



MURILO SANTHIAGO

**CONSTRUÇÃO E APLICAÇÃO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS 2D E 3D À
BASE DE PAPEL COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

MURILO SANTHIAGO

**CONSTRUÇÃO E APLICAÇÃO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS 2D E 3D À
BASE DE PAPEL COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA**

ORIENTADOR: PROF. DR. LAURO TATSUO KUBOTA

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR MURILO SANTHIAGO, E ORIENTADA PELO PROF.DR. LAURO TATSUO KUBOTA**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

Sa59c Santhiago, Murilo, 1984-
 Construção e aplicação de dispositivos analíticos 2D e 3D à base de papel
 com detecção eletroquímica / Murilo Santhiago. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

 Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

 1. Microfluidica em papel. 2. Dispositivos em papel. 3. Sensor amperométrico.
 I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
 Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Construction and application of 2D and 3D electrochemical paper-based analytical devices.

Palavras-chave em inglês:

Paper microfluidic

Paper-based devices

Amperometric sensor

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Lauro Tatsuo Kubota [Orientador]

Lúcio Angnes

Wendell Karlos Tomazelli Coltro

Juliano Alves Bonacin

José Alberto Fracassi da Silva

Data de defesa: 25-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Química

*Dedico esta tese à minha família,
pelo apoio incondicional,
sempre.*

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família pelo apoio, em especial meus pais Celso e Vânia, e a minha irmã Fernanda que sempre me deram amor;

A minha namorada Caroline, pelo suporte, companheirismo, amizade, paciência e por sempre estar ao meu lado nos momentos mais críticos e felizes. Obrigado também por ter me aguentado por algumas horas a mais no laboratório.

Ao Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota, por ter me incentivado e orientado de maneira grandiosa desde o início do mestrado. Ficam aqui os meus sinceros agradecimentos pela ajuda imediata nos momentos críticos e, principalmente, de tornar possível à realização deste trabalho;

Aos colegas de grupo Victor, Zé Tiago (Seu Zé), Dênio, Glauco, Ronaldo, Maiuí, Cecília e aos demais colegas do grupo LEEDS. Para todos que já deixaram o laboratório, Wilney, Phabyanno, Caio, Shiroma, Kisner e Cátia, ficam aqui também meus sinceros agradecimentos;

Aos amigos de Blumenau Eduardo (Tchê), Aldori e Juliano pelo companheirismo e amizade que já está ultrapassa 15 anos;

A todos os funcionários do Instituto de Química que colaboraram para a realização deste trabalho, especialmente a Izabel Aquino Calasso, Izabel Ribeiro Filippi, Miguel da Silva Morel e Nestor P. Maia pela atenção e ajuda;

A FAPESP pelo apoio financeiro. Eu tive a felicidade de ter uma bolsa de doutorado aprovada da melhor agência de fomento do país. Agradeço também pelo auxílio da FAPESP no processo da bolsa BEPE, o qual eu tive a oportunidade de fazer um estágio durante seis meses nos Estados Unidos.

Ao Prof. Dr. Charles Sherman Henry (Chuck) da Universidade Estadual do Colorado (CSU) em Fort Collins, CO, EUA. Agradeço pelos bons momentos de descontração, ensinamentos e amizade. Valeu por tudo Chuck !!!

Aos colegas do grupo do Prof. Henry, em especial: John, David, Pommrat (Dói), Aie, Yupaporn (Yu), Scott, Jaclyn, Julie, Rachel, Meghan e aos demais colegas do grupo que me ajudaram prontamente. (Jim's Wings was awesome John)...

Agradeço também à família americana que me recebeu de braços abertos e me tratou como parte da família. Obrigado pela ajuda. Foi demais. Valeu James, Shelby, Bodhi and Acacia.

CURRICULUM VITAE

Nome: Murilo Santhiago

Naturalidade: Blumenau-SC

Data de nascimento: 26/04/1984

I.0 Formação acadêmica

I.1 Química

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis-SC

Início: 2003 / 2º. semestre término: 2007 / 2º. semestre

Título da monografia: “**Determinação de Ácido Rosmarínico Utilizando Sensor Biomimético Contendo Complexo Binuclear de Fe-Zn e Eletroforese Capilar**”.

Orientadora: Profa. Dra. Iolanda da Cruz Vieira

I.2 Mestrado em Química

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP

Início: 2008 / 1º. semestre término: 2010 / 1º. semestre

Título da dissertação: “**Construção de Plataformas Nanoestruturadas para Detecção de Cys e NADH**”.

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

II. Produção científica

II.1 Artigos publicados (15)

II.1.1 M. Santhiago, E.W. Nery, G.P. Santos, L.T. Kubota, *Bioanalysis* 6 (2014) 89 – 106.

II.1.2 M. Santhiago, J.B. Wydallis, L.T. Kubota, C.S. Henry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 5233 – 5239.

II.1.3 C.C. Côrrea, S.A.V. Jannuzzi, M. Santhiago, R.A. Timm, A.L.B. Formiga, L.T. Kubota, *Electrochim. Acta* 113 (2013) 332 – 339.

II.1.4 M. Santhiago, L.T. Kubota, *Sens. Act. B* 177 (2013) 224 – 230.

II.1.5 C.C. Côrrea, M. Santhiago, A.L.B. Formiga, L.T. Kubota, *Electrochim. Acta* 90 (2013) 309 – 316.

II.1.6 W.J.R. Santos, M. Santhiago, I.V.P. Yoshida, L.T. Kubota, *Sens. Act B* 166 (2012) 739 – 745.

II.1.7 L.Y. Shiroma, M. Santhiago, A.L. Gobbi, L.T. Kubota, *Anal. Chim. Acta* 725 (2012) 44 – 50.

II.1.8 C.C.C. Silva, M.C. Breitzkreitz, M. Santhiago, C.C. Côrrea, L.T. Kubota, *Electrochim. Acta* 71 (2012) 150 – 158.

II.1.9 C.C. Côrrea, M. Santhiago, C.C.C. Silva, A.L.B. Formiga, L.T. Kubota, *Electroanal.* 23 (2011) 2562 – 2568.

II.1.10 W.J.R. Santos, M. Santhiago, I.V.P. Yoshida, L.T. Kubota, *Anal. Chim. Acta* 695 (2011) 44 – 50.

II.1.11 M. Santhiago, P.R. Lima, W.J.R. Santos, L.T. Kubota, *Sens. Act. B* 146 (2010) 213 – 220.

II.1.12 M. Santhiago, P.R. Lima, W.J.R. Santos, A.B. Oliveira, L.T. Kubota, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 6609 – 6616.

II.1.13 M.L. Carvalho, M. Santhiago, R.A. Peralta, A. Neves, G.A. Micke, I.C. Vieira, *Talanta* 74 (2008) 394 – 399.

II.1.14 M. Santhiago, R.A. Peralta, A. Neves, G.A. Micke, I.C. Vieira, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 91 – 97.

II.1.15 M. Santhiago, I.C. Vieira, *Sens. Act. B* 128 (2007) 279 – 285.

III. Citações

III.1 Web of Science – 108 citações – Fator H: 7

III.2 Scopus – 123 citações – Fator H: 7

IV. Prêmios

I.V.1 Painel premiado apresentado na seção Química Analítica na SBQ 2011.

I.V.2 Painel premiado apresentado na seção Eletroanalítica no 16º ENQA 2011.

RESUMO

Título: “Construção e aplicação de dispositivos analíticos 2D e 3D à base de papel com detecção eletroquímica”.

Autor: Murilo Santhiago

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota

Palavras-chave: Microfluídica, detecção eletroquímica, dispositivos em papel.

Neste trabalho descreve-se a construção e aplicação de dispositivos analíticos 2D e 3D à base de papel com detecção eletroquímica (ePAD). Os dispositivos foram construídos empregando o método de impressão com cera e diferentes tipos de papéis. Eletrodos de ouro foram utilizados juntamente com o conceito da separação cromatográfica em dispositivos microfluídicos. No canal microfluídico à base de papel foi possível realizar a separação de ácido ascórbico e dopamina em 14 minutos. A necessidade por processos de fabricação mais simples e de baixo custo nos motivou a estudar eletrodos de carbono em ePADs. Assim, eletrodos de grafite de lapiseira foram selecionados visando o desenvolvimento de um biossensor para glicose. O biossensor apresentou uma excelente resposta eletroquímica e um tempo de análise de 4 minutos. O mesmo eletrodo de grafite foi acoplado com um sistema de informação para determinação de p-nitrofenol. Assim, foi possível detectar $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de p-nitrofenol em amostras de água e analisar/interpretar os resultados empregando um celular. Por fim, a necessidade por sistemas eletroquímicos com menores limites de detecção nos impulsionou a fabricar microeletrodos de pasta de carbono. Os microeletrodos foram fabricados em folhas de transparência e acoplados no papel empregando uma configuração do tipo sanduíche. Os dispositivos foram caracterizados eletroquimicamente na presença de cisteína e apresentaram uma constante cinética de $10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Um limite de detecção de $4,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cisteína foi obtido empregando um arranjo de microeletrodos. Por fim, os microeletrodos de pasta de carbono foram utilizados para a construção de um biossensor visando a determinação de metil paration. O ePAD foi construído de modo a acomodar o substrato (acetilcolina) e a enzima (acetilcolinesterase) no mesmo dispositivo.

ABSTRACT

Title: “Construction and application of 2D and 3D electrochemical paper-based analytical devices”.

Author: Murilo Santhiago

Adviser: Lauro Tatsuo Kubota

Keywords: Microfluidics, electrochemical detection, paper-based devices

This thesis describes the construction and application of 2D and 3D electrochemical paper-based analytical devices (ePADs). The devices were constructed using the wax printing method and different types of papers. Gold electrodes were employed along with the concept of chromatographic separation in microfluidic devices. By using the paper-based microfluidic channel it was possible to perform the separation of ascorbic acid and dopamine in 14 minutes. The need for simpler and low cost manufacturing processes motivated us to study carbon electrodes in ePADs. Thus, pencil graphite electrodes were selected for the development of a biosensor for glucose. The biosensor exhibited excellent electrochemical response and analysis time of 4 minutes. The same graphite electrode was coupled to an information system for the determination of p-nitrophenol. Thus, it was possible to detect $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ of p - nitrophenol in water samples and analyze/interpret the results using a smartphone. Finally, the need for electrochemical systems with lower limits of detection made us to search for carbon paste microelectrodes. The microelectrodes were fabricated on transparency sheets and coupled on paper using a sandwich-type configuration. The devices were characterized electrochemically in the presence of cysteine and had a rate constant of $10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A detection limit of $4.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ for cysteine was obtained using an array of microelectrodes. By last, carbon paste microelectrodes were used to construct a biosensor in order to determine methyl parathion. The ePAD was constructed to accommodate the substrate (acetylthiocholine) and enzyme (acetylcholinesterase) in the same device.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xxiii	
LISTA DE TABELAS	xxv	
LISTA DE FIGURAS	xxvii	
I	Introdução e objetivos	1
I.1	Análises de “ <i>point-of-care</i> ”	3
I.2	Laboratório em um chip	5
I.3	Papel: uma plataforma versátil	6
I.3.1	Construção de dispositivos à base de papel	8
I.4	Métodos de detecção	12
I.4.1	Detecção colorimétrica	12
I.4.1.2	Análise qualitativa	12
I.4.1.3	Análise semi-quantitativa	13
I.4.1.4	Análise quantitativa	15
I.4.2	Detecção eletroquímica	16
I.4.3	Fabricação de eletrodos impressos	17
I.4.4	Eletrodos impressos acoplados em dispositivos à base de papel	18
I.5	Motivação	20
I.6	Objetivos	20
I.6.1	Geral	20
I.6.2	Específicos	20
II	Parte experimental	23
II.1	Parte experimental	25
II.1.2	Reagentes e soluções	25
II.1.3	Equipamentos e materiais	25

II.1.4	Fabricação dos dispositivos	26
II.1.5	Separação e detecção eletroquímica de ácido ascórbico e dopamina (ePAD _{AD})	27
II.1.5.2	Medidas cromatográficas	29
II.1.6	Biossensor para detecção de glicose (ePAD _{gli})	30
II.1.6.1	Construção dos eletrodos de trabalho	30
II.1.6.2	Desenho e construção dos dispositivos	31
II.1.6.3	Construção dos eletrodos de referência e auxiliar	32
II.1.6.4	Modificação dos dispositivos	33
II.1.6.5	Detecção eletroquímica	33
II.1.6.6	Preparo da amostra e medidas	33
II.1.7	Dispositivo para determinação de p-nitrofenol (ePAD _{QR})	34
II.1.7.2	Fabricação dos eletrodos	34
II.1.7.3	Construção dos dispositivos	34
II.1.7.4	Medidas eletroquímicas	36
II.1.7.5	Preparo das amostras e medidas	36
II.1.8	Microeletrodos de pasta de carbono (ePAD _μ)	37
II.1.8.2	Fabricação dos microfuros e máscaras	37
II.1.8.3	Construção dos dispositivos	37
II.1.8.4	Medidas eletroquímicas	39
II.1.9	Biossensor para metil paration (ePAD _{mp})	39
III	Separação e detecção eletroquímica de ácido ascórbico e dopamina ePAD_{AD}	41
III.1	Apresentação	43
III.2	Resultados e discussão	45
III.2.1	Caracterização eletroquímica dos eletrodos de Au sobre papel	45
III.2.2	Influência do tipo de papel na separação de DA e AA	49
III.2.3	Distância de aplicação da amostra	52
III.2.4	Volume de amostra	54
III.2.5	Influência da largura dos canais	55
III.2.6	Curva analítica	56

III.2.7	Testes de estabilidade	58
III.3	Conclusões parciais e motivação para a próxima etapa	58
IV	Biossensor para detecção de glicose (ePAD_{gli})	61
IV.1	Apresentação	63
IV.2	Resultados e discussão	65
IV.2.1	Layout e funcionamento do dispositivo	65
IV.2.2	Escolha do eletrodo de trabalho	66
IV.2.3	Caracterização eletroquímica: sistema convencional	67
IV.2.4	Caracterização eletroquímica do ePAD _{gli}	70
IV.2.5	Efeito da concentração da enzima glicose oxidase	74
IV.2.6	Concentração do mediador redox	75
IV.2.7	Tempo de reação	77
IV.2.8	Influência do pH	78
IV.2.9	Concentração do eletrólito de suporte	79
IV.2.10	Efeito de potencial aplicado	81
IV.2.11	Curva analítica: cronoamperometria	82
IV.2.12	Estudo de interferentes	84
IV.2.13	Estabilidade e repetibilidade	85
IV.2.14	Determinação de glicose nas amostras	85
IV.3	Conclusões parciais e motivação para a próxima etapa	85
V	Dispositivo para determinação de p-nitrofenol (ePAD_{QR})	87
V.1	Apresentação	89
V.2.	Resultados e discussão	91
V.2.1	Layout do dispositivo	91
V.2.2	Microscopia eletrônica de varredura	92
V.2.3	Caracterização eletroquímica	93
V.2.4	Efeito do pH e da concentração de eletrólito de suporte	96

V.2.5	Voltametria de pulso diferencial (VPD)	98
V.2.6	Sistema de filtração	102
V.2.7	Análise das amostras de água	103
V.2.8	Repetibilidade do ePAD _{QR}	105
V.3	Conclusões parciais e motivação para a próxima etapa	105
VI	Microeletrodos de pasta de carbono (ePAD_μ)	107
VI.1	Apresentação	109
VI.2	Resultados e discussão	111
VI.2.1	Layout e funcionamento do dispositivo	11
VI.2.2	Caracterização eletroquímica	112
VI.2.3	Atividade eletrocatalítica do ePAD _μ	114
VI.2.4	Influência do pH	116
VI.2.5	Influência da porcentagem de CoPC	117
VI.2.6	Influência da velocidade de varredura	118
VI.2.7	Estudos cronoamperométricos	119
VI.2.8	Arranjo de microeletrodos	123
VI.3	Conclusões parciais e motivação para a próxima etapa	126
VII	Biossensor para metil paration (ePAD_{mp})	129
VII.1	Apresentação	131
VII.2	Resultados e discussão	133
VII.2.1	Princípio da detecção de tiocolina	133
VII.2.2	Influência do pH	134
VII.2.3	Influência da concentração do substrato	135
VII.2.4	Curva analítica: inibição da enzima	136
VII.2.5	Seletividade	138
VII.3	Conclusões parciais e continuidade do trabalho	138

VIII	Conclusões gerais	141
VIII.1	Conclusões gerais	143
IX	Perspectivas	145
IX.1	Perspectivas	147
X	Referências Bibliográficas	149
X.1	Referências Bibliográficas	151

LISTA DE ABREVIATURAS

POC	<i>“Point-of-care”</i>
μPADs	Dispositivos analíticos à base de papel
ePADs	Dispositivos eletroquímicos à base de papel
TRIS	2-amino-2-(hidróximetil)-1,3-propanodiol
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida
NHS	N-hidroxi succinimida
AA	Ácido ascórbico
DA	Dopamina
WE	Eletrodo de trabalho
RE	Eletrodo de referência
CE	Contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar
QR	<i>“Quick response”</i>
pNP	p-Nitrofenol
CoPC	Ftalocianina de cobalto
I_p	Corrente de pico
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
I	Corrente
E	Potencial
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
ΔE_p	Separação de potencial de picos anódico e catódico
E⁰	Potencial formal
n	Número de elétrons
Ag/AgCl	Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata

ν	Velocidade de varredura
ECS	Eletrodo de referência de calomelano saturado
GO	Glicose oxidase
4-APBA	Ácido 4-aminofenil borônico
A	Área do eletrodo
D	Coeficiente de difusão
C	Concentração das espécies eletroativas no seio da solução
Eapl.	Potencial aplicado na cronoamperometria
L.D.	Limite de detecção
L.Q.	Limite de quantificação
F	Constante de Faraday
Cys	L-cisteína
k_{obs}	Constante cinética
CPE	Eletrodo de pasta de carbono
I_{cat}	Corrente catalítica
I_L	Corrente na ausência do analito
I_{lim}	Corrente limite
Ache	Enzima acetilcolinesterase

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1	Comparação entre os diferentes métodos de fabricação de μ PADs.	10
Tabela III.1	Comparação entre coeficientes de difusão do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ empregando Au em papel, Au convencional e valores da literatura.	48
Tabela IV.1	Comparação entre coeficientes de difusão do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ e coeficiente de difusão do Ferroceno-COOH.	73
Tabela IV.2	Comparação de parâmetros analíticos na detecção eletroquímica de glicose empregando dispositivos à base de papel.	83
Tabela V.1	Comparação dos parâmetros analíticos obtidos na determinação eletroquímica de pNP.	101
Tabela V.2	Determinação de pNP nas amostras de água.	105
Tabela VI.1	Valores experimentais e teóricos referentes à caracterização dos microeletrodos.	114
Tabela VI.2	Influência de v no deslocamento do potencial de oxidação.	119
Tabela VI.3	Comparação analítica entre um e quatro microeletrodos (arranjo).	126

LISTA DE FIGURAS

I	Introdução e objetivos	
Figura I.1.	Comparação das etapas envolvidas em análises rotineiras e de “point-of-care”.	3
Figura I.2.	Dispositivo de baixo custo para a detecção de bactérias em amostras líquidas.	5
Figura I.3.	(a) Estrutura de repetição da celulose formada por duas moléculas de D-glicose e (b) esquema ilustrativo das interações intra e intermoleculares na celulose.	7
Figura I.4.	(a) e (b) Etapas envolvidas no processo de construção e preparo do dispositivo. Os reagentes necessários para os ensaios de cada analito foram adicionados nas zonas de detecção com o auxílio de uma micropipeta: glicose (KI + peroxidase + glicose oxidase) e BSA (azul de tetrabromofenol). (c) Fotos das zonas de detecção ilustrando o aumento de intensidade da cores em função do aumento da concentração dos analitos.	9
Figura I.5.	(a) Etapas envolvidas no processo de construção. (b) Desenho estudado. (b) Esquema ilustrativo que mostra o espalhamento da cera pelo papel após o tratamento térmico. Figura adaptada [21].	11
Figura I.6.	Procedimento adotado para a determinação semi-quantitativa das enzimas AST e ALT em sangue utilizando guias de leitura como forma de comparação das cores produzidas no ensaio. Figura adaptada [59].	14
Figura I.7.	Esquema geral adotado para conduzir análises de baixo custo em lugares remotos, onde os resultados são encaminhados para técnicos especializados. As curvas de calibração são obtidas plotando o sinal de intensidade média obtidos nas imagens em função da concentração. Figura adaptada [15].	15

- Figura I.8.** Esquema das duas estratégias adotadas visando à detecção eletroquímica em dispositivos à base de papel. (a) Construção de eletrodos de carbono e prata via “*silk-screen*”, Figura adaptada [48]. (b) Posicionamento de um canal feito a partir de papel sobre os eletrodos pré-fabricados, Figura adaptada [49]. 18

II Parte Experimental

- Figura II.1.** Esquema ilustrativo do processo de construção dos dispositivos microfluídicos de separação com detecção eletroquímica. (a) Papel cromatográfico com linhas hidrofóbicas. (b) Máscara em cobre. (c) Posicionamento da máscara sobre a coluna de papel. (d) Eletrodos de ouro depositados no papel após sputtering e remoção da máscara. 28
- Figura II.2.** (a) Foto da região frontal e lateral do conector. (b) Esquema do dispositivo microfluídico e suas regiões principais após ser devidamente cortado com uma tesoura: 1) Entrada do eluente; 2) paredes hidrofóbicas; 3) região de adição da amostra; 4) região de trabalho dos eletrodos; 5) região do dispositivo que é encaixada no conector e 6) região de escape do eluente. 30
- Figura II.3.** (a) Materiais empregados na construção dos eletrodos e (b) esquema de montagem dos eletrodos. 31
- Figura II.4.** Desenho esquemático do μ PAD para a detecção de glicose. (i) filtração, (ii) microzona reacional, (iii) zona de detecção eletroquímica. 31
- Figura II.5.** (a) Construção dos eletrodos de prata. (b) Hidrofobização da superfície do papel com cera. 32

- Figura II.6.** Etapas de construção do ePAD_{QR}. (a) Folha de papel impressa na cor verde. (b) Dispositivo após a impressão do código e linhas de delimitação seguido do tratamento térmico na face 33 × 29 mm. (c) Face oposta do dispositivo na qual foi feita a impressão. (d) Dispositivo contendo a fita dupla face e a trilha de carbono. (e) Esquema ilustrando o dispositivo após perfurações e dobragem do papel. (f) Foto do dispositivo após a inserção do sistema de filtração e do eletrodo de trabalho. (g) Dispositivo pronto para a análise. 35
- Figura II.7.** Máscaras para a construção das trilhas condutoras de prata. 37
- Figura II.8.** Esquema do processo de construção do eletrodo de trabalho (a) e do RE/CE (b) empregando fita dupla face. (c) Montagem do WE + RE/CE para a construção ePAD_μ. 38
- Figura II.9.** (a) Esquema de construção do biossensor para a detecção de metil paration. (i) reservatório do substrato, (ii) espaçadores, (iii) canal microfluídico de coleta e filtração da amostra, (iv) reservatório da enzima e (v) RE/CE. (b) Acoplamento com o WE. (c) Foto do dispositivo com os conectores. 40
- III Separação e detecção eletroquímica de ácido ascórbico e dopamina (ePAD_{AD})**
- Figura III.1.** Fórmula estrutural da dopamina (a) e do ácido ascórbico (b). 43
- Figura III.2.** Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ para (a) Au convencional e (b) Au em papel. 45
- Figura III.3.** Comparação entre as áreas eletroativas e geométricas dos eletrodos de trabalho para os canais de papel com largura de 1,0 a 5,0 mm. A área do retângulo de ouro na região hidrofílica foi utilizada como área geométrica. 46

- Figura III.4.** (a) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando a célula eletroquímica fabricada sobre o papel em diferentes velocidades de varredura ($10 - 100 \text{ mV s}^{-1}$). (b) Gráfico de i_p vs. $v^{1/2}$. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. 47
- Figura III.5.** Voltamogramas cíclicos do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregando como eletrodo de referência Au, ECS e Ag/AgCl. As linhas verticais pontilhadas mostram a localização do E^0 da sonda para cada referência. 49
- Figura III.6.** Injeções de $0,5 \mu\text{L}$ de uma solução padrão contendo uma mistura DA e AA (1 mmol L^{-1} cada). Eluente: Tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. Eapl. = $0,4 \text{ V vs. Au}$. Papel Whatman #1 com largura do canal de $2,0 \text{ mm}$. As setas indicam os tempos nos quais foram feitas injeções dos padrões. Gráfico inserido: ilustração da coluna de papel com destaque para as regiões de adição da amostra. 50
- Figura III.7.** Cromatograma em papel trocador catiônico P81 da Whatman. Eluente: Tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. Eapl. = $0,4 \text{ V vs. Au}$. Largura do canal de $2,0 \text{ mm}$. Injeção de $0,5 \mu\text{L}$ de uma solução padrão (seta inserida) contendo uma mistura DA e AA 1 mmol L^{-1} cada. Injeção à 12 mm do WE. 51
- Figura III.8.** Injeções de $0,5 \mu\text{L}$ de uma solução padrão contendo uma mistura DA e AA (1 mmol L^{-1} cada). Eluente: Tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. Eapl. = $0,4 \text{ V vs. Au}$. Papel Whatman P81 com largura do canal de $2,0 \text{ mm}$. As setas mostram os tempos nos quais foram feitas as injeções dos padrões. Distâncias em relação ao eletrodo de trabalho de cada injeção: (a) 3 mm , (b) 7 mm , (c) 12 mm , (d) 17 mm e (e) 22 mm . 53
- Figura III.9.** Cromatogramas em papel trocador catiônico P81 da Whatman. Condições: Tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0, Eapl. = $0,4 \text{ V vs. Au}$, largura do canal $2,0 \text{ mm}$. Injeções (seta inserida) de (a) $0,25$, (b) $0,5$, (c) $1,0$, (d) $1,5$, (e) $2,0$ e (f) $2,5 \mu\text{L}$ de uma solução padrão contendo a mistura de DA e AA 1 mmol L^{-1} . 54

- Figura III.10.** Respostas analíticas normalizadas em função da área eletroativa. Estudo realizado em papel trocador catiônico P81 da Whatman, eluente tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 e $E_{apl.} = 0,4 \text{ V vs. Au}$. Injeção de $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução padrão contendo a mistura de DA e AA 1 mmol L^{-1} à 12 mm do eletrodo de trabalho. 55
- Figura III.11.** Cromatogramas em papel trocador catiônico P81 da Whatman. Condições: Solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0, $E_{apl.} = 0,4 \text{ V vs. Au}$, largura do canal $2,0 \text{ mm}$. $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ das soluções padrão contendo a mistura de DA e AA $0,075$ até $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ adicionadas à 12 mm do eletrodo de trabalho. 56
- Figura III.12.** Curva analítica para dopamina e ácido ascórbico. 57
- IV** **Biossensor para detecção de glicose (ePAD_{gli})**
- Figura IV.1.** Fórmula estrutural da D-glicose. 63
- Figura IV.2.** Foto do dispositivo em funcionamento. 67
- Figura IV.3.** Voltamograma cíclico obtido em sistema eletroquímico convencional com três eletrodos. Eletrodo de trabalho = grafite H, eletrodo de referência = Ag/AgCl e auxiliar = platina. Condições: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-} 1 \text{ mmol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$. 68
- Figura IV.4.** Gráfico de corrente de pico (I_p) *versus* raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). Condições: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-} 1 \text{ mmol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 30 - 110 \text{ mV s}^{-1}$. Sistema convencional de três eletrodos. 69
- Figura IV.5.** Gráfico de I_{pa} *versus* diâmetro do eletrodo de referência (RE). Condições: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-} 1 \text{ mmol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$. 70
- Figura IV.6.** Voltamogramas cíclicos obtidos em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-} 1 \text{ mmol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$. (–) Sistema eletroquímico usando três eletrodos. Sistema eletroquímico empregando dois eletrodos: (–) Ag/AgCl e grafite e (–) ePAD_{gli} com tinta de prata ($d = 4 \text{ mm}$) e grafite. 81

- Figura IV.7.** Gráfico de corrente de pico (i_p) *versus* raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). Condições: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 1 mmol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1} e $v = 30 - 110 \text{ mV s}^{-1}$. Sistema de dois eletrodos (ePAD_{gli} com detecção eletroquímica). 72
- Figura IV.8.** Gráfico da resposta do ePAD_{gli} (i_{pa}) em função da concentração da enzima GO. Condições: $[\text{4-APBA}] = 4 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo de reação = 3 min, $[\text{glicose}] = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ e PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,4. 74
- Figura IV.9.** Reação entre o peróxido de hidrogênio e o mediador redox (a) e reação de oxidação do 4-aminofenol (4-AF) (b). 75
- Figura IV.10.** (a) Voltamograma cíclico obtido em PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,4, $[\text{4-APBA}] = 4 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{GO}] = 65 \text{ U mL}^{-1}$, tempo de reação = 3 min e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ na ausência (-) e na presença (-) de glicose 1 mmol L^{-1} . (b) Influência da concentração do mediador na resposta do dispositivo. As condições experimentais são as mesmas da Figura (a) com exceção para a concentração do mediador que foi variada entre 1 – 6 mmol L^{-1} . 76
- Figura IV.11.** Gráfico de corrente de pico anódica em função do tempo da reação. Condições: PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,4, $[\text{4-APBA}] = 4 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{GO}] = 65 \text{ U mL}^{-1}$, glicose = 1 mmol L^{-1} e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$. 77
- Figura IV.12.** Influência do pH na resposta do ePAD_{gli} . Condições: $[\text{4-APBA}] = 4 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo de reação = 3 minutos, $[\text{GO}] = 65 \text{ U mL}^{-1}$, glicose = 1 mmol L^{-1} e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$. 78
- Figura IV.13.** Gráfico de corrente de pico anódica em função da concentração do eletrólito de suporte. Eletrólito = PBS pH 7,4, $[\text{4-APBA}] = 4 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo de reação = 3 minutos, $[\text{GO}] = 65 \text{ U mL}^{-1}$, glicose = 1 mmol L^{-1} e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$. 79
- Figura IV.14.** Voltamogramas cíclicos obtidos na presença e ausência de eletrólito de suporte (PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,4). Condições: $[\text{4-APBA}] = 4 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo de reação = 3 minutos, $[\text{GO}] = 65 \text{ U mL}^{-1}$, glicose = 1 mmol L^{-1} e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$. 80

- Figura IV.15.** Efeito do potencial aplicado na resposta de corrente do μ PAD. Condições: PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4, [4-APBA] = 4 mmol L⁻¹, tempo de reação = 3 minutos, [GO] = 65 U mL⁻¹, glicose = 1 mmol L⁻¹ e $v = 30$ mV s⁻¹. 81
- Figura IV.16.** Cronoamperogramas obtidos em diferentes concentrações de glicose (0,01 até 5 mmol L⁻¹). Condições: PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4, [4-APBA] = 4 mmol L⁻¹, tempo de reação = 3 minutos, [GO] = 65 U mL⁻¹, e Eapl. = 200 mV vs. Ag. Gráfico inserido: Curva analítica. 82
- Figura IV.17.** Voltamogramas cíclicos obtidos para o estudo de interferentes. Condições: PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4, [4-APBA] = 4 mmol L⁻¹, [glicose] = 1 mmol L⁻¹, tempo de reação = 3 minutos, [GO] = 65 U mL⁻¹, $v = 30$ mV s⁻¹. [interferentes] = 1 mmol L⁻¹. 84
- V Dispositivo para determinação de p-nitrofenol (ePAD_{QR})**
- Figura V.1.** Fórmula estrutural do p-nitrofenol. 89
- Figura V.2.** Esquema ilustrando a comparação entre códigos de informação [131]. (Prezado leitor, baixe gratuitamente o leitor de código QR no seu smartphone, escaneie o código na Figura e acesse informações sobre a defesa de doutorado). 91
- Figura V.3.** Fotografia do dispositivo para detecção de p-nitrofenol (ePAD_{QR}). 92
- Figura V.4.** Micrografias do papel antes (a) e após (b) o procedimento de desenho do lápis sobre o papel. 93
- Figura V.5.** Voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L⁻¹ e $v = 30$ mV s⁻¹ usando um sistema eletroquímico convencional de três eletrodos (linha preta) e o ePAD_{QR} com dois eletrodos (linha azul). 94
- Figura V.6.** Voltamogramas cíclicos obtidos a 30 mV s⁻¹ na presença e ausência de 200 μ mol L⁻¹ de pNP em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ e pH 4,0. 95

Figura V.7.	(a) Voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes velocidades de varredura (10 até 50 mV s^{-1}) na presença de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de pNP em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} e pH 4,0. (b) Gráfico de corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.	96
Figura V.8.	Efeito do pH do eletrólito de suporte na resposta do ePAD _{QR} .	97
Figura V.9.	(a) Gráfico de corrente de pico anódica em função da concentração do tampão acetato em pH 4,0 e (b) voltamogramas cíclicos obtidos na presença e ausência de pNP 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sem eletrólito de suporte. $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$.	98
Figura V.10.	Efeito da amplitude de potencial na resposta do dispositivo. Condições: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de pNP e tampão acetato 0,1 mol L^{-1} em pH 4,0.	99
Figura V.11.	(a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em diferentes concentrações de pNP (10 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de 125 mV em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 4,0. (b) Curva analítica.	100
Figura V.12.	Gráfico de volume coletado ou filtrado em função do tempo. Volume adicionado = 100 μL .	102
Figura V.13.	Foto da tela do celular após a leitura do código QR contido na face superior do ePAD _{QR} . As concentrações foram inseridas no código em unidades de micromolar (μM) somente para facilitar a digitação.	103
VI	Microeletrodos de pasta de carbono (ePAD_{μ})	
Figura VI.1.	Fórmula estrutural da cisteína.	109
Figura VI.2.	Foto do ePAD _{μ} (sistema de dois eletrodos).	111
Figura VI.3.	Imagem do microeletrodo de trabalho obtida pelo perfilômetro óptico.	112
Figura VI.4.	Voltamograma de varredura linear empregando o ePAD _{$\mu 2$} e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.	113

- Figura VI.5.** Voltamogramas cíclicos obtidos a 5 mV s^{-1} usando o ePAD_{μ2} modificado (CPE+CoPC) e não modificado (CPE) na presença e ausência do analito em solução tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 4.0. 115
- Figura VI.6.** Gráfico de I_{pa} vs. pH para o ePAD_{μ2}. Condições 8 % de CoPc, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e 500 μmol L^{-1} de Cys. 116
- Figura VI.7.** (a) Gráfico de I_{pa} vs. porcentagem de CoPC e (b) Voltamograma cíclico empregando 0,5 % de CoPC. Condições: $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, 500 μmol L^{-1} de Cys em tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (ePAD_{μ2}). 117
- Figura VI.8.** (a) Gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$ e (b) Gráfico da resposta normalizada em função de $v^{1/2}$ versus v . Condições: 500 μmol L^{-1} de Cys em tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e ePAD_{μ2} contendo 8 % de CoPC. 118
- Figura VI.9.** (a) Gráfico de corrente *versus* potencial aplicado na presença de 500 μmol L^{-1} de Cys. (b) Cronoamperogramas obtidos após adições sucessivas de cisteína e Eapl. = 0.6 V vs. Ag. Condições (a-b): tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ usando o ePAD_{μ2} contendo 8 % de CoPC. 120
- Figura VI.10.** (a) Gráfico de I_{cat} / I_L em função de $t^{1/2}$. (b) Gráfico dos coeficientes angulares obtidos em função de $[\text{Cys}]^{1/2}$. Condições (a-b): tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 usando o ePAD_{μ2} contendo 8 % de CoPC. 121
- Figura VI.11.** Curva analítica para cisteína empregando o ePAD_{μ2} contendo 8% de CoPC. Condições: tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 e Eapl. = $0,6 \text{ V}$. 122
- Figura VI.12.** (a) Gráfico da resposta dos microeletrodos em função da distância (centro a centro). (b) Voltamogramas de varredura linear para a comparação entre o arranjo de microeletrodos ($d = 500 \text{ μm}$) e o ePAD_{μ2}. A resposta dos gráficos (a) e (b) foi avaliada medindo a corrente de pico ou limite nos voltamogramas de varredura linear na presença de 5 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a 10 mV s^{-1} . CoPC = 8% em ambos os dispositivos. (c) Imagem do arranjo de microeletrodos obtida pelo perfilômetro óptico. 124

Figura VI.13. Curva analítica para cisteína empregando o arranjo de microeletrodos. Condições: 8% de CoPC, tampão acetato 0,5 mol L⁻¹ pH 4,0 e Eapl. = 0,6 V. 125

VII Biossensor para metil paration (ePADmp)

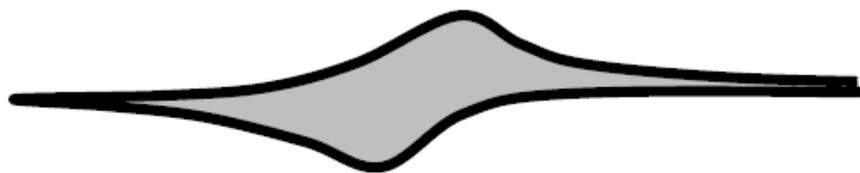
Figura VII.1. Fórmula estrutural do metil paration. 131

Figura VII.2. (a) Voltamogramas de varredura linear obtidos na presença e ausência da enzima acetilcolinesterase (Ache). Condições: 100 µL de tampão TRIS 0,5 mol L⁻¹ pH 8,0, substrato = 0,5 µmol na face (i), Ache = 20 U na face (iv) e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. 134

Figura VII.3. Voltamogramas de varredura linear obtidos em diferentes valores de pH (4,0 até 9,0). Condições: 100 µL de tampão 0,5 mol L⁻¹, substrato = 0,5 µmol na face (i), Ache = 20 U na face (iv) e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. 135

Figura VII.4. Resposta de corrente obtida por cronoamperometria (Eapl. = 0,2 V vs. Ag) em função da [acetiltiocolina]. Ache = 20 U na face (iv). As concentrações no eixo x representam as concentrações esperadas após a adição de 100 µL de tampão 0,5 mol L⁻¹ pH 8,0 na face (i) do dispositivo. 136

Figura VII.5. (a) Gráfico de resposta de corrente obtida por cronoamperometria (Eapl.: 200 mV vs. Ag por 15 s) em função da concentração do inibidor. (b) Gráfico da resposta de corrente em função da concentração do inibidor (log). Condições: 100 µL de tampão 0,5 mol L⁻¹ pH 8,0, substrato = 0,5 µmol na face (i), Ache = 20 U na face (iv). 137



I. Introdução e objetivos

I.1 Análises de “*point-of-care*”

Atualmente a Química Analítica tem concentrado inúmeros estudos visando o desenvolvimento de análises simples para as mais diversas aplicações. Parte desta dedicação desde a década de 90 foi impulsionada pelo crescimento acentuado da venda de kits para análises de “*point-of-care*” (POC). Este tipo de análise é usualmente descrita como auxiliar, próxima do paciente, remota e descentralizada, sendo possível realizar testes clínicos no local mais cômodo para o paciente, como por exemplo: no escritório, em salas de espera ou até mesmo em casa [1]. Assim, testes de diagnóstico são baseados em dispositivos leves, portáteis e fáceis de usar que visam tornar todo o processo de uma análise rotineira muito mais simples [2]. A Figura 1 mostra um esquema comparando as diferentes etapas envolvidas em análises rotineiras e de POC.

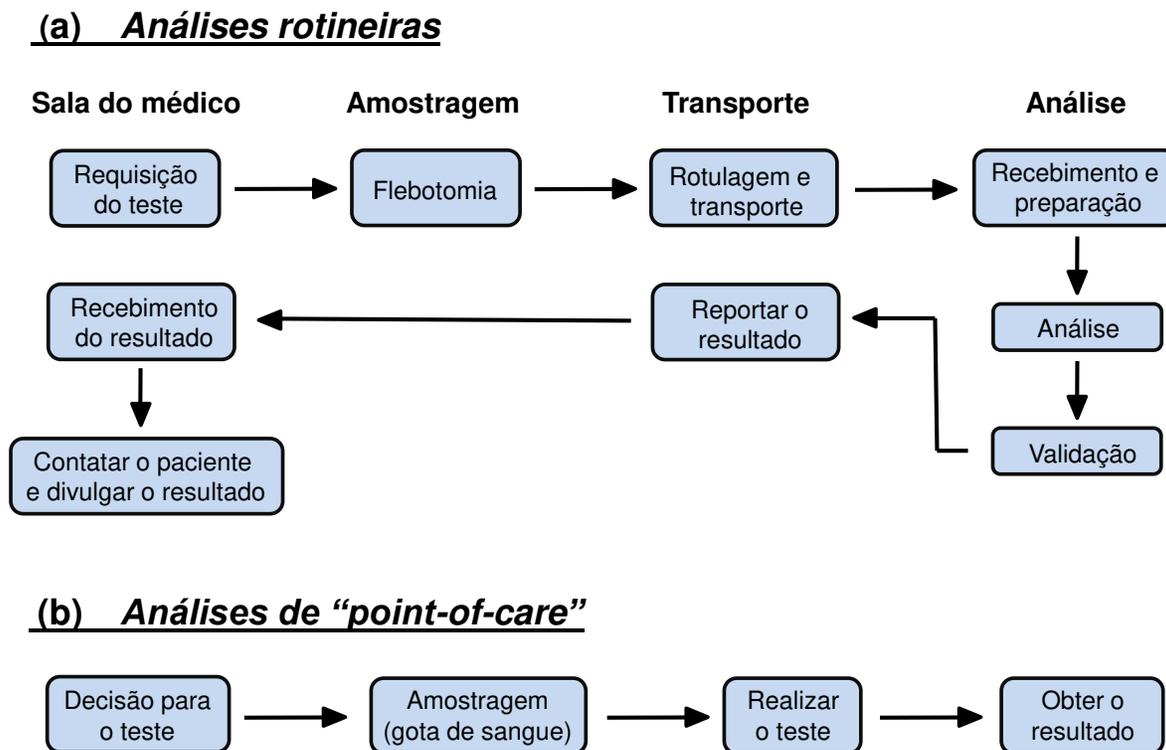


Figura I.1. Comparação das etapas envolvidas em análises rotineiras e de “*point-of-care*”. Figura adaptada [1]. Copyright 2009, Springer.

Análises rotineiras, Fig I.1(a), são realizadas por técnicos especializados e geralmente utilizam uma estrutura laboratorial que segue rigorosos sistemas de controle de qualidade para analisar a amostra e reportar os resultados. Por outro lado, as análises de POC (Fig. I.1(b)) possuem um número menor de etapas envolvidas no processo, fazendo com que o resultado seja obtido de maneira simples e com rapidez, beneficiando não somente a população em geral mas também os profissionais da saúde.

A obtenção rápida dos resultados em hospitais por profissionais da saúde permite que os mesmos ajam também rapidamente em situações de emergência, tal como em casos de ataque cardíaco, e forneçam um diagnóstico enquanto o paciente ainda está na unidade hospitalar, agilizando o tratamento e minimizando eventuais problemas. Para pacientes, o teste de POC ajuda os usuários a monitorar efetivamente uma determinada espécie de interesse, reduzindo o tempo, custo do tratamento e a necessidade de uma visita regular ao médico. Portadores de diabetes representam uma parcela da população que desfruta dos benefícios do teste de POC e representam a principal vertente do comércio de dispositivos de POC [3].

Além do monitoramento de glicose, a crescente demanda por outros alvos como marcadores cardíacos e de tumores, doenças infecciosas, drogas de abuso e muitas outras espécies presentes no sangue ou urina têm despertado o interesse de inúmeras empresas [3,4]. Esse interesse é refletido pelas mais de 100 empresas em todo o mundo que fabricam dispositivos para testes rápidos [1]. De acordo com uma previsão divulgada pela agência Reuters, espera-se que o mercado global de dispositivos de POC gire na casa de 25 bilhões de dólares até 2016 [5].

