa concordância com aqueles anteriormente relatados na literatura para amostras semelhantes [52,53].

Tabela 4.3 – Determinação de parabenos em produtos de cuidados pessoais automatizados DLLME-SFO

Amostra	MP (mg g ⁻¹)	EP (mg g ⁻¹)	PP (mg g ⁻¹)	BP (mg g ⁻¹)	% w/w*
Gel de banho	1,14 ± 0,10	--	0,48 ± 0,02	--	0,16
Creme de mãos	0,024 ± 0,001	--	--	--	0,002
Talco corporal	0,68 ± 0,04	0,72 ± 0,04	--	--	0,14
Creme para cabelo	2,4 ± 0,07	--	--	--	0,24

* % w/w: Conteúdo total de Parabenos expressado como porcentagem em massa

As amostras de água, urina e saliva foram enriquecidas com uma solução padrão de parabenos ($25 \mu\text{g L}^{-1}$). Os valores de recuperação das amostras de água de torneira, água do mar e água piscina variaram de 82 a 121% (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Resultados para a determinação de parabenos em amostras de água pelo método DLLME-SFO automatizado desenvolvido

Analitos	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra					
		Água de torneira		Água de mar		Água de piscina	
		Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
MP	25	$20,6 \pm 0,7$	82	$23,3 \pm 1,5$	93	$25,4 \pm 1,4$	102
EP	25	$23,2 \pm 0,6$	93	$26,2 \pm 1,6$	105	$28,9 \pm 2,6$	115
PP	25	$24,7 \pm 1,5$	99	$27,8 \pm 1,6$	108	$30,2 \pm 0,6$	121
BP	25	$21,6 \pm 1,7$	96	$25,7 \pm 2,1$	103	$29,2 \pm 0,8$	117

No caso de amostras de urina e saliva enriquecidas também foram obtidas recuperações satisfatórias, variando de 82% a 101% (Tabela 4.5). Os RSDs para análise de amostras de água, urina ou saliva em triplicatas variaram entre 0,3% e 8,5%.

Tabela 4.5 – Resultados para a determinação de parabenos em amostras biológicas pelo procedimento DLLME-SFO desenvolvido

Analitos	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra			
		Urina		Saliva	
		Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
MP	25	$23,5 \pm 0,6$	94	$22,6 \pm 0,6$	90
EP	25	$24,8 \pm 0,6$	99	$23,0 \pm 0,3$	92
PP	25	$25,3 \pm 0,6$	101	$24,0 \pm 0,3$	96
BP	25	$22,8 \pm 0,7$	91	$20,6 \pm 0,6$	82

Os valores obtidos para amostras de produtos de cuidado pessoal, amostras de água enriquecidas, assim como urina e saliva demonstraram a viabilidade do procedimento DLLME-

SFO automatizado desenvolvido e sua aplicabilidade na análise de amostras reais de diferente natureza e complexidade.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi apresentado um novo conceito que integra técnicas de fluxo e ferramentas de robótica *open-source* mediante interfaces específicas e dedicadas, obtidas por impressão 3D. Como prova de conceito, a DLLME-SFO foi automatizada pela primeira vez, e usada na extração de parabenos previamente à análise por HPLC-UV.

As técnicas de análise em fluxo baseadas em seringas possibilitaram a automação da DLLME usando um solvente mais leve que a água. Um microcontrolador Arduino assistiu o processo DLLME permitindo a agitação em seringa para melhorar a transferência de massa de analito da fase aquosa para a fase orgânica, bem como a separação de fases mediante o controle da temperatura de um conjunto de células *Peltier* montado em um braço robótico multieixo.

A impressão 3D estereolitográfica permitiu a manufatura de dispositivos de separação de fases adequados para ser montados sobre um conjunto de células *Peltier*, permitindo uma rápida solidificação/fusão da fase orgânica após a DLLME. Diferentes materiais e modelos de separadores de fase foram avaliados, obtendo um método robusto, sensível e reproduzível para a pré-concentração de parabenos em diferentes tipos de amostras.

O procedimento desenvolvido foi aplicado satisfatoriamente à análise de amostras com matrizes complexas. Uma vez que o método desenvolvido baseia-se no uso de separadores de fases baseados em arquitetura aberta, não requer nenhum tipo de empacotamento.

A comercialização de novas resinas com maior estabilidade frente a solventes orgânicos ou o desenvolvimento de impressoras 3D para modelagem de deposição fundida de polímeros altamente robustos com maior resolução serão necessários para o avanço adicional na aplicação de dispositivos impressos 3D para microextrações em fase líquida.