Assim, para que o negócio seja economicamente rentável e alcance as previsões esperadas [5], um dos pontos de partida da indústria visa estabelecer como integrar as várias etapas descritas na Fig. I.1(a) em um único dispositivo de baixo custo.

I.2 Laboratório em um chip

Uma das propostas para reduzir o tempo e o custo de análises de rotina visa o desenvolvimento de laboratórios miniaturizados [6]. Assim, as etapas usualmente envolvidas em laboratórios convencionais são convertidas para uma única plataforma analítica [7]. Este tipo de análise miniaturizada e com inúmeras operações integradas é conhecida como *Lab-on-a-chip* [6,7]. A Fig. 1.2 mostra uma foto de um microchip onde é possível conduzir inúmeras operações após o dispositivo ser devidamente encaixado na interface de medida.

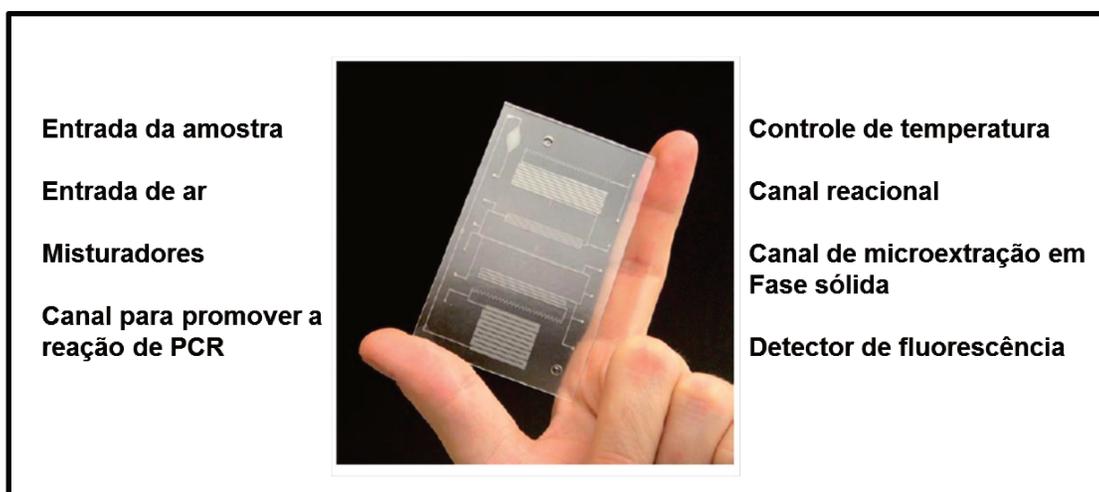


Figura I.2. Dispositivo de baixo custo para a detecção de bactérias em amostras líquidas. Figura adaptada [8]. © The Royal Society of Chemistry (2009).

Sistemas analíticos baseados em microssistemas de análise merecem destaque em diversos fatores, como: baixo consumo de amostra e de reagentes, uso simplificado, baixo custo e possibilidade de uso no campo. Os primeiros sistemas construídos foram focados principalmente na utilização de substratos de vidro e quartzo, no entanto, a introdução de novos tipos de materiais propicia a construção de dispositivos descartáveis com propriedades únicas [9,10]. De fato, materiais derivados do plástico têm sido exaustivamente empregados para esse propósito e, certamente, a substituição do silício e vidro por polímeros trouxe novas características [11]. Recentemente, o papel tem se destacado como um material muito versátil para a construção de microdispositivos analíticos de baixo custo [12].

I.3 Papel: uma plataforma versátil

Durante o passar dos anos o papel foi lentamente sendo substituído pelo plástico para os mais variados fins como fabricação de embalagens em geral, sacolas de supermercado e condicionamento de alimentos. Isso nos leva há a questão interessante: por quê devemos voltar para o papel e construir dispositivos nesta plataforma? A resposta é simples, o papel oferece vantagens únicas em relação ao plástico e outros materiais poliméricos [2,13]:

- (1) o papel é barato e produzido praticamente em todas as partes do mundo a partir de recursos renováveis e recicláveis;
- (2) é facilmente impresso, revestido e/ou impregnado;
- (3) a celulose é um polímero de ocorrência natural;
- (4) é biodegradável;
- (5) a estrutura porosa facilita a preparação de dispositivos microfluídicos baratos.

A celulose, principal constituinte do papel, é um homopolissacarídeo sem ramificações composto de cerca de 10.000 a 15.000 unidades de D-glicose. O polímero formado por essas unidades de glicose pode ser representado através de uma série de anéis de glicopiranosose na conformação cadeira, onde o átomo de oxigênio funciona como ponte para conectar os átomos de carbonos [14]. Essa ligação por onde as moléculas de glicose são unidas é chamada de ligação glicosídica ($\beta 1 \rightarrow 4$), conforme ilustrado na Fig. I.3(a). As cadeias formadas a partir dessa ligação interagem com outras cadeias do mesmo material formando uma rede que é estabilizada por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (Fig. I.3(b)). Essa rede de interações dá origem às fibras do papel [14].

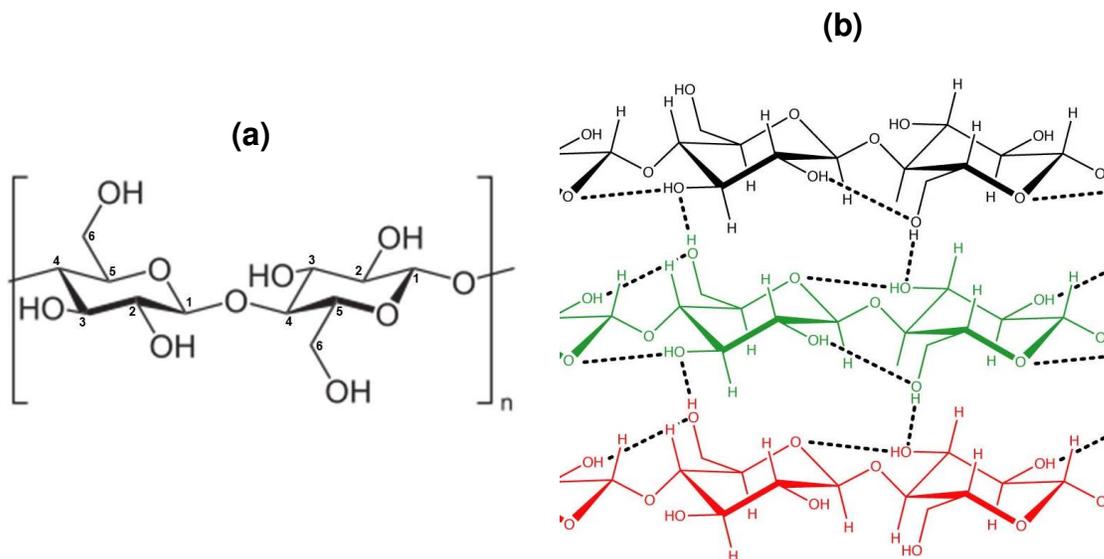


Figura I.3. (a) Estrutura de repetição da celulose formada por duas moléculas de D-glicose e (b) esquema ilustrativo das interações intra e intermoleculares na celulose.

As suas fibras, os blocos de construção do papel, são tubos ocos de ~1,5 mm de comprimento, 20 μm de largura e com uma espessura de paredes de ~2 μm . A orientação das fibras é outro fator importante da preparação do papel. Usualmente, as fibras têm uma orientação ligeiramente preferida ao longo da direção em que o papel foi fabricado. Assim, o transporte de soluções ao longo da fita de papel em dispositivos pode depender do ângulo em que a fita de papel foi cortada. Esse fator passa a ser importante quando a ideia principal passa a ser em utilizar uma extremidade do papel para se adicionar a amostra e fazer com que forças de capilaridade puxem o líquido pela fita [13]. Esse tipo de análise pode oferecer as seguintes vantagens que são únicas para o papel e substratos porosos similares.

- (1) O líquido vai se mover, ao passo que partículas grandes vão ficar retidas na matriz do papel, uma forma de filtração da amostra. A separação cromatográfica de componentes solúveis na superfície do papel também é possível [13].

- (2) A inserção de barreiras para fornecer canais que possam dividir a amostra em duas ou mais partes transportando-as para diferentes locais na superfície do papel [12].

Face às inúmeras vantagens do material como suporte para separações cromatográficas, portabilidade, baixo custo, possibilidade de modificação e construção de canais [12,13], fica claro que o papel é uma plataforma muito versátil e que possibilita uma gama de aplicações. Quando essas aplicações entram no campo da química analítica, ensaios qualitativos e quantitativos podem ser estabelecidos de maneira simplificada. Visando esse tipo de análise, uma das etapas iniciais consiste em controlar o fluxo no papel para possibilitar o acoplamento com sistemas de detecção.

I.3.1 Construção de dispositivos à base de papel

O primeiro passo na construção de microdispositivos analíticos à base de papel (μ PADs) consiste em estabelecer regiões hidrofílicas delimitadas por barreiras que direcionem o fluxo para um local ou zona de detecção desejada, caso contrário, o líquido irá se espalhar radialmente pelo papel. Um dos métodos de destaque que alavancou o campo dos μ PADs foi proposto por Martinez *et al.* em 2007 [12]. Basicamente, os autores utilizaram um fotorresiste negativo para formar paredes hidrofóbicas no papel cromatográfico. As etapas envolvidas no processo podem ser visualizadas na Fig. I.4(a). Após a incorporação das paredes hidrofóbicas, o dispositivo pode ser devidamente cortado e modificado com os reagentes cromóforos visando o ensaio de dois analitos, conforme ilustrado na Fig. I.4(b). Cores mais intensas são observadas nas zonas de detecção à medida que as concentrações de albumina de soro bovino (BSA) e glicose também aumentam, conforme ilustrado na Fig. I.4(c).

Esse trabalho marcante que possibilita o controle do fluxo através da inserção de paredes hidrofóbicas foi uma das principais contribuições para impulsionar o campo de dispositivos de baixo custo para aplicações de POC [15,16]. Por outro lado, o processo de fabricação fotolitográfico ainda exigia

inúmeras etapas de construção e de lavagem com solventes orgânicos para remoção do fotorresiste. Mesmo após todas as etapas de lavagem o material ainda permanecia nos poros, fazendo-se necessário tratar o papel com plasma de oxigênio para deixar os canais mais hidrofílicos [12]. Assim, a necessidade por processos de construção mais simples e que não exijam tantas etapas como nos processos litográficos tem impulsionado o desenvolvimento de métodos de construção mais simples.

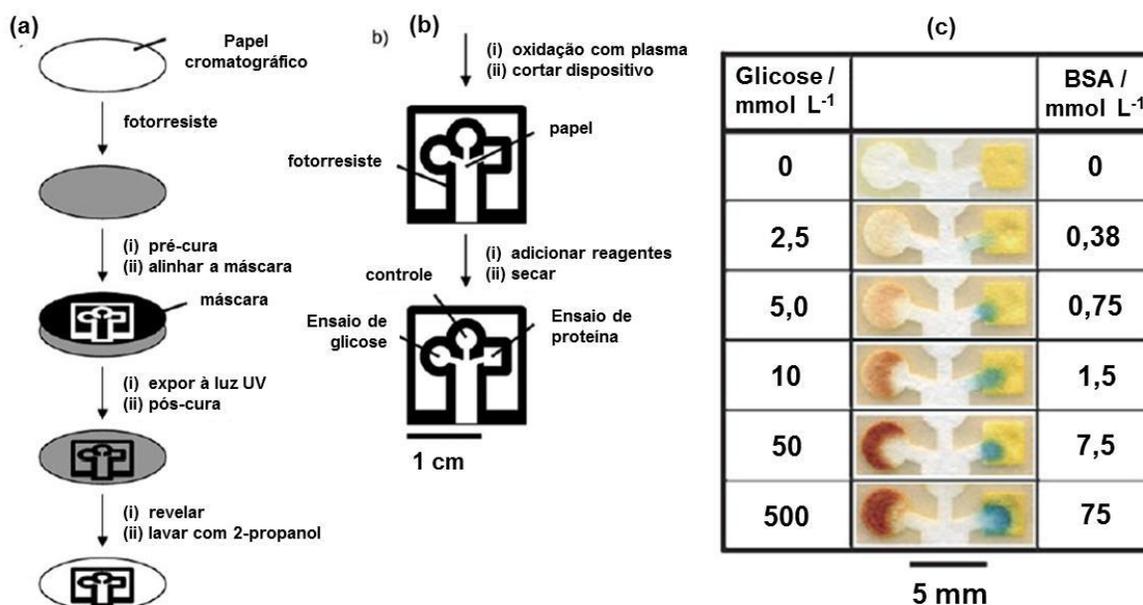


Figura I.4. (a) e (b) Etapas envolvidas no processo de construção do dispositivo. Os reagentes necessários para os ensaios de cada analito foram adicionados nas zonas de detecção com o auxílio de uma micropipeta: glicose (KI + peroxidase + glicose oxidase) e BSA (azul de tetrabromofenol). (c) Fotos das zonas de detecção ilustrando o aumento de intensidade das cores em função do aumento da concentração dos analitos. Figura adaptada [12]. ©WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. (2007).

Após o trabalho de Martinez *et al.* em 2007 surgiram uma série de artigos reportando novos métodos de construção para μ PADs [17–27]. A Tabela I.1 ilustra algumas das contribuições recentes visando a fabricação de μ PADs.

Tabela I.1. Comparação entre os diferentes métodos de fabricação de μ PADs.

Métodos	Custo	Resolução	Vantagens	Desvantagens
Corte				
Manual	Baixo	Baixa	Sem contaminação de reagentes;	Produção em larga escala, resolução baixa e susceptível às habilidades do usuário;
Laser [19]	Baixo	Alta	Sem contaminação de reagentes;	Podem aparecer bordas danificadas;
Ploter [20]	Baixo	Alta	Sem contaminação de reagentes;	Papel pode dobrar durante o corte;
Impressão				
Cera [21]	Baixo	Moderada	Produção em larga escala, uso simples;	Espalhamento desigual da cera durante o tratamento térmico;
Tinta [17, 22,23]	Baixo - Moderado	Moderada	Impressão de reagentes ao mesmo tempo	Entupimento; algumas impressoras operam em temperaturas relativamente altas.
“Screen-printing” [24]	Baixo	Baixa - Moderada	Matéria prima facilmente obtida;	Necessidade de uma tela com um padrão definido;
Outros				
Desenho [25]	Baixo	Baixa	Simples e de preparo fácil;	Produção em larga escala; baixa resolução;
Imersão em cera [26]	Baixo	Moderada	Não necessita de etapas de pós tratamento, rápido;	Necessita de máscaras físicas e de um aquecimento prévio da cera;
Fotolitografia [12]	Alto	Moderada - alta	Pode ser adotada em locais com baixos recursos;	Necessita de inúmeras etapas/equipamentos, difícil remover fotorresiste;
Spray [27]	Baixo	Moderada	Rápida e simples;	Necessita de máscara física.

Assim como pode ser observado na Tabela I.1 há uma diversidade de métodos utilizados para a fabricação de μ PADs. A maioria dos métodos criam paredes hidrofóbicas em papéis hidrofílicos, com exceção para alguns métodos que fabricam canais hidrofílicos em papéis hidrofóbicos [17,18,28,29]. Basicamente, a escolha de um método vai depender de uma série de fatores como custo, resolução, infraestrutura disponível, quantidade de reagentes, geração de resíduos sólidos ou líquidos e etc. Dentre os métodos apresentados na Tabela I.1, a impressão com cera apresenta um excelente balanço entre baixo custo e resolução. Além disso, somente três etapas de construção são necessárias para a fabricação dos dispositivos (Fig. I.5(a)).



Figura I.5. (a) Etapas envolvidas no processo de construção. (b) Desenho estudado. (b) Esquema ilustrativo que mostra o espalhamento da cera pelo papel após o tratamento térmico. Figura adaptada [21]. Copyright (2009) American Chemical Society.

As duas primeiras etapas são muito simples e consistem em estabelecer o layout e imprimir, respectivamente. A última etapa requer o posicionamento dos dispositivos impressos sobre uma chapa de aquecimento para que a cera se funda e preencha os poros do papel. O aquecimento faz com que a cera se espalhe por todos os lados da região impressa, conforme ilustrado na Fig. I.5(b). De maneira geral, o método de impressão com cera é barato, rápido, simples, não necessita de solventes, requer poucas etapas e possui resolução suficiente para inúmeras aplicações (canais microfluídicos de largura $> 600 \mu\text{m}$) [21].

Por fim, fica evidente que existem vários caminhos que podem ser tomados para a construção de μ PADs. Os diferentes métodos de construção possibilitaram

também um grande avanço no ponto de vista da detecção. Uma vez selecionado o método de construção mais adequado, resta estabelecer qual será o modo de detecção utilizado para uma determinada aplicação.

I.4 Métodos de detecção

Até o presente momento uma série de métodos de detecção têm sido reportados. Sistemas de detecção quimioluminescente [30-33], eletroquimioluminescente [34-37], fluorescente [38], colorimétrico [12,16,39-43], Raman [44,45], espectrometria de massas [46,47] e eletroquímico [48-53] foram recentemente acoplados com μ PADs visando a determinação quantitativa de moléculas-alvo. Dentre os métodos de detecção mencionados os mais empregados são o colorimétrico e o eletroquímico [54]. Iniciaremos essa abordagem destacando a detecção colorimétrica pois este modo de detecção sempre acompanha as principais novidades em μ PADs.

I.4.1 Detecção colorimétrica

A espectrofotometria UV-VIS é uma das técnicas analíticas mais utilizadas e o grande número de aplicações está relacionado com o baixo custo e simplicidade dessa técnica [55]. Visto que simplicidade e baixo custo são um dos requisitos básicos quando se visa à construção de dispositivos de POC [1], sistemas de detecção colorimétricos podem ser um bom ponto de partida para o acoplamento com dispositivos à base de papel. Além do mais, o longo histórico de separações cromatográficas em papel e detecção colorimétrica deixou uma enorme bagagem que impulsiona a escolha por este método de detecção. Outro ponto a favor se refere à facilidade de modificação onde os reagentes colorimétricos podem ser pipetados nas zonas de detecção.

I.4.1.2 Análise qualitativa

Um dos sistemas de detecção colorimétricos mais simples é o próprio olho humano [56]. Assim, sistemas analíticos de baixo custo onde somente um “sim” ou “não” já são suficientes como resposta, como por exemplo o teste de gravidez,

não necessitam de nenhum outro equipamento para monitorar a intensidade da cor. Muitos dos testes envolvendo doenças são também qualitativos e de enorme importância para a população [57].

Outro exemplo que não requer nenhum tipo de equipamento ou sistema de amplificação do sinal é o papel indicador de pH. Esses papéis são baratos, possuem um longo tempo de vida e apresentam uma alta sensibilidade. O papel de pH indicando pH 11, por exemplo, está mostrando uma concentração de íons H^+ na ordem de 10^{-11} mol L^{-1} , o qual é uma sensibilidade na ordem de picomolar [13].

Estes foram alguns exemplos que mostram como uma simples mudança de cor pode ser suficiente para uma análise, mas para outros casos pode ser insuficiente. Assim, antes de chegar na questão quantitativa da detecção colorimétrica, existe um espaço que é preenchido com a utilização de dispositivos com detecção semi-quantitativa.

I.4.1.3 Análise semi-quantitativa

As análises semi-quantitativas em μ PADs são normalmente acompanhadas por ensaios envolvendo soluções padrão concomitantemente à análise da amostra [58] ou por informações adicionais que permitam o usuário a estimar a concentração de uma determinada espécie [59].

Wang *et al.* reportaram em seu trabalho a utilização de um dispositivo à base de papel com seis padrões de proteína em diferentes concentrações imobilizados no papel e uma região para a adição da amostra [58]. Desta forma, foi possível comparar a intensidade da amostra com a dos padrões e obter o resultado.

De maneira similar ao funcionamento das fitas de pH, Pollock *et al.* desenvolveram um μ PAD para a determinação de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), indicadores de possíveis danos ao fígado [59]. Basicamente, os autores construíram zonas de detecção e de controle circulares empregando o método de impressão com cera. Os reagentes necessários foram gotejados nas regiões circulares e uma membrana de filtração

de células vermelhas foi acoplada na parte inferior dispositivo. A Fig. 1.6 ilustra o procedimento de análise e o guia de leitura para a comparação das cores. O μ PAD possui ainda três regiões de controle para garantir que os reagentes estão funcionando apropriadamente. Empregando o dispositivo proposto pelos autores foi possível analisar em 15 min as enzimas AST e ALT em níveis de interesse biológico. Este exemplo ilustra claramente como os μ PADs podem ser versáteis e simples.

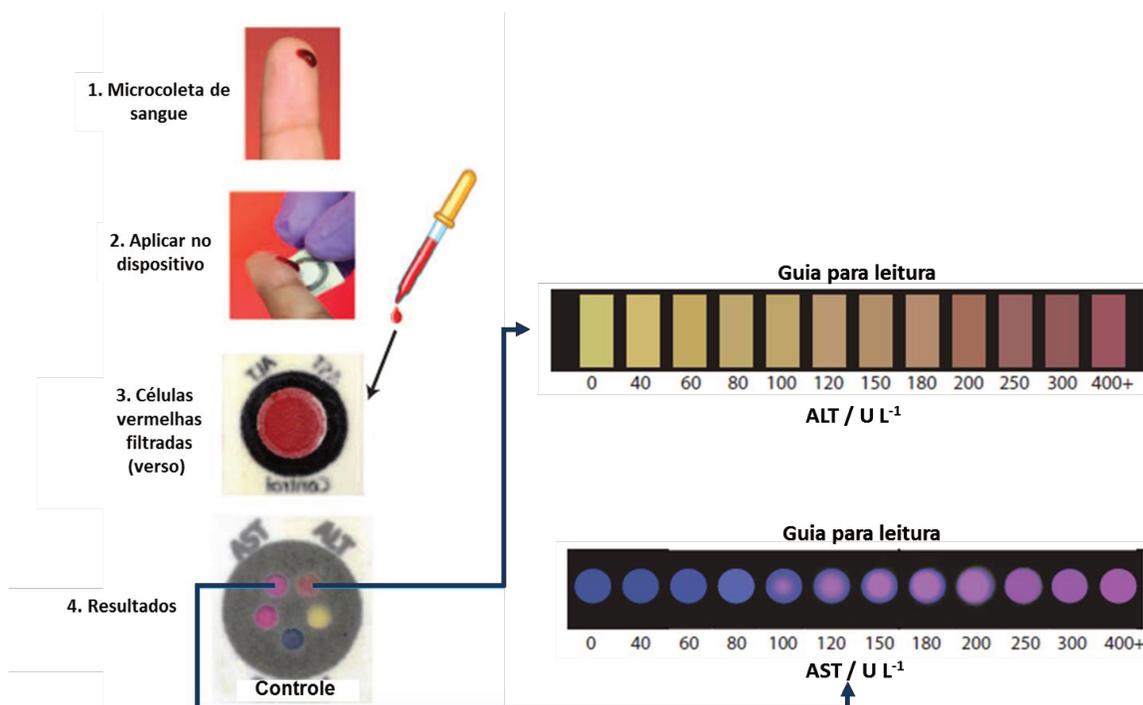


Figura 1.6. Procedimento adotado para a determinação semi-quantitativa das enzimas AST e ALT em sangue utilizando guias de leitura como forma de comparação das cores produzidas no ensaio. Figura adaptada [59]. Copyright © 2012, American Association for the Advancement of Science.

Por um lado, a detecção semi-quantitativa é simples e não exige nenhum equipamento, mas por outro, a precisão do dispositivo fica limitada pelo poder de comparação visual do operador. Uma das maneiras para melhorar a precisão dos dispositivos consiste em medir a intensidade das cores e construir uma curva de calibração.

I.4.1.4 Análise quantitativa

Após o surgimento dos μ PADs foram propostas algumas maneiras de quantificar espécies coloridas sobre o papel [15,16]. Martinez *et al.* abordaram em seu trabalho detectores simples e portáteis como câmeras comuns, câmeras de celulares e scanners portáteis [15]. Juntamente com isso eles abordaram o conceito da telemedicina (Fig. I.7).

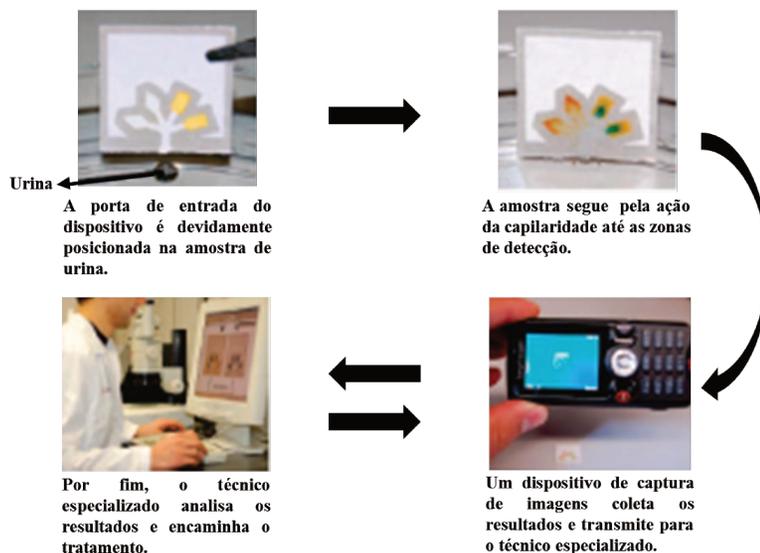


Figura I.7. Esquema geral adotado para conduzir análises de baixo custo em lugares remotos, onde os resultados são encaminhados para técnicos especializados. As curvas de calibração são obtidas plotando o sinal de intensidade média obtidos nas imagens em função da concentração. Figura adaptada [15]. Copyright (2008), American Chemical Society.

Na telemedicina o usuário tira uma foto do dispositivo, envia para um profissional treinado interpretar os resultados e recebe o resultado juntamente com o tratamento adequado no mesmo celular [6]. No entanto, a detecção colorimétrica através de câmeras de celular ainda sofre devido às variações de luz do ambiente, que possivelmente podem prejudicar os resultados. Buscando contornar essas dificuldades, alguns pesquisadores procuraram investir na busca por ferramentas simples para medir os ensaios colorimétricos.

Em 2009, Ellerbee *et al.* desenvolveram um colorímetro portátil para quantificar ensaios colorimétricos medindo a transmissão da luz através do papel

[16]. Nesse exemplo, as curvas de calibração para a determinação de proteína foram obtidas e armazenadas no colorímetro. O desenvolvimento do colorímetro descartou a necessidade de encaminhar os resultados para um software específico e permitiu estudar concentrações de proteína em urina artificial na ordem de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Recentemente, a detecção colorimétrica tem sido explorada empregando uma ferramenta muito comum do nosso cotidiano, um smartphone. Basicamente, o que muda em relação ao conceito de telemedicina em μPADs [6] é que o próprio aplicativo do celular já analisa e reporta os resultados na tela, sem qualquer necessidade de envio para um profissional ou técnico especializado [60]. Possivelmente, esse tipo de abordagem irá acompanhar de perto o avanço da tecnologia nos novos smartphones.

Por fim, a detecção colorimétrica teve e ainda tem um papel importante no contínuo crescimento da área de dispositivos à base de papel. Há ainda uma busca constante visando menores limites de detecção através do uso de novos reagentes cromóforos [61] e diferentes layouts, incluindo dispositivos 2D [62, 63] e 3D [64,65]. O espalhamento desigual das cores formadas nas zonas de detecção e a necessidade do controle da iluminação durante a captura das imagens são pontos que merecem uma atenção especial quando esse modo de detecção é selecionado. Observando essas questões, pesquisadores propuseram então a utilização do modo de detecção eletroquímico para dispositivos analíticos à base de papel.

I.4.2 Detecção eletroquímica

A detecção eletroquímica é uma alternativa promissora para a construção de dispositivos microfluídicos à base de papel devido à possibilidade de miniaturização, portabilidade, baixo custo, alta sensibilidade e também seletividade com a escolha adequada do potencial de detecção. Outra vantagem adicional da detecção eletroquímica é a simplicidade da instrumentação resultando em um baixo consumo de eletricidade para análises em campo [48]. Outra facilidade em relação à instrumentação é que já podem ser encontrados no

mercado potenciostatos portáteis para uso no campo [66-68]. Por outro lado, os eletrodos precisam ser fabricados no dispositivo ou integrados com o papel, e uma das maneiras mais utilizadas para tal propósito consiste no emprego de eletrodos impressos.

I.4.3 Fabricação de eletrodos impressos

A primeira etapa do processo de *screen-printing* consiste na fabricação da tela que acomodará os padrões a serem impressos no substrato. A região interna dos padrões permite que a tinta atravesse a tela enquanto que as demais regiões bloqueiam a passagem da tinta. Após a fabricação da tela contendo os padrões, a tela é posicionada sobre o substrato e então a tinta é adicionada sobre a tela. Em seguida, a tinta é espalhada com uma espécie de rodo ou puxador e forçada a passar pelas regiões abertas dos padrões contidos na tela. Por fim, a tela é removida e o substrato é submetido a uma etapa de secagem [69].

Outra questão importante na fabricação dos eletrodos impressos é a escolha da tinta. O eletrodo deve ser condutor de corrente elétrica e, portanto, a formulação das tintas utilizadas no processo de impressão é de suma importância. Tintas condutoras comerciais têm se mostrado apropriadas para serem utilizadas como material base na confecção de eletrodos impressos [48,49]. A composição das tintas de carbono compreende basicamente de um material inerte de elevada condutividade como grafite de alta pureza finamente pulverizado; um aglutinante como o polímero acetato de celulose e um sistema solvente como a ciclohexanona-acetona [70,71]. Além do carbono, prata e ouro também são utilizados na composição das tintas [69].

De maneira geral, o processo de impressão é rápido, simples, de baixo custo e possibilita a produção em massa de eletrodos. Essas características marcantes motivaram alguns pesquisadores a utilizar esse processo para a fabricação de dispositivos à base de papel com detecção eletroquímica (ePADs).

I.4.4 Eletrodos impressos acoplados em dispositivos à base de papel

Existem basicamente duas vertentes que envolvem o processo de fabricação de ePADs empregando o processo de *screen-printing*. A Fig. I.8 ilustra as duas aproximações juntamente com exemplos para cada caso.

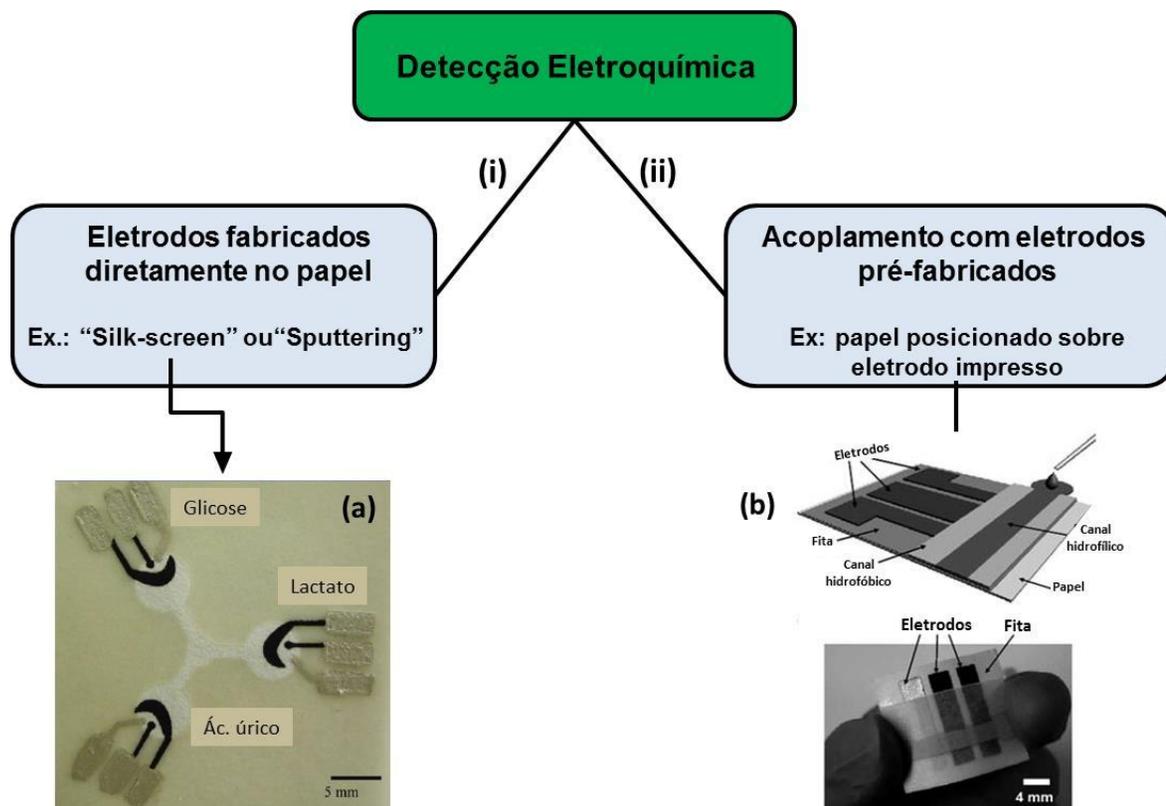


Figura I.8. Esquema das duas estratégias adotadas visando à detecção eletroquímica em dispositivos à base de papel. (a) Construção de eletrodos de carbono e prata via “*silk-screen*”, Figura adaptada [48]. Copyright (2009), American Chemical Society. (b) Posicionamento de um canal feito a partir de papel sobre os eletrodos pré-fabricados, Figura adaptada [49]. © The Royal Society of Chemistry (2010).

No caso (i) na Fig. I.8, os eletrodos podem ser fabricados diretamente sobre o papel. Nessa abordagem, o papel é o próprio substrato utilizado na construção dos eletrodos. Já no caso (ii), o substrato pode ser qualquer outro material, como

por exemplo um filme de poliéster [49], visto que o papel será acoplado com os eletrodos em uma segunda etapa. Existe ainda, caso haja interesse, a possibilidade de evitar a etapa de *screen-printing* utilizando eletrodos impressos comerciais. Por exemplo, Noiphung *et al.* reportaram o uso de eletrodos impressos comerciais acoplados com dispositivo à base de papel para a determinação de glicose em sangue [72].

A Fig. 1.8(a) ilustra um exemplo importante que alavancou a detecção eletroquímica em dispositivos microfluídicos à base de papel e é considerado um dos mais importante por muitos pesquisadores [4,54,73,74]. Nesse trabalho, Dungchai *et al.* reportaram a construção de uma célula eletroquímica em papel com capacidade para três eletrodos. Através de uma delimitação do papel com um fotorresiste, os autores estabeleceram os contatos dos eletrodos na porção hidrofóbica e as regiões de trabalho dos eletrodos na região hidrofílica [48]. Assim, utilizando uma tinta de carbono modificada e enzimas oxidases nas zonas de detecção, os autores determinaram indiretamente glicose, ácido úrico e lactato monitorando o peróxido de hidrogênio formado a partir das enzimas oxidases de cada analito.

Já voltado para a detecção de metais, Nie *et al.* construíram eletrodos de carbono e prata e adicionaram por cima dos eletrodos um canal de papel com paredes hidrofóbicas, que posteriormente foi preso ao eletrodo com fita adesiva (Fig. 1.8(b) [49]. Empregando o ePAD proposto, foram obtidos limites de detecção na ordem de 1,0 ppb para os metais Pb^{2+} e Zn^{2+} . Já Carvalhal *et al.*, combinaram eletrodos impressos de ouro com tiras de papel cromatográfico para a construção de dispositivos microfluídicos de separação à base de papel com detecção eletroquímica [52]. Os autores conseguiram separar os ácidos úrico e ascórbico e detectar, ao final da coluna de papel, as espécies nos eletrodos de ouro. Além dessas aplicações, a combinação de eletrodos impressos com papel também pode ser observada em outros trabalhos [41,42].

As duas vertentes ilustradas acima ainda são ferramentas constantes na construção de ePADs. Basicamente, o cenário atual visa à modificação dos eletrodos com nanomateriais [75,76] e busca por diferentes layouts que

proporcionem novas propriedades: como dispositivos 2D/3D [77-79] e microfluídica digital no papel [80]. Além disso, há uma busca constante por ePADs com menores limites de detecção e processos de construção envolvendo materiais mais simples.

I.5 Motivação

Fica claro através dos exemplos mostrados anteriormente que os dispositivos à base de papel são ferramentas únicas e muito promissoras. Em particular, os dispositivos com detecção eletroquímica apresentam um enorme potencial para inúmeras aplicações de tipo POC. Com essa linha em mãos, uma das motivações do nosso trabalho foi trazer novas contribuições para esse campo tão versátil e em constante ascensão. Sistemas de separação em papel, construção de ePADs em diferentes tipos de papéis, eletrodos simples e de baixo custo, códigos de informação e dispositivos 3D com fluxo lateral e vertical integrados são alguns dos tópicos que serão abordados nesse trabalho.

I.6 Objetivos

I.6.1 Geral

Este trabalho de pesquisa visa o desenvolvimento de dispositivos à base de papel com detecção eletroquímica para a determinação de espécies de interesse biológico, farmacológico e ambiental.

I.6.2 Específicos

- Construir e empregar canais microfluídicos à base de papel visando a separação de analitos e detecção eletroquímica.
- Fabricar, caracterizar e utilizar dispositivos dobráveis e eletrodos de baixo custo para simplificar as medidas e diminuir os limites de detecção.

- Construir e aplicar um dispositivo 3D de baixo custo com um código de informação integrado.
- Construir e caracterizar microeletrodos de pasta de carbono para serem acoplados com dispositivos à base de papel.
- Utilizar os microeletrodos de pasta de carbono para fabricar um biossensor 3D para a detecção de metil paration.



II. Parte experimental

II.1 Parte experimental

II.1.2 Reagentes e soluções

Ácido ascórbico, L-cisteína, ftalocianina de cobalto, dopamina, ácido acético, acetato de sódio, enzima glicose oxidase (*Aspergillus Niger* tipo II-S de 18.500 unidades por miligrama), enzima acetilcolinesterase (*Electrophorus Electricus* tipo V-S de ≥ 1000 unidades por miligrama), cloreto de acetiltiocolina, 2-amino-2-(hidróximetil)-1,3-propanodiol (TRIS), quitosana de alta massa molecular, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxi succinimida (NHS), ácido p-aminofenilborônico, trealose e glicose ferrocianeto, ferricianeto de potássio e grafite (tamanho de partícula $< 20 \mu\text{m}$) foram obtidos da Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Ácido cítrico, citrato de sódio e óleo mineral de alta massa molecular foram adquiridos da Fischer Scientific, NJ, EUA. N,N-dimetilformamida (DMF), dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4), hidrogeno fosfato de sódio (Na_2HPO_4) e cloreto de potássio (KCl) foram obtidos da Synth, São Paulo, Brasil. Ácido fosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Mallinckrodt, Xalostoc, México e Nuclear, Diadema, Brasil respectivamente. Metil paration da Supelco Analytical Bellefonte, PA, USA. p-Nitrofenol (pNP) foi adquirido da Merck, Darmstadt, DE. Alumina com tamanho de partícula de $0,3 \mu\text{m}$ da Fortel, São Paulo, Brasil foi empregada para o polimento dos eletrodos de grafite. As soluções-padrão foram preparadas diariamente por diluição apropriada das soluções estoque. As soluções foram preparadas usando água purificada em um sistema Milli-Q Millipore e os valores de pH das soluções tampão foram ajustados com um pHmetro Corning, modelo 350.

II.1.3 Equipamentos e materiais

A detecção voltamétrica e cronoamperométrica foi obtida empregando um potenciostato modelo PGSTAT-30 da Autolab Eco Chemie (Utrecht, Holanda) conectado à um computador utilizando um programa computacional GPES 4.9. Uma célula eletroquímica com capacidade para três eletrodos foi utilizada em alguns ensaios para a caracterização dos dispositivos. Eletrodos de referência de

calomelano saturado (ECS) ou prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e um fio de platina como eletrodo auxiliar foram empregados nos experimentos juntamente com o eletrodo de trabalho dos dispositivos.

Os reagentes foram pesados em uma balança analítica Sartorius modelo BP 211D de 5 casas decimais de Goettingen, Lower Saxony, Alemanha. Uma impressora ColorQube 8570 da XEROX, Campinas, Brasil, foi usada para imprimir os dispositivos. Uma chapa de aquecimento da Fisatom, SP, Brasil foi usada para tratar termicamente os dispositivos. Um perfilômetro óptico ZeScope foi utilizado para medir o tamanho e a distância entre os microeletrodos de pasta de carbono. Para a construção dos eletrodos de ouro foi utilizado um equipamento Sputtering DC, Balzers, modelo BA 510. Um sistema de gravação a laser da Epilog modelo 1000, CO, EUA foi usado para o corte das transparências.

Bastões de grafite H com 150 μm de raio da marca Pentel e lápis preto com dureza 6B da General's foram adquiridos em uma livraria local. Tintas de prata da marca Electrolube, Derbyshire, UK e SPI Supplies, PA, EUA foram empregadas no processo de construção do dispositivo. Resina epóxi da marca Araldite® foi utilizada para aderir os bastões de grafite ao capilar de vidro e isolar a área eletroativa. Capilares de vidro foram fabricados na oficina do Instituto de Química da UNICAMP. Fitas adesivas e de dupla-face foram adquiridas em uma livraria local de Campinas. Os papéis cromatográficos P81 e #1 foram adquiridos da Whatman. Papel de impressão convencional tamanho A4 foi adquirido em uma livraria local (Suzano Report 75 g m^2 , Limeira-SP). Folhas de transparência da Highland 901 (215 \times 279 mm \times 0.11 mm) da 3M, Austin, TX, USA foram empregadas para a fabricação das máscaras e dos microeletrodos de pasta de carbono. Perfuradores circulares de 4, 5, 6 e 8 mm de diâmetro da marca Kolplast Itupeva, SP, Brasil foram usados para abrir regiões circulares no papel.

II.1.4 Fabricação dos dispositivos

O processo de fabricação apresenta algumas etapas que são comuns a todo os tipos de ePADs reportados aqui neste trabalho. Basicamente, a primeira etapa consiste no desenho do dispositivo empregando um software gráfico

CorelDRAW X5. Em seguida, o desenho é impresso no papel empregando uma impressora da XEROX que utiliza cera sólida ao invés das tintas convencionais. Foi efetuado um tratamento térmico no papel com o auxílio de uma chapa de aquecimento (110 °C por aproximadamente 60 segundos). Após o tratamento o papel foi removido e deixado esfriar a temperatura ambiente [21]. A etapa posterior consiste no acoplamento com o sistema de detecção eletroquímico. Como cada ePAD possui uma configuração única, mais detalhes sobre a fabricação serão abordados detalhadamente nos tópicos a seguir.

II.1.5 Separação e detecção eletroquímica de ácido ascórbico e dopamina (ePAD_{AD})

O procedimento de construção dos dispositivos microfluídicos de separação à base de papel com detecção eletroquímica pode ser dividido em duas etapas, i) construção dos canais e ii) formação dos filmes finos de ouro. Na primeira etapa, foram desenhados canais de 50 mm de comprimento com diferentes larguras (1,0 – 5,0 mm) utilizando o software CoreDRAW X5. No software, foram desenhadas barreiras hidrofóbicas como linhas pretas para delimitar o caminho do eluente e da amostra. Os papéis cromatográficos #1 e P81 da Whatman foram cortados em folhas de tamanho A4 (210 × 297 mm) e os dispositivos foram impressos utilizando uma impressora da XEROX. Em seguida, foi efetuado um tratamento térmico no papel com o auxílio de uma chapa de aquecimento. Após o tratamento o papel foi removido e deixado esfriar à temperatura ambiente. A Fig. II.1(a) mostra um desenho esquemático do papel impresso com os canais hidrofóbicos.

A construção dos eletrodos foi efetuada pelo pesquisador Ângelo L. Gobbi no laboratório de microfabricação lotado no CNPEM. Para a construção dos eletrodos inicialmente foi construída uma máscara em cobre com delimitações para três eletrodos (Fig. II.1(b)).

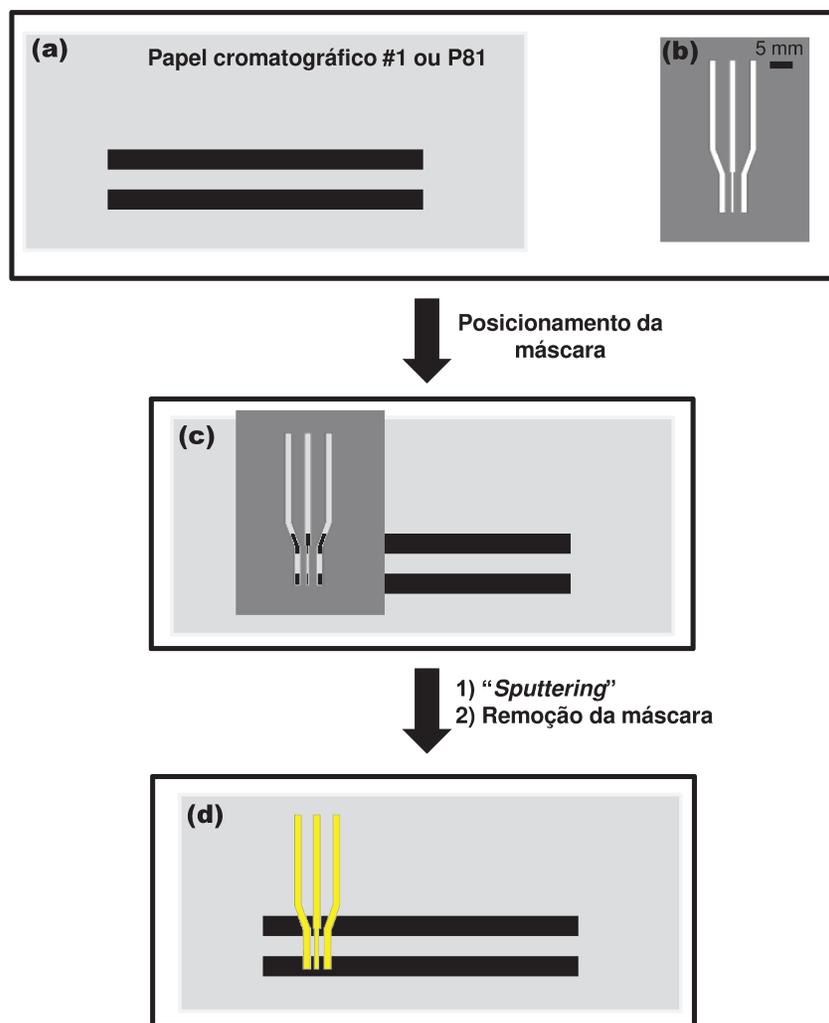


Figura II.1. Esquema ilustrativo do processo de construção dos dispositivos microfluídicos de separação com detecção eletroquímica. (a) Papel cromatográfico com linhas hidrofóbicas. (b) Máscara em cobre. (c) Posicionamento da máscara sobre a coluna de papel. (d) Eletrodos de ouro depositados no papel após sputtering e remoção da máscara.

Em seguida, a máscara foi posicionada sobre o canal de forma que as regiões de trabalho dos eletrodos fiquem na porção hidrofílica do canal (Fig. II.1(c)). Após o posicionamento, um filme fino de ouro foi depositado sobre a máscara através de um processo conhecido como *sputtering*. A pressão de base, antes de começar a deposição, foi de 2×10^{-6} mbar e a pressão de deposição na ordem de 4×10^{-3} mbar. A deposição foi controlada por uma balança de quartzo

resultando em um filme fino de ouro de aproximadamente 200 nm. Após a remoção da máscara pode ser observado à disposição dos eletrodos no dispositivo (Fig. II.1(d)).

II.1.5.2 Medidas cromatográficas

Inicialmente, o dispositivo foi devidamente cortado com uma tesoura e encaixado em um conector (Fig. II.2(a)) construído no nosso laboratório utilizando cabos coaxiais, capa DB9, peças em teflon e um conector N/Lock. Em seguida, a extremidade da coluna de papel mais afastada do detector foi colocada no reservatório do eluente para o início do experimento. Para as medidas cromatográficas foram utilizados como eluente soluções tampão ácido acético/acetato de sódio pH 5,0. Após o eluente ultrapassar os detectores, um potencial de 0,4 V vs. Au foi aplicado no eletrodo de trabalho e a corrente foi monitorada em função do tempo por cronoamperometria. As amostras foram adicionadas com o auxílio de uma micropipeta na região da coluna entre os detectores e a entrada do eluente. Para que o eluente permaneça se deslocando pela coluna de papel no sentido do detector, cerca de quinze folhas de papel Whatman #1 de tamanho 1 × 1 cm foram colocados sobre a região de escape do eluente. A Fig. II.2(b) mostra um resumo das principais regiões de funcionamento do dispositivo.

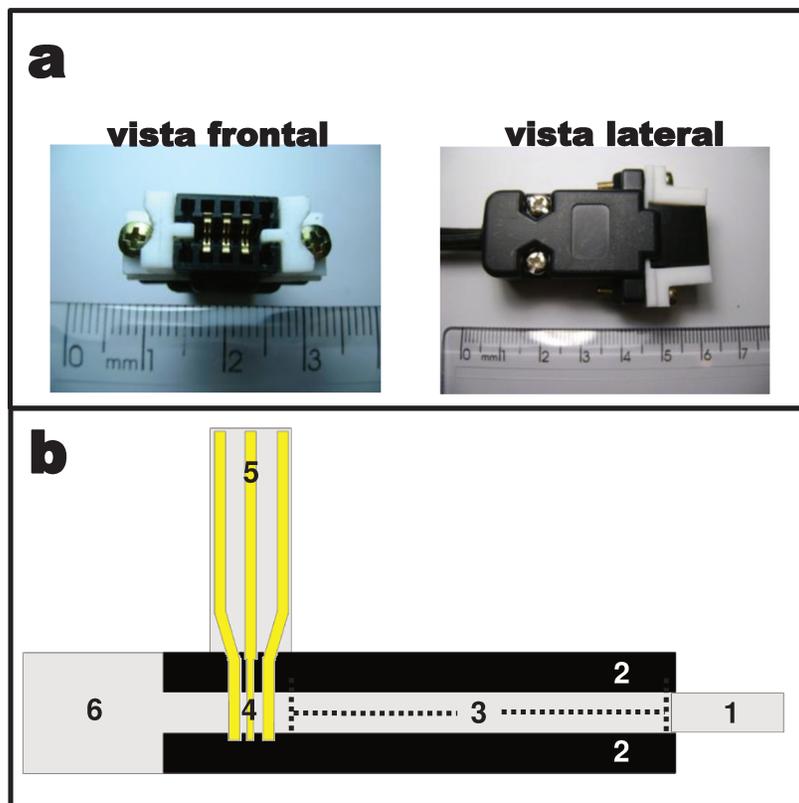


Figura II.2. (a) Foto da região frontal e lateral do conector. (b) Esquema do dispositivo microfluídico e suas regiões principais após ser devidamente cortado com uma tesoura: 1) Entrada do eluente; 2) paredes hidrofóbicas; 3) região de adição da amostra; 4) região de trabalho dos eletrodos; 5) região do dispositivo que é encaixada no conector e 6) região de escape do eluente.

II.1.6 Biossensor para detecção de glicose (ePAD_{gli})

II.1.6.1 Construção dos eletrodos de trabalho

Para a construção dos eletrodos de trabalho foram empregados grafites cilíndricos do tipo H ($r = 150 \mu\text{m}$) disponíveis comercialmente. Os grafites, inicialmente com 60 mm de comprimento, foram cortados ao meio e inseridos dentro de um tubo capilar de vidro. Em seguida, uma resina epóxi de secagem rápida (~ 2 minutos) foi utilizada para selar e prender os eletrodos no capilar de vidro. A Fig. II.3 ilustra os materiais empregados e o esquema de montagem dos

eletrodos de trabalho. Um conector tipo jacaré foi empregado para fazer o contato elétrico diretamente com o grafite.

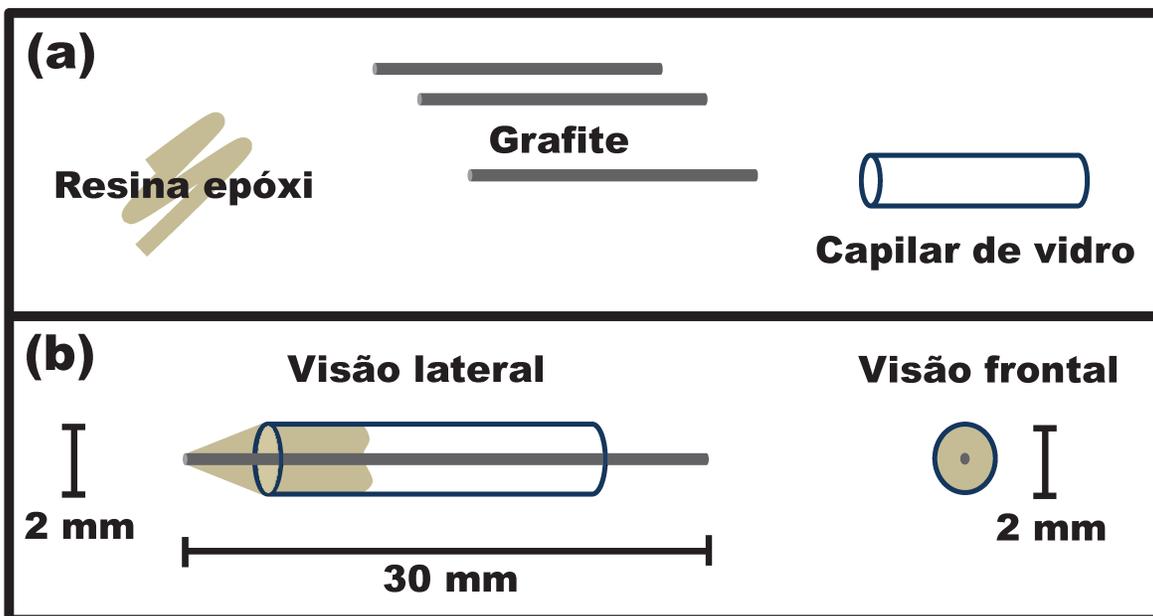


Figura II.3. (a) Materiais empregados na construção dos eletrodos e (b) esquema de montagem dos eletrodos.

II.1.6.2 Desenho e construção dos dispositivos

O ePAD para a detecção de glicose (ePAD_{gli}), Fig. II.4, possui três microzonas circulares de 4,0 mm de diâmetro com funções específicas, sendo: filtração (Fig. II.4.i), microzona reacional e de imobilização dos reagentes (Fig. II.4.ii) e microzona de detecção eletroquímica (Fig. II.4.iii). Os dispositivos foram construídos empregando o papel Whatman #1 seguindo procedimento ilustrado no tópico II.1.4.

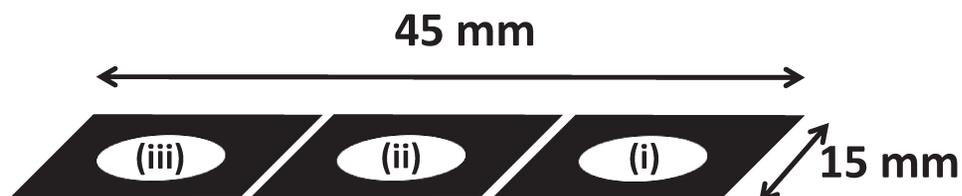


Figura II.4. Desenho esquemático do μ PAD para a detecção de glicose. (i) filtração, (ii) microzona reacional, (iii) zona de detecção eletroquímica.

II.1.6.3 Construção dos eletrodos de referência e auxiliar

Os eletrodos de referência e auxiliar foram construídos através de uma modificação do processo de “*screen-printing*”. Para isso, inicialmente foi construída uma máscara física em uma folha de transparência, ilustrada na Fig. II.5(a). A máscara foi posicionada sobre a microzona e com o auxílio de uma espátula metálica a tinta de prata foi espalhada sobre a superfície da máscara. Após a remoção da máscara os dispositivos foram tratados termicamente a 70 °C por trinta minutos. Já na etapa de hidrofobização da região (ii) do dispositivo foi feita uma adaptação do procedimento recentemente reportado [24]. As etapas envolvidas nesse processo podem ser visualizadas na Fig. II.5(b). Após a construção da plataforma o papel foi modificado com a enzima e o mediador redox.

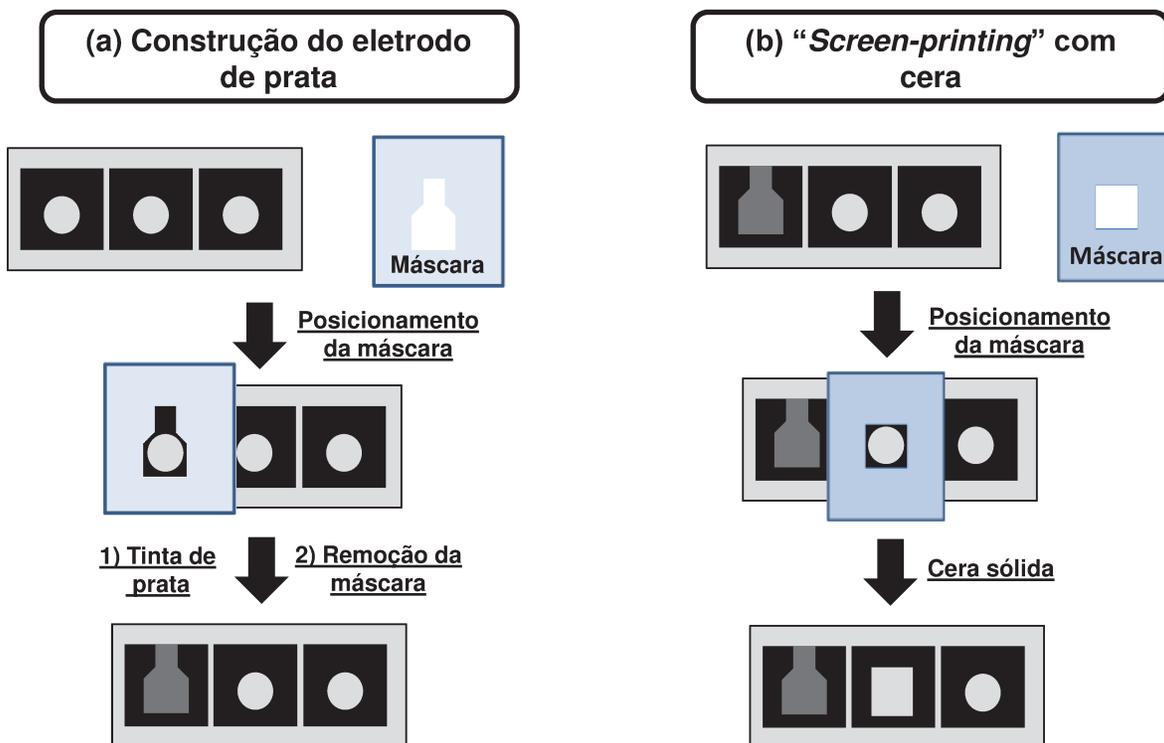


Figura II.5. (a) Construção dos eletrodos de prata. (b) Hidrofobização da superfície do papel com cera.

II.1.6.4 Modificação dos dispositivos

Na região (ii) dos dispositivos (Fig. II.4), foi adicionado inicialmente 3 μL de uma solução 20 mmol L^{-1} do mediador redox, o ácido 4-aminofenilborônico, preparada em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4. Em seguida, esperou-se secar por 40 minutos para a próxima etapa de modificação. Com o dispositivo seco, foi adicionado na mesma região 2,5 μL da enzima glicose oxidase preparada em uma solução tampão 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 + trealose 0,3 mol L^{-1} . Antes das medidas eletroquímicas os dispositivos foram deixados secar sob temperatura ambiente por 60 minutos.

II.1.6.5 Detecção eletroquímica

As medidas voltamétricas e cronoamperométricas foram feitas da seguinte maneira, inicialmente o dispositivo foi devidamente cortado e encaixado em um conector de tipo jacaré. Para realizar as medidas eletroquímicas, 40 μL da amostra ou da solução padrão foi adicionada na região (i) do dispositivo que corresponde ao processo de filtração. Após 1 minuto, 15 μL foram coletados na face oposta do dispositivo e transferidos para a região (ii) de análise. Após 3 minutos de reação nessa microzona, 10 μL dessa solução foram transferidos para a região (iii) do dispositivo. O eletrodo foi posicionado verticalmente, sem tocar o papel, sobre a microzona (iii) para efetuar as medidas eletroquímicas. Foi empregado um sistema de dois eletrodos, eletrodo de trabalho (WE) e referência (RE)/contra eletrodo (CE) (sistema combinado).

II.1.6.6 Preparo da amostra e medidas

Para a análise empregando o ePAD_{gli} foram preparadas amostras de soro sanguíneo artificial conforme descrito por Liu *et al.* [81]. Utilizando a solução descrita acima, foram preparadas soluções de glicose nas concentrações de 0,1 e 1,0 mmol L^{-1} . As amostras foram analisadas por cronoamperometria aplicando 200 mV vs. Ag no eletrodo de trabalho.

II.1.7 Dispositivo para determinação de p-nitrofenol (ePAD_{QR})

II.1.7.2 Fabricação dos eletrodos

O eletrodo de referência foi fabricado pelo processo de desenho onde um lápis foi usado para preencher a área que foi demarcada para o eletrodo de referência. Basicamente, 1,5 minutos foram suficientes para pintar a área demarcada e proporcionar um bom contato elétrico. A morfologia da superfície do papel antes e depois do procedimento de desenho foi verificada com um microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JSM-5610LV.

O eletrodo de trabalho foi preparado da mesma forma descrita anteriormente, ver tópico II.1.6.1.

II.1.7.3 Construção dos dispositivos

Para a determinação de p-nitrofenol foram inseridos no papel um código de informação bidimensional (código QR) para facilitar a interpretação por leigos nesse tipo de análise. Inicialmente uma folha inteira de papel convencional de impressão de tamanho A4 (210 × 297 mm) foi impressa com uma cor selecionada e tratada termicamente. Basicamente, qualquer cor que proporcione um bom contraste com os símbolos do código pode ser usada. Nós selecionamos o contraste verde e preto para fabricar os nossos dispositivos. A Fig. II.6 ilustra o esquema de preparo e montagem dos dispositivos, iniciando-se pela folha impressa na cor verde (Fig. II.6(a)).

Os códigos QR foram construídos usando um software gratuito e livre disponível em <http://www.qrstuff.com>. A informação a ser decodificada foi digitada no espaço previsto para a construção do código e, após a geração do código pelo software, o mesmo foi copiado e posicionado em uma das faces do desenho do dispositivo. O código QR (25 × 25 mm) e as linhas de delimitação foram impressas no dispositivo usando a impressora descrita no tópico II.1.4 (Fig. II.6(b)). Depois disso, a face do dispositivo contendo a delimitação para os eletrodos de referência+contra eletrodo (face 33 × 29 mm) foi tratada termicamente. Atenção: A face do código QR não pode tocar a chapa de aquecimento, caso contrário, as

informações serão perdidas. Dobre o dispositivo e use uma pinça para tocar somente a face contendo a delimitação do sistema RE/CE. Em seguida, o dispositivo foi virado e pode-se observar na Fig. II.6(c) que a linha de delimitação retangular para a construção do RE/CE fica evidente no interior da face 33×29 mm do lado oposto no qual o dispositivo foi impresso.

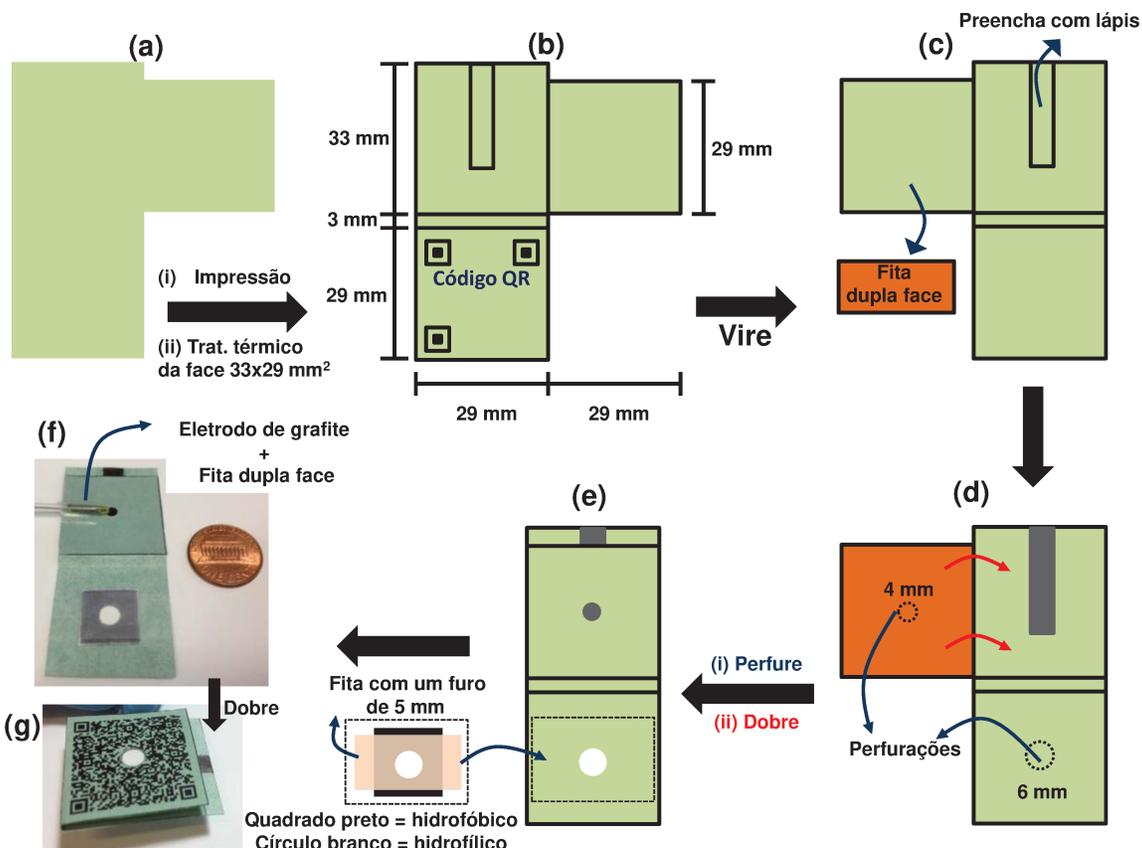


Figura II.6. Etapas de construção do ePAD_{QR}. (a) Folha de papel impressa na cor verde. (b) Dispositivo após a impressão do código e linhas de delimitação seguido do tratamento térmico na face 33×29 mm. (c) Face oposta do dispositivo na qual foi feita a impressão. (d) Dispositivo contendo a fita dupla face e a trilha de carbono. (e) Esquema ilustrando o dispositivo após perfurações e dobragem do papel. (f) Foto do dispositivo após a inserção do sistema de filtração e do eletrodo de trabalho. (g) Dispositivo pronto para a análise.

A Fig. II.6(d) mostra o dispositivo contendo a trilha de carbono desenhada com um lápis 6B, a fita dupla face colada em uma das regiões e algumas

informações sobre onde perfurar e dobrar o dispositivo. A Fig. 6(e) ilustra o dispositivo perfurado e dobrado juntamente com uma região retangular pontilhada no qual deverá ser colado o sistema de filtração. O sistema consiste de um pedaço de papel cromatográfico Whatman #1 contendo uma região hidrofóbica (quadrado em preto de 15×15 mm) e um círculo hidrofílico (círculo em branco d = 5 mm) que foi colado na face posterior do código QR utilizando uma fita adesiva convencional, a qual foi previamente perfurada (d = 5 mm). O eletrodo de trabalho, grafite de lapiseira descrito no tópico II.1.6.1 foi anexado no dispositivo usando fita dupla face, conforme ilustrado na Fig. II.6(f). A Fig. II.6(g) mostra uma foto do dispositivo pronto para análise.

II.1.7.4 Medidas eletroquímicas

Para as medidas eletroquímicas, o eletrodo de grafite de lapiseira foi posicionado na horizontal e integrado com pedaço de fita dupla face. Conectores de tipo jacaré foram usados para fazer o contato elétrico. Os experimentos de voltametria foram realizados com um potenciostato/galvanostato da Autolab Eco Chemie modelo PGSTAT-12 (Utrecht, Holanda) ligado a um microcomputador (Software GPES 4.9). As medidas eletroquímicas foram conduzidas empregando um sistema de dois eletrodos, grafite de lápis como referência (RE) / contra-eletrodo (CE) e grafite de lapiseira como eletrodo de trabalho (WE). Os voltamogramas de pulso diferencial foram realizados a 50 mV s^{-1} na faixa de potencial de 0,0 até 1,2 V versus *pseudo* referência de carbono.

II.1.7.5 Preparo das amostras e medidas

Amostras de água da torneira a partir de três locais diferentes na cidade de Campinas-SP foram coletadas e utilizadas para a determinação de p-nitrofenol. As amostras foram fortificadas com $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pNP e analisadas conforme descrito no tópico acima. O resultado da análise da amostra foi interpretado utilizando um iPhone modelo 4S da Apple usando um leitor de código QR disponível gratuitamente.

II.1.8 Microeletrodos de pasta de carbono (ePAD_μ)

II.1.8.2 Fabricação dos microfuros e máscaras

Os microfuros e as máscaras para a confecção dos eletrodos de prata foram fabricados utilizando folhas de transparência e um sistema de gravação a laser. As folhas de transparência sem película protetora foram utilizadas sem qualquer pré-tratamento. Para a fabricação dos microfuros, círculos de 25 – 100 μm foram previamente desenhados usando o software gráfico e em seguida cortados um a um usando o sistema de gravação a laser. Os dispositivos foram denominados de acordo com o tamanho dos círculos: ePAD_{μ1} (25 μm), ePAD_{μ2} (50 μm), ePAD_{μ3} (75 μm) e ePAD_{μ4} (100 μm). O mesmo procedimento foi adotado para a construção do arranjo de microfuros onde a distância de centro a centro foi variada entre 300 - 1000 μm .

O sistema de gravação a laser foi utilizado para cortar a transparência e preparar duas máscaras, uma para a construção do contato elétrico do eletrodo de trabalho e uma segunda para a fabricação do eletrodo RE/CE. O tamanho e o formato das máscaras podem ser visualizados na Fig. II.7 abaixo.

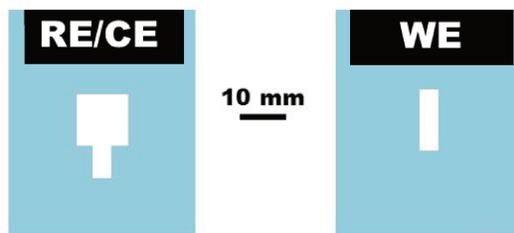


Figura II.7. Máscaras para a construção das trilhas condutoras de prata.

II.1.8.3 Construção dos dispositivos

As máscaras preparadas na Fig. II.7 foram utilizadas para a construção das trilhas de prata (Fig. II.8(a)i e (b)i) usando o procedimento similar descrito na Fig. II.5(a). Após a fabricação das trilhas em prata a folha de transparência contendo o microfuro foi aderida no papel usando fita dupla face (Fig. II.8(a)ii e iii). Na sequência o microfuro foi preenchido com pasta de carbono (Fig. II.8(a)iv). A pasta

de carbono não modificada foi preparada através de uma mistura de pó de grafite com óleo mineral (60:40) (m:m) em um frasco de vidro. Para as pastas de carbono modificadas, diferentes quantidades de ftalocianina de cobalto (CoPC) foram adicionadas, 0,5% – 10,0% em massa, mantendo-se constante a quantidade de óleo mineral. As pastas de carbono modificadas e não modificadas foram mantidas em um frasco de vidro fechado e foram utilizadas quando necessário. A Fig. II.8(b) ilustra as etapas envolvidas no processo de construção do eletrodo RE/CE. A Fig. II.8(c) mostra o esquema de montagem dos eletrodos e uma fotografia com os conectores fazendo contato elétrico com as trilhas de prata.

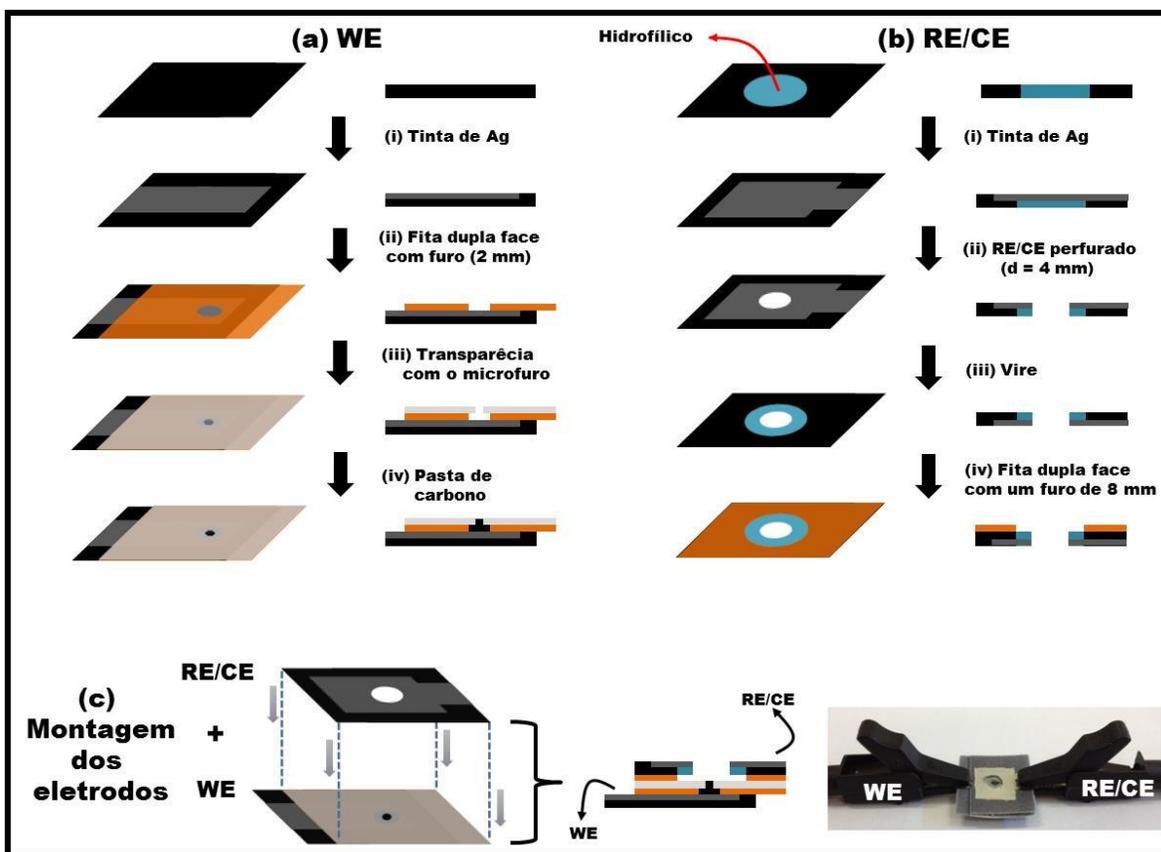


Figura II.8. Esquema do processo de construção do eletrodo de trabalho (a) e do RE/CE (b) empregando fita dupla face. (c) Montagem do WE + RE/CE para a construção ePAD_μ.

II.1.8.4 Medidas eletroquímicas

Nas medidas eletroquímicas foi empregado um sistema de dois eletrodos, tinta de prata como RE/CE e o microeletrodo de pasta de carbono como eletrodo de trabalho (WE). Conectores tipo jacaré foram posicionados em lados opostos para facilitar a manipulação do dispositivo, assim como ilustrado na fotografia da Fig. II.8(c). Para a caracterização analítica e eletroquímica do ePAD_μ, tipicamente 30 μL de solução (mínimo de 20 μL) podem ser usados com o dispositivo proposto sem que haja vazamento na parte superior. A molécula de cisteína foi utilizada como prova de conceito para a detecção de tióis nos testes de voltametria e cronoamperometria. A detecção amperométrica de cisteína foi realizada aplicando um potencial de 0,6 V vs. Ag durante 20 segundos.

II.1.9 Biossensor para metil paration (ePAD_{mp})

A determinação de metil paration foi baseada na inibição da enzima acetilcolinesterase pelo inseticida. Para isso, foram criados reservatórios nos dispositivos para acomodar a enzima e o substrato (acetiltiocolina). A Fig. II.9(i-v) ilustra as principais partes do dispositivo. Após a dobragem do dispositivo a face (i) foi modificada com 5 μL de acetiltiocolina 100 mmol L⁻¹ em água MilliQ e a face (iv) com 5 μL de uma solução de enzima acetilcolinesterase (3830 U mL⁻¹) preparada em uma solução tampão acetato 0,5 mol L⁻¹ pH 4,0 com a seguinte composição: 0,1 % (m:v) de quitosana, 80 mmol L⁻¹ de NHS e 50 mmol L⁻¹ de EDC. Após as modificações o dispositivo foi seco por 20 min a temperatura ambiente e em seguida foi devidamente colado com o eletrodo de trabalho desenvolvido no tópico anterior (ver Fig. II.8(a)).

Para os ensaios de inibição, o canal microfluídico (Fig. II.9(a)iii) foi colocado em contato com a solução do inibidor por 20 minutos. O inibidor foi preparado em uma solução tampão TRIS 50 mmol L⁻¹ pH 7,0 contendo 10 % de DMF. Após a inibição pelo metil paration, 100 μL de solução tampão TRIS 0,5 mol L⁻¹ pH 8,0 foi adicionado na face (i) do dispositivo. Após 3 min as medidas voltamétricas e cronoamperométricas foram conduzidas. Os voltamogramas foram obtidos a uma

velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} enquanto que na cronoamperometria um potencial de 250 mV foi aplicado no eletrodo de trabalho por 15 s.

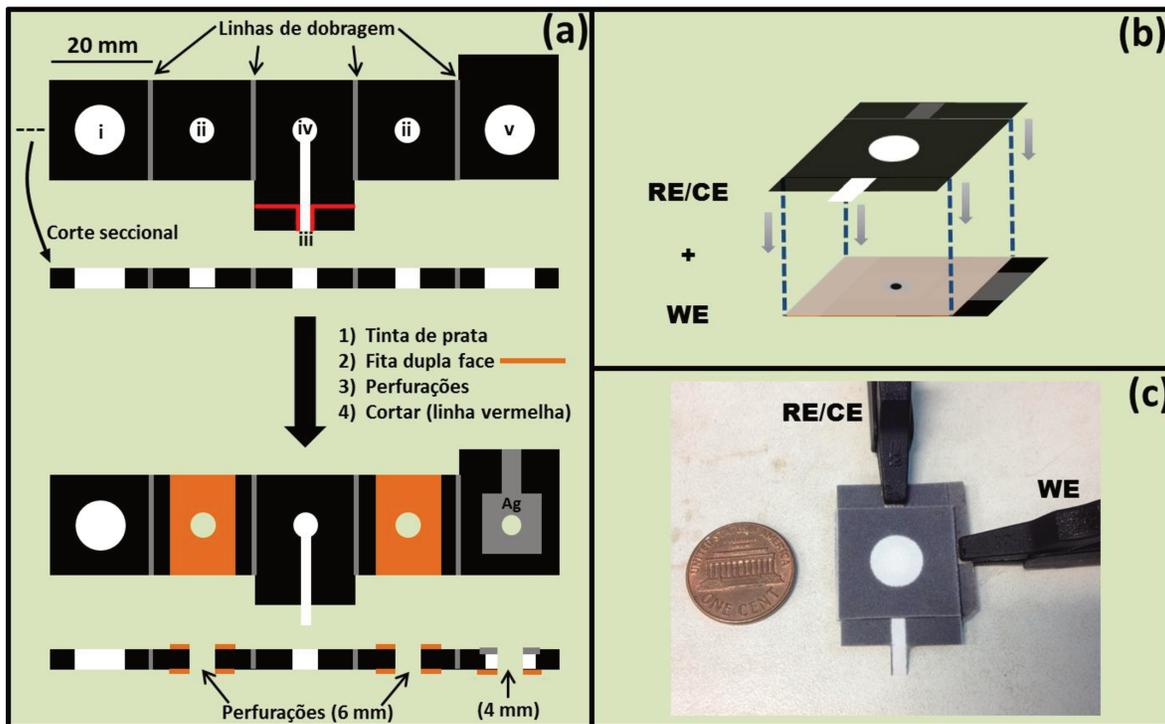


Figura II.9. (a) Esquema de construção do biossensor para a detecção de metil paration. (i) reservatório do substrato, (ii) espaçadores, (iii) canal microfluídico de coleta e filtração da amostra, (iv) reservatório da enzima e (v) RE/CE. (b) Acoplamento com o WE. (c) Foto do dispositivo com os conectores.



III. Separação e detecção eletroquímica de ácido ascórbico e dopamina (ePAD_{AD})

III.1 Apresentação

Os neurotransmissores são substâncias químicas que são secretadas por neurônios e transmitem mensagens para certas células-alvo. A dopamina (DA), Fig. III.1(a), é uma molécula importante no estudo de neurotransmissores pois ocupa uma função de destaque no sistema de "recompensa" do cérebro [82]. Uma das maneiras de monitorar dopamina é através da combinação de microeletrodos com técnicas eletroquímicas de análise [82,83]. No entanto, um dos principais interferentes nas medidas eletroquímicas é o ácido ascórbico (AA) (Fig. III.1(b)), que é oxidado no mesmo potencial da dopamina [82]. Dessa forma, buscando contornar esse problema, o presente tópico descreve a construção, caracterização eletroquímica e utilização de um dispositivo simples, de baixo custo e com consumo de amostra reduzido que possibilite a separação e detecção eletroquímica de DA e AA empregando um dispositivo microfluídico à base de papel.

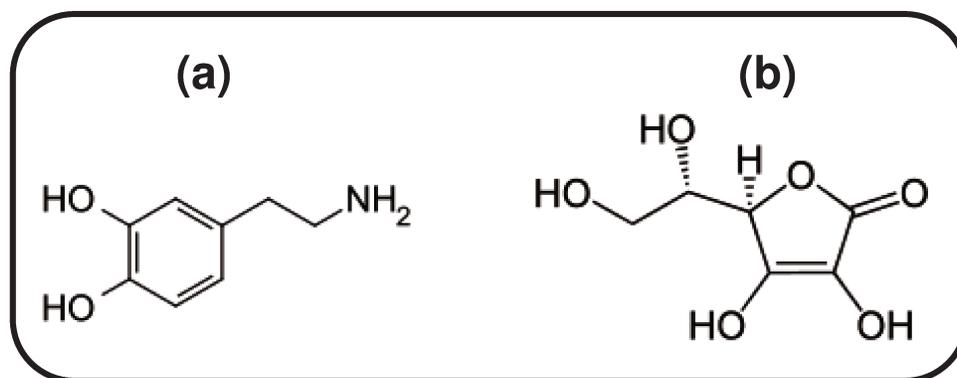


Figura III.1. Fórmula estrutural da dopamina (a) e do ácido ascórbico (b).

III.2 Resultados e discussão

III.2.1 Caracterização eletroquímica dos eletrodos de Au sobre papel

Eletrodos de ouro convencionais são extensivamente utilizados em química eletroanalítica para inúmeras aplicações. Esses eletrodos apresentam um comportamento eletroquímico característico, uma espécie de “impressão digital”, quando voltamogramas cíclicos são obtidos somente na presença do eletrólito de suporte [84]. Essa “impressão digital” pode ser definida, de maneira simplificada, como a formação do óxido de ouro no sentido anódico e a respectiva redução desse óxido formado no sentido catódico da varredura de potencial, Fig. III.2(a).

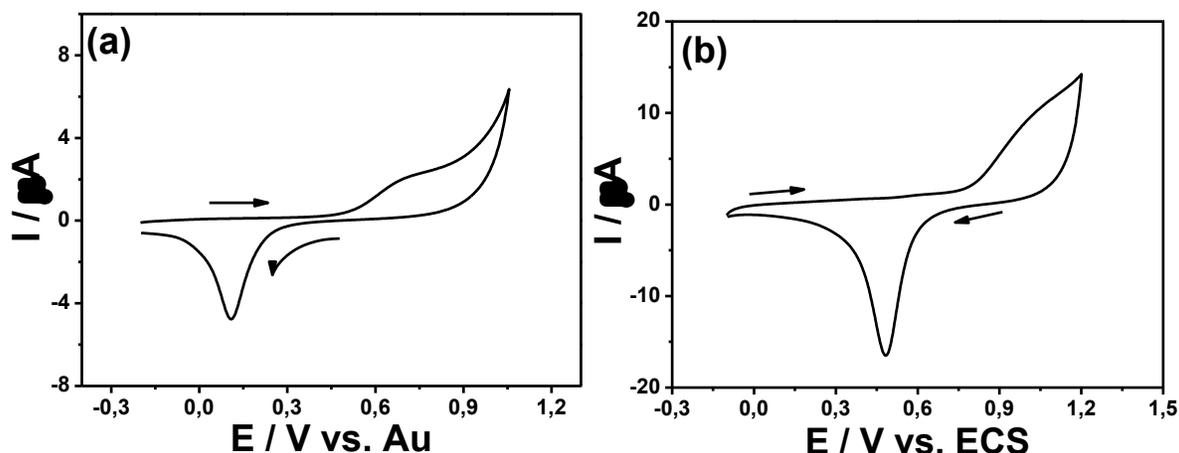


Figura III.2. Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ para (a) Au convencional e (b) Au em papel.

Para verificar o comportamento eletroquímico dos eletrodos de ouro construídos sobre a plataforma de papel, foram obtidos voltamogramas cíclicos na faixa de potencial de $-0,1$ até $1,2 \text{ V}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH $7,0$. Como pode ser observado na Fig. II.2(b), os eletrodos de ouro apresentaram um perfil similar ao dos eletrodos de ouro convencionais, com formação e redução do óxido de ouro.

A região de redução do óxido de ouro pode ser utilizada ainda para o cálculo da área eletroativa de eletrodos de ouro. Desta forma, a carga necessária

para a redução do óxido de ouro formado sobre a superfície de eletrodos de ouro foi considerada $390 \pm 10 \mu\text{C cm}^{-2}$ [84]. Empregando esse valor, foram calculadas as áreas eletroativas para todas as colunas de papel, Fig. III.3.