Futuros trabalhos poderiam estar direcionados para a integração *on-line* do sistema desenvolvido com sistemas de separação e detecção, tais como cromatografia líquida e/ou espectrometria de massas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MEDINA, D.A.V.; SANTOS NETO, A.J.; CERDÀ, V.; MAYA, F. Automated dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of the organic phase. **Talanta**, v. 189, p. 241-248, 2018.
2. PŁOTKA-WASYLKA, J.; OW CZAREK, K.; NAMIEŚNIK, J. Modern solutions in the field of microextraction using liquid as a medium of extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 46-64, 2016.
3. REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.-R.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, 2006.
4. LEONG, M.; FUH, M.; HUANG, S. Beyond dispersive liquid – liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1335, p. 2-14, 2014.
5. CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; ŠANDREJOVÁ, J.; ANDRUCH, V. Ten years of dispersive liquid-liquid microextraction and derived techniques. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 4928, n. October, p. 1-149, 2016.
6. MAYA, F.; HORSTKOTTE, B.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, V. Automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 1-8, 2014.
7. ALEXOVIČ, M.; HORSTKOTTE, B.; ŠRÁMKOVÁ, I.; SOLICH, P.; SABO, J. Automation of dispersive liquid-liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow-batch and in-syringe modes. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 86, p. 39-55, 2017.
8. GUO, L.; LEE, H. K. Automated dispersive liquid-liquid microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 8, p. 3743-3749, 2014.
9. GUO, L.; CHIA, S. H.; LEE, H. K. Automated agitation-assisted demulsification dispersive liquid-liquid microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 5, p. 2548-2552, 2016.
10. GUO, L.; TAN, S.; LI, X.; LEE, H. K. Fast automated dual-syringe based dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1438, n. Supplement C, p. 1-9, 2016.
11. TROJANOWICZ, M.; KOLACINSKA, K. Recent advances in flow injection analysis. **Analyst**, v. 141, n. 7, p. 2085-2139, 2016.
12. ANTHEMIDIS, A. N.; IOANNOU, K.-I. G. On-line sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples. **Talanta**, v. 79, n. 1, p. 86-91, 2009.

13. BERTON, P.; MARTINIS, E. M.; WUILLOUD, R. G. Development of an on-line temperature-assisted ionic liquid dispersive microextraction system for sensitive determination of vanadium in environmental and biological samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, n. 1, p. 721–728, 2010.
14. ANDRUCH, V.; ACEBAL, C. C.; ŠKRLÍKOVÁ, J.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P.; BALOGH, I. S.; BILLES, F.; KOCÚROVÁ, L. Automated on-line dispersive liquid–liquid microextraction based on a sequential injection system. **Microchemical Journal**, v. 100, p. 77–82, 2012.
15. TIMOFEEVA, I.; TIMOFEEV, S.; MOSKVIN, L.; BULATOV, A. A dispersive liquid–liquid microextraction using a switchable polarity dispersive solvent. Automated HPLC–FLD determination of ofloxacin in chicken meat. **Analytica Chimica Acta**, v. 949, p. 35–42, 2017.
16. MAYA, F.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, V. Completely automated in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction using solvents lighter than water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 3, p. 1383–1388, 2012.
17. MAYA, F.; HORSTKOTTE, B.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, V. Lab in a syringe: fully automated dispersive liquid–liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 3, p. 909–917, 2012.
18. FRIZZARIN, R. M.; MAYA, F.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, V. Fully-automated in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of caffeine in coffee beverages. **Food Chemistry**, v. 212, n. Supplement C, p. 759–767, 2016.
19. HORSTKOTTE, B.; SUÁREZ, R.; SOLICH, P.; CERDÀ, V. In-syringe-stirring: A novel approach for magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 788, n. Supplement C, p. 52–60, 2013.
20. SUÁREZ, R.; HORSTKOTTE, B.; CERDÀ, V. In-syringe magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for automation and downscaling of methylene blue active substances assay. **Talanta**, v. 130, n. Supplement C, p. 555–560, 2014.
21. SÁNCHEZ, R.; HORSTKOTTE, B.; FIKAROVÁ, K.; SKLENÁŘOVÁ, H.; MAESTRE, S.; MIRÓ, M.; TODOLÍ, J.-L. Fully automatic in-syringe magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction hyphenated to high-temperature torch integrated sample introduction system-inductively coupled plasma spectrometer with direct injection of the organic phase. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 6, p. 3787–3794, 2017.
22. REZA, M.; ZANJANI, K.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; AKE, J. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, n. 2, p. 286–293, 2007.
23. LEONG, M. I.; HUANG, S. DA. Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7645–7650, 2009.
24. VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; ANDRUCH, V. Recent achievements in solidified floating

organic drop microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 68, p. 48–77, 2015.