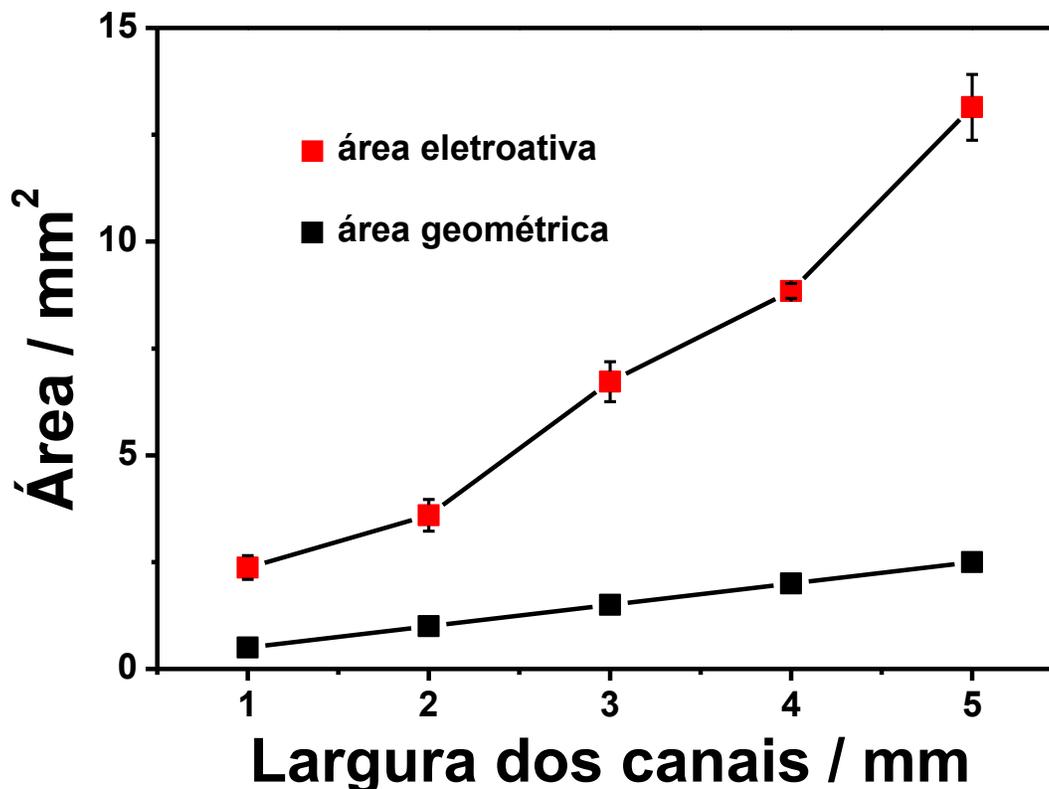


Figura III.3. Comparação entre as áreas eletroativas e geométricas dos eletrodos de trabalho para os canais de papel com largura de 1,0 a 5,0 mm. A área do retângulo de ouro na região hidrofílica foi utilizada como área geométrica.

Após o estudo do comportamento eletroquímico dos eletrodos de ouro somente com o eletrólito de suporte, foram obtidos voltamogramas cíclicos utilizando como sonda redox o sistema $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A Fig. III.4(a) ilustra o perfil voltamétrico da sonda redox em diferentes velocidades de varredura ($10 - 100 \text{ mV s}^{-1}$).

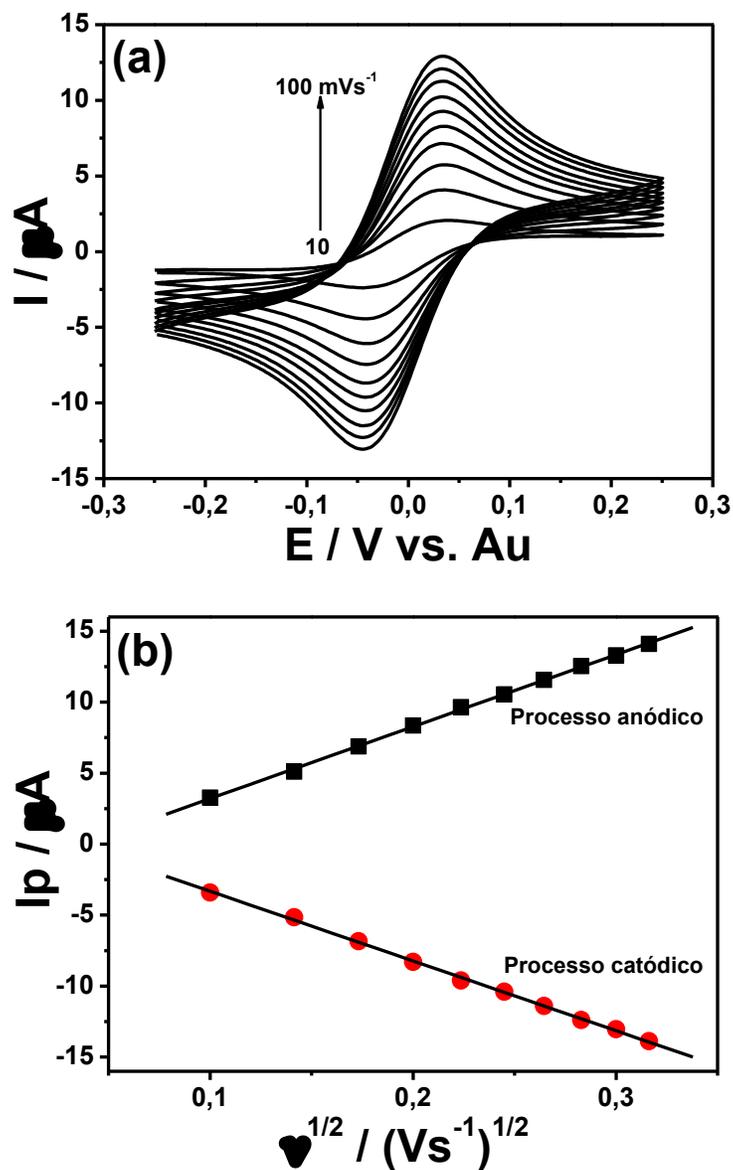


Figura III.4. (a) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando a célula eletroquímica fabricada sobre o papel em diferentes velocidades de varredura (10 – 100 mV s^{-1}). (b) Gráfico de I_p vs. $v^{1/2}$. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A razão entre as correntes de pico dos processos anódico e catódico (I_{pa}/I_{pc}) foram obtidas como sendo aproximadamente 1,0. Além disso, a diferença entre os potenciais de pico de oxidação (E_{pa}) e redução (E_{pc}) foi de 83 mV para $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$, valor próximo do esperado para um comportamento eletroquímico reversível ($59,2 \text{ mV}$ para $n = 1$) [85]. Plotando as correntes de pico dos

voltamogramas cíclicos em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) foi obtido uma dependência linear entre os parâmetros (Fig. III.4(b)), confirmando que as espécies eletroativas chegam até a superfície do eletrodo por difusão. Utilizando os coeficientes angulares das retas contidas na Fig. III.4(b) foi possível calcular o coeficiente de difusão das espécies $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ utilizadas (Tabela III.1).

Tabela III.1. Comparação entre coeficientes de difusão do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ empregando Au em papel, Au convencional e valores da literatura.

Coeficientes de difusão / $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$			
Sonda redox	Au em papel	Au convencional*	Literatura [86]
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	$1,15 \pm 0,07$	$5,87 \pm 0,09$	7,63
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	$1,23 \pm 0,05$	$6,34 \pm 0,04$	6,50

* Experimento conduzido em um sistema eletroquímico convencional: célula eletroquímica de 10 mL com capacidade para três eletrodos. Eletrodo de trabalho = Au de área eletroativa de $0,115 \text{ cm}^2$, referência ECS e eletrodo auxiliar de Pt. Os valores contidos na Tabela são referentes à medidas feitas em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A Tabela III.1 mostra ainda uma comparação dos valores de coeficiente de difusão da sonda redox entre o eletrodo de ouro em papel e o eletrodo de ouro convencional, usando a mesma solução da sonda redox para ambos os testes. Como pode ser observado na Tabela, os valores de coeficiente de difusão empregando o Au em papel foram aproximadamente cinco vezes menores quando comparado com o sistema eletroquímico convencional. Essa diminuição pode estar relacionada com a presença das fibras de celulose próximas ao eletrodo de trabalho, dificultando o processo de difusão.

Além das caracterizações eletroquímicas com o eletrodo de trabalho, foram feitos testes também com o pseudo-eletrodo de referência de ouro. Após 50 voltamogramas cíclicos obtidos na mesma faixa de potencial da Fig. III.4(a) e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, nenhuma alteração significativa dos potenciais de oxidação e redução da sonda redox foram observados. Em seguida, avaliou-se o deslocamento do potencial formal E° ($E_{pa} + E_{pc} / 2$) da sonda redox em comparação com eletrodos de referência já bem estabelecidos, Fig. III.5.

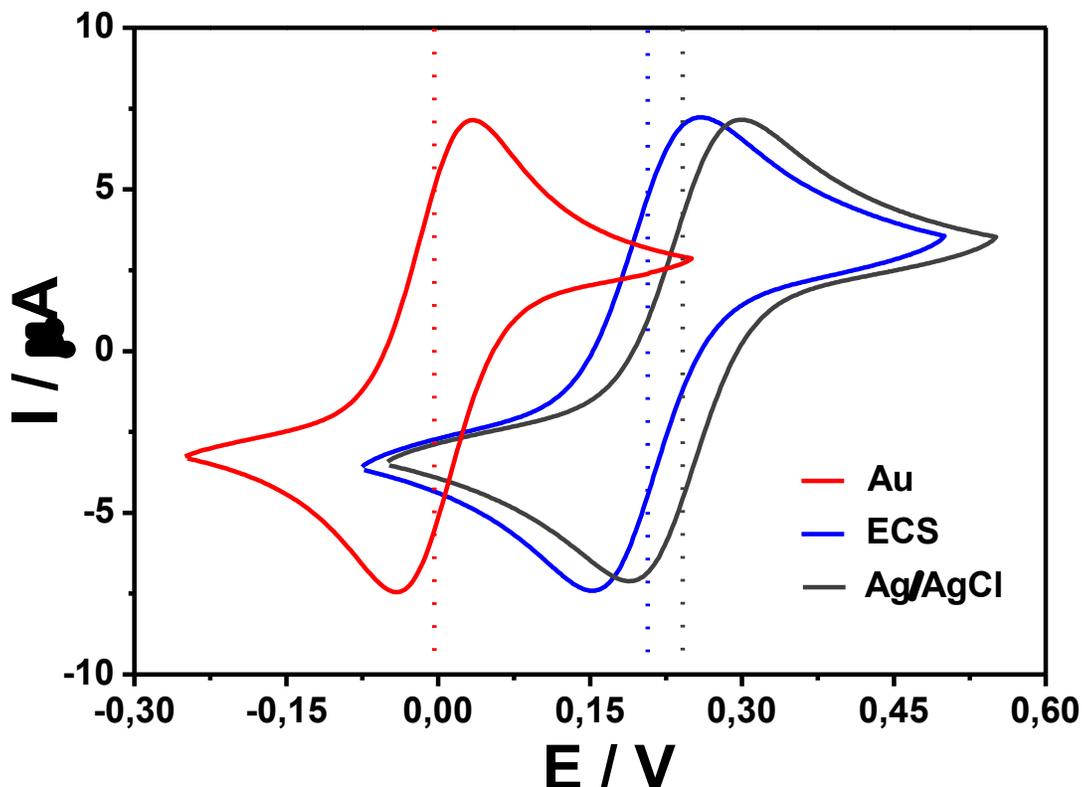


Figura III.5. Voltamogramas cíclicos do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregando como eletrodo de referência Au, ECS e Ag/AgCl. As linhas verticais pontilhadas mostram a localização do E° da sonda para cada referência.

Pode ser observado na Fig. III.5, através das linhas verticais pontilhadas, diferenças do E° obtido para o Au de 203 e 244 mV em relação aos eletrodos de ECS e Ag/AgCl, respectivamente. A diferença entre o ECS e o Ag/AgCl foi de 37 mV, valor próximo ao reportado (44 mV) [85], indicando que a montagem do experimento foi feita de maneira a minimizar efeitos de queda ôhmica.

III.2.2 Influência do tipo de papel na separação de DA e AA

O papel Whatman #1 é um dos papéis cromatográficos mais utilizados para a construção de dispositivos de baixo custo, tanto para a detecção colorimétrica quanto para a detecção eletroquímica [18,23,29,48,49,52,87-89]. Inicialmente foram construídos dispositivos microfluídicos de separação empregando o papel #1 para verificar a separação das espécies de interesse nessa plataforma. A Fig.

III.6 mostra a resposta de corrente do dispositivo após injeções de uma solução padrão contendo DA e AA em diferentes pontos do canal de papel.

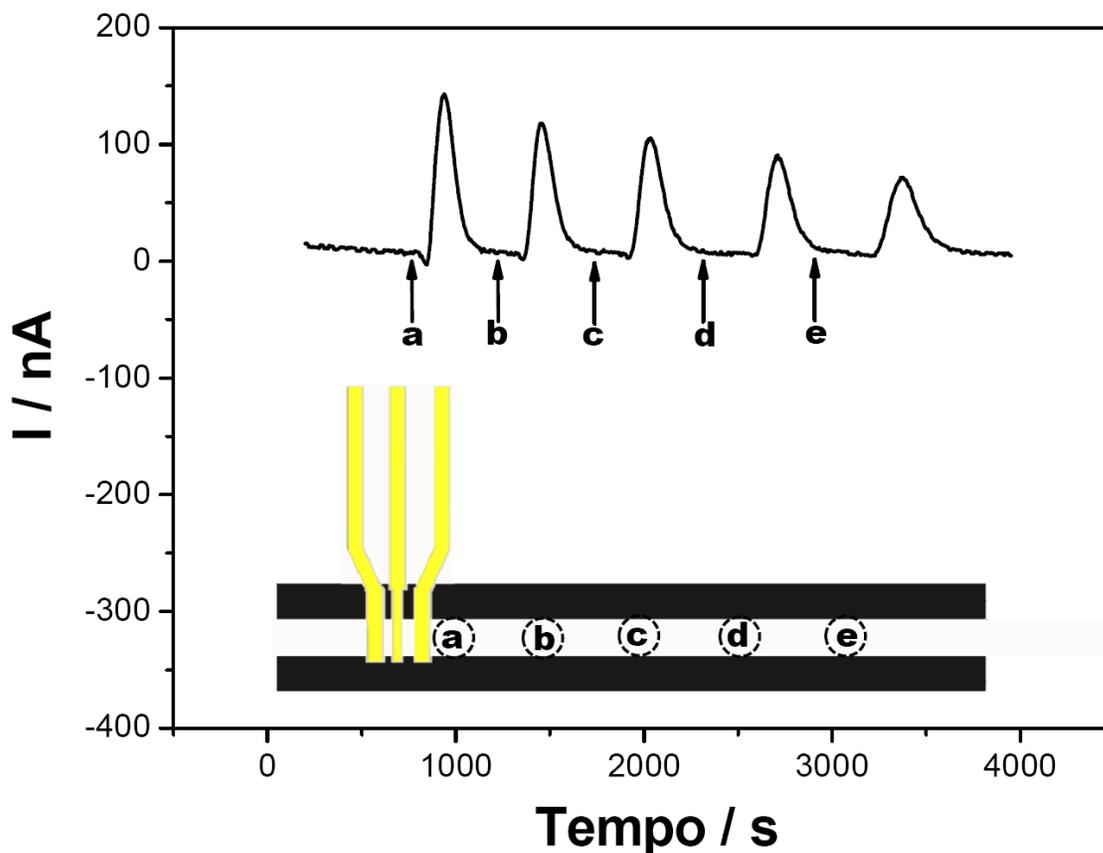


Figura III.6. Injeções de $0,5 \mu\text{L}$ de uma solução padrão contendo uma mistura DA e AA (1 mmol L^{-1} cada). Eluente: Tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. Eapl. = $0,4 \text{ V}$ vs. Au. Papel Whatman #1 com largura do canal de $2,0 \text{ mm}$. As setas indicam os tempos nos quais foram feitas injeções dos padrões. Gráfico inserido: ilustração da coluna de papel com destaque para as regiões de adição da amostra.

Na tentativa de favorecer o processo de separação foram feitas injeções da mistura dos padrões em distâncias mais afastadas do detector (Fig. III.6), mas mesmo assim, não foi possível observar nenhuma melhora no resultado. Sendo assim, não foi possível observar a separação das bandas cromatográficas dos analitos utilizando o papel cromatográfico Whatman #1.

Aproveitando que as moléculas de DA e AA possuem valores bem distintos de pKa, 8,9 para o grupo R-NH₃ da dopamina [90] e 4,1 para o grupo R-OH do ácido ascórbico [91], foram construídos dispositivos utilizando um papel trocador catiônico para favorecer o processo de separação. A Fig. III.7 mostra um cromatograma obtido nesse tipo de papel após a injeção de uma mistura contendo AA e DA.

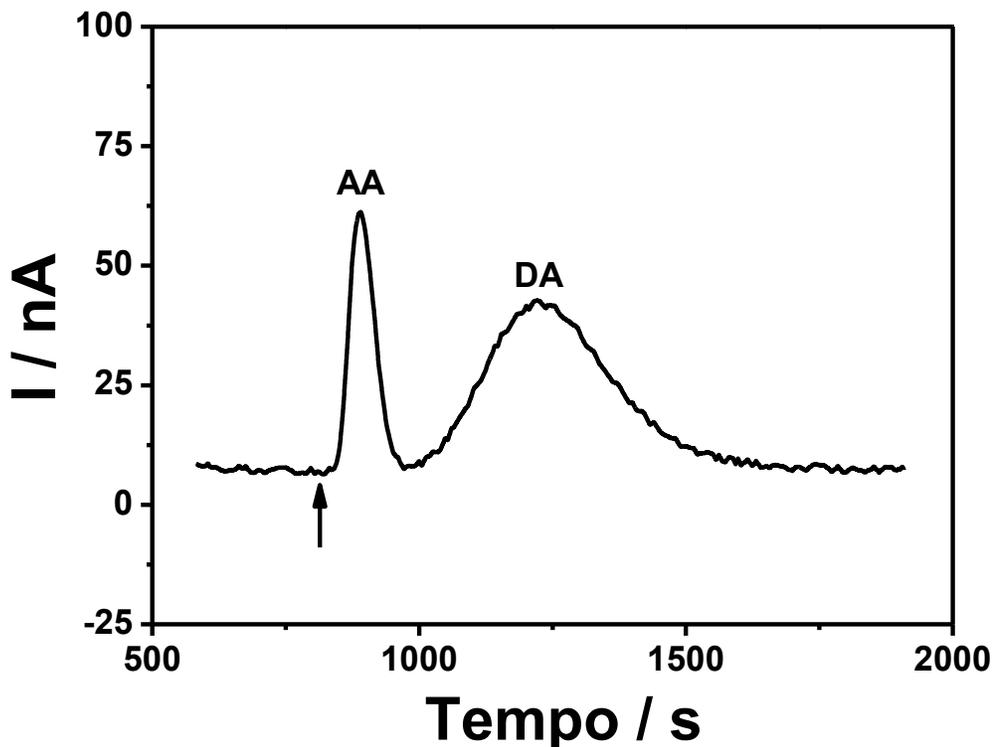


Figura III.7. Cromatograma em papel trocador catiônico P81 da Whatman. Eluente: Tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0. Eapl. = 0,4 V vs. Au. Largura do canal de 2,0 mm. Injeção de 0,5 μL de uma solução padrão (seta inserida) contendo uma mistura DA e AA 1 mmol L⁻¹ cada. Injeção à 12 mm do WE.

O cromatograma obtido com o dispositivo microfluídico, Fig. III.7, demonstra uma separação para AA e DA em nível de linha de base. Pode ser observado ainda que o ácido ascórbico apresenta um tempo de retenção menor do que a dopamina. A razão para isso está relacionado com o tipo de papel empregado na construção do dispositivo. O papel Whatman P81 é um papel

trocador catiônico forte de alta capacidade [92]. O grupo ácido fosfórico com contraíons de sódio é responsável pelo processo de troca iônica [93,94]. Assim, quando a forma protonada da dopamina está percorrendo o canal microfluídico um processo de troca iônica acontece no interior dos poros do papel. Esse processo retém substâncias com carga positiva devido à presença de grupos funcionais com carga negativa imobilizados no papel.

III.2.3 Distância de aplicação da amostra

O fator de retardamento (R_F), razão entre as distâncias percorridas pelo analito e a fase móvel, não é uma constante cromatográfica que define o deslocamento de uma substância em quaisquer condições. Os valores de R_F se alteram de acordo com as condições experimentais nas quais os experimentos são obtidos, inclusive com a posição onde a amostra é adicionada [95]. No entanto, no dispositivo microfluídico de separação a frente da fase móvel não é monitorada. O sistema de detecção eletroquímico foi fixo ao final da coluna de papel e, conhecendo a distância de aplicação das amostras e soluções padrão, o termo R_F pode ser substituído pelo tempo de retenção (T_R).

Assim, um dos fatores importantes está relacionado com a distância de aplicação da amostra em relação ao sistema de detecção eletroquímico. Para verificar o efeito da distância na separação dos compostos foi obtido um cromatograma onde as soluções padrão contendo uma mistura de AA e DA foram adicionadas em diferentes posições da coluna de papel (Fig. III.8).

Na Fig. III.8, pode ser observado que o processo de separação é favorecido quando os padrões são adicionados em posições mais distantes do sistema de detecção.

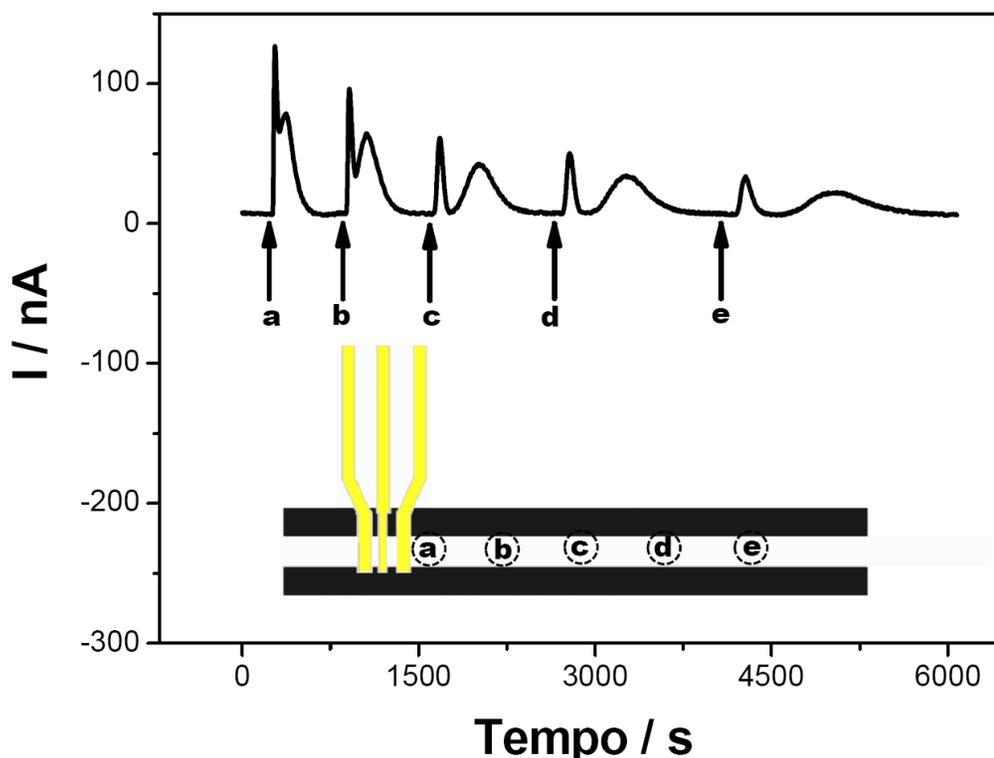


Figura III.8. Injeções de 0,5 μL de uma solução padrão contendo uma mistura DA e AA (1 mmol L^{-1} cada). Eluente: Tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. Eapl. = $0,4 \text{ V}$ vs. Au. Papel Whatman P81 com largura do canal de 2,0 mm. As setas mostram os tempos nos quais foram feitas as injeções dos padrões. Distâncias em relação ao eletrodo de trabalho de cada injeção: (a) 3 mm, (b) 7 mm, (c) 12 mm, (d) 17 mm e (e) 22 mm.

Para avaliar a separação dos dois compostos foram calculados os valores de resolução (R_s), definido como a distância (d_R) que separa os pontos máximos dos picos e a média das larguras de suas respectivas bases, w_b , [96]:

$$R_s = 2(d_{R \text{ DA}} - d_{R \text{ AA}}) / (w_{b \text{ DA}} + w_{b \text{ AA}}) \quad \text{Eq. III.1}$$

A resolução dos picos aumentou de 0,6 até 1,3, indicando que a separação dos picos é fortemente influenciada pela distância de aplicação das soluções padrão. Pode ser verificado também na Fig III.8 uma separação em nível de linha de base para uma distância de 12 mm em relação ao sistema de

detecção eletroquímica. Para distâncias maiores que 12 mm a resolução aumenta, mas por outro lado, o tempo necessário para efetuar a separação torna-se cada vez maior. Buscando uma separação em nível de linha de base no menor tempo análise foi selecionada a distância de 12 mm para injeção dos padrões.

III.2.4 Volume de amostra

O volume de amostra é um parâmetro que também deve ser cuidadosamente avaliado em separações cromatográficas [95,96]. A quantidade de amostra a ser adicionada depende da sensibilidade do método de detecção, e de maneira geral empregam-se quantidades na ordem de microgramas a miligramas [96]. Para avaliar a influência desse parâmetro foram adicionados volumes de 0,25 até 2,5 μL de uma solução padrão contendo uma mistura de AA e DA (Fig. III.9).

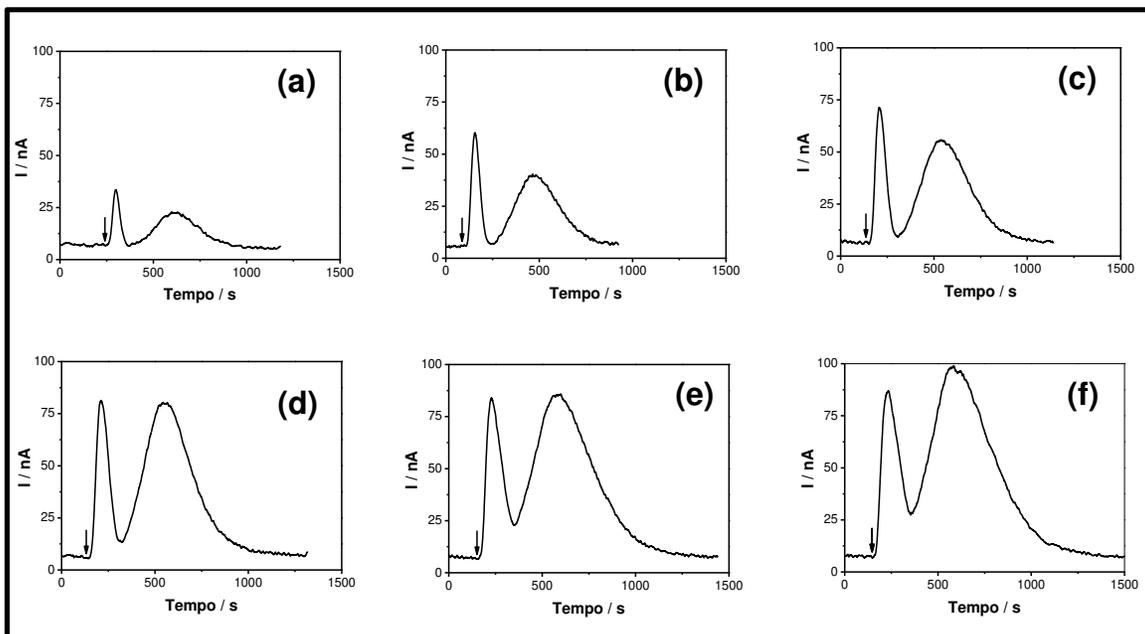


Figura III.9. Cromatogramas em papel trocador catiônico P81 da Whatman. Condições: Tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0, Eapl. = $0,4 \text{ V vs. Au}$, largura do canal $2,0 \text{ mm}$. Injeções (seta inserida) de (a) 0,25, (b) 0,5, (c) 1,0, (d) 1,5, (e) 2,0 e (f) $2,5 \mu\text{L}$ de uma solução padrão contendo a mistura de DA e AA 1 mmol L^{-1} .

Como pode ser observado na Fig. III.9, o aumento do volume adicionado na coluna de papel prejudica o processo de separação da DA e do AA. Assim, buscando por um compromisso entre o maior sinal analítico e uma separação em nível de linha de base, o volume de amostra de 0,5 μL foi selecionado.

III.2.5 Influência da largura dos canais

A largura do canal é um parâmetro que influencia diretamente na detecção dos compostos de interesse. Conforme demonstrado na Fig. III.3, a medida que a largura do canal aumenta a área dos eletrodos de trabalho também aumenta. Visando investigar a influência da largura do canal na detecção dos compostos, as respostas analíticas foram normalizadas em função da área eletroativa do eletrodo de trabalho em cada canal (Fig. III.10).

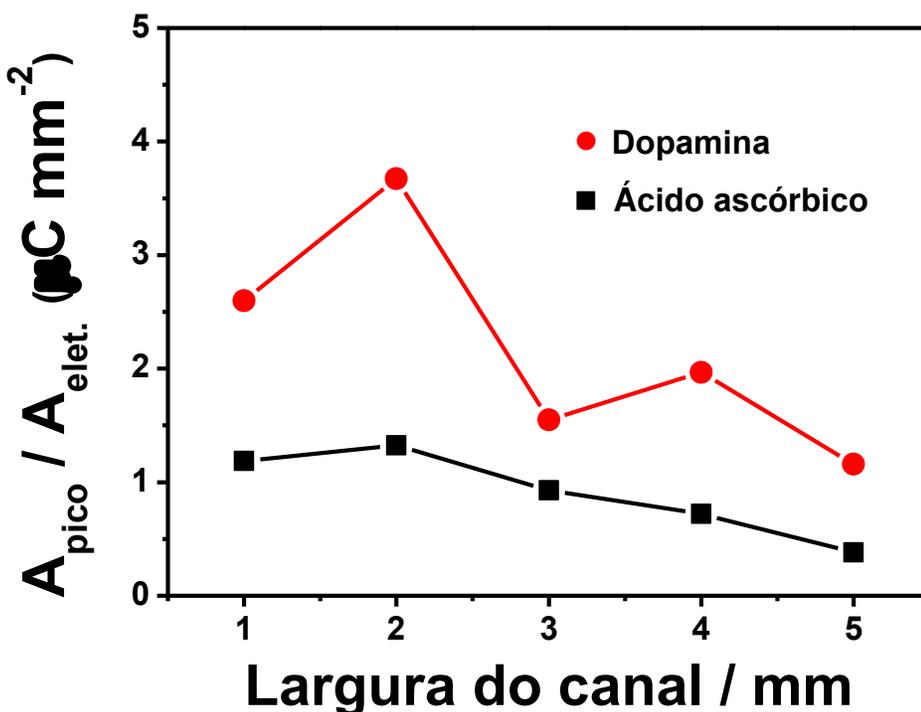


Figura III.10. Respostas analíticas normalizadas em função da área eletroativa. Estudo realizado em papel trocador catiônico P81 da Whatman, eluente tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 e Eapl. = 0,4 V vs. Au. Injeção de 0,5 μL de uma solução padrão contendo a mistura de DA e AA 1 mmol L⁻¹ à 12 mm do eletrodo de trabalho.

Como pode ser observado na Fig. III.10, a resposta analítica normalizada aumenta até uma largura de canal de 2 mm e então decresce para canais mais largos. Esse decréscimo do sinal pode estar relacionado com a distribuição da amostra de 0,5 μL adicionada no canal. Canais mais largos que 2 mm podem estar concentrando a amostra na região central do canal, fazendo com que o eletrodo de ouro na proximidades das parede de cera contribua somente com o aumento da corrente capacitiva.

III.2.6 Curva analítica

A curva analítica foi construída utilizando as condições experimentais que apresentaram a maior resposta (área do pico) e com separação de AA e DA em nível de linha de base. A Fig. III.11 mostra os cromatogramas obtidos após adições sucessivas de AA e DA preparadas em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0.

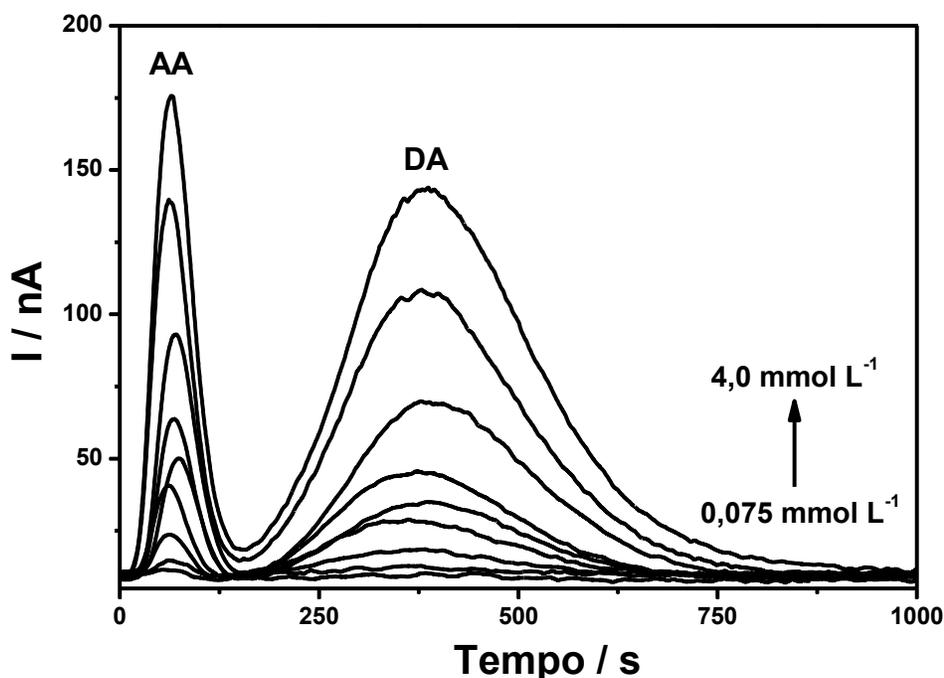


Figura III.11. Cromatogramas em papel trocador catiônico P81 da Whatman. Condições: Solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0, Eapl. = 0,4 V vs. Au, largura do canal 2,0 mm. 0,5 μL das soluções padrão contendo a mistura de DA e AA 0,075 até 4,0 mmol L⁻¹ adicionadas à 12 mm do eletrodo de trabalho.

Como pode ser observado na Fig. III.11, os cromatogramas obtidos para concentrações de AA e DA até $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ apresentaram uma separação em nível de linha de base. Assim, as áreas dos picos foram plotadas em função da concentração dos analitos estudados (Fig. III. 12).

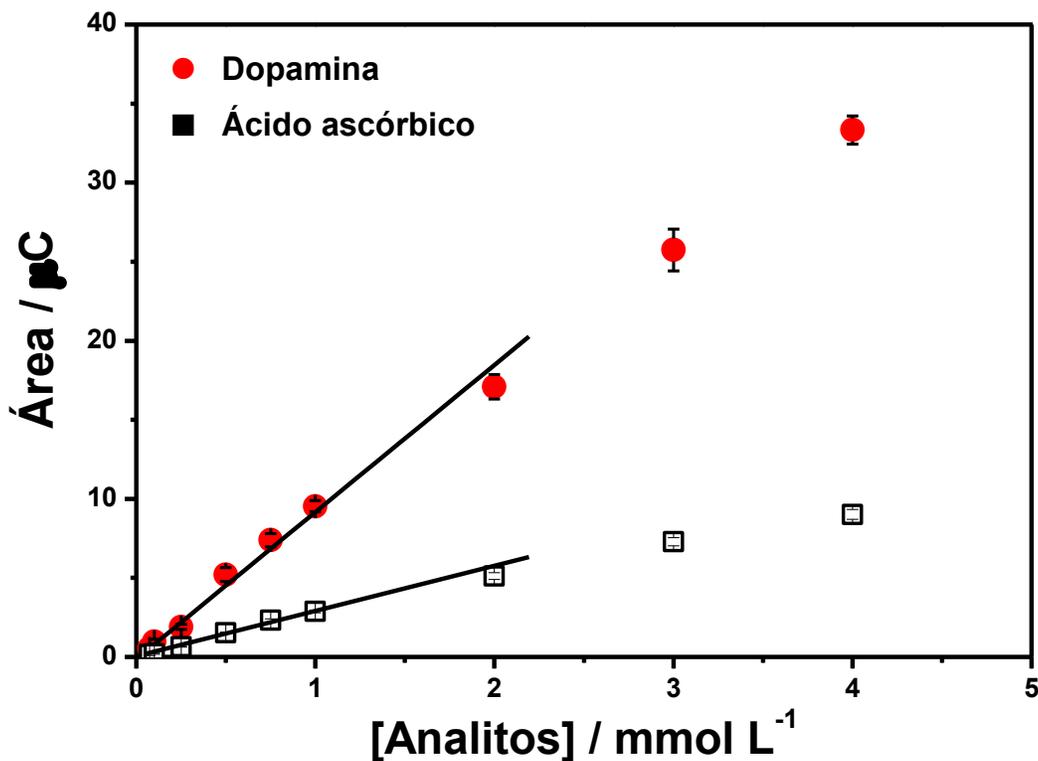


Figura III.12. Curva analítica para dopamina e ácido ascórbico.

Na Figura III.12, pode ser observado uma faixa linear de resposta de $0,075$ até $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para ambos os analitos. Cada faixa linear pode ser expressa com as seguintes equações:

$$\text{Área } (\mu\text{C}) = -0,06(\pm 0,03) + 2,9(\pm 0,1) [\text{AA mmol L}^{-1}] \quad \text{Eq. III.2}$$

$$\text{Área } (\mu\text{C}) = -0,15(\pm 0,07) + 9,3(\pm 0,4) [\text{DA mmol L}^{-1}] \quad \text{Eq. III.3}$$

com coeficiente de correlação de $0,994$ e $0,995$ para ácido ascórbico e dopamina, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação para o ácido ascórbico

foram de 0,031 e 0,10 mmol L⁻¹. Já para a dopamina, os limites de detecção e quantificação foram de 0,022 e 0,075 mmol L⁻¹. Os limites de detecção e quantificação foram calculados seguindo as recomendações da IUPAC, $3 \times s_b$ /coeficiente angular e $10 \times s_b$ /coeficiente angular.

III.2.7 Testes de estabilidade

Além dos ótimos resultados referentes à separação e detecção eletroquímica da dopamina e do ácido ascórbico, os resultados referentes aos ensaios de estabilidade também surpreenderam. Enquanto que os protótipos encontrados na literatura permitem que o dispositivo seja utilizado uma única vez [48,49], com o protótipo proposto foi possível realizar 83 separações com um único dispositivo. Esse é um ponto interessante visto que eletrodos de ouro são mais caros que eletrodos de carbono e prata. A estimativa de custo do presente dispositivo com os eletrodos de ouro é de R\$ 9,50.

O custo pode ser compensado pelo número de separações possíveis com cada dispositivo. Aproximadamente vinte separações a cada dia por até quatro dias seguidos podem ser conduzidas. O ponto chave que possibilita inúmeras separações em um único dispositivo está relacionado com a maneira com que o canal foi construído. Os dispositivos publicados normalmente realizam medidas eletroquímicas em regiões cercadas por cera [49] ou fotorresiste [48] e sem escape para o eluente [48,49]. Por outro lado, o dispositivo proposto neste trabalho possui uma região de escape ao final da coluna de papel que permite que os analitos previamente detectados sejam direcionados para essa região, não atrapalhando as análises posteriores. Dessa forma, essa região de escape (Fig. II.2(b)) funciona como um reservatório de descarte para o eluente e amostras, de maneira similar aos equipamentos de HPLC.

III.3 Conclusões parciais e motivação para a próxima etapa

Neste tópico foi desenvolvido um dispositivo de microfluídico à base de papel com um sistema de detecção eletroquímico baseado em eletrodos de ouro. O processo de fabricação dos dispositivos é muito simples e pode ser dividido em

apenas dois passos: 1) construção das paredes hidrofóbicas e 2) fabricação dos eletrodos de ouro.

Os canais hidrofílicos criados no papel funcionaram como uma plataforma de separação de baixo custo. O comprimento desses canais, bem como nos métodos cromatográficos convencionais, teve um efeito importante na separação dos analitos. Uma separação em nível de linha de base de ácido ascórbico e dopamina pode ser conseguida através da injeção da amostra em 12,0 mm do eletrodo de trabalho de ouro. Os canais de separação também podem ser utilizados para a filtração da amostra, caso seja necessário.

Assim, a combinação de canais de separação à base de papel com detecção eletroquímica é uma ferramenta promissora para a tecnologia de *lab-on-a-paper*. Por outro lado, não foi possível atingir os limites de detecção para a determinação de dopamina em fluídos biológicos ($\sim 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). O tempo de análise de 15 minutos é outro fator que precisa ser melhorado. Com isso, a nossa motivação foi buscar por processos de construção mais simples e de baixo custo, onde os dispositivos resultantes apresentem menores tempos de análise e limites de detecção mais apreciáveis.



IV. Biossensor para detecção de glicose (ePAD_{gli})

IV.1 Apresentação

O monitoramento simples e rápido de espécies de interesse biológico no sangue é um objeto de desejo tanto para usuários e médicos quanto para as indústrias farmacêuticas. Médicos buscam dispositivos simples e precisos para indicarem aos seus pacientes [97]. Sabendo desta busca, empresas farmacêuticas vão atrás dessas necessidades para desenvolverem tais dispositivos de análise.

Uma das moléculas alvo presentes no sangue que desperta a atenção de muitos pesquisadores e indústrias é a glicose [15,48,97]. A glicose, Fig. IV.1, é uma espécie que merece um controle especial de sua concentração em pacientes com diabetes [98]. A redução das flutuações da glicemia ao longo do tempo pode prevenir ou retardar o aparecimento de complicações relacionadas à hiperglicemia e hipoglicemia em ambos os tipos de diabetes, tipo 1 e tipo 2 [97]. Assim, a determinação de glicose empregando dispositivos simples e rápidos é muito importante. Baseado nestas abordagens, o presente tópico descreverá os resultados obtidos empregando o ePAD_{gli} para a determinação de glicose.

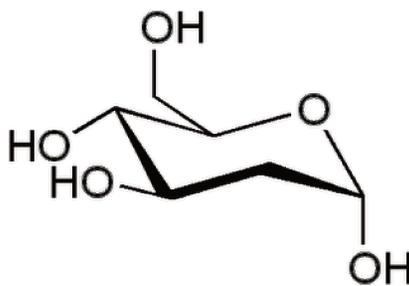


Figura IV.1. Fórmula estrutural da D-glicose.

IV.2 Resultados e discussão

IV.2.1 Layout e funcionamento do dispositivo

Após a construção dos eletrodos de prata e da hidrofobização de uma das microzonas circulares, o ePAD_{gli} foi devidamente cortado assim como ilustrado na Fig. IV.2. Como pode ser observado na Fig. IV.2, o dispositivo apresenta três regiões principais de operação. A região (i) funciona como uma microzona de filtração para minimizar o efeito de possíveis interferentes. O processo de filtração é rápido e após 1 minuto já é possível coletar uma quantidade suficiente de amostra para a análise. Após este processo, a amostra passa por uma segunda microzona (ii) onde estão imobilizados a enzima glicose oxidase (GO) e o ácido 4-aminofenil borônico (4-APBA). Nesta etapa, o peróxido de hidrogênio formado como produto da reação enzimática reage com o 4-APBA (mediador redox) formando o 4-aminofenol. Após a formação do 4-aminofenol, a amostra é então transferida para a microzona de detecção (iii). Na última etapa, o 4-aminofenol é correlacionado com a concentração de glicose empregando a detecção eletroquímica (voltametria cíclica ou cronoamperometria).

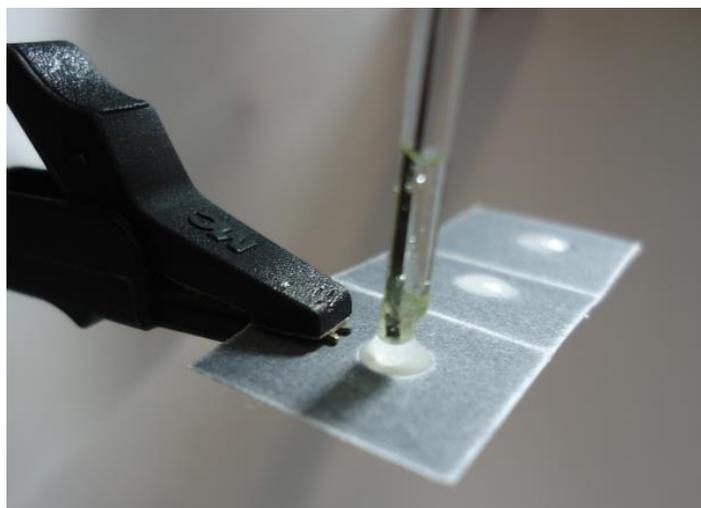


Figura IV.2. Foto do dispositivo em funcionamento.

IV.2.2 Escolha do eletrodo de trabalho

O carbono é um dos materiais mais utilizados para a construção de eletrodos em microdispositivos analíticos à base de papel [48–51]. Normalmente, eletrodos de carbono são estabelecidos no papel empregando a tecnologia de “*screen-printing*”. Em muitos casos, é necessário que o contato elétrico do eletrodo com o potenciostato ou com o leitor de corrente seja feito com o auxílio de outro material condutor, como por exemplo a prata [48,51,99,100]. Possivelmente, uma das razões para a incorporação da prata em ePADs seja a baixa resistividade das trilhas condutoras formadas a partir deste material. A necessidade de outro material para fazer o contato elétrico aumenta o tempo de preparo do dispositivo, uma vez que agora duas etapas de “*screen-printing*” e duas etapas de cura (tratamento térmico) das tintas são necessárias.

Buscando uma alternativa mais simples para acoplar eletrodos de carbono com dispositivos a base de papel está sendo proposto aqui neste tópico a utilização de grafite de lapiseira como eletrodo de trabalho. O grafite de lapiseira possui ótimas características para ser acoplado com ePADs, como: baixo custo, disponível em diversos tamanhos (raio entre 150 e 350 μm), condutor de corrente elétrica e disponibilidade de compra no mundo todo em livrarias e/ou papelarias.

Os grafites comerciais para lapiseira apresentam uma rigidez intermediária que fica entre o grafite pirolítico ou eletrodos de pasta de carbono e o carbono vítreo [101]. Uma das maneiras de avaliar os diferentes tipos de grafite é através de sua dureza. A dureza do grafite pode ser dividida em dois tipos principais, tipo B (grafite mais mole) e tipo H (grafite mais duro), e a diferença desses tipos é influenciada basicamente pela quantidade de polímero utilizado na sua fabricação [102].

Tavares e Barbeira estudaram o comportamento eletroquímico de inúmeras marcas e diferentes tipos de grafite [101]. Os autores avaliaram parâmetros como ΔE_p , repetibilidade das medidas, sensibilidade, razão das correntes de pico em módulo ($|I_{pa} / I_{pc}|$) e verificaram que grafites mais duros são mais recomendados para serem utilizados como materiais eletródicos [101]. Assim, buscando por grafites acessíveis comercialmente, com superfície reprodutível e parâmetros

eletroquímicos apropriados o grafite H da Pentel com raio de 150 μm foi selecionado como eletrodo de trabalho. Além disso, outro fator importante que contribuiu para a escolha dessa marca de grafite foi a localização da empresa. A Pentel conta com distribuidores em pontos estratégicos pelo mundo, incluindo: Brasil, México, África do Sul, Tailândia, Canadá, Estados Unidos, Austrália, China, Japão e etc [103]. Este fator localização poderá facilitar o emprego de dispositivos de baixo custo com detecção eletroquímica em praticamente todas as localidades, inclusive em países emergentes.

IV.2.3 Caracterização eletroquímica: sistema convencional

Eletrodos de carbono são extensivamente empregados em química eletroanalítica para inúmeras aplicações. Uma das maneiras de realizar a caracterização eletroquímica de eletrodos de carbono é empregando uma sonda redox com um comportamento eletroquímico bem estabelecido [104]. Inicialmente foram obtidos voltamogramas cíclicos empregando a sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ para avaliação dos eletrodos de trabalho.

Como pode ser observado na Figura IV.3, o par redox da sonda apresenta um comportamento bem definido e sem ruído. A razão em módulo entre as correntes de pico foi de 1,01 sugerindo um processo eletroquímico reversível. Já a separação de picos (ΔE_p) foi de 83 mV. Este valor é um pouco maior do que o esperado para um processo eletroquímico reversível envolvendo 1 elétron ($\Delta E_p \sim 60$ mV) mas é inferior quando comparado com alguns eletrodos impressos de carbono disponíveis comercialmente [105]. Além disso, quando cinco eletrodos foram preparados da mesma maneira e testados em uma solução contendo 1 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ e KCl 0,1 mol L^{-1} o coeficiente de variação (C.V.), avaliando a corrente de pico anódica, foi menor que 5 %.

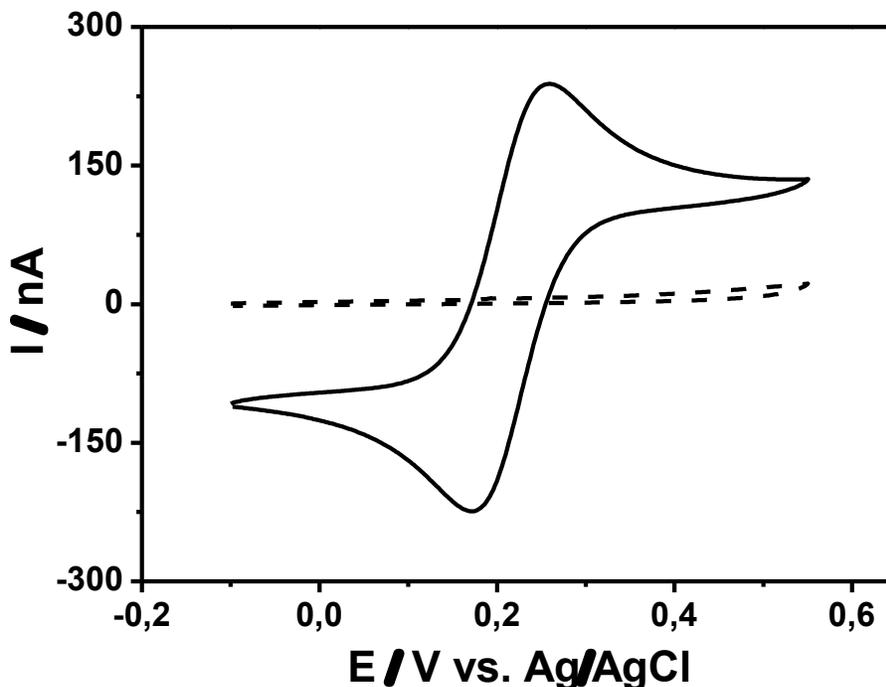


Figura IV.3. Voltamograma cíclico obtido em sistema eletroquímico convencional com três eletrodos. Eletrodo de trabalho = grafite H, eletrodo de referência = Ag/AgCl e auxiliar = platina. Condições: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 1 mmol L^{-1} + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$.

A sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ foi empregada também para calcular a área eletroativa dos eletrodos de grafite conforme relatado na literatura [107]. Para isso, inicialmente foram obtidos voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura ($30 - 110 \text{ mV s}^{-1}$) e em seguida as correntes de pico obtidas foram plotadas em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura IV.4).

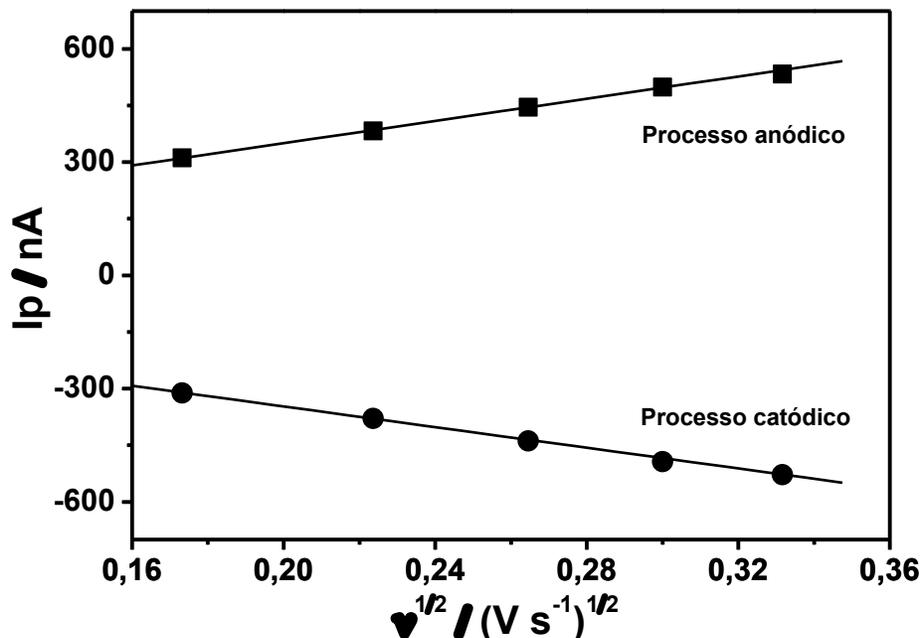


Figura IV.4. Gráfico de corrente de pico (I_p) versus raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). Condições: $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ 1 mmol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹ e $v = 30 - 110$ mV s⁻¹. Sistema convencional de três eletrodos.

As correntes de pico apresentaram um comportamento linear em função da raiz quadrada da velocidade de varredura indicando que as espécies eletroativas chegam até a superfície do eletrodo de grafite por difusão. O mesmo gráfico pode ser usado também para o cálculo da área eletroativa empregando a equação de Randles-Sevcik [85]:

$$I_p = \left(2,69 \times 10^5\right) n^{3/2} A D^{1/2} C^* v^{1/2} \quad \text{Eq. IV.1}$$

onde I_p é a corrente de pico (A), n é o número de elétrons envolvidos, A é a área do eletrodo (cm²), D é o coeficiente de difusão (cm² s⁻¹), C^* é a concentração das espécies eletroativas no seio da solução (mol cm⁻³) e v é a velocidade de varredura (V s⁻¹). Utilizando o coeficiente angular do processo anódico na Fig. IV.4

e substituindo os demais parâmetros na Eq. IV.1 foi possível determinar a área eletroativa dos eletrodos de grafite como sendo $0,19 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ ($n = 3$).

IV.2.4 Caracterização eletroquímica do ePAD_{gli}

Dispositivos analíticos à base de papel com detecção eletroquímica empregam sistemas com três eletrodos para a determinação de espécies eletroativas [48,49,89,100,108,109]. Por outro lado, quando o diâmetro dos eletrodos de trabalho atinge alguns micrômetros existe a possibilidade de efetuar experimentos eletroquímicos com somente dois eletrodos, sem que haja uma diminuição da corrente [85]. Baseado nesta informação, uma das motivações do nosso trabalho foi desenvolver um sistema eletroquímico de análise simples usando um sistema de dois eletrodos, o grafite de lapiseira como eletrodo de trabalho e o dispositivo de papel com tinta de prata como eletrodo de referência e auxiliar. Inicialmente, buscando a maior resposta eletroquímica empregando um sistema de dois eletrodos, foram conduzidos experimentos utilizando o ePAD_{gli} com diferentes diâmetros da região circular do eletrodo de referência (Fig. IV.5).

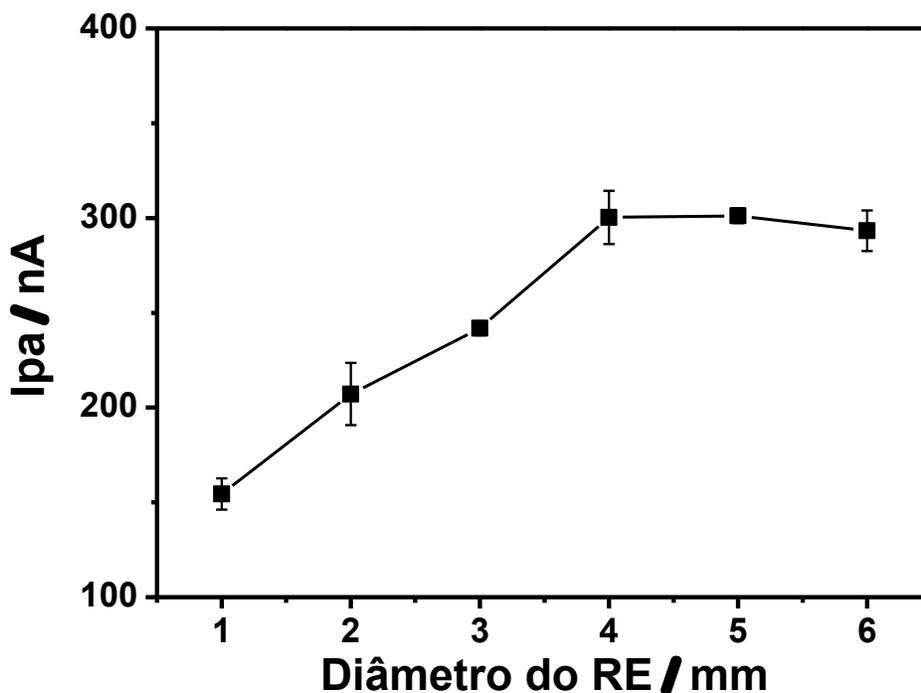


Figura IV.5. Gráfico de I_{pa} versus diâmetro do eletrodo de referência (RE). Condições: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 1 mmol L^{-1} + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser visualizado na Figura IV.5, a I_{pa} atinge um máximo de resposta para o eletrodo de referência com diâmetro de 4 mm e permanece constante para diâmetros superiores. Assim, o diâmetro de 4 mm foi selecionado para a fabricação do eletrodo de referência no papel. Em seguida, o desempenho do $ePAD_{gli}$ com o eletrodo de referência de 4 mm foi comparado com sistemas eletroquímicos convencionais utilizando dois e três eletrodos (Figura IV.6).

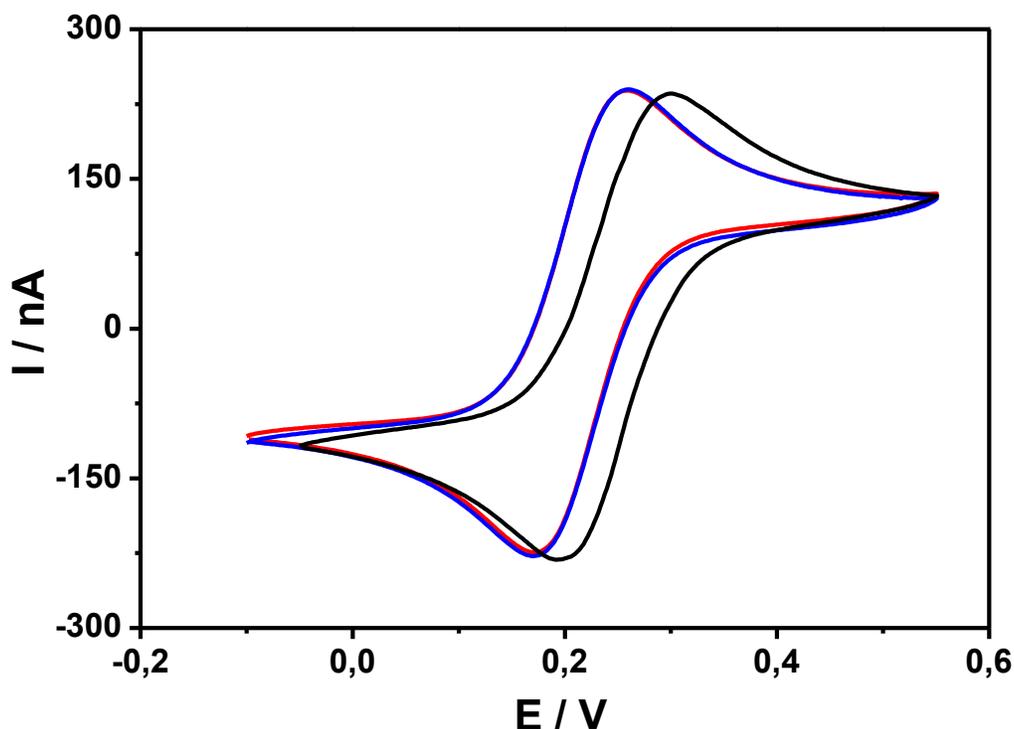


Figura IV.6. Voltamogramas cíclicos obtidos em $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ 1 mmol L^{-1} + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$. (—) Sistema eletroquímico usando três eletrodos. Sistema eletroquímico empregando dois eletrodos: (—) Ag/AgCl e grafite e (—) $ePAD_{gli}$ com tinta de prata ($d = 4 \text{ mm}$) e grafite.

Como pode ser observado na Figura IV.6, não há diferença nas correntes de pico anódica e catódica quando a resposta do $ePAD_{gli}$ é comparada com as medidas realizadas nos sistemas eletroquímicos com dois ou três eletrodos. Assim, de maneira geral, o $ePAD_{gli}$ com detecção eletroquímica é um dispositivo muito promissor no desenvolvimento de sensores simples, práticos e de baixo custo. Pode ser observado ainda na mesma Figura um deslocamento anódico de

40 mV do potencial formal E^0 ($E_{pa} + E_{pc} / 2$) em relação ao eletrodo de referência convencional.

O efeito da velocidade de varredura na resposta do ePAD_{gli} também foi verificado utilizando voltametria cíclica e a sonda redox $Fe(CN)_6^{4-/3-}$. As correntes de pico foram plotadas em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, assim como ilustrado na Fig. IV.7.

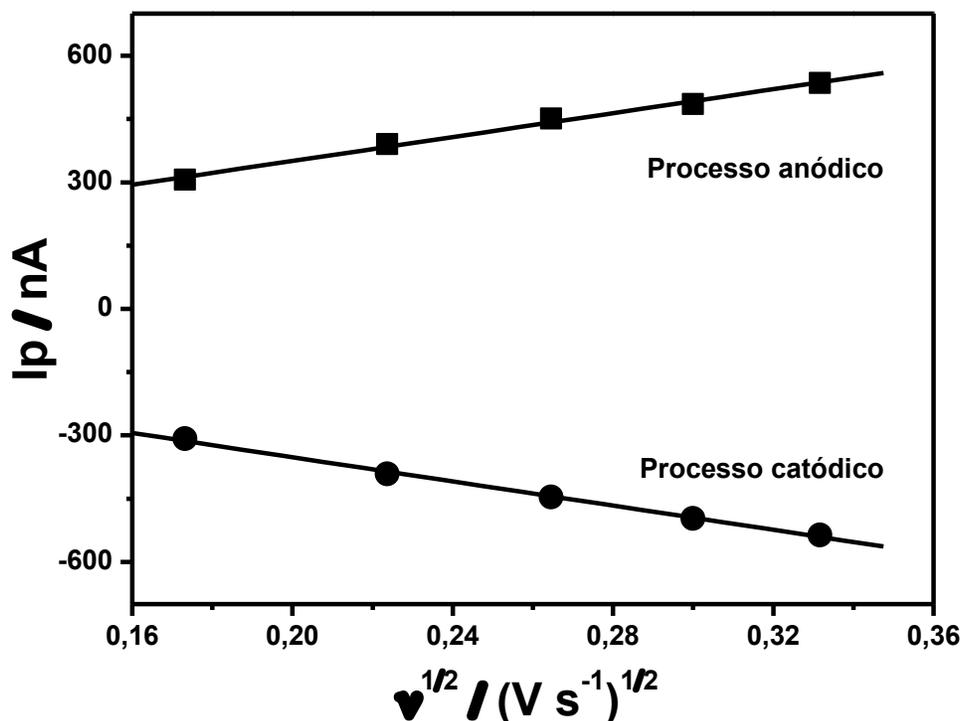


Figura IV.7. Gráfico de corrente de pico (I_p) versus raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). Condições: $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ 1 mmol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹ e $v = 30 - 110$ mV s⁻¹. Sistema de dois eletrodos (ePAD_{gli} com detecção eletroquímica).

Na Fig. IV.7 pode ser observado que para ambos os processos, anódico e catódico, foi observado um comportamento linear da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Esse tipo de comportamento indica que o processo é limitado pelo transporte de massa devido ao efeito da difusão. Utilizando a equação de Randles-Sevcik (Eq. IV.1) e os coeficientes angulares das retas ilustradas na Figura IV.7 foi calculado o coeficiente de difusão da sonda redox (Tabela IV.1).

Tabela IV.1. Comparação entre coeficientes de difusão do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ e coeficiente de difusão do Ferroceno-COOH.

Coeficientes de difusão / $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$			
Referências	Sonda redox	ePAD	Literatura
Este trabalho	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	$7,33 \pm 0,46^a$	7,63 [110]
Este trabalho	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	$7,61 \pm 0,28^a$	6,50 [110]
Nie <i>et al.</i> [49]	Ferroceno-COOH	$4,3^b$	5,7 [111]

^a Experimentos conduzidos usando 1 mmol L^{-1} da sonda redox em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

^b Experimentos conduzidos em 2 mmol L^{-1} da sonda redox (ácido ferrocenomonocarboxílico) em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Como pode ser observado na Tabela IV.1 os valores dos coeficientes de difusão obtidos pelo ePAD_{gli} proposto aqui são bem próximos dos valores encontrados na literatura. Empregando uma sonda redox diferente, *Nie et al.* também obtiveram um valor de coeficiente de difusão próximo do valor reportado na literatura [49]. Por outro lado, os mesmos autores relataram que o contato do eletrodo de carbono impresso com o papel cromatográfico resulta em uma diminuição de 30 % da resposta quando comparado com um sistema convencional. *Nie et al.* atribuíram essa diminuição sugerindo que 30 – 40 % do volume que deveria estar ocupado pela solução está sendo preenchido pelas fibras do papel [49]. Assim, o contato dos eletrodos com as fibras do papel ocasiona uma diminuição considerável na resposta do dispositivo. No entanto, no ePAD_{gli} proposto neste trabalho não há contato papel-eletrodo e, portanto, há uma ótima perspectiva na obtenção de menores limites de detecção. Essa perspectiva é fortalecida a partir do momento em que não há perda de resposta do eletrodo de grafite usando sistemas eletroquímicos com dois ou três eletrodos (Fig. IV.6 e comparação entre as Figs. IV.4 e IV.7). Assim, os tópicos a seguir serão destinados para discutir o efeito da concentração dos reagentes e das condições experimentais visando a maior resposta do ePAD_{gli}.

IV.2.5 Efeito da concentração da enzima glicose oxidase

O emprego de enzimas em sistemas analíticos visa principalmente o desenvolvimento de sistemas mais seletivos e com menores limites de detecção. Como prova de teste do funcionamento deste ePAD foi escolhida a enzima glicose oxidase devido a sua ampla utilização na construção de biossensores eletroquímicos, inclusive para a detecção de glicose em dispositivos do tipo POC [112]. A enzima glicose oxidase catalisa, na presença de oxigênio, a oxidação da glicose formando ácido glicônico e peróxido de hidrogênio [112]:



Inicialmente foi avaliada a concentração da enzima glicose oxidase na resposta do ePAD_{gli}. A Fig. IV.8 mostra os gráficos de corrente de pico anódica obtidos a partir de voltamogramas cíclicos em função da concentração (U mL^{-1}) da enzima.

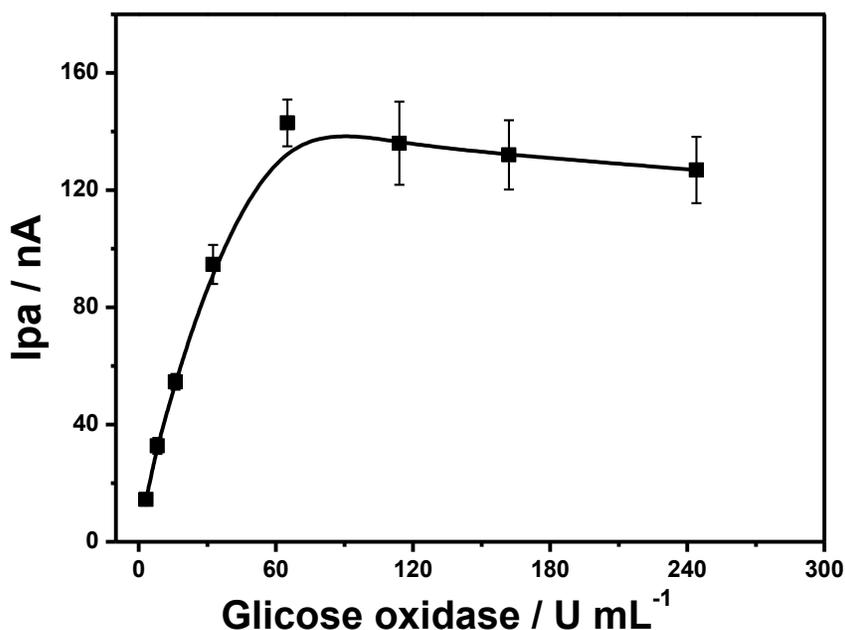


Figura IV.8. Gráfico da resposta do ePAD_{gli} (I_{pa}) em função da concentração da enzima GO. Condições: $[4\text{-APBA}] = 4 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo de reação = 3 min, $[\text{glicose}] = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ e PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4.

Assim como pode ser observado na Figura IV.8, a resposta do ePAD_{gli} atinge um valor máximo empregando 65 U mL⁻¹ da concentração da enzima GO e permanece praticamente constante para valores de concentração mais altos. Esse perfil de curva que tende a uma saturação é típico para sistemas enzimáticos [113,114]. Assim, visando o maior sinal analítico combinado com uma economia de reagentes, a concentração de 65 U mL⁻¹ foi selecionada.

IV.2.6 Concentração do mediador redox

Compostos contendo átomos de boro já têm sido amplamente estudados, principalmente na síntese de novos compostos orgânicos. Uma parte desses estudos envolve reações de oxidação com derivados do ácido borônico utilizando peróxido de hidrogênio. A oxidação em meio básico do ácido fenilborônico com peróxido de hidrogênio, por exemplo, resulta na formação de fenol e íons tetra-hidróxiborato [115]. De maneira similar, o 4-APBA é um mediador redox que reage com peróxido de hidrogênio liberado como produto da reação enzimática (Eq. IV.2) formando o 4-aminofenol que pode ser detectado na superfície do eletrodo [116]. A Fig. IV.9 mostra as reações envolvidas entre o peróxido de hidrogênio e mediador e a reação de oxidação do 4-aminofenol.

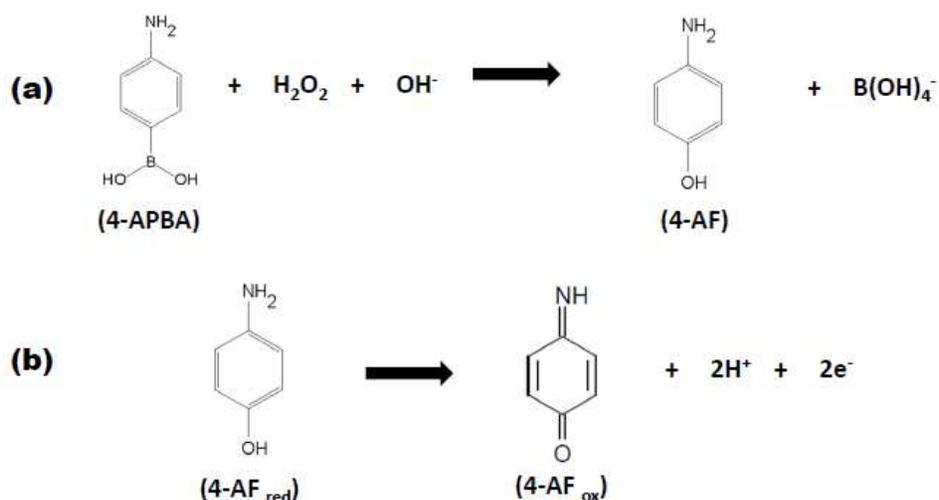


Figura IV.9. Reação entre o peróxido de hidrogênio e o mediador redox (a) e reação de oxidação do 4-aminofenol (4-AF) (b).

A Fig. IV.10(a) ilustra o voltamograma cíclico obtido empregando o ePADgli na presença e ausência de glicose. Conforme esperado, na ausência de glicose não foi observado nenhum processo redox. Já na presença de glicose o voltamograma cíclico apresenta dois picos na faixa de potencial estudado, onde os mesmos podem ser atribuídos a oxidação do 4-aminofenol na varredura direta e redução do produto de oxidação (p-benzoquinona-imina) na varredura reversa.

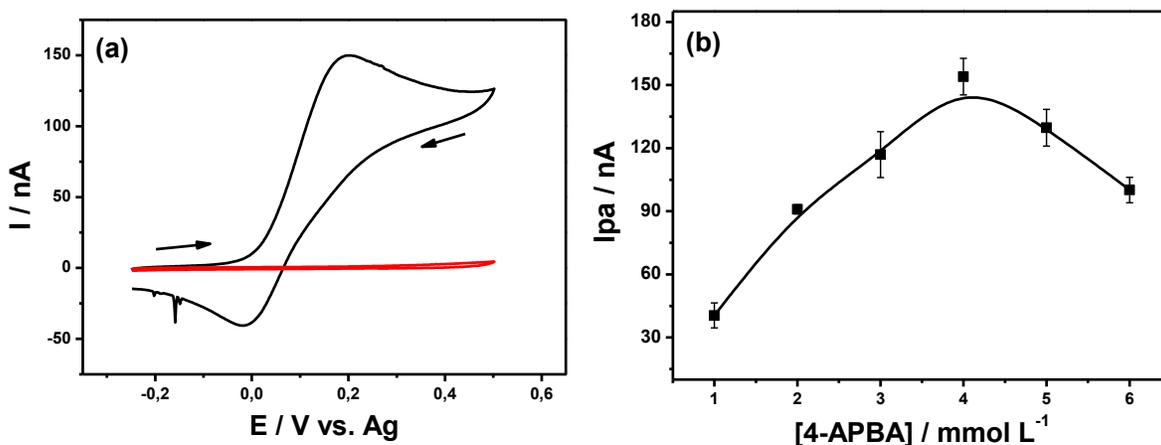


Figura IV.10. (a) Voltamograma cíclico obtido em PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4, [4-APBA] = 4 mmol L⁻¹, [GO] = 65 U mL⁻¹, tempo de reação = 3 min e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ na ausência (—) e na presença (—) de glicose 1 mmol L⁻¹. (b) Influência da concentração do mediador na resposta do dispositivo. As condições experimentais são as mesmas da Figura (a) com exceção para a concentração do mediador que foi variada entre 1 – 6 mmol L⁻¹.

A Fig. IV.10(b) mostra a dependência da corrente de pico anódica em função da concentração do mediador redox. A corrente de pico atinge um máximo para 4 mmol L⁻¹ de 4-APBA e decresce para concentrações superiores (Fig. III.10(b)). Essa diminuição de resposta pode estar associada ao excesso de mediador presente nas fibras do papel, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

IV.2.7 Tempo de reação

Como demonstrado nos tópicos IV.2.5 e 2.6, a resposta do ePAD_{gli} com detecção eletroquímica depende de uma série de reações, que incluem a formação de peróxido de hidrogênio e reação desta espécie com o mediador redox para formar o produto eletroativo (4-aminofenol). Com o intuito de buscar o maior sinal analítico do dispositivo, o tempo necessário para que essas reações aconteçam foi avaliado monitorando a corrente de pico anódica dos voltamogramas cíclicos (Fig. IV.11).

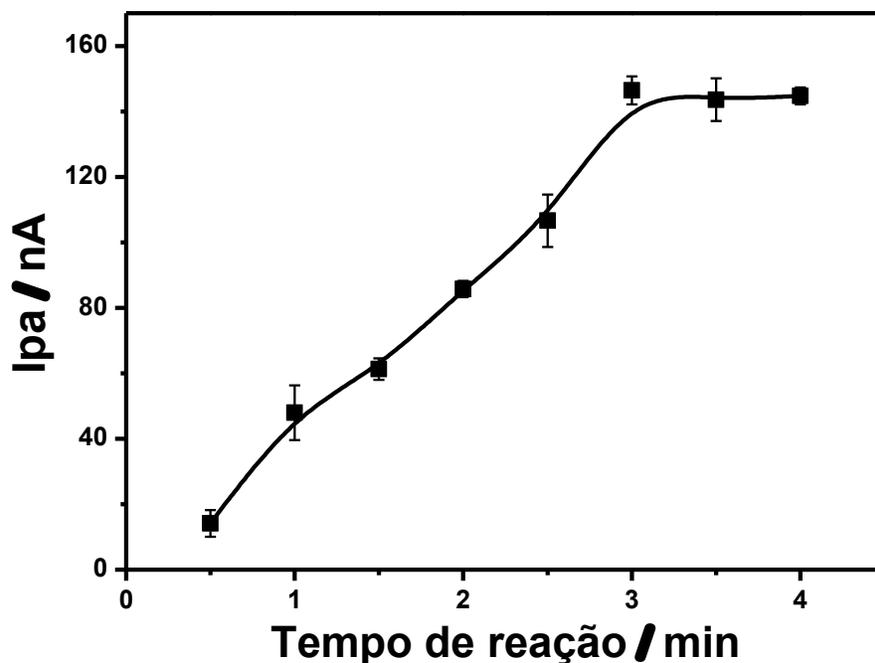


Figura IV.11. Gráfico de corrente de pico anódica em função do tempo da reação. Condições: PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4, [4-APBA] = 4 mmol L⁻¹, [GO] = 65 U mL⁻¹, glicose = 1 mmol L⁻¹ e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$.

Assim como pode ser observado na Fig. IV.11, a corrente de pico anódica aumenta até 3 minutos de reação e então o sinal permanece constante. Dessa forma, o tempo de reação de 3 minutos foi selecionado tendo em vista uma análise rápida.

IV.2.8 Influência do pH

Enzimas possuem um pH ótimo ou uma faixa de pH onde a sua atividade catalítica é máxima; para os demais valores de pH a atividade da enzima diminui [14]. A razão para esse comportamento está relacionado com a protonação ou desprotonação de grupos funcionais de moléculas que exercem uma função importante no sítio ativo da enzima [14]. Para investigar esse efeito foram conduzidos voltamogramas cíclicos empregando o ePAD_{gli}. A Fig. IV.12 ilustra os valores de corrente de pico anódica em função do pH.

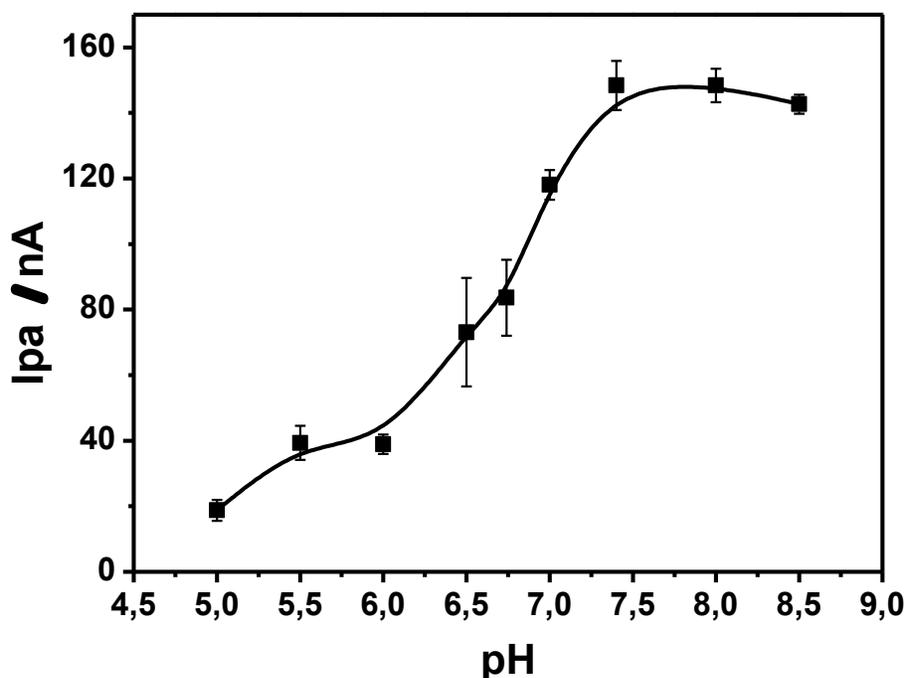


Figura IV.12. Influência do pH na resposta do ePAD_{gli}. Condições: [4-APBA] = 4 mmol L⁻¹, tempo de reação = 3 minutos, [GO] = 65 U mL⁻¹, glicose = 1 mmol L⁻¹ e v = 30 mV s⁻¹.

A Fig. IV.12 mostra que a resposta do ePAD_{gli} aumenta até pH 7,4 e então permanece praticamente constante para os demais valores de pH (8,0 e 8,5). Um ponto interessante a ser mencionado aqui é que o pH de maior resposta obtido difere bastante do pH ótimo da enzima glicose oxidase, cuja atividade catalítica máxima é em torno de pH 5,5 [117,118]. Por outro lado, a resposta do dispositivo não depende somente da atividade da enzima. Para que seja obtida a resposta

em potenciais menos positivos o peróxido de hidrogênio deve reagir com o mediador redox, e essa reação é favorecida com o aumento do pH, conforme demonstrado na Fig. IV.9(a). No entanto, a resposta do ePAD_{gli} não aumenta para valores de pH acima de 7,4 indicando, possivelmente, uma diminuição da atividade enzimática a medida que o pH se afasta do pH ótimo da enzima. Assim, a respeito do estudo de pH pode ser concluído que a maior resposta obtida pelo ePAD_{gli} é uma combinação de dois fatores, atividade enzimática e condição adequada para a reação entre o mediador e peróxido de hidrogênio.

IV.2.9 Concentração do eletrólito de suporte

Eletrólitos de suporte são necessários em experimentos eletroquímicos para diminuir a resistência da solução, minimizar os efeitos da migração e manter uma força iônica constante [85,106]. Assim, para investigar a influência da concentração do eletrólito de suporte, inicialmente foram obtidos voltamogramas cíclicos e as correntes de pico anódica desses voltamogramas foram plotadas em função da concentração do eletrólito de suporte Fig. IV.13.

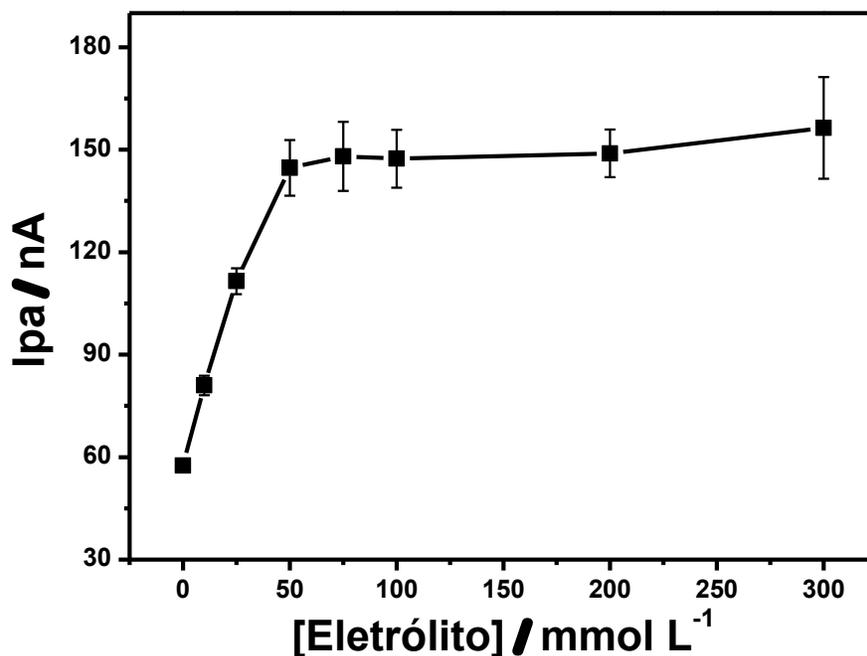


Figura IV.13. Gráfico de corrente de pico anódica em função da concentração do eletrólito de suporte. Eletrólito = PBS pH 7,4, [4-APBA] = 4 mmol L⁻¹, tempo de reação = 3 minutos, [GO] = 65 U mL⁻¹, glicose = 1 mmol L⁻¹ e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$.

Assim como pode ser visualizado na Fig. IV.13, a I_{pa} aumenta em função da concentração do eletrólito até 50 mmol L^{-1} e então permanece constante até 300 mmol L^{-1} . Outro aspecto interessante que chama a atenção na Fig. IV.13 é a resposta do dispositivo na ausência de eletrólito de suporte. O $ePAD_{gli}$ apresenta aproximadamente 40 % da resposta quando comparado com a resposta do dispositivo em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A Fig. IV.14 mostra a resposta do dispositivo na ausência e presença de 100 mmol L^{-1} de eletrólito de suporte.

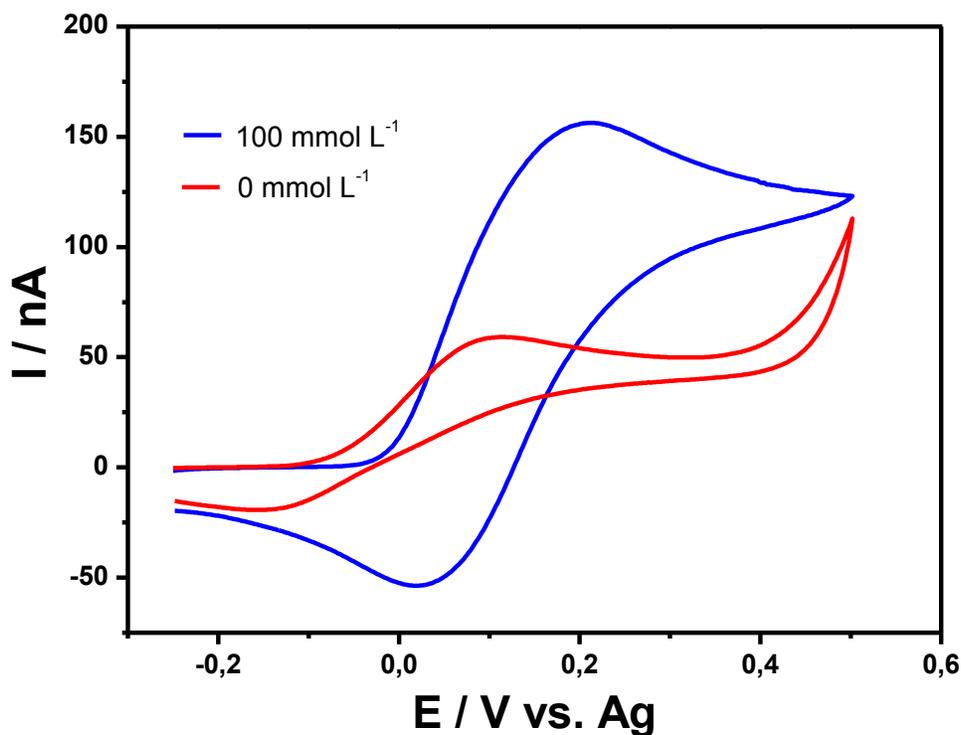


Figura IV.14. Voltamogramas cíclicos obtidos na presença e ausência de eletrólito de suporte (PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4). Condições: $[4\text{-APBA}] = 4 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo de reação = 3 minutos, $[\text{GO}] = 65 \text{ U mL}^{-1}$, glicose = 1 mmol L^{-1} e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$.