25. MANSOUR, F. R.; DANIELSON, N. D. Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. **Talanta**, v. 170, n. January, p. 22–35, 2017.

26. SAFDARIAN, M.; HASHEMI, P.; NADERLOU, M. In-line cold column trapping of organic phase in dispersive liquid-liquid microextraction: Enrichment and determination of curcumin in human serum. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 14–19, 2012.

27. PRABHU, G. R. D.; URBAN, P. L. The dawn of unmanned analytical laboratories. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 88, p. 41–52, 2017.

28. DRYDEN, M. D. M.; FOBEL, R.; FOBEL, C.; WHEELER, A. R. Upon the shoulders of giants: *open-source* hardware and software in analytical chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 8, p. 4330–4338, 2017.

29. CHIU, S.-H.; URBAN, P. L. Robotics-assisted mass spectrometry assay platform enabled by *open-source* electronics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 64, n. Supplement C, p. 260–268, 2015.

30. CHEN, C.-L.; CHEN, T.-R.; CHIU, S.-H.; URBAN, P. L. Dual robotic arm “production line” mass spectrometry assay guided by multiple Arduino-type microcontrollers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 239, n. Supplement C, p. 608–616, 2017.

31. WAHEED, S.; CABOT, J. M.; MACDONALD, N. P.; LEWIS, T.; GUIJT, R. M.; PAULL, B.; BREADMORE, M. C. 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 11, p. 1993–2013, 2016.

32. MACDONALD, N. P.; CABOT, J. M.; SMEJKAL, P.; GUIJT, R. M.; PAULL, B.; BREADMORE, M. C. Comparing microfluidic performance of three-dimensional (3d) printing platforms. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 7, p. 3858–3866, 2017.

33. LI, F.; MACDONALD, N. P.; GUIJT, R. M.; BREADMORE, M. C. Using Printing Orientation for Tuning Fluidic Behavior in Microfluidic Chips Made by Fused Deposition Modeling 3D Printing. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 23, p. 12805–12811, 2017.

34. RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 237, p. 329–343, 1990.

35. GHANI, M.; FONT PICÓ, M. F.; SALEHINIA, S.; PALOMINO CABELLO, C.; MAYA, F.; BERLIER, G.; SARAJI, M.; CERDÀ, V.; TURNES PALOMINO, G. Metal-organic framework mixed-matrix disks: versatile supports for automated solid-phase extraction prior to chromatographic separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1488, p. 1–9, 2017.

36. ARDUINO. **Index @ Wwww.Arduino.Cc**. 2014. Disponível em:

<<http://www.arduino.cc/>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

37. GUPTA, V.; BEIRNE, S.; NESTERENKO, P. N.; PAULL, B. Investigating the effect of column geometry on separation efficiency using 3d printed liquid chromatographic columns containing polymer monolithic phases. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 2, p. 1186–1194, 2018.
38. GROSS, B.; LOCKWOOD, S. Y.; SPENCE, D. M. Recent advances in analytical chemistry by 3D printing. **Analytical Chemistry**, v. 89, p. 57–70, 2017.
39. SU, C. K.; PENG, P. J.; SUN, Y. C. Fully 3D-printed preconcentrator for selective extraction of trace elements in seawater. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 6945–6950, 2015.
40. KATAOKA, É. M.; MURER, R. C.; SANTOS, J. M.; CARVALHO, R. M.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTO, F.; POPPI, R. J.; GOBBI, A. L.; HANTAO, L. W. Simple, expendable, 3d-printed microfluidic systems for sample preparation of petroleum. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 6, p. 3460–3467, 2017.
41. WANG, H.; COCOVI-SOLBERG, D. J.; HU, B.; MIRÓ, M. 3D-Printed microflow injection analysis platform for online magnetic nanoparticle sorptive extraction of antimicrobials in biological specimens as a front end to liquid chromatographic assays. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 22, p. 12541–12549, 2017.
42. MATTIO, E.; ROBERT-PEILLARD, F.; BRANGER, C.; PUZIO, K.; MARGAILLAN, A.; BRACH-PAPA, C.; KNOERY, J.; BOUDENNE, J. L.; COULOMB, B. 3D-printed flow system for determination of lead in natural waters. **Talanta**, v. 168, p. 298–302, 2017.
43. GALINARO, C. A.; PEREIRA, F. M.; VIEIRA, E. M. Determination of parabens in surface water from Mogi Guaçu River (São Paulo, Brazil) using dispersive liquid-liquid microextraction based on low density solvent and LC-DAD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 11, p. 2205–2213, 2015.
44. MATTIO, E.; ROBERT-PEILLARD, F.; VASSALO, L.; BRANGER, C.; MARGAILLAN, A.; BRACH-PAPA, C.; KNOERY, J.; BOUDENNE, J. L.; COULOMB, B. 3D-printed lab-on-valve for fluorescent determination of cadmium and lead in water. **Talanta**, v. 183, p. 201–208, 2018.
45. MORADI, M.; YAMINI, Y. Application of vesicular coacervate phase for microextraction based on solidification of floating drop. **Journal of Chromatography A**, v. 1229, p. 30–37, 2012.
46. CALDERILLA, C.; MAYA, F.; CERDÀ, V.; LEAL, L. O. 3D printed device including disk-based solid-phase extraction for the automated speciation of iron using the multisyringe flow injection analysis technique. **Talanta**, v. 175, p. 463–469, 2018.
47. ÇABUK, H.; AKYÜZ, M.; ATA, Ş. A simple solvent collection technique for a