O voltamograma em vermelho ilustrado na Fig. IV.14 mostra uma resposta bem definida e sem ruído obtida na ausência de eletrólito de suporte. Tal comportamento não é uma surpresa. Em alguns casos, microeletrodos são explorados em meios de baixa condutividade [119]. A baixa magnitude de corrente medida nesses eletrodos faz com que o efeito da queda ôhmica (IR) seja minimizado e com isso voltamogramas cíclicos bem definidos podem ser obtidos

nesses meios [119]. Por outro lado, o menor valor de ΔE_p foi obtido empregando PBS 0,1 mol L⁻¹ e, portanto, esta concentração de eletrólito foi mantida nos estudos subsequentes.

IV.2.10 Efeito de potencial aplicado

Buscando uma aplicação amperométrica o efeito do potencial aplicado na resposta do dispositivo também foi avaliado. O potencial aplicado é um parâmetro muito importante no desenvolvimento de sensores amperométricos pois pode conferir seletividade ao sistema [48], minimizando a oxidação de possíveis espécies interferentes. A Figura IV.15 mostra o gráfico de corrente *versus* potencial aplicado empregando o ePAD_{gli} para a detecção de glicose.

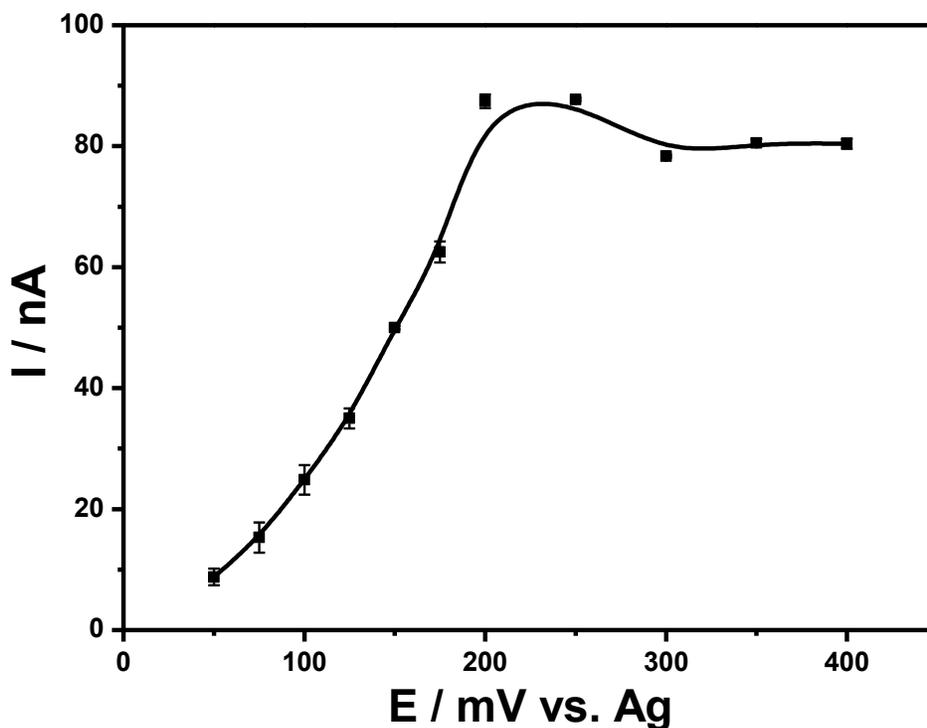


Figura IV.15. Efeito do potencial aplicado na resposta de corrente do μ PAD. Condições: PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4, [4-APBA] = 4 mmol L⁻¹, tempo de reação = 3 minutos, [GO] = 65 U mL⁻¹, glicose = 1 mmol L⁻¹ e $v = 30$ mV s⁻¹.

Na Fig. IV.15 pode ser observado que a corrente obtida nos experimentos cronoamperométricos aumenta em função do potencial aplicado até 200 mV *versus* Ag. Após 250 mV a corrente apresentou um leve decréscimo. Assim, buscando por um compromisso entre menor potencial aplicado e maior sinal analítico o valor de 200 mV vs. Ag foi selecionado para a construção da curva analítica.

IV.2.11 Curva analítica: cronoamperometria

Para a construção da curva analítica os parâmetros que apresentaram maior resposta foram selecionados. A Fig. IV.16 mostra os cronoamperogramas obtidos em diferentes concentrações de glicose.

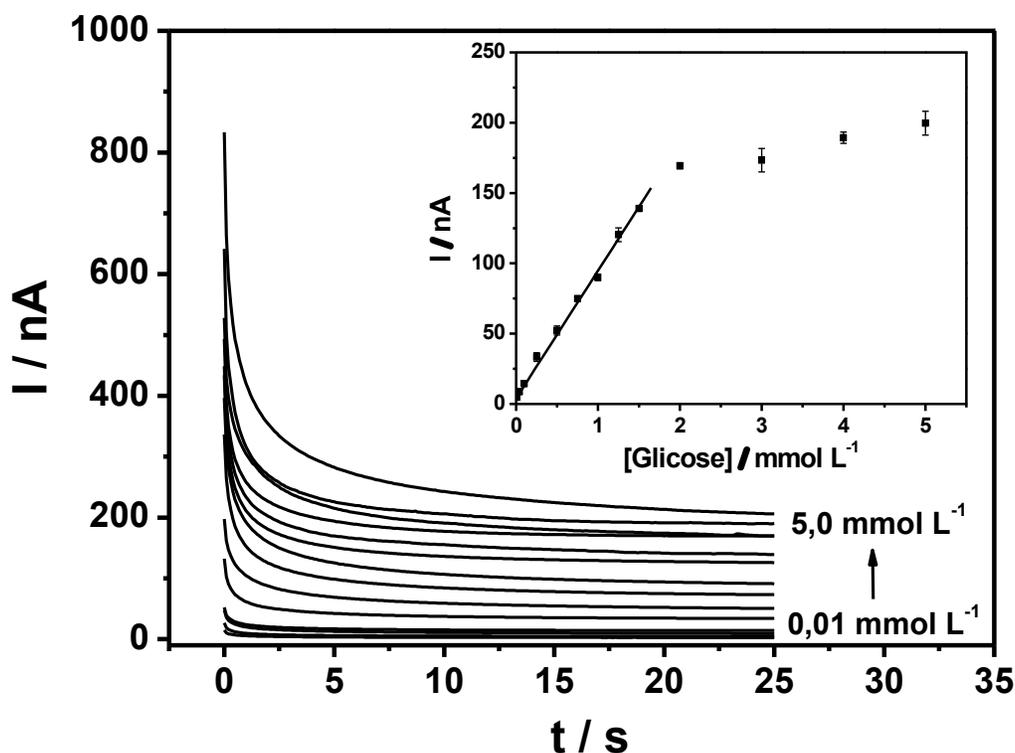


Figura IV.16. Cronoamperogramas obtidos em diferentes concentrações de glicose (0,01 até 5 mmol L^{-1}). Condições: PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,4, [4-APBA] = 4 mmol L^{-1} , tempo de reação = 3 minutos, [GO] = 65 U mL^{-1} , e Eapl. = 200 mV vs. Ag. Gráfico inserido: Curva analítica.

No gráfico inserido na Fig. IV.16, pode ser observado uma faixa linear de resposta de 0,01 até 1,5 mmol L⁻¹, podendo ser expressa com a seguinte equação:

$$\Delta I(nA) = 4,0(\pm 0,2) + 90,7(\pm 0,9)[D\text{-glicose}] \text{ (mmol L}^{-1}\text{)} \quad \text{Eq. IV.3}$$

com um coeficiente de correlação de 0,9989 (n = 3). O ePAD_{gli} apresentou limite de detecção e quantificação de 3,3 e 10 μmol L⁻¹ respectivamente, seguindo as recomendações da IUPAC [97]. A Tabela IV.2 mostra os parâmetros analíticos obtidos por alguns trabalhos encontrados na literatura para a determinação de glicose em ePADs.

Tabela IV.2. Comparação de parâmetros analíticos na detecção eletroquímica de glicose empregando dispositivos à base de papel.

Trabalho	Faixa linear / mmol L ⁻¹	L.D. / μmol L ⁻¹	R	Eapl. / mV vs. RE
Dungchai <i>et al.</i> [48]	0 – 100	210	0,994	0 vs. Ag
Nie <i>et al.</i> [49]	1 – 22,2	220	0,995	500 vs. C
Cui <i>et al.</i> [120]	1,5 – 9,7	–	0,994	700 vs. Ag
Nie <i>et al.</i> [51]	2,5 – 25,0	1443	0,993	–
ePAD _{gli}	0,01 – 1,5	3,3	0,999	200 vs. Ag

Assim como pode ser observado na Tabela IV.2, o trabalho proposto apresenta uma ampla faixa linear e o menor limite de detecção dentre os trabalhos selecionados. Além disso, com exceção do trabalho reportado por Dungchai *et al.* [48], o ePAD_{gli} desenvolvido aqui apresenta um dos menores potenciais aplicados para a detecção de glicose. Além destas características, o dispositivo apresentou um custo de R\$ 1,60.

IV.2.12 Estudo de interferentes

Quando se trata de determinações eletroquímicas em amostras de sangue ou de soro sanguíneo os maiores interferentes são o ácido ascórbico e o ácido úrico [121]. Visando estudar esse efeito foram obtidos voltamogramas cíclicos para verificar se os possíveis interferentes se oxidam no mesmo potencial do mediador redox (Fig. IV.17).

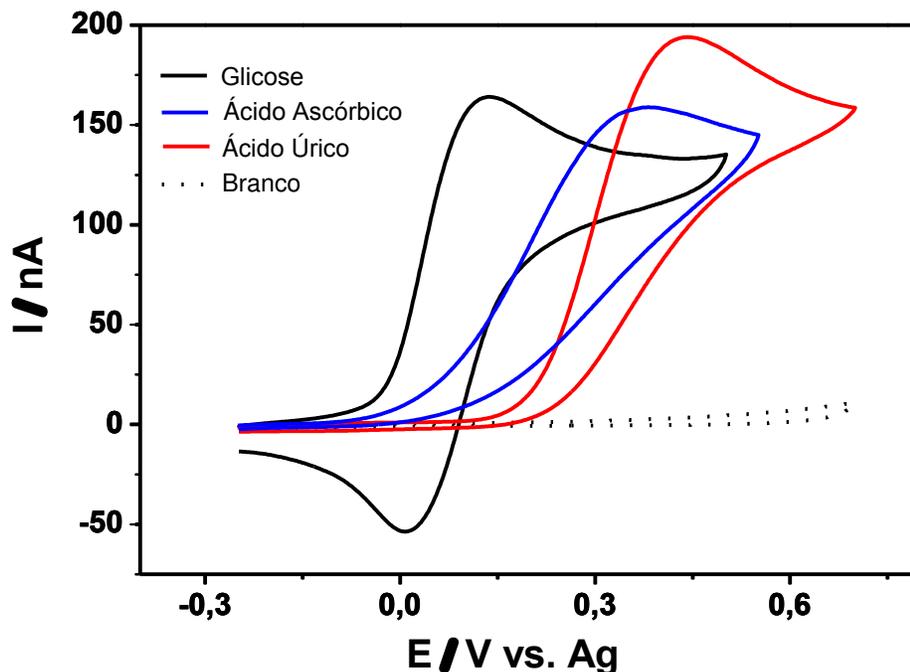


Figura IV.17. Voltamogramas cíclicos obtidos para o estudo de interferentes. Condições: PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4, [4-APBA] = 4 mmol L⁻¹, [glicose] = 1 mmol L⁻¹, tempo de reação = 3 minutos, [GO] = 65 U mL⁻¹, $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$. [interferentes] = 1 mmol L⁻¹.

Assim como pode ser observado na Fig. IV.17, o ácido úrico se oxida em potenciais mais positivos que o mediador redox. Por outro lado, o ácido ascórbico inicia o seu processo de oxidação em aproximadamente 0 V e é um possível interferente na detecção eletroquímica de glicose. Apesar disto, existe uma boa perspectiva, mas que não será abordada aqui, no sentido da modificação dos eletrodos de grafite ou da região de filtração para minimizar o efeito do ácido ascórbico como interferente.

IV.2.13 Estabilidade e repetibilidade

Os testes de estabilidade e repetibilidade do ePAD_{gli} foram verificados em PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 através de medidas de corrente por cronoamperometria, após a adição de uma solução de glucose 1,0 mmol L⁻¹. Quando os dispositivos foram armazenados a 2 – 8 ° C nenhuma alteração significativa na resposta foi observada em cinco dias. O dispositivo modificado apresentou boa repetibilidade na determinação de glucose. O desvio padrão relativo (DPR) para cinco determinações foi de 5,8%.

IV.2.14 Determinação de glicose nas amostras

Em base no conhecimento anterior em que o ácido ascórbico é um interferente nas amostras de sangue, foi preparada uma amostra de soro sanguíneo artificial para demonstrar o funcionamento do dispositivo [81]. Para a aplicação, as amostras de soro de sangue foram preparadas e enriquecidas com glicose em dois níveis, de 0,1 e 1,0 mmol L⁻¹. As amostras foram analisadas como descrito na seção experimental e os resultados obtidos utilizando o ePA_{gli} foram considerados satisfatórios, com um intervalo de recuperação entre 90,7–114%. É importante mencionar aqui que o tempo de análise usando o ePAD_{gli} com detecção eletroquímica é baixo. Uma amostra que contenha glicose pode ser analisada em menos de 5 minutos, incluindo a filtração, a reação enzimática e a etapa de detecção eletroquímica.

IV.3 Conclusões parciais e motivação para a próxima etapa

Neste tópico foram desenvolvidos dispositivos analíticos à base de papel para a detecção eletroquímica de glicose. Inicialmente foram criadas regiões circulares no papel com o auxílio de uma impressora à base de cera para estabelecer as regiões hidrofóbicas do dispositivo. As três regiões circulares construídas de maneira simples e rápida funcionam como etapas de filtração, reação enzimática e detecção eletroquímica.

A detecção eletroquímica foi realizada utilizando um sistema de dois eletrodos, sendo o eletrodo auxiliar e referência de prata e o grafite de lapiseira

como eletrodo de trabalho. Esse trabalho demonstrou pela primeira vez a utilização de eletrodos de grafite e sistemas eletroquímicos com dois eletrodos para ePADs. O dispositivo proposto aqui é fácil de ser construído e, além disso, somente uma etapa de “*screen-printing*” foi necessária para a construção dos eletrodos de referência e auxiliar. Empregando o grafite de lapiseira foram obtidas excelentes respostas eletroquímicas para a detecção de glicose. Assim, aliando rapidez a uma excelente resposta eletroquímica, o dispositivo proposto aqui é uma alternativa promissora para a detecção de H₂O₂ liberado por muitas outras enzimas oxidases.

Aproveitando os excelentes resultados obtidos com o grafite de lapiseira, a motivação para a próxima etapa do trabalho consistiu em utilizar materiais presentes no nosso dia-a-dia para deixar a construção dos eletrodos ainda mais simples. Outro ponto que será abordado é a utilização de códigos bidimensionais para facilitar a interpretação dos resultados. Ou seja, usuários não-treinados ou leigos vão poder ter acesso rápido às principais características do dispositivo e ainda interpretar os valores de corrente medidos pelo potenciostato usando um smartphone. Tudo isso sem perder portabilidade e baixo custo em uma análise simples e com sistema de filtração integrado para a determinação de substâncias de interesse ambiental.



**V. Dispositivo para determinação de
p-nitrofenol (ePAD_{QR})**

V.1 Apresentação

O mundo tem acompanhado nos últimos anos o uso de muitas moléculas orgânicas em áreas agrícolas, como inseticidas e pesticidas [122]. Muitas destas moléculas são extremamente tóxicas para os seres humanos e podem causar vários problemas à saúde [122,123]. Outra preocupação acerca da utilização de inseticidas está vinculado aos processos de biodegradação, que eventualmente podem ocorrer e formar outros produtos prejudiciais [123]. O p-nitrofenol (pNP) é exemplo para tal caso (Fig. V.1), pode ser encontrado nas águas residuais e de campos agrícolas devido à degradação de dois inseticidas altamente tóxicos, paration e metil-paration [124]. Os efeitos prejudiciais de pNP em seres humanos podem variar dependendo do tempo de exposição e incluem dores de cabeça, febre, problemas respiratórios e até mesmo a morte em níveis mais elevados de exposição [125]. Portanto, o monitoramento do pNP é muito importante e muitas técnicas analíticas foram descritas para detectar esta molécula [126-129]. Além do mais, existe uma necessidade crescente por dispositivos mais simples, descartáveis, que possam ser usados no campo para monitorar moléculas alvo em tempo real, sem aumentar os custos [15,130].

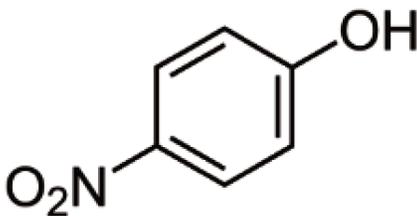


Figura V.1. Fórmula estrutural do p-nitrofenol.

V.2 Resultados e discussão

V.2.1 Layout do dispositivo

Para a construção dos dispositivos foram selecionados sistemas de dois eletrodos e códigos de informação para ajudar os usuários. Códigos bidimensionais foram escolhidos perante os códigos de barra devido à capacidade dos mesmos de guardar mais informações por unidade de área. A Fig. V.2 mostra uma comparação entre os códigos de informação.

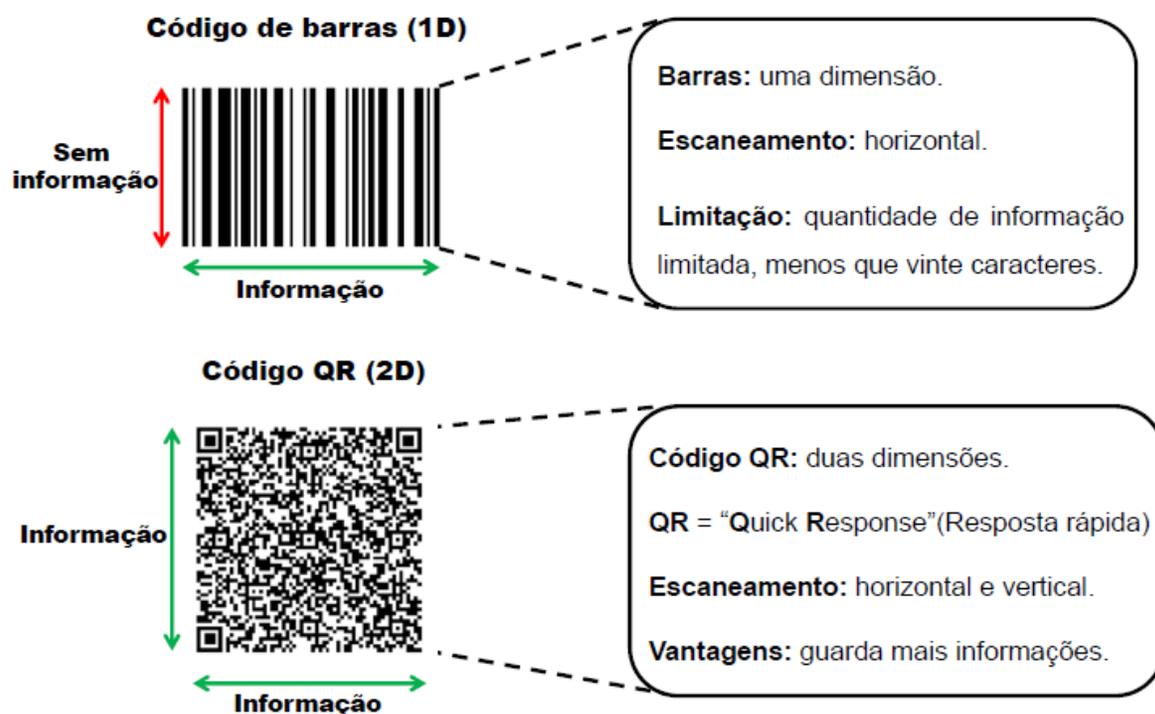


Figura V.2. Esquema ilustrando a comparação entre códigos de informação [131]. (Prezado leitor, baixe gratuitamente o leitor de código QR no seu smartphone, escaneie o código na Figura e acesse informações sobre a defesa de doutorado).

Uma vez selecionado o código de informação, torna-se necessário estabelecer o substrato no qual o código será impresso. Para a impressão do código QR e construção dos dispositivos foram utilizados papéis de impressão convencionais como substratos de baixo custo e de ampla disponibilidade. O tamanho do código QR foi selecionado para ter 25 mm² e uma região de 2 mm de

espaço livre ao redor do código (*quiet zone*). Esta distância deve ser obedecida com garantia de que o código vai ser facilmente lido por diferentes leitores de códigos QR [132]. O sistema RE/CE foi facilmente fabricado através de um processo de desenho com um lápis. Uma região circular de filtração foi criada no centro do código QR e alinhada com o sistema RE/CE por uma etapa de dobragem. Uma fita dupla face foi usada para anexar o eletrodo de grafite de lapiseira com as regiões internas do dispositivo. Esta etapa simples conecta os eletrodos sobre a plataforma à base de papel formando um dispositivo integrado e ao mesmo tempo mantém o WE próximo do sistema RE/CE. Uma fotografia do ePAD_{QR} pode ser visualizada na Fig. V.3.

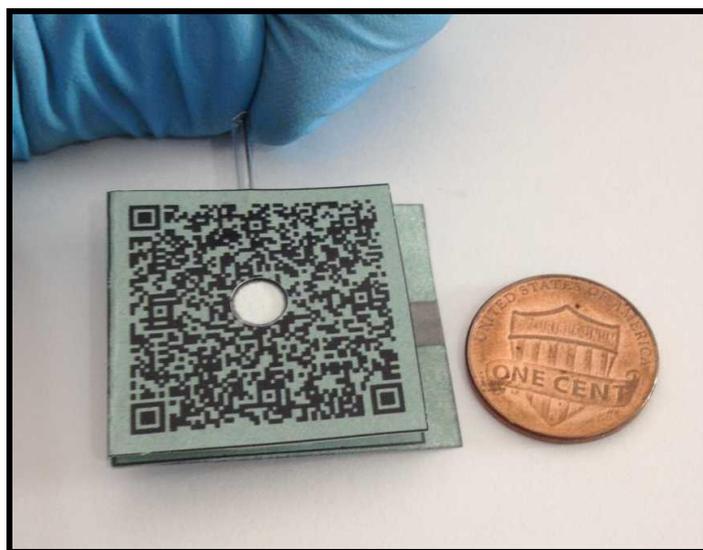


Figura V.3. Fotografia do dispositivo para detecção de p-nitrofenol (ePAD_{QR}).

V.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da plataforma de papel foi caracterizada antes e depois do processo de desenho com lápis. A Fig. V.4(a) ilustra uma micrografia do papel impresso com cera após o tratamento térmico. A imagem mostra uma estrutura fibrosa em que os poros do papel foram preenchidos por cera e outros reagentes. Normalmente, os papéis de impressão são modificados com produtos químicos ou aditivos para melhorar as propriedades superficiais para muitas aplicações [25].

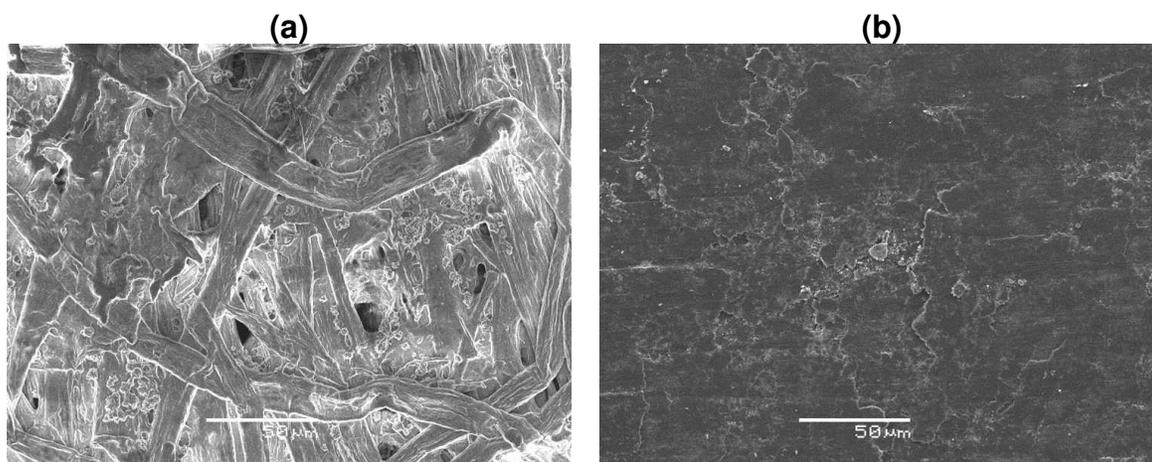


Figura V.4. Micrografias do papel antes (a) e após (b) o procedimento de desenho do lápis sobre o papel.

Após o procedimento de desenho com lápis, é possível observar uma alteração significativa na morfologia do papel (Fig. V.4(b)). A estrutura fibrosa do papel foi uniformemente recoberta por camadas de grafite oriundas do lápis de desenho. Além disso, pode ser observado na Fig. V.4(b) à formação de algumas placas que são características do processo mecânico no qual as folhas de grafite são transferidas para o substrato. Assim, o procedimento de desenho com lápis é uma abordagem muito interessante, simples e de baixo custo para a fabricação de trilhas condutoras uniformes e sem rachaduras em plataformas flexíveis baseadas em papel.

V.2.3 Caracterização eletroquímica

Os primeiros experimentos foram realizados empregando um sistema de dois e três eletrodos com intuito de comparar a resposta do ePAD_{QR} com sistemas eletroquímicos convencionais. A partir da Fig. V.5 pode ser observado que, independentemente de onde a medida é conduzida, seja em papel ou em uma célula eletroquímica convencional, as respostas de corrente são basicamente iguais considerando um desvio de 5 %.

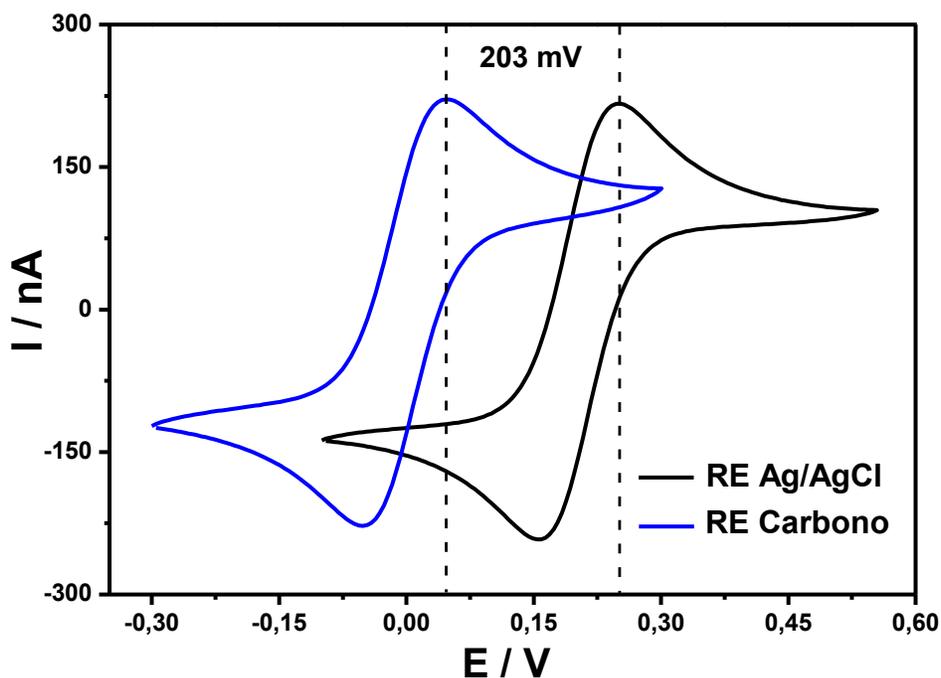


Figura V.5. Voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L⁻¹ e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$ usando um sistema eletroquímico convencional de três eletrodos (linha preta) e o ePAD_{QR} com dois eletrodos (linha azul).

A única diferença foi um deslocamento catódico de 203 mV em relação ao sistema eletroquímico convencional. Além disso, a resposta do ePAD_{QR} apresentou uma razão de pico normalizado de aproximadamente 1,0 e uma separação de picos (ΔE_p) de 96 mV. A separação dos picos foi maior do que o esperado para um processo eletroquímico reversível ($\Delta E_p \sim 60 \text{ mV}$ para um elétron) [85], mas é menor quando comparado com alguns eletrodos fabricados via *screen-printing* [105].

A oxidação eletroquímica de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de pNP empregando o ePAD_{QR} pode ser observada na Fig. V.6. O voltamograma cíclico para o primeiro ciclo de oxidação apresenta um pico bem definido em 0,9 V vs. carbono na varredura direta e nenhum pico de redução na varredura reversa.

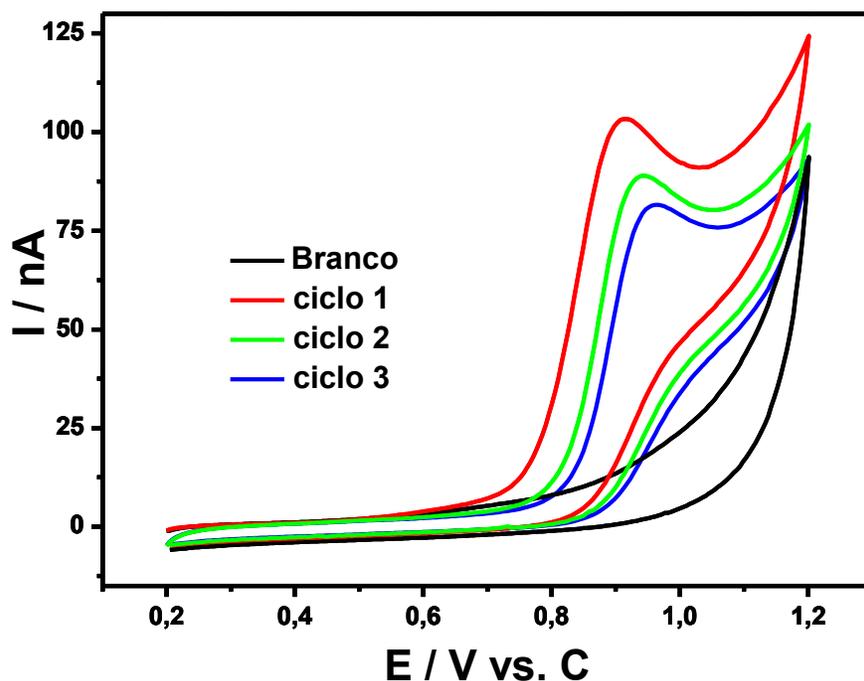


Figura V.6. Voltamogramas cíclicos obtidos a 30 mV s^{-1} na presença e ausência de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pNP em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 4,0.

A medida que o grafite de lapiseira é ciclado no dispositivo, a corrente de pico associada ao processo de oxidação diminui e os potenciais de pico se deslocam para potenciais mais positivos. Este resultado sugere que os produtos da reação eletroquímica do pNP são adsorvidos na superfície do WE, como recentemente demonstrado [134]. Visando um ePAD_{QR} com boa sensibilidade, o primeiro ciclo ou scan foi selecionado para medir todas as correntes de pico nos experimentos posteriores. Um ponto interessante é que o ePAD_{QR} é descartável, fazendo com que a adsorção do produto de oxidação não afete as medidas.

A influência da velocidade de varredura nos experimentos de voltametria cíclica foi também verificado na presença de pNP. A Fig. V.7(a) mostra os voltamogramas cíclicos para diferentes velocidades de varredura $10 - 50 \text{ mV s}^{-1}$.

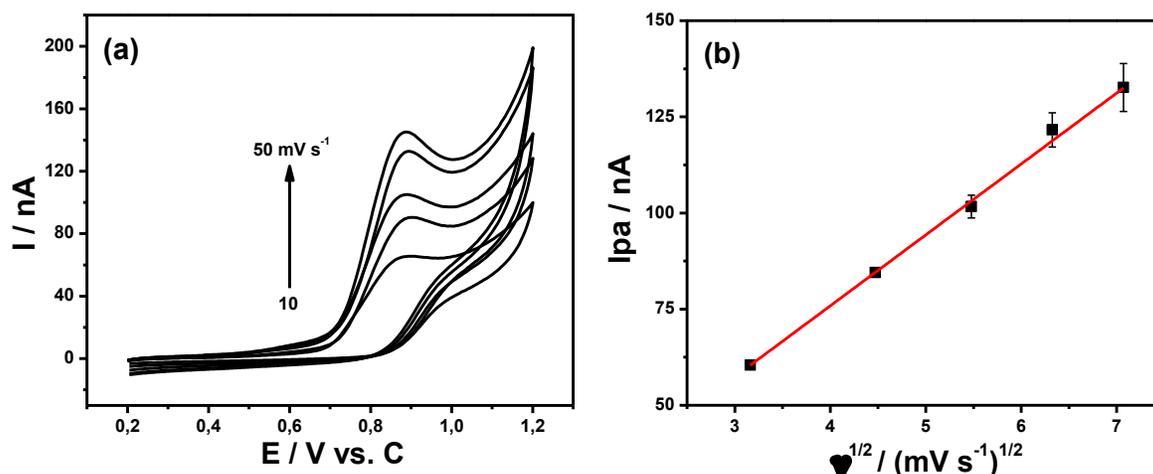


Figura V.7. (a) Voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes velocidades de varredura (10 até 50 mV s^{-1}) na presença de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de pNP em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} e pH 4,0. (b) Gráfico de corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

Assim como se pode ser observado na Fig. V.7(a), a corrente associada ao processo de oxidação eletroquímica aumenta em função da velocidade de varredura. Em seguida, as correntes de pico anódica foram plotadas em função da raiz quadrada da velocidade de varredura e uma correlação linear foi encontrada (Fig. V.7(b)), indicando que o processo é limitado pelo transporte de massa [85]. Além disso, o potencial de pico anódico não se desloca para potenciais mais positivos, indicando uma cinética rápida na superfície do eletrodo.

V.2.4 Efeito do pH e da concentração de eletrólito de suporte

O efeito do pH do eletrólito de suporte de 2,5 até 8,0 sobre a resposta do ePAD_{QR} foi avaliado medindo a corrente de pico nos voltamogramas cíclicos. Como se pode observar na Fig. V.8(a), as respostas para a oxidação eletroquímica do pNP diminuem com o aumento do pH da solução.

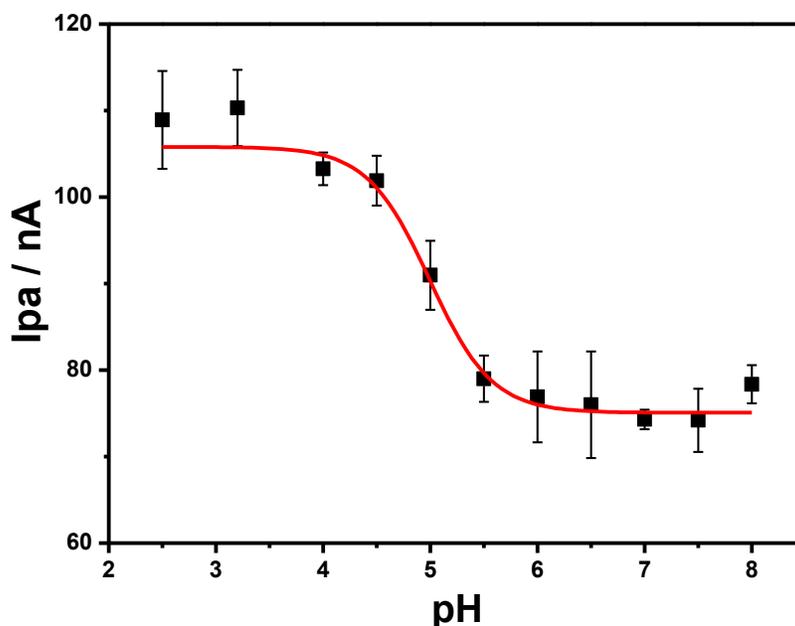


Figura V.8. Efeito do pH do eletrólito de suporte na resposta do ePAD_{QR}.

Assim, as respostas eletroquímicas de maior sinal foram obtidas na faixa de pH de 2,5 até 4,5 e as menores ao redor do pKa do pNP ($pK_a = 7,16$) [135]. A maior resposta observada em valores mais baixos de pH pode estar relacionada com a composição do eletrodo. Grafites de lapiseira são normalmente fabricados com uma mistura de um aglutinante (caolinita), solventes e pó de grafite [102]. A caolinita é um argilo-mineral que possui cargas negativas em sua estrutura e possivelmente deve estar repelindo eletrostaticamente a molécula de pNP em valores mais altos de pH, fazendo com que a resposta diminua.

Recentemente, foi demonstrado que os eletrodos de grafite de lapiseira podem ser usados para efetuar experimentos eletroquímicos em condições de baixa concentração de eletrólito de suporte [136]. A Figura V.9(a) mostra a influência da concentração do eletrólito de suporte na resposta do dispositivo.

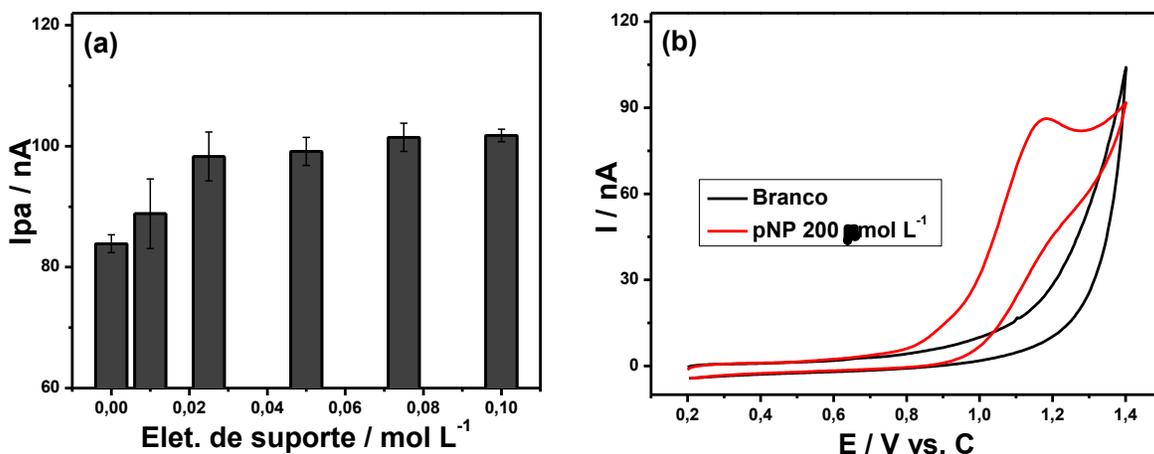


Figura V.9. (a) Gráfico de corrente de pico anódica em função da concentração do tampão acetato em pH 4,0 e (b) voltamogramas cíclicos obtidos na presença e ausência de pNP 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sem eletrólito de suporte. $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser observado na Fig. V.9(a), a resposta do ePAD_{QR} aumenta até 0,025 mol L⁻¹ e mantém-se constante para concentrações mais elevadas. Basicamente, as dimensões micrométricas do grafite de lapiseira minimizam os efeitos de queda ôhmica (queda IR) possibilitando obter voltamogramas mesmo na ausência de eletrólito de suporte. O ePAD_{QR} mantém mais de 80% da resposta máxima mesmo na ausência de eletrólito, no entanto, o pico de oxidação se desloca para potenciais mais positivos (Fig V.9(b)).

V.2.5 Voltametria de pulso diferencial (VPD)

A voltametria de pulso diferencial foi selecionada para a aplicação analítica do ePAD_{QR} em amostras de água. A VPD é uma técnica eletroquímica relativamente simples e pode ser acoplada com leitores eletroquímicos portáteis para análises no campo. De modo a estudar as condições de detecção de pNP o efeito da amplitude de potencial foi investigado de 10 a 200 mV (Fig. V.10).

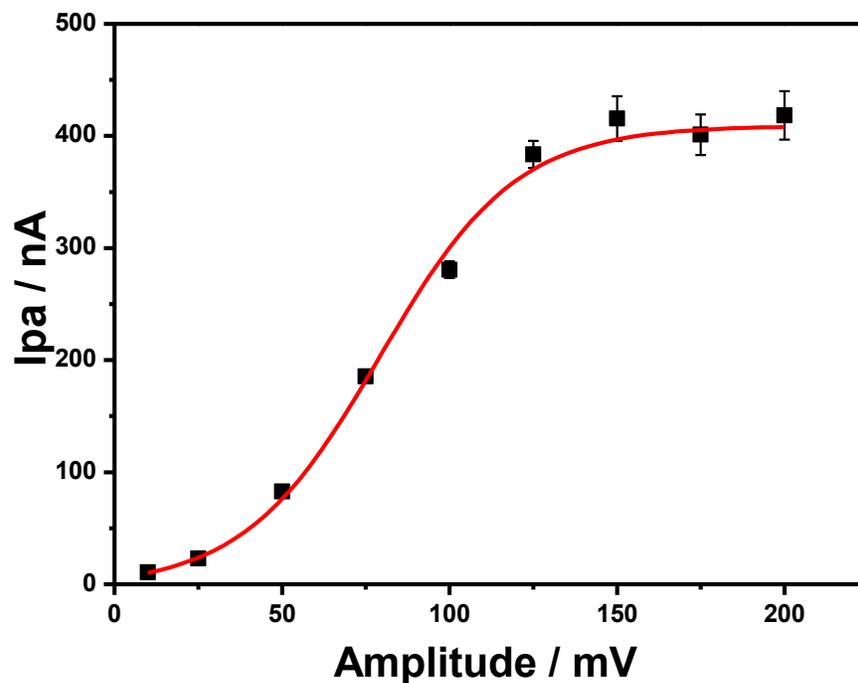


Figura V.10. Efeito da amplitude de potencial na resposta do dispositivo. Condições: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pNP e tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,0.

Assim como pode ser observado na Fig. V.10, a corrente de pico anódica aumenta até 125 mV e depois permanece constante até 200 mV. Sendo assim, a amplitude de 125 mV foi selecionada para a construção da curva analítica.

A curva analítica para a determinação pNP foi construída utilizando o ePAD_{QR} nas condições de maior resposta obtidas até o momento. A Fig. V.11(a) mostra os VPDs obtidos para diferentes concentrações de pNP.

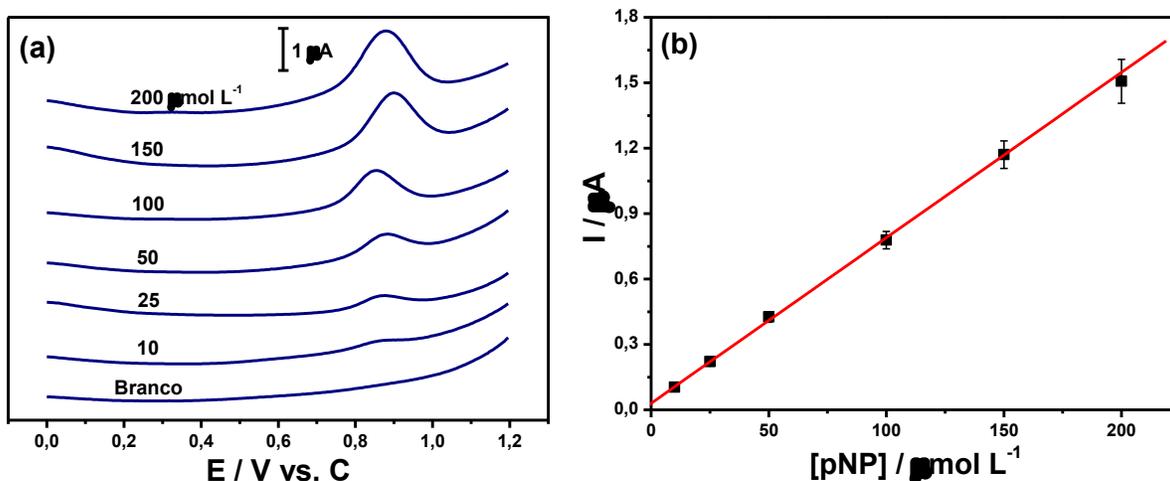


Figura V.11. (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em diferentes concentrações de pNP (10 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$), $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de 125 mV em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 4,0. (b) Curva analítica.

A curva analítica foi linear de 10 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. V.11(b)) e pode ser descrita pela seguinte equação:

$$I_{pa} \text{ (nA)} = 30,2 (\pm 3,6) + 7,6 (\pm 0,1) [\text{pNP}] \text{ (}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)} \quad \text{Eq. V.1}$$

com um coeficiente de correlação de 0,998. O limite de detecção (LD) de 1,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi calculado como sendo a concentração de pNP que apresentou uma relação sinal-ruído (S/R) de 3.

A concentração de pNP estabelecida para proteger a vida aquática em água doce e água salgada não deve exceder 4,0 e 0,86 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente [137]. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) estabeleceu a concentração desta classe de compostos como sendo de 72 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para proteger a saúde humana [138]. O código ePAD_{QR} apresenta um limite de detecção inferior aos valores acima relatados, exceto para a análise de amostras de água salgada em que o seu LD é mais elevado que o especificado, mas ainda

comparável. A Tabela V.1 apresenta alguns trabalhos que envolvem a determinação eletroquímica de pNP em diferentes amostras.

Tabela V.1. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos na determinação eletroquímica de pNP.

[Ref]	Tipo de eletrodo	Técnica	Faixa linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Sensibilidade / $\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1}$	L.D. / $\mu\text{mol L}^{-1}$
139	EPC/ <i>Moraxella</i> sp.	Amp.	–	1,9	0,02
140	GCE/hidroxiapatita	VPD	1 – 300	29,5	0,6
141	ITO/MIP	VPD	–	1500	1,0
142	Ti/TiO ₂ /Au/HRP-MB	Amp.	0,3 – 140	300	0,1
143	SPE/MWCNT	VPD	10 – 900	18,2	1,3
ePAD	Grafite	VPD	10 – 200	7,6	1,1

Legendas: EPC = eletrodo de pasta de carbono, GCE = eletrodo de carbono vítreo, ITO = óxido de índio dopado com estanho, MIP = polímero molecularmente impresso, HRP = enzima peroxidase, MB = azul de meldola, SPE/MWCNT = eletrodo impresso com nanotubos de carbono.

Assim como pode ser observado na Tabela V.1, a VPD é uma das técnicas eletroquímicas mais usadas para determinação de pNP e o dispositivo proposto apresenta limites de detecção semelhantes com as referências [141] e [143]. Fica claro a partir da Tabela V.1, que os eletrodos modificados, exceto para a referência [139], mostraram uma maior sensibilidade quando comparado com este trabalho. Por outro lado, baixo custo (R\$ = 0,80), fácil manuseio e fabricação simples são pontos importantes para ressaltar sobre o dispositivo proposto. O ePAD_{QR} apresentou também um limite de detecção suficiente para ser usado para verificar a qualidade de amostras de água [137,138].

V.2.6 Sistema de filtração

Amostras coletadas no campo podem ter partículas sólidas que podem entrar em contato com a superfície do eletrodo e levar a resultados não confiáveis. Assim, a filtração é um dos primeiros passos normalmente realizados por laboratórios de análise quando amostras provenientes de matrizes ambientais são analisadas. Para combinar a etapa de filtração juntamente com o código QR um pedaço de papel cromatográfico foi incorporado ao dispositivo.

O tamanho do círculo no código QR é o único fator que pode dificultar o processo de decodificação. Observou-se que para círculos de até 6 mm de diâmetro, não há nenhuma complicação na leitura do código. Assim, a contribuição do diâmetro do círculo hidrofílico no volume filtrado foi estudado. A Fig. V.12 mostra o gráfico do volume filtrado (face posterior) *versus* tempo de filtração.

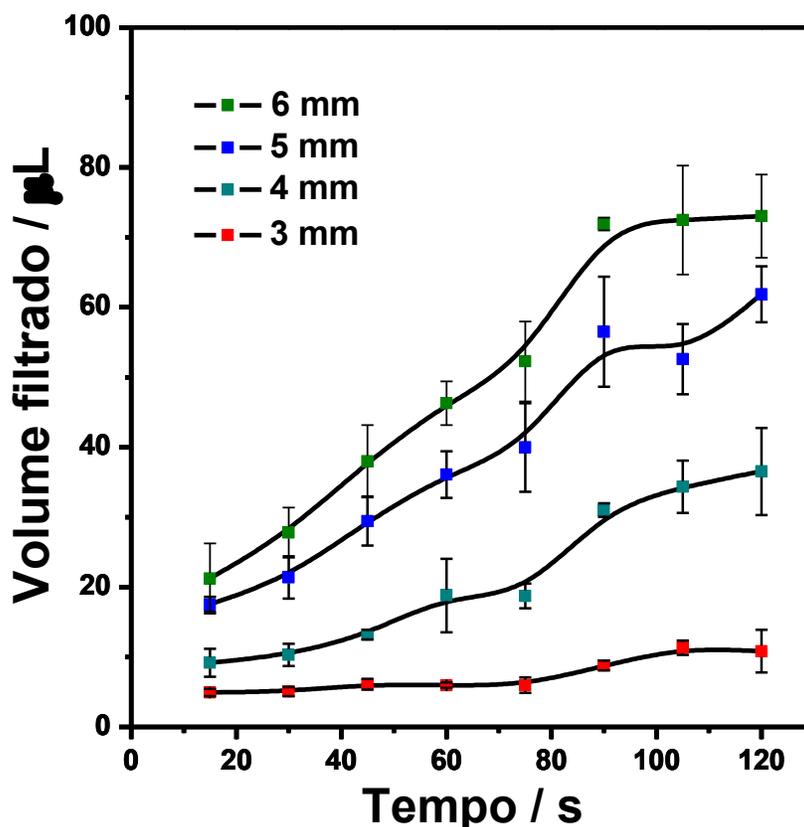


Figura V.12. Gráfico de volume coletado ou filtrado em função do tempo. Volume adicionado = 100 µL.

Como pode ser observado na Fig. V.12, para um diâmetro fixo, o volume filtrado aumenta em função do tempo até atingir um patamar. Para obtenção de dispositivos com respostas mais rápidas, o tempo de filtração também pode ser reduzido, aumentando o diâmetro da zona de filtração. Aqui, uma zona de filtração de 5 mm e 40 s para o tempo de filtração (volume de $\sim 25 \mu\text{L}$) foram selecionados para os demais experimentos.

V.2.7 Análise das amostras de água

Foram selecionadas amostras de água de torneira de três locais diferentes da cidade de Campinas-SP. As amostras foram fortificadas com pNP e o ePAD_{QR} foi utilizado para medir os níveis de pNP dessas amostras. Nós incluímos algumas informações no código para ajudar o analista a fazer a análise, incluindo: o tipo de grafite, volume da amostra, tempo de filtração, curva analítica, níveis de concentração definidos pela EPA e mais (Fig. V.13). Para ter acesso as informações contidas no código basta abrir o leitor de código QR no smartphone e posicionar o celular sobre o código. A Fig. V.13 mostra a informações que aparecem na tela do celular após a leitura do código inserido no ePAD_{QR}.

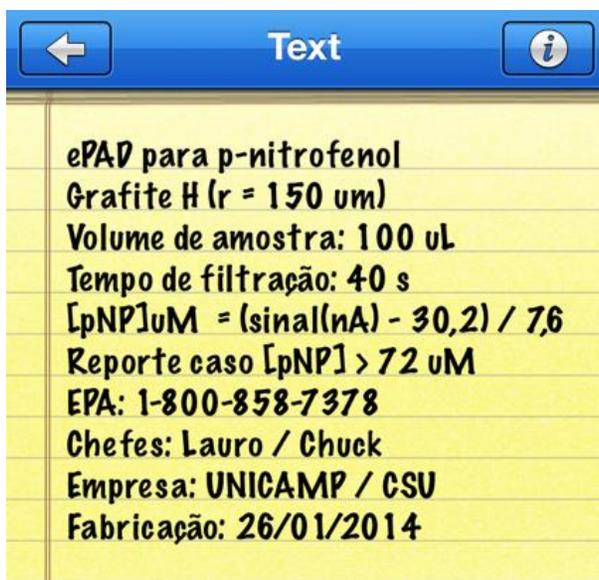


Figura V.13. Foto da tela do celular após a leitura do código QR contido na face superior do ePAD_{QR}. As concentrações foram inseridas no código em unidades de micromolar (μM) somente para facilitar a digitação.

Assim como pode ser observado na Fig. V.13, várias informações podem ser incluídas para tornar a análise e obtenção dos resultados mais simples. Usuários não-treinados não estão interessados em valores de corrente, mas sim o que aquele valor representa. Ou seja, qual a concentração da espécie de interesse que originou aquela medida. Para ajudar neste ponto, nós incluímos na quinta linha a curva analítica da determinação de pNP. Basicamente é a Eq. V.1 isolando a concentração de pNP. Desta forma, o usuário só necessita fazer duas operações muito simples para chegar ao resultado, subtração e divisão. Esse cálculo pode ser facilmente conduzido com a própria calculadora do celular. A concentração de pNP na amostra pode ser obtida em menos de 3 minutos utilizando o dispositivo proposto combinado com o leitor de código QR do iPhone.

Outro fator importante é fornecer informações sobre o analito de interesse. Afinal, o valor de concentração encontrado representa algum risco? Para ajudar nessa questão nós incluímos o valor da concentração limite para que não haja risco para a saúde humana e adicionamos um número de telefone caso o valor encontrado for maior do que o valor crítico. Outra vantagem dos smartphones é que muitos deles já possuem um sistema de GPS integrado, o que facilita a montagem de um mapa de concentração para análises no campo.

Por fim, os resultados da análise das amostras de água podem ser observados na Tabela V.2. Os níveis de recuperação das três amostras fortificadas variaram entre 91,8 – 108,2%, indicando a ausência de efeito de matriz nos resultados.

Tabela V.2. Determinação de pNP nas amostras de água.

Amostras	[pNP] encontrado / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperação / %
1*	41,3 ($\pm 1,5$)	98,9 – 106,2
2*	41,5 ($\pm 2,8$)	95,5 – 108,2
3*	38,7 ($\pm 2,5$)	91,8 – 103,8

* As amostras foram fortificadas com $40 \mu\text{mol L}^{-1}$.

V.2.8 Repetibilidade do ePAD_{QR}

O ePAD_{QR} é descartável, assim como muitos outros dispositivos do tipo *point-of-care* ou *point-of-need*, e uma das principais preocupações é que o dispositivo deve apresentar um baixo coeficiente de variação. Assim, foram preparados e testados oito dispositivos diferentes e um valor de 6,3% para o coeficiente de variação (CV) foi encontrado medindo a corrente associada ao processo de oxidação de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pNP. O valor obtido é aceitável, considerando que o processo de construção é muito simples e feito manualmente.

V.3 Conclusões parciais e motivação para a próxima etapa

A construção, caracterização eletroquímica e aplicação de um dispositivo 3D à base de papel com detecção eletroquímica foi apresentado aqui neste tópico. A célula eletroquímica à base de papel empregando eletrodos de grafite de lapiseira (dureza H) como eletrodos de trabalho oferece excelentes sinais eletroquímicos, ΔE_p de 96 mV e respostas eletroquímicas reversíveis para a sonda redox estudada aqui. O formato 3D permite a integração com grafite H de forma simples e o acoplamento de uma camada de filtração contendo instruções para o analista. Além disso, os materiais para a construção deste dispositivo podem ser encontrados em praticamente qualquer livraria ou loja de material de escritório e incluem papel, fita adesiva, grafite e lápis. Neste exemplo, o ePAD_{QR} apresentou um limite de detecção de $1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o p-nitrofenol, e foi utilizado para a determinação desta substância em amostras de água. O layout 3D

proposto permite uma filtragem livre de bombas de vácuo, detecção eletroquímica e análise/interpretação dos resultados em menos de 3 minutos. Acreditamos que layouts 3D para dispositivos analíticos à base de papel com detecção eletroquímica serão usados em muitas aplicações analíticas uma vez que a etapa de dobragem é muito simples. Possivelmente, este tipo de abordagem irá abrir muitas possibilidades, inclusive com o acoplamento de diferentes métodos de detecção.

Os excelentes resultados obtidos com eletrodos de grafite nos motivaram a mergulhar ainda mais na busca por eletrodos de carbono com dimensões reduzidas. Outra vertente que será explorada é a modificação dos eletrodos de carbono visando propriedades eletrocatalíticas. Sendo assim, o próximo tópico abordará a construção e caracterização eletroquímica de microeletrodos para ePADs. Seguindo a mesma linha de baixo custo, os dispositivos serão fabricados usando substratos simples.



VI. Microeletrodos de pasta de carbono (ePAD_μ)

VI.1 Apresentação

Microeletrodos têm muitas propriedades atrativas voltadas para a química eletroanalítica, incluindo: (i) a queda ohmica (IR) é minimizada por causa das pequenas correntes medidas [106,144], (ii) um rápido tempo de resposta é obtido devido a baixa capacitância da dupla camada elétrica [145], (iii) aumento da velocidade de transferência de massa das espécies eletroativas para a superfície do eletrodo devido à difusão radial [85,106,144] e (iv) a relação entre as correntes faradaica e capacitiva (I_f/I_c) é aumentada devido a área ser substancialmente menor nos microeletrodos [106]. Além disso, o tamanho reduzido dos eletrodos permite que experimentos eletroquímicos sejam realizados em ambientes microscópicos e com volumes de solução reduzidos [144,145].

Microeletrodos têm sido construídos a partir de uma variedade de materiais como ouro, platina e carbono [146]. Dentre estes, o carbono é um material eletródico muito interessante devido à sua ampla janela de potencial, baixo custo e possibilidade de modificação química. Estas propriedades também fazem do carbono uma excelente escolha para a fabricação de ePADs [48,49]. Microeletrodos de pasta de carbono são particularmente interessantes para aplicações de baixo custo visto que podem ser facilmente modificados através da mistura de agentes catalisadores na pasta antes da fabricação do eletrodo [147]. Além do mais, a pasta de carbono é atóxica e pode ser facilmente manipulada, facilitando a construção de um arranjo de microeletrodos.

Neste tópico serão apresentados os resultados referentes à construção e caracterização eletroquímica de microeletrodos para a detecção electrocatalítica de cisteína. (Fig. VI.1). A cisteína (Cys) foi escolhida por ser uma das moléculas mais simples que apresenta o grupo tiol em sua estrutura.

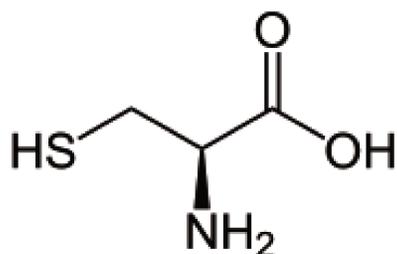


Figura VI.1. Fórmula estrutural da cisteína.

VI.2 Resultados e discussão

VI.2.1 Layout e funcionamento do dispositivo

Foi projetado um sistema de dois eletrodos para o desenvolvimento deste trabalho inserindo folhas de transparência entre trilhas condutoras de prata. Folhas de transparência são excelentes materiais a serem acoplados com ePADs uma vez que são fáceis de usar, flexíveis, podem ser cortadas e têm um baixo custo. Assim, foram desenhados círculos a serem cortados na transparência através de um sistema de gravação a laser. O processo de corte é de baixo custo (R\$ 0,30 por hora de uso do laser) e rápido, cada furo pode ser cortado em 1-2 segundos, o que permite a produção em massa do substrato a ser usado na construção do eletrodo de trabalho. Para a fabricação do microeletrodo de trabalho, a pasta de carbono foi selecionada para preencher os microfuros criados na folha de transparência. Trilhas condutivas de prata foram estabelecidas na folha de papel para a fabricação dos contatos elétricos e do RE/CE. O sistema RE/CE foi desenhado sob a forma de um anel para facilitar a introdução de amostras no centro do dispositivo (Fig. VI.2). Além disso, o RE/CE foi estabelecido para ser maior do que o eletrodo de trabalho, a fim de permitir um fluxo de corrente ilimitada entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo.

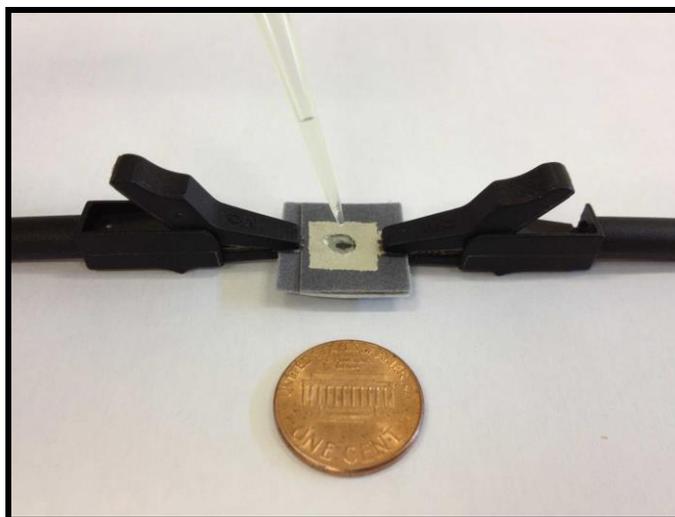


Figura VI.2. Foto do ePAD_μ (sistema de dois eletrodos).

VI.2.2 Caracterização eletroquímica

Assim como pode ser visto na Fig. VI.3, os eletrodos que foram desenhados inicialmente para ter uma forma circular de 50 μm de diâmetro, apresentam uma forma elíptica após o processo de corte a laser. Uma das razões para esse efeito pode estar relacionada à fusão do plástico devido ao contato do laser com a folha de transparência. Esse efeito também pode ter originado a região de alto relevo observado em torno da região de trabalho do eletrodo. Portanto, os ensaios de caracterização foram conduzidos com microeletrodos de forma elíptica.

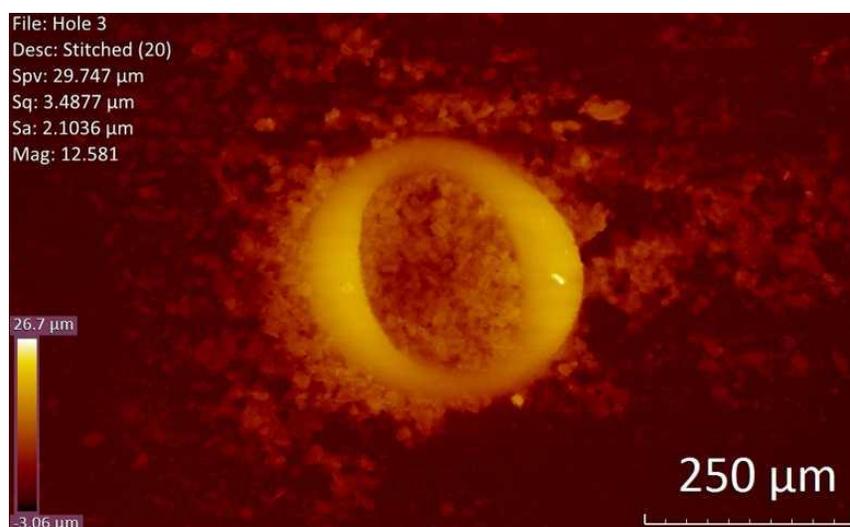


Figura VI.3. Imagem do microeletrodo de trabalho obtida pelo perfilômetro óptico.

Microeletrodos são geralmente reconhecidos pelo formato sigmoidal característico das curvas I vs. E que se origina devido ao processo de transferência de massa que é peculiar nestes sistemas [85]. Assim, a fim de fazer uma caracterização eletroquímica dos ePAD $_{\mu}$, a técnica de voltametria de varredura linear e a sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ foram utilizadas para tal propósito. A Fig. VI.4 mostra um voltamograma bem definido, com uma forma sigmoidal típica para um microeletrodo.

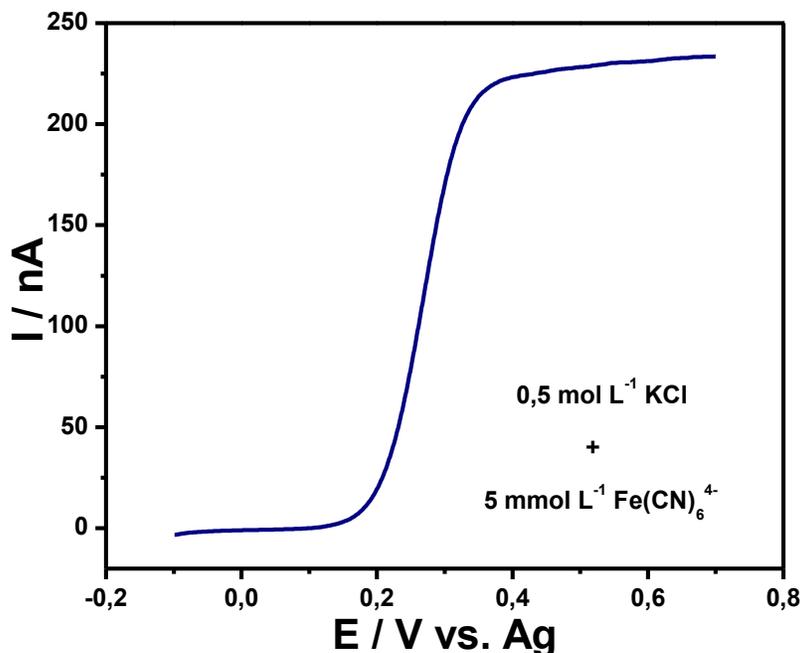


Figura VI.4. Voltamograma de varredura linear empregando o ePAD_{μ2} e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

A corrente de difusão de microeletrodos de forma elíptica foi descrito por Bruckenstein e Janiszewska [148], onde a corrente limite elíptica ($I_{el,lim}$) para a oxidação de espécies eletroativas denominadas A pode ser definida como:

$$I_{el,lim} = 2\pi n F D_A C_A^b a / K \left([1 - b^2 a^{-2}]^{1/2} \right), \quad a \geq b \quad \text{Eq. VI.1}$$

onde a e b representam o maior e menor semieixo da elipse respectivamente, n é o número de elétrons transferidos, F a constante de Faraday, D é o coeficiente de difusão da espécie A ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), C_A é a concentração da espécie eletroativa A (mol cm^{-3}) e K é a integral elíptica completa de primeiro tipo. Ao resolver K , a corrente limite elíptica pode ser obtida [148] e os microeletrodos de baixo custo do ePAD_μ podem ser caracterizados.

Para a caracterização dos microeletrodos, discos elípticos de diferentes tamanhos foram construídos e as correntes limites obtidas foram comparadas com valores teóricos, Tabela VI.1.

Tabela VI.1. Valores experimentais e teóricos referentes à caracterização dos microeletrodos.

Desenho ¹ d / μm	Observado ² d / μm	$I_{el,lim}$ / nA (teórico)	$I_{el,lim}$ / nA (experimental)	Erro relativo / %
25	a = 190 ± 25 b = 137 ± 13	178 ± 18	145 ± 25	18
50	a = 246 ± 1 b = 189 ± 4	239 ± 3	229 ± 7	4
75	a = 247 ± 20 b = $208 \pm 7,0$	253 ± 8	264 ± 2	4
100	a = 280 ± 23 b = $225 \pm 2,1$	279 ± 8	276 ± 5	1

¹Formato circular. ²Formato elíptico (a e b representam o maior e menor semieixo, respectivamente). n = 3 para experimentos teóricos e experimentais.

Os semieixos dos microeletrodos de trabalho foram calculados empregando um perfilômetro óptico. Como pode ser observado na Tabela VI.1, o erro relativo para a correlação entre os valores teóricos e experimentais é inferior a 5,0 % para os microeletrodos que foram inicialmente desenhados na faixa de 50 – 100 μm de diâmetro. Uma possível explicação para o maior erro relativo observado para o tamanho de 25 μm refere-se basicamente à inconsistência do corte do sistema de gravação a laser quando dimensões dessa magnitude são selecionadas. Assim, os menores microeletrodos que podem ser fabricados com uma boa repetibilidade são os eletrodos que foram estabelecidos com um tamanho inicial de 50 μm .

VI.2.3 Atividade eletrocatalítica do ePAD _{μ}

A atividade eletrocatalítica do ePAD _{μ} 2 foi investigada inicialmente por voltametria cíclica na presença e ausência de Cys. O processo associado com a oxidação eletroquímica de Cys é ilustrado na Fig. VI.5 por voltametria cíclica usando 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cys em tampão acetato 0,5 mol L⁻¹ pH 4,0.

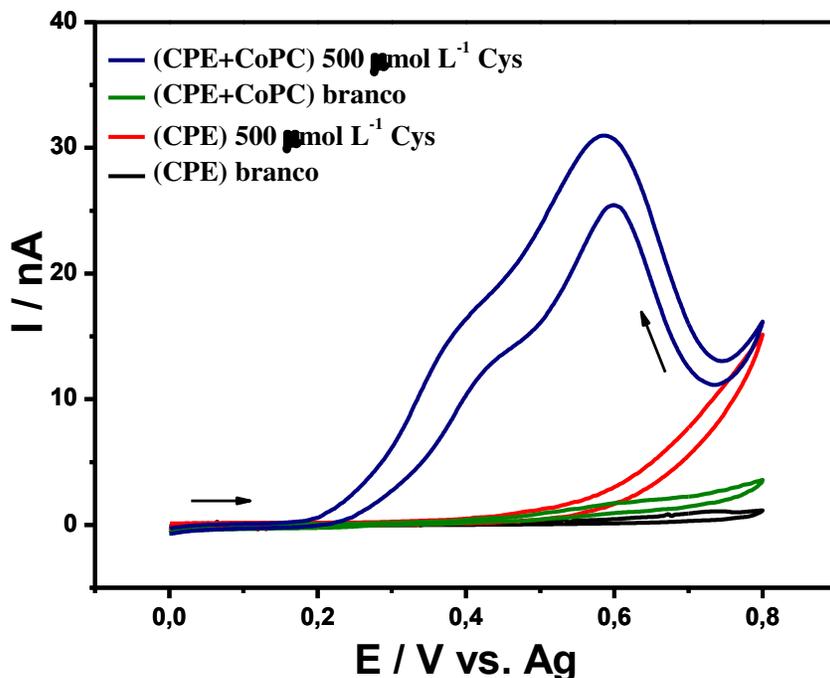


Figura VI.5. Voltamogramas cíclicos obtidos a 5 mV s^{-1} usando o $\text{ePAD}_{\mu 2}$ modificado (CPE+CoPC) e não modificado (CPE) na presença e ausência do analito em solução tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 4.0.

Como pode ser observado na Figura VI.5, o microeletrodo de pasta de carbono não modificado apresenta apenas uma resposta discreta para eletrooxidação de Cys. Por outro lado, um pico de oxidação bem definido e um aumento drástico da corrente são observados quando a CoPC foi adicionada como mediador redox. O voltamograma do eletrodo modificado mostra um ombro em 0,4 V e um pico em 0,6 V vs. Ag na eletrooxidação de Cys. Na varredura reversa pode ser observado que há um comportamento anômalo para o voltamograma obtido com o eletrodo modificado com CoPC na presença de Cys. Esse tipo de perfil possivelmente está associado com a contínua oxidação do produto ou produtos formados durante a varredura direta. O pico que aparece em 0,6 V apresenta uma maior resposta de corrente, desta forma, o mesmo foi utilizado para medir a corrente em todos os voltamogramas.

VI.2.4. Influência do pH

A cisteína é um composto zwitteriônico e apresenta três formas diferentes que dependem do pH da solução [14]. Assim, um dos nossos primeiros experimentos foi estudar o pH no qual o ePAD_{μ2} fornece as maiores respostas de corrente (Fig.VI.6).

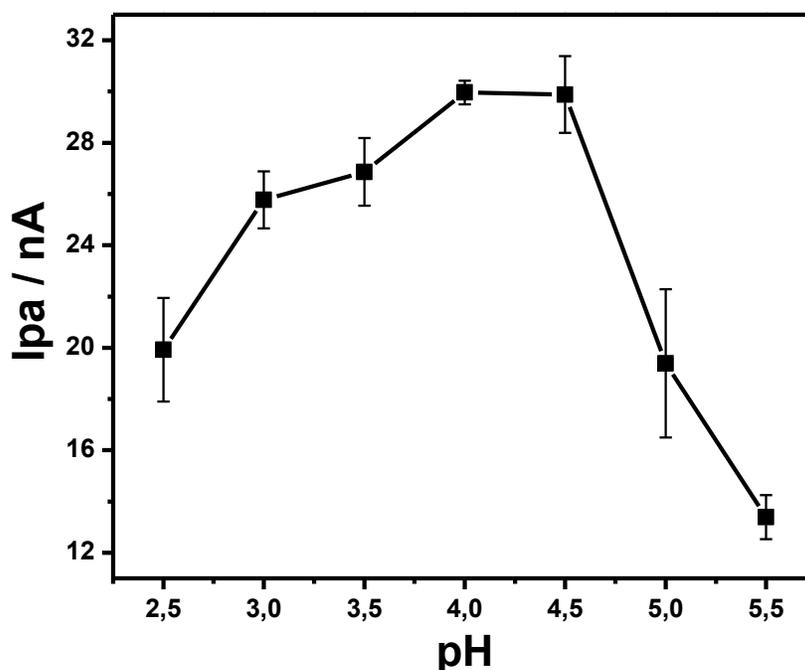


Figura VI.6. Gráfico de Ipa vs. pH para o ePAD_{μ2}. Condições 8 % de CoPc, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cys.

A Fig. VI.6 mostra que as correntes mais elevadas são observadas para pHs 4,0 – 4,5. Para valores de pH superiores a 5,5 o pico de oxidação se desloca para potenciais mais positivos. Observou-se que as maiores respostas são observadas abaixo do ponto isoelétrico da Cys ($pI = 5,07$) [14]. O efeito da diminuição da resposta em função do aumento do pH pode estar relacionado com a coordenação de íons hidroxila no centro metálico de cobalto.

VI.2.5 Influência da porcentagem de CoPC

A quantidade de ftalocianina cobalto presente na pasta de carbono é também um fator importante que pode influenciar diretamente a resposta do ePAD. Foi relatado que a quantidade de CoPC adsorvido em eletrodos de carbono vítreo pode influenciar a resposta da corrente e também o aparecimento de mais de um pico no processo de oxidação do ácido 2-mercaptosulfônico [149]. A fim de verificar os dois parâmetros, estudos foram conduzidos empregando a técnica de voltametria cíclica utilizando diferentes porcentagens de CoPC na pasta de carbono (Fig. VI.7(a)).

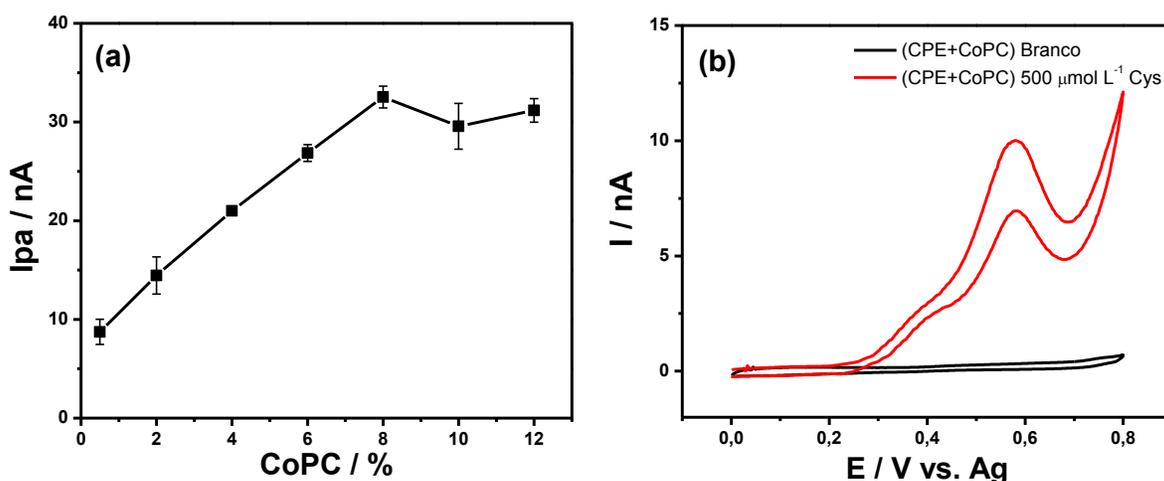


Figura VI.7. (a) Gráfico de I_{pa} vs. porcentagem de CoPC e (b) Voltamograma cíclico empregando 0,5 % de CoPC. Condições: $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cys em tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{ePAD}_{\mu 2}$).

Observou-se uma correlação linear da corrente de resposta de 0,5% até 8,0% de CoPC. Para porcentagens mais elevadas, a corrente permanece constante, provavelmente devido a uma saturação dos sítios eletroativos. Foi verificado que, mesmo em baixas concentrações de CoPC os voltamogramas cíclicos mostraram o mesmo formato, um pico com um ombro (Fig. VI.7(b)). Assim, sob as nossas condições experimentais, a presença de um ombro não é uma função da concentração de CoPC uma vez que o mesmo perfil foi observado em todos os voltamogramas cíclicos como uma espécie de impressão digital do

processo redox. Estudos mais aprofundados sobre a presença do ombro no voltamograma estão fora do escopo deste trabalho.

VI.2.6. Influência da velocidade de varredura

A influência da velocidade de varredura foi avaliada por voltametria cíclica na presença de Cys. Basicamente, qualquer alteração na velocidade de varredura irá refletir diretamente na escala de tempo do experimento. A Fig. VI.8(a) mostra uma dependência linear da corrente de pico anódica do processo a 0,6 V *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que o processo eletroquímico de oxidação é controlado pelo transporte de massa [85]. O processo de oxidação a 0,6 V desloca para potenciais mais positivos em função do aumento da velocidade de varredura, indicando uma limitação cinética da reação entre a cisteína e a ftalocianina de cobalto (Tabela VI.2).

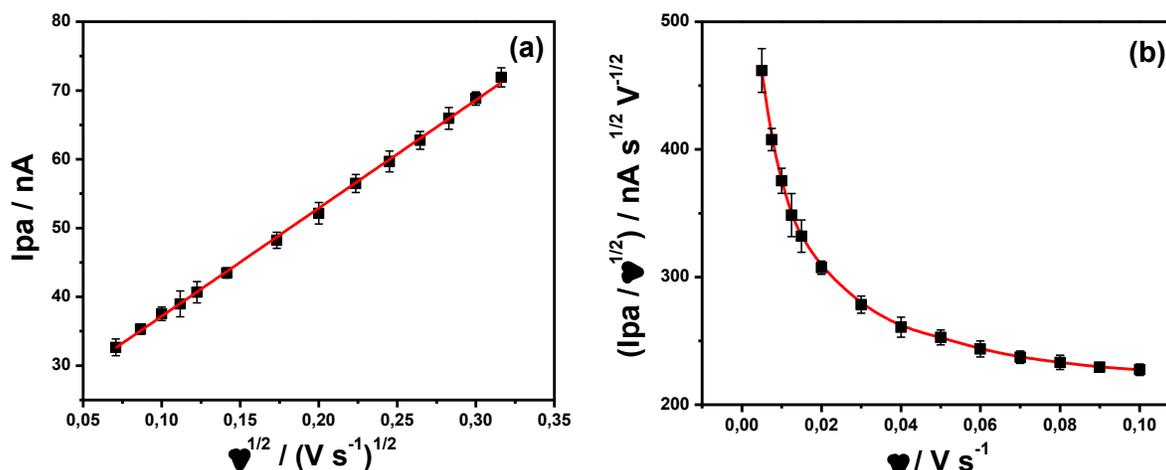


Figura VI.8. (a) Gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$ e (b) Gráfico da resposta normalizada em função de $v^{1/2}$ *versus* v . Condições: $500 \mu mol L^{-1}$ de Cys em tampão acetato $0,5 mol L^{-1}$ e $ePAD_{\mu 2}$ contendo 8 % de CoPC.

Tabela VI.2. Influência de v no deslocamento do potencial de oxidação.

$v / \text{mV s}^{-1}$	E_{pa} / mV
5	597 ± 4
50	623 ± 1
100	640 ± 9

A partir dos resultados obtidos na Figura VI.8(a), mais informações sobre o mecanismo que ocorre na superfície do eletrodo podem ser extraídas. Assim, um gráfico de corrente pico normalizado pela raiz quadrada da velocidade de varredura ($I_p / v^{1/2}$) plotado em função da velocidade de varredura (Figura VI.8(b)) apresenta um formato típico de um processo eletroquímico-químico catalítico (EC_{cat}) [85]. Um exame mais aprofundado do processo electrocatalítico entre a cisteína e o ePAD _{μ 2} pode ser feito por cronoamperometria.

VI.2.7. Estudos cronoamperométricos

A cronoamperometria de uma única etapa foi utilizada para realizar a caracterização analítica do microeletrodo de pasta de carbono e extrair a constante catalítica entre os sítios ativos do mediador redox e a cisteína. Primeiramente, para obter as condições de maior resposta, foram realizados experimentos para estabelecer o potencial de detecção. A Figura VI.9(a) mostra as respostas obtidas por cronoamperometria em função do potencial aplicado.

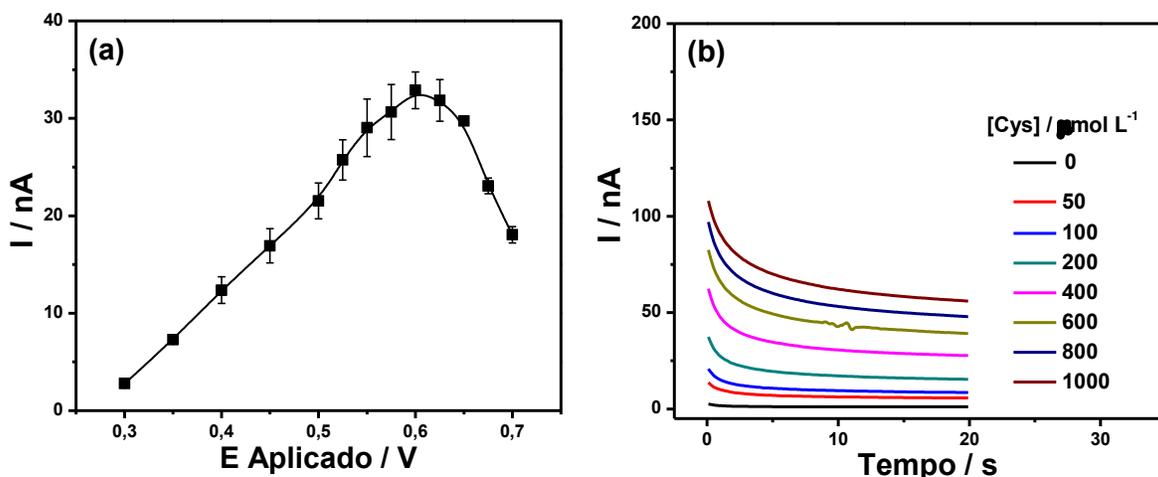
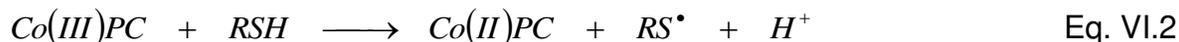


Figura VI.9. (a) Gráfico de corrente *versus* potencial aplicado na presença de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cys. (b) Cronoamperogramas obtidos após adições sucessivas de cisteína e $E_{\text{apl.}} = 0.6 \text{ V vs. Ag}$. Condições (a-b): tampão acetato 0,5 mol L^{-1} usando o $\text{ePAD}_{\mu 2}$ contendo 8 % de CoPC.

Assim como pode ser observado na Figura VI.9(a), a maior resposta do ePAD é obtida aplicando um potencial de 0,6 V vs. Ag. Assim, este potencial foi selecionado e utilizado para obter as curvas cronoamperométricas após sucessivas adições de cisteína. Na Figura VI.9(b), maiores respostas catalíticas são observadas com o aumento da concentração de cisteína. A reação entre a cisteína e o mediador redox pode ser descrita como:



As equações descritas acima são consistentes com o tipo de mecanismo (EC_{cat}) obtidos através dos estudos conduzidos por voltametria cíclica. A reação global pode ser escrita como:



Sendo assim, uma reação química ocorre na superfície do microeletrodo modificado na presença de Cys e a constante cinética (k_{obs}) desta reação pode ser obtida por cronoamperometria de acordo com o método descrito na literatura [42]:

$$\frac{I_{cat}}{I_L} = \pi^{1/2} (k_{obs} C t)^{1/2} \quad \text{Eq. VI.5}$$

onde I_{cat} é a corrente catalítica do microeletrodo modificado na presença de Cys, I_L é a corrente na ausência de Cys, C é a concentração de Cys (mol L^{-1}) e t é o tempo (s)). A partir do coeficiente angular de um gráfico I_{cat} / I_L versus $t^{1/2}$ o valor de k_{obs} pode ser obtido para uma concentração conhecida do analito. Assim, como pode ser observado na Fig. VI.10(a), inicialmente foi obtido um gráfico de I_{cat} / I_L em função de $t^{1/2}$. Em seguida, os coeficientes angulares dessas retas foram plotados em função da $[\text{Cys}]^{1/2}$, Fig. VI.10(b). O coeficiente angular obtido foi de $1110,1 \text{ s}^{-1/2} \text{ L}^{1/2} \text{ mol}^{-1/2}$, resultando em um valor de constante de $3,92 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a constante cinética.

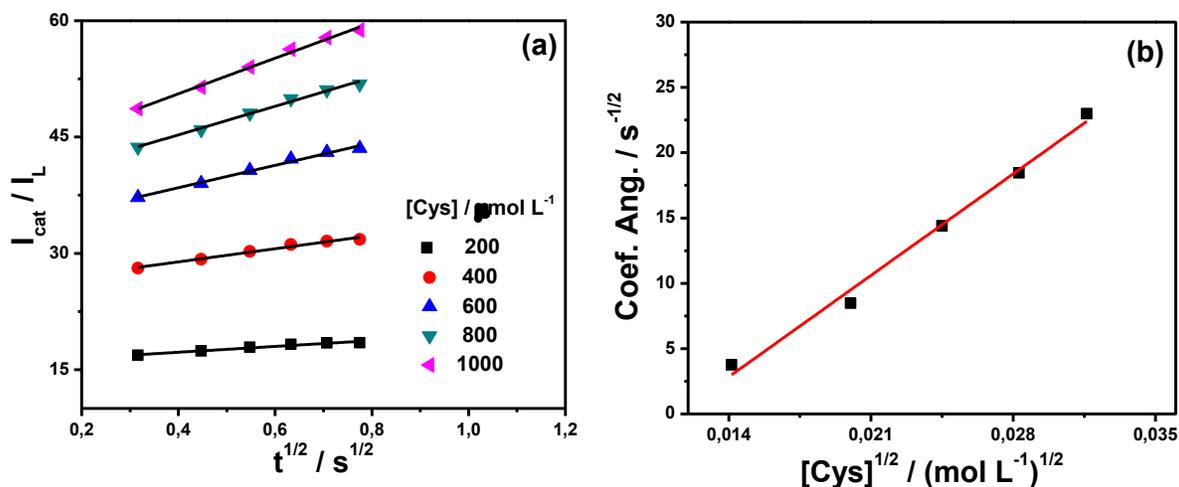


Figura VI.10. (a) Gráfico de I_{cat} / I_L em função de $t^{1/2}$. (b) Gráfico dos coeficientes angulares obtidos em função de $[\text{Cys}]^{1/2}$. Condições (a-b): tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 usando o ePAD $_{\mu 2}$ contendo 8 % de CoPC.

O ponto chave que possibilita a obtenção de uma alta constante cinética para este ePAD pode ser basicamente descrita como uma combinação de uma reação rápida entre a cisteína e o mediador redox com eletrodos de tamanho reduzido.

Os cronoamperogramas demonstrados na Figura VI.9(b) podem ser usados para construir a curva analítica para cisteína (Fig. VI.11).

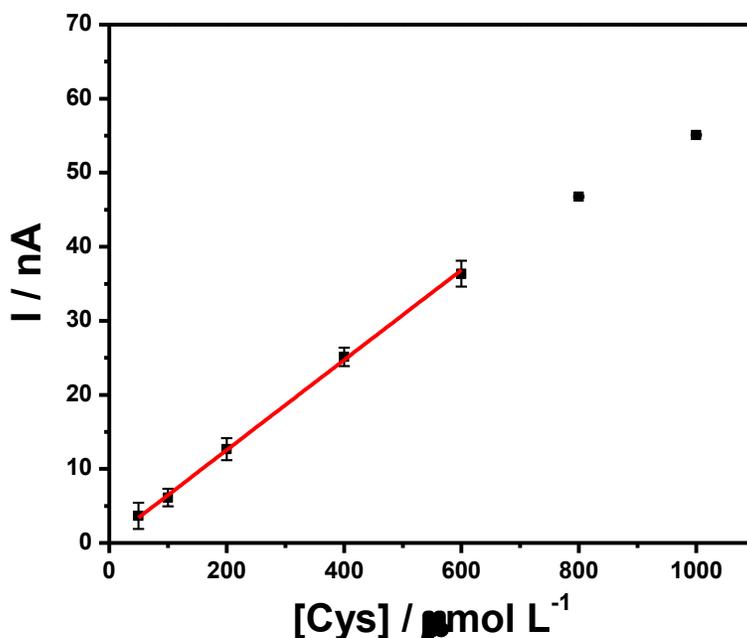


Figura VI.11. Curva analítica para cisteína empregando o ePAD _{μ 2} contendo 8% de CoPC. Condições: tampão acetato 0,5 mol L⁻¹ pH 4,0 e Eapl. = 0,6 V.

O intervalo de resposta linear foi de 50 até 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. VI.11), o qual pode ser expresso pela seguinte equação:

$$\Delta I \text{ (nA)} = 0,4(\pm 0,3) + 0,061(\pm 0,001) [\text{Cys}] \text{ (}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)} \quad \text{Eq. VI.6}$$

com um coeficiente de correlação de 0,998 ($n = 3$).

A preocupação com a baixa sensibilidade dos dispositivos analíticos à base de papel foi levantada recentemente na literatura como um ponto muito importante a ser superado [54]. A sensibilidade do ePAD demonstrado aqui pode ser

facilmente ajustada para proporcionar dispositivos à base de papel ainda mais sensíveis. Assim, uma das maneiras de aumentar a sensibilidade de dispositivos à base de papel com detecção eletroquímica consiste no desenvolvimento de um arranjo de microeletrodos.

VI.2.8 Arranjo de microeletrodos

Arranjos de microeletrodos foram relatados recentemente para muitas aplicações, que vão desde sensores a gás [151] passando por alguns estudos de caracterização [152] até aplicações em sistemas biológicos [153-155]. Em geral, a construção de um arranjo de microeletrodos envolve muitas etapas de construção e procedimentos de limpeza, distanciando este tipo de abordagem de uma possível combinação com dispositivos analíticos à base de papel. Assim, outra inspiração do nosso trabalho foi demonstrar pela primeira vez um procedimento de construção simplificado e caracterização eletroquímica de um arranjo de microeletrodos para ePADs. A principal vantagem de uma matriz de microeletrodos é combinar as propriedades de um microeletrodo único, criando uma série de eletrodos para aumentar a resposta do dispositivo eletroquímico. A construção de um arranjo de microeletrodos deve ser avaliada cuidadosamente, pois a sobreposição das camadas de difusão resulta em voltamogramas com um formato de pico indicando que a difusão linear tem uma boa parcela de contribuição no processo [156]. Assim, foi desenvolvido um arranjo com quatro microeletrodos para o ePAD e um dos nossos primeiros estudos foi avaliar o efeito da distância entre os microeletrodos. A Fig. VI.12(a) mostra a influência da resposta do microeletrodo para a oxidação de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ em função da distância entre os microeletrodos. Para a distância de 300 μm , um voltamograma com formato de pico é obtido e, como consequência, a resposta do ePAD é menor quando comparado com as outras distâncias. O aumento da resposta do dispositivo pode ser facilmente visualizado através da comparação da corrente limite empregando um microeletrodo e o arranjo com quatro microeletrodos (Fig. VI.12(b)).

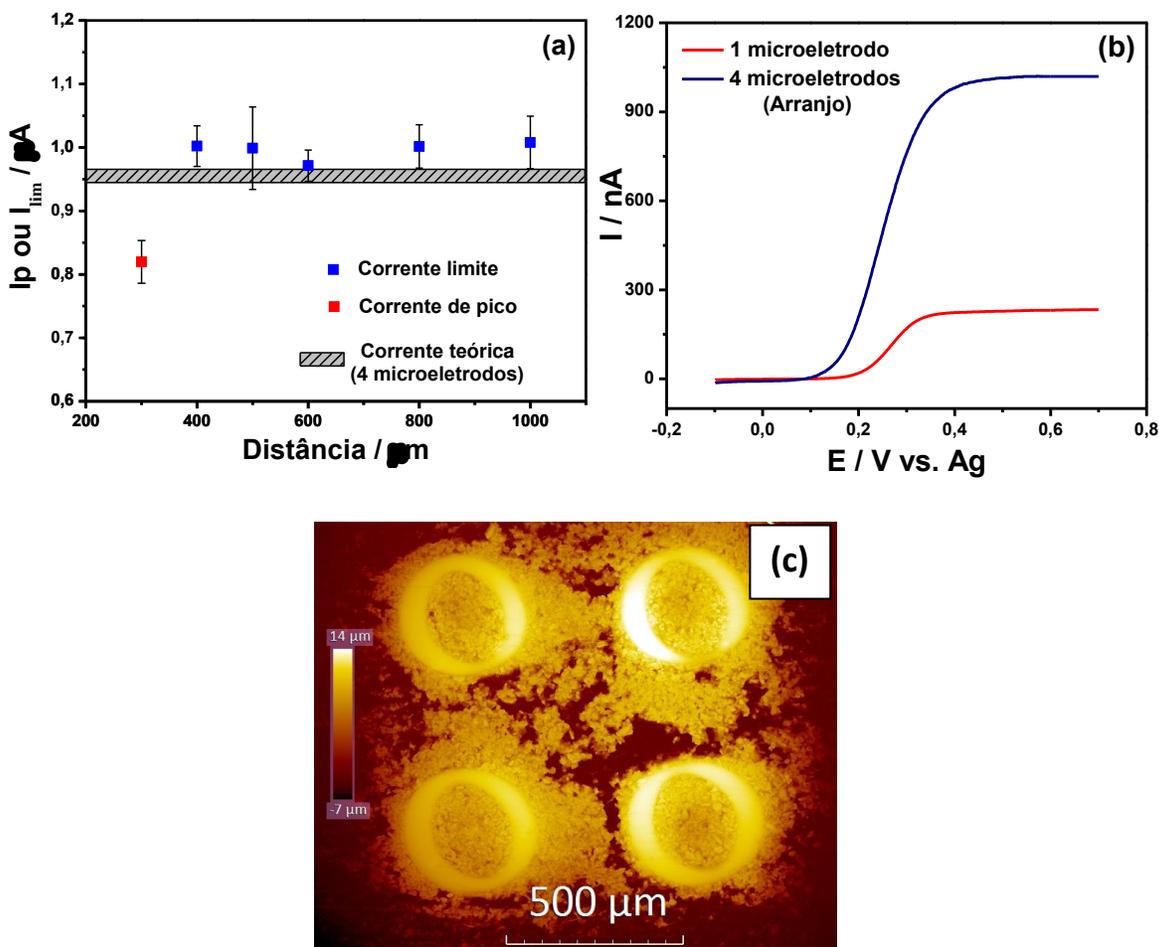


Figura VI.12. (a) Gráfico da resposta dos microeletrodos em função da distância (centro a centro). (b) Voltamogramas de varredura linear para a comparação entre o arranjo de microeletrodos ($d = 500 \mu m$) e o ePAD $_{\mu 2}$. A resposta dos gráficos (a) e (b) foi avaliada medindo a corrente de pico ou limite nos voltamogramas de varredura linear na presença de 5 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a 10 mV s^{-1} . CoPC = 8% em ambos os dispositivos. (c) Imagem do arranjo de microeletrodos obtida pelo perfilômetro óptico.

A Fig. VI.12(b) mostra a resposta voltamétrica para a oxidação de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ utilizando um e quatro microeletrodos (distância = $500 \mu m$). Como pode ser observado na mesma Figura, os voltamogramas têm a mesma forma sigmoideal, mas com um aumento significativo de resposta para o arranjo de microeletrodos. A Fig. VI.12(c) mostra uma imagem do arranjo de microeletrodos obtida por um

perfilômetro óptico. Os valores teóricos para a resposta eletroquímica do arranjo de microeletrodos foram calculados utilizando a Equação VI.1, e estão em boa concordância com os resultados experimentais.

A fim de mostrar o aumento de resposta na presença do analito, cronoamperogramas foram obtidos após adições sucessivas de Cys e a resposta de corrente obtida foi representada graficamente em função da concentração de Cys (Fig. VI.13).

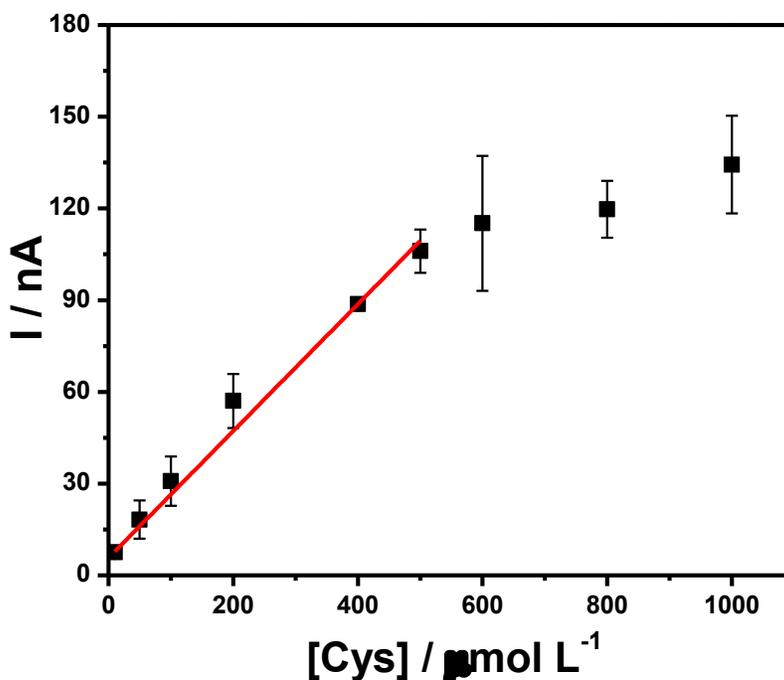


Figura VI.13. Curva analítica para cisteína empregando o arranjo de microeletrodos. Condições: 8% de CoPC, tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 e Eapl. = 0,6 V.

Os resultados da caracterização analítica do arranjo de microeletrodos e uma comparação com o ePAD_{μ2} com um único eletrodo podem ser observados na Tabela VI.3. Uma melhoria significativa dos parâmetros analíticos são claramente mostrados na Tabela.

Tabela VI.3. Comparação analítica entre um e quatro microeletrodos (arranjo).

Número de microeletrodos	Sensibilidade / nA mol L ⁻¹	Faixa linear / μmol L ⁻¹	R ²	L.D. / μmol L ⁻¹
1	0,061	50 - 600	0,998	52,0
4 (arranjo)	0,21	10 - 500	0,998	4,8

Outro ponto positivo dos dispositivos com um arranjo de microeletrodos é o baixo custo (R\$ = 1,80), o qual ainda pode ser ajustado para fornecer dispositivos ainda mais baratos.

VI.3 Conclusões parciais e motivação para a próxima etapa

Nós relatamos aqui a construção e caracterização eletroquímica de microeletrodos de pasta de carbono para dispositivos eletroquímicos à base de papel. Folhas de transparência são uma nova alternativa de baixo custo para serem usadas como substrato na fabricação de microeletrodos para ePADs. Além disso, transparências são facilmente combinadas com papel para a montagem de dispositivos com uma configuração do tipo sanduíche. A resposta eletroquímica dos ePADs é similar ao comportamento de microeletrodos já reportados na literatura e pode ser prevista também por formulações teóricas. Os microeletrodos modificados com CoPC mostraram ser uma excelente alternativa para a detecção eletrocatalítica de cisteína com uma das mais altas constantes cinéticas reportadas até agora. Microeletrodos de pasta de carbono modificados são uma ferramenta promissora para ePADs uma vez que são fáceis de fabricar, usar, modificar e, talvez uma das características mais importantes e promissoras, eles podem melhorar o limite de detecção dos ePADs. Os limites de detecção podem ser levados para níveis ainda mais baixos com a inserção de mais microeletrodos no arranjo.

A motivação para a última etapa do trabalho foi juntar alguns aspectos apresentados nos últimos tópicos para formar um biossensor para a detecção de metil paration. Sendo assim, o dispositivo contará com canais microfluídicos,

layout 3D e microeletrodos de baixo custo. Tendo em vista as excelentes características do microeletrodo de pasta de carbono na detecção do grupo tiol, o princípio de funcionamento do biossensor será baseado na detecção de um outro composto contendo o grupo tiol, a tiocolina.



VII. Biossensor para metil paration (ePAD_{mp})

VII.1 Apresentação

O Brasil se destaca na agricultura e acaba sendo um importador em potencial de pesticidas e inseticidas devido a sua grande área territorial e clima subtropical. O metil paration (Fig. VII.1) é um inseticida e acaricida organofosforado que possui uma classificação toxicológica tipo I, ou seja, extremamente tóxico [157]. Devido à sua ampla utilização na agricultura este composto foi escolhido como molécula modelo nos estudos deste tópico.

O mecanismo de ação dos organofosforados ocorre através da inibição da enzima acetilcolinesterase nos tecidos nervosos [158]. Concretamente, os organofosforados interrompem a comunicação entre as células, que é efetuada pela molécula acetilcolina. Esta transmissão de célula para célula não pode operar adequadamente, a menos que a molécula de acetilcolina seja eliminada após ter executado a sua função. Os organofosforados ligam-se seletivamente às enzimas cuja função é destruir a acetilcolina, bloqueando, dessa maneira, sua ação. A molécula de inseticida tem, então, o efeito de suprimir a transmissão continuada de impulsos entre as células nervosas, que é essencial para a coordenação dos processos vitais dos organismos, provocando por fim a morte [158,159].

Assim, uma das propostas deste tópico é fornecer uma ferramenta de detecção simples fundamentada no próprio mecanismo de ação dos organofosforados. A molécula de acetiltiocolina foi selecionada como substrato da enzima para que o produto formado após a hidrólise, tiocolina (R-SH), possa ser detectado pelos microeletrodos de pasta de carbono descritos no tópico anterior.

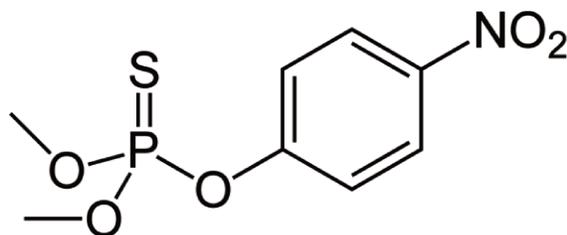
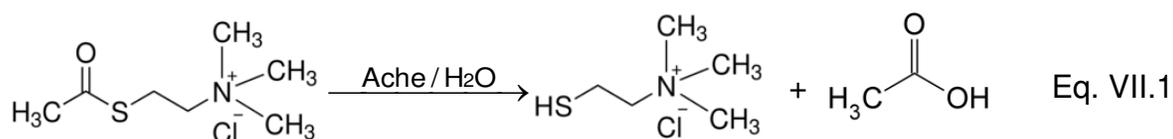


Figura VII.1. Fórmula estrutural do metil paration.

VII.2 Resultados e discussão

VII.2.1 Princípio da detecção de tiocolina

O dispositivo para detecção de metil paration baseado na inibição da enzima acetilcolinesterase (Ache) foi montado conforme ilustrado na parte experimental Fig. II.9. O substrato imobilizado na região mais externa (Fig. II.9(i)) é forçado pelo fluxo vertical a atravessar a região contendo a enzima antes de chegar ao detector. Com isso, o produto da reação abaixo (tiocolina R-SH) pode ser detectado pelos microeletrodos na porção inferior do dispositivo.



A Fig. VII.2 mostra os voltamogramas de varredura linear na presença e ausência da enzima Ache. O voltamograma mostra um aumento significativo da corrente e um formato sigmoidal indicando que a detecção da tiocolina pelos microeletrodos está funcionando de forma adequada. Além disso, fica claro a partir do voltamograma em vermelho que a acetiltiocolina não sofre oxidação na superfície do microeletrodo de trabalho.

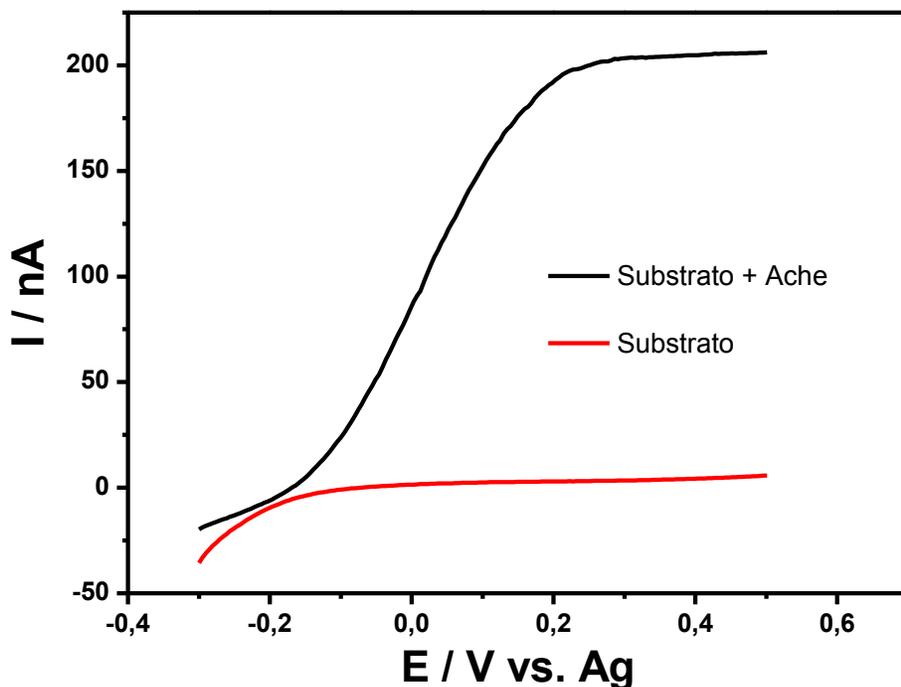


Figura VII.2. (a) Voltamogramas de varredura linear obtidos na presença e ausência da enzima acetilcolinesterase (Ache). Condições: 100 μL de tampão TRIS 0,5 mol L^{-1} pH 8,0, substrato = 0,5 μmol na face (i), Ache = 20 U na face (iv) e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

VII.2.2 Influência do pH

Conforme discutido no tópico IV.2.8 as enzimas possuem um pH ótimo ou uma faixa onde a atividade catalítica é máxima [14]. Assim, foram obtidos voltamogramas de varredura linear em diferentes pHs (Fig. VII.3).

Assim como pode ser observado na Fig. VII.3, o processo de oxidação é favorecido em função do aumento do pH da solução, ou seja, há um deslocamento catódico dos potenciais de meia onda na faixa de pH 4,0 até 8,0. Já em pH 9,0 não foi observado um deslocamento significativo do potencial de meia onda. Esse efeito possivelmente está relacionado com o pK_a (7,7) [160] do grupo tiol envolvido no processo de oxidação. Em pH 9,0 o grupo tiol da molécula de tiocolina está desprotonado e portanto não há variação do potencial de meia onda.

A Fig. VII.3 mostra também que o maior sinal de corrente limite foi obtido em solução tampão pH 8,0. A maior resposta obtida neste pH está coerente com

outros estudos reportados na literatura [23,161]. Pode ser observado também na Fig. VII.3 em pH 8,0 que a resposta de corrente atinge um valor máximo em 0,2 V vs. Ag e então permanece constante para potenciais mais elevados. Assim, o potencial de 0,2 V foi selecionado para conduzir os demais estudos.

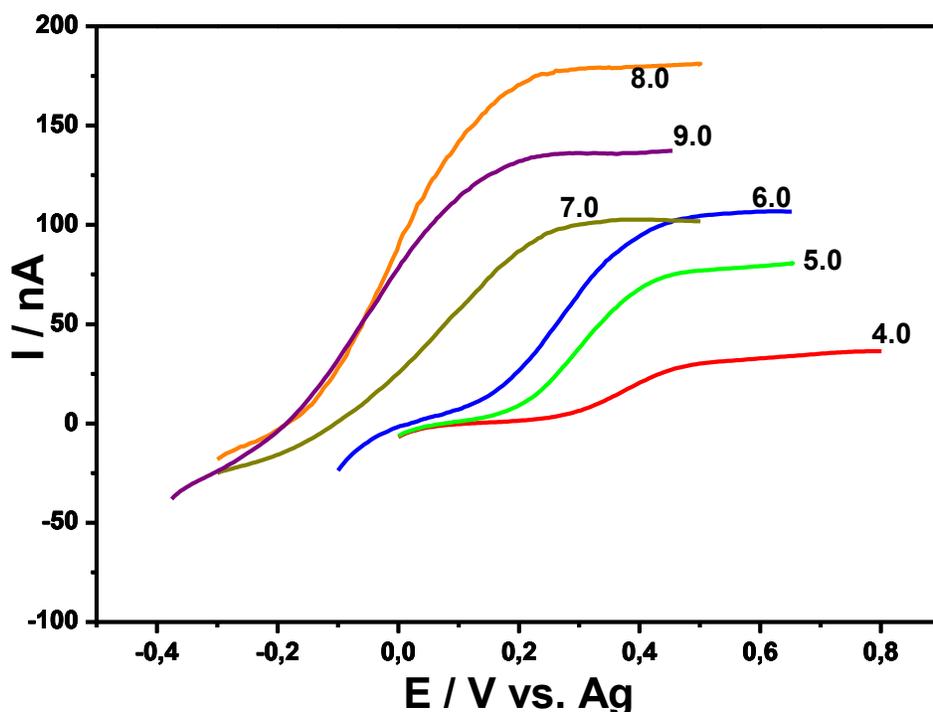


Figura VII.3. Voltamogramas de varredura linear obtidos em diferentes valores de pH (4,0 até 9,0). Condições: 100 μL de tampão 0,5 mol L^{-1} , substrato = 0,5 μmol na face (i), Ache = 20 U na face (iv) e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

VII.2.3 Influência da concentração do substrato

A concentração do substrato é um parâmetro que afeta diretamente a resposta de biossensores que empregam sistemas enzimáticos. Observando a Eq. VII.1, podemos afirmar que o aumento da concentração do substrato irá favorecer a reação no sentido da formação de mais moléculas de tiocolina [14]. Baseado nisso, foram realizados experimentos cronoamperométricos para avaliar o efeito da concentração do substrato na resposta do dispositivo. A Fig. VII.4 ilustra as resposta de corrente em função da concentração de acetiltiocolina.

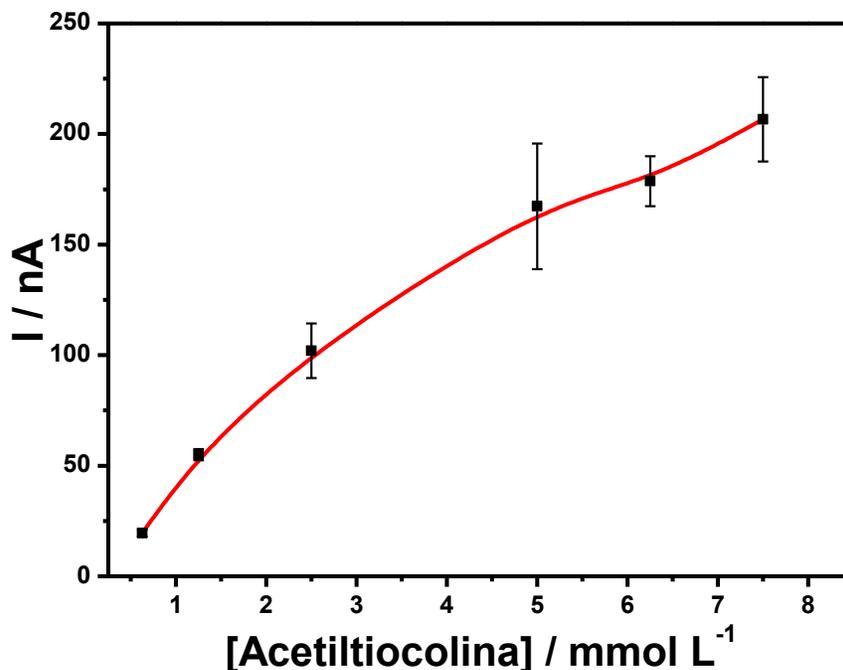


Figura VII.4. Resposta de corrente obtida por cronoamperometria (Eapl. = 0,2 V vs. Ag) em função da [acetiltiocolina]. Ache = 20 U na face (iv). As concentrações no eixo x representam as concentrações esperadas após a adição de 100 μ L de tampão 0,5 mol L⁻¹ pH 8,0 na face (i) do dispositivo.

Assim como pode ser observado na Fig. VII.4, a resposta do ePAD_{mp} aumenta até 5 mmol L⁻¹ e então permanece praticamente constante para as demais concentrações. O patamar observado após 5 mmol L⁻¹ indica uma possível saturação do sítio ativo da enzima devido ao excesso de substrato adicionado no dispositivo [14].

VII.2.4 Curva analítica: inibição da enzima

Na presença de metil paration a enzima Ache é inibida pela ação do inseticida e com isso é esperado uma diminuição da quantidade de produto formado. Sendo assim, podemos antecipar que na presença do inseticida as respostas serão menores do que para os experimentos de controle, ou seja, na ausência de metil paration.

Para os ensaios de inibição, inicialmente o canal microfluídico de coleta foi colocado em contato com a amostra ou solução-padrão do inseticida. Assim, a amostra percorre o canal microfluídico por capilaridade até a zona onde a enzima foi imobilizada. O tempo necessário para que este processo ocorra foi de 7 minutos. Outro ponto importante do canal microfluídico é a possibilidade de filtração, o qual é uma característica importante quando amostras de interesse ambiental estão sendo analisadas. Nós selecionamos um tempo total para coleta de amostra e inibição de 20 minutos. Com isso, o tempo necessário para a inibição fica dentro do que vêm sendo observado por outros pesquisadores, entre 10 e 15 minutos [162,163,164].

A Fig. VII.5(a) ilustra as resposta de corrente em função da concentração de metil paration de $0,1 \text{ nmol L}^{-1}$ até $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. A partir do gráfico pode ser observado que concentrações baixas de metil paration já exercem um impacto significativo na resposta do biossensor. Essa queda brusca de sinal próximo da origem no eixo das abscissas (Fig. VII.5(a)) pode ser melhor visualizada através de um gráfico de semi-log (Fig.VII.5(b), uma vez que as concentrações cobrem uma grande gama de valores.

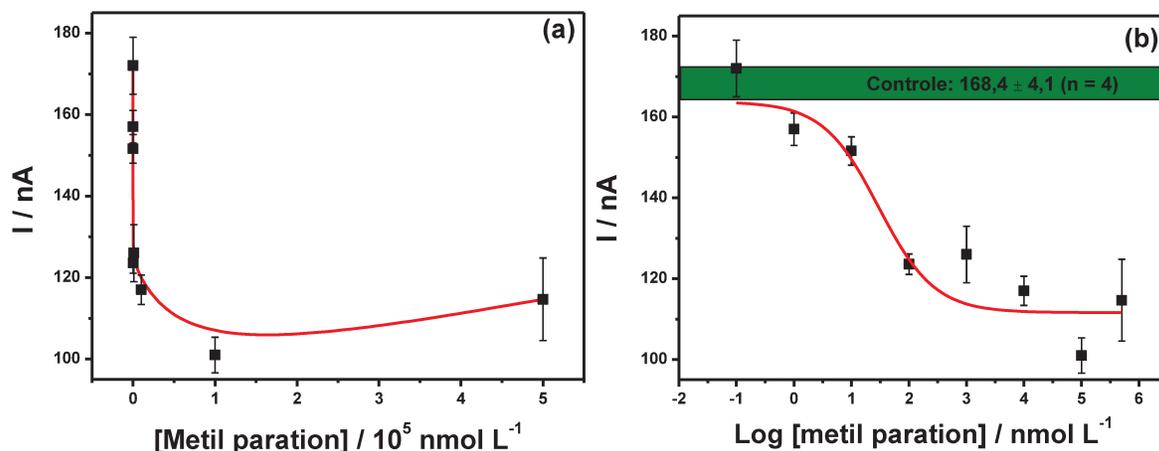


Figura VII.5. (a) Gráfico de resposta de corrente obtida por cronoamperometria (Eapl.: 200 mV vs. Ag por 15 s) em função da concentração do inibidor. (b) Gráfico da resposta de corrente em função da concentração do inibidor (log). Condições: 100 μL de tampão $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0, substrato = $0,5 \mu\text{mol}$ na face (i), Ache = 20 U na face (iv).

O quadro verde na Fig. VII.5(b) ilustra o resultado obtido para os experimentos de controle, ou seja, correntes obtidas por cronoamperometria na ausência do inibidor. Assim, qualquer sinal abaixo do sinal de controle indica a presença do inibidor. Pode ser observado também na Fig. VII.5(b) que o ePAD_{mp} não diferencia a concentração de 0,1 nmol L⁻¹ de metil paration do controle. O mesmo provavelmente irá ocorrer para concentrações inferiores a este valor. Já caminhando para a outra direção, o ePAD_{mp} diferencia claramente as demais concentrações de metil paration (≥ 1 nmol L⁻¹).

VII.2.5 Seletividade

A seletividade é outro parâmetro importante a ser avaliado em dispositivos analíticos. Enzimas, de maneira geral, são biomoléculas bastante seletivas aos seus respectivos substratos e por isso são motivo de escolha por muitos pesquisadores para a montagem de plataformas mais seletivas. Por outro lado, aqui neste trabalho, as respostas do ePAD_{mp} não dependem somente da concentração do substrato mas também do inibidor utilizado. Há relatado na literatura que várias espécies podem inibir a enzima acetilcolinesterase, como: carbofuran, metomil, diclorvos, metamidofós, monocrotofós, malation, paration e etc [23,164]. Dentre estes compostos o inseticida malation também foi testado com o ePAD_{mp}, apresentando uma resposta de 132 nA para a concentração de 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Assim, este ensaio confirma que o ePAD_{mp} não é seletivo para um determinado composto mas por outro lado é uma ferramenta muito simples e prática para a detecção de inibidores da enzima acetilcolinesterase.

VII.3 Conclusões parciais e continuidade do trabalho

Neste tópico foi abordado um dispositivo com uma configuração inédita visando a determinação de inibidores da enzima acetilcolinesterase. O layout do dispositivo proposto aqui simplifica muito a análise e o ePAD_{mp} demonstrou ser uma ferramenta promissora para a análise de inibidores da enzima acetilcolinesterase. A combinação do fluxo lateral do canal microfluídico com o fluxo vertical facilita as etapas necessárias para este tipo de biossensor. O

dispositivo pode coletar e detectar concentrações de metil paration de 1 nmol L^{-1} , sendo portanto uma ferramenta em potencial para a análise de amostras reais.

Como etapa futura será investigado a estabilidade do ePAD_{mp} e serão conduzidos ensaios com amostras reais. O canal microfluídico pode ser eventualmente utilizado para coletar amostras diretamente sobre a folha de uma planta ou superfície de uma fruta, sem necessidade de pré-tratamento da amostra.



VIII. Conclusões gerais

VIII.1 Conclusões gerais

Neste trabalho foram desenvolvidos dispositivos simples baseados em uma plataforma de baixo custo presente praticamente em todos os dias no nosso cotidiano, o papel. Para controlar a direção da amostra pelo dispositivo, foram desenvolvidas paredes de cera de maneira muito simples e sem a necessidade de equipamentos sofisticados. Além disso, a detecção eletroquímica foi acoplada de diferentes maneiras para ilustrar a gama de possibilidades que esse modo de detecção oferece.

O primeiro passo foi dado com o intuito de explorar o conceito da separação e detecção eletroquímica em plataformas à base de papel. A construção dos eletrodos foi conduzida em apenas duas etapas e os eletrodos de ouro formados sobre o papel apresentaram um perfil similar aos eletrodos de ouro convencionais. Algumas características marcantes desse dispositivo foram o baixo consumo de amostra (500nL) e uma separação em nível de linha de base em 13 minutos para ácido ascórbico e dopamina. Nessa primeira abordagem o custo foi um tanto quanto elevando para um ePAD mas essa questão foi melhorada nos trabalhos posteriores.

A busca por materiais de baixo custo e menores limites de detecção nos fez enxergar um material muito comum do nosso cotidiano, o grafite de lapiseira. A detecção eletroquímica foi realizada utilizando um sistema de dois eletrodos, sendo o eletrodo auxiliar e referência de prata e o grafite de lapiseira como eletrodo de trabalho. O dispositivo é fácil de ser construído, com somente uma etapa de “*screen-printing*”, simples e possibilita etapas de filtração, reação enzimática e detecção eletroquímica em menos de 5 minutos. Desta forma, o ePAD_{gli} é uma alternativa promissora para a detecção de H₂O₂ liberado por muitas outras enzimas oxidases.

O eletrodo de grafite foi também explorado juntamente com um novo conceito para ePADs. Esse conceito consiste na incorporação de códigos QR (códigos 2D) juntamente com o sistema de detecção eletroquímico. Assim, os resultados da análise podem ser facilmente interpretados/disseminados pelo usuário através de um leitor de código QR de um smartphone. Os dispositivos

apresentaram um limite de detecção de $1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o p-nitrofenol e foram utilizados para a determinação desta substância em amostras reais de água. Além do mais baixo custo, sistema de filtração integrado, detecção eletroquímica e portabilidade são características marcantes do ePAD_{QR}

Tendo em vista que houve um ganho de resposta significativo com a diminuição da área dos eletrodos de trabalho foram construídos microeletrodos de pasta de carbono ainda menores e modificados, para diminuir o potencial de oxidação e aumentar as correntes. Os microeletrodos modificados com CoPC mostraram ser uma excelente alternativa para a detecção electrocatalítica de cisteína, com uma das mais altas constantes cinéticas já reportadas. Microeletrodos de pasta de carbono modificados são uma ferramenta promissora para ePADs uma vez que são fáceis de fabricar, usar e modificar.

Os microeletrodos modificados foram empregados também na montagem de um biossensor simples e de uso descomplicado para a determinação de inseticidas. O princípio de funcionamento do ePAD_{mp} foi fundamentado na inibição da enzima acetilcolinesterase por agentes inibidores. Para integrar os reagentes necessários foi utilizado um dispositivo 3D que possibilita tanto o fluxo lateral como vertical. O ePAD_{mp} é uma ferramenta promissora para a análise de inibidores na enzima acetilcolinesterase em amostra reais.



IX. Perspectivas

IX.1 Perspectivas

Os tópicos III – VII apresentaram dispositivos inovadores, simples e com grande potencial para análises descentralizadas. Estas análises, no entanto, precisam de um leitor de corrente para que seja possível correlacionar o sinal obtido com uma determinada concentração. Nós demos um primeiro passo com intuito de facilitar essa correlação sinal-concentração de maneira simples e prática empregando um telefone celular. E por que não realizar a análise inteira empregando um celular? Alguns avanços nessa área já foram demonstrados para a detecção colorimétrica, principal concorrente da detecção eletroquímica. Para isso, aplicativos poderiam ser criados e utilizados para conduzir a análise na palma da mão. Uma coisa é certa, à medida que a detecção eletroquímica se dispor de formas mais simples, práticas e acessíveis à população em geral, aplicações diversas serão bem mais comuns de serem vistas.

Outra perspectiva que surge a partir deste trabalho consiste na fabricação de ePADs visando a detecção de NADH. A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) é um cofator e têm sido amplamente estudado por ter um papel crucial no desenvolvimento de biossensores amperométricos. A grande parte das enzimas utilizadas para tais fins são desidrogenases que dependem diretamente do processo redox deste cofator. Sendo assim, o grande motivo que explica tantos estudos com essa molécula se deve ao fato de que existem mais de 300 reações enzimáticas dependentes da etapa redox deste cofator. No entanto, para a obtenção de sensores eletroquímicos à base de papel para NADH algumas dificuldades terão que ser superadas: i) alto potencial de oxidação do NADH em eletrodos convencionais, ii) baixa sensibilidade e iii) dificuldade em estabelecer um eletrodo com o cofator integrado ao sistema de análise.



X. Referências Bibliográficas

X.1 Referências bibliográficas

- [1] A. Warsinke, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1393 – 1405.
- [2] W. Zhao, A.V.D. Berg, *Lab Chip* 8 (2008) 1988 – 1991.
- [3] A.P.F. Turner, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3184 – 3196.
- [4] A.K. Yetisen, M.S. Akram, C.R. Lowe, *Lab Chip* 13 (2013) 2210 – 2251.
- [5] **Market research report** (<http://www.reuters.com/article/2013/01/30/idUSnMKW79668a+1c0+MKW20130130>) acessado em 14.12.2013.
- [6] D. Figeys, D. Pinto, *Anal. Chem.* 72 (2000) 330A – 335A.
- [7] G.M. Whitesides, *Nature* 442 (2006) 368 – 373.
- [8] S.F. Sauer-Budge, P. Mirer, A. Chatterjee, C.M. Klapperich, D. Chargin, A. Sharon, *Lab Chip* 9 (2009) 2803 – 2810.
- [9] D.J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C.S. Effenhauser, A. Manz, *Science* 261 (1993) 895 – 897.
- [10] C.S. Effenhauser, A. Manz, H.M. Widmer, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2637 – 2642.
- [11] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4974 – 4984.
- [12] A.W. Martinez, S.T. Phillips, M.J. Butte, G.M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* 119 (2007) 1340 – 1342.
- [13] R. Pelton, *Trends. Anal. Chem.* 28 (2009) 925 – 942.
- [14] A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*, 2nd ed, Worth Publishers, New York, 1993.
- [15] A.W. Martinez, S.T. Phillips, E. Carrilho, S.W. Thomas III, H. Sindi, G.M. Whitesides, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3699 – 3707.
- [16] A.K. Ellerbee, S.T. Phillips, A.C. Siegel, K.A. Mirica, A.W. Martinez, P. Striehl, N. Jain, M. Prentiss, G.M. Whitesides, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8447 – 8452.
- [17] K. Abe, K. Suzuki, D. Citterio, *Anal. Chem.* 80 (2008) 6928 – 6934.
- [18] X. Li, J. Tian, T. Nguyen, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9131 – 9134.
- [19] J. Nie, Y. Liang, Y. Zhang, S. Le, D. Li, S. Zhang, *Analyst* 138 (2013) 671 – 676.

- [20] A.C. Glavan, R.V. Martinez, E.J. Maxwell, A.B. Subramaniam, R.M.D. Nunes, S. Soh, G.M. Whitesides, **Lab Chip**. 13 (2013) 2922 – 2930.
- [21] E. Carrilho, A.W. Martinez, G.M. Whitesides, **Anal. Chem.** 81 (2009) 7091 – 7095.
- [22] B. Balu, A.D. Berry, D.W. Hess, V. Breedveld, **Lab Chip** 9 (2009) 3066 – 3075.
- [23] S.M.Z. Hossain, R.E. Luckham, A.M. Smith, J.M. Lebert, L.M. Davies, R.H. Pelton, C.D.M. Filipe, J.D. Brennan, **Anal. Chem.** 81 (2009) 5474 – 5483.
- [24] W. Dungchai, O. Chailapakul, C.S. Henry, **Analyst** 136 (2011) 77 – 82.
- [25] J. Nie, Y. Zhang, L. Lin, C. Zhou, S. Li, L. Zhang, J. Li, Anal. Chem. **Anal. Chem.** 84 (2012) 6331 – 6335.
- [26] T. Songjaroena, W. Dungchai, O. Chailapakul, W. Laiwattanapaisal, **Talanta** 85 (2011) 2587 – 2593.
- [27] T. Nurak, N. Praphairaksit, O. Chailapakul, **Talanta** 114 (2013) 291 – 296.
- [28] G. Chitnis, Z. Ding, C. Chang, C.A. Savranacde, B. Ziaie, **Lab Chip** 11 (2011) 1161 – 1165.
- [29] X. Li, J. Tian, W. Shen, **Cellulose** 17 (2010) 649 – 659.
- [30] J. Yu, S. Wang, L. Ge, S. Ge, **Biosens. Bioelectron.** 26 (2011) 3284 – 3289.
- [31] S. Wang, L. Ge, L. Li, M. Yan, S. Ge, J. Yu, **Biosens. Bioelectron.** 50 (2013) 262 – 268.
- [32] S. Wang, L. Ge, X. Song, J. Yu, S. Ge, J. Huang, F. Zeng, **Biosens. Bioelectron.** 31 (2012) 212 – 218.
- [33] L. Ge, S. Wang, X. Song, S. Ge, J. Yu, **Lab Chip** 12 (2012) 3150 – 3158.
- [34] W. Li, L. Li, S. Ge, X. Song, L. Ge, M. Yan, J. Yu, **Chem. Commun.** 49 (2013) 7687 – 7689.
- [35] Y. Xu, B. Lou, Z. Lv, Z. Zhou, L. Zhang, E. Wang, **Anal. Chim. Acta** 763 (2013) 20 – 27.
- [36] W. Li, M. Li, S. Ge, M. Yan, J. Huang, J. Yu, **Anal. Chim. Acta** 767 (2013) 66 – 74.
- [37] X. Zhang, J. Li, C. Chen, B. Lou, L. Zhang, E. Wang, **Chem. Commun.** 49 (2013) 3866 – 3868.

- [38] M. He, Z. Liu, *Anal. Chem.* 85 (2013) 11691 – 11694.
- [39] R.C. Murdock, L. Shen, D.K. Griffin, N. Kelley-Loughnane, I. Papautsky, J.A. Hagen, *Anal. Chem.* 85 (2013) 11634 – 11642.
- [40] G.G. Lewis, J.S. Robbins, S.T. Phillips, *Anal. Chem.* 85 (2013) 10432 – 10439.
- [41] A.A. Weaver, H. Reiser, T. Barstis, M. Benvenuti, D. Ghosh, M. Hunckler, B. Joy, L. Koenig, K. Raddell, M. Lieberman, *Anal. Chem.* 85 (2013) 5453 – 6460.
- [42] R.S.J. Alkasir, M. Ornatska, S. Andreescu, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9229 – 9737.
- [43] W. Dungchai, Y. Sameenoi, O. Chailapakul, J. Volckens, C.S. Henry, *Analyst* 138 (2013) 6766 – 6773.
- [44] W.W. Yu, I.M. White, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9626 – 9630.
- [45] Y. Chen, H. Cheng, K. Tram, S. Zhang, Y. Zhao, L. Han, Z. Chen, S. Huan, *Analyst* 138 (2013) 2624 – 2631.
- [46] J. Liu, H. Wang, N.E. Manicke, J.M. Lin