dispersive liquid-liquid microextraction of parabens from aqueous samples using low-density organic solvent. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 19, p. 2645–2652, 2012.

48. CALDERILLA, C.; MAYA, F.; CERDÀ, V.; LEAL, L. O. 3D printed device for the automated preconcentration and determination of chromium (VI). **Talanta**, v. 184, p. 15–22, 2018.

49. PRICHODKO, A.; ŠAKOČIUTE, V.; VIČKAČKAITE, V. Dispersive liquid-liquid microextraction of parabens. **Chemija**, v. 21, n. 2–4, p. 112–117, 2010.

50. HOU, F.; DENG, X.; JIANG, X.; YU, J. Determination of parabens in beverage samples by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet. **Journal of Chromatographic Science**, v. 52, n. 10, p. 1332–1338, 2014.

51. MORADI, M.; YAMINI, Y. Application of vesicular coacervate phase for microextraction based on solidification of floating drop. **Journal of Chromatography A**, v. 1229, p. 30–37, 2012.

52. WANG, P. G.; ZHOU, W. Rapid determination of parabens in personal care products by stable isotope GC-MS/MS with dynamic selected reaction monitoring. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 11, p. 1781–1787, 2013.

53. RODAS, M.; PORTUGAL, L. A.; AVIVAR, J.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, V. Parabens determination in cosmetic and personal care products exploiting a multi-syringe chromatographic (MSC) system and chemiluminescent detection. **Talanta**, v. 143, p. 254–262, 2015.

CONCLUSÃO GERAL

A automatização dos procedimentos de preparo de amostra, não apenas representa uma grande redução do esforço manual, mas também facilita o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, precisos e altamente produtivos, possibilitando desta forma o uso eficiente do tempo e dos recursos no laboratório de química.

Embora a implementação de sistemas automatizados no laboratório esteja limitada pelas distâncias existentes entre áreas como a química, a eletrônica e a computação, esta lacuna entre disciplinas está sendo saldada pelas novas possibilidades de acesso ao conhecimento de prototipagem e construção.

No presente trabalho, foi possível desenvolver com sucesso três sistemas robotizados para automatização de procedimentos complexos, multietapas, próprios da rotina de preparo de amostra mediante o uso de técnicas miniaturizadas, como a MEPS, a SDME e a DLLME-SFO.

Na primeira parte do trabalho um robô, capaz de preparar simultaneamente até seis amostras, demonstrou a potencialidade das ferramentas de robótica *open-source* no incremento da produtividade e da frequência de analítica com adequadas precisão e exatidão.

Um segundo robô desenvolvido mostrou a possibilidade de desenvolver sistemas automatizados versáteis com capacidade para se adaptar a diferentes protocolos de preparo de amostras, possibilitando a integração das etapas de preparo de amostra e análise cromatográfica de forma completamente automatizada.

Finalmente, a combinação sinérgica da robótica e a eletrônica *open-source* com outras estratégias de automatização, como as técnicas em fluxo e tecnologias modernas de fabricação como a impressão 3D, possibilitou a automatização de procedimentos complexos, envolvendo etapas de refrigeração e aquecimento, permitindo prescindir de etapas limitantes da produtividade como a centrifugação, o resfriamento em banho de gelo e a recuperação manual dos extratos.

Esta tese constitui um insumo de partida para nosso grupo de pesquisa e a todos aqueles interessados no desenvolvimento de sistemas similares, que tenham interesse no desenvolvimento de novos instrumentos e dispositivos dedicados à realização de análises químicas, incorporando circuitos eletrônicos, sistemas programados e impressão 3D.

Etapas futuras de criação e desenvolvimento poderão envolver novas oportunidades de acoplamento dos sistemas construídos com instrumentos analíticos, possibilitando a integração

on-line de técnicas como MEPS, SDME, HFLPME e DLLME-SFO com a análise mediante técnicas cromatográficas ou de espectrometria de massas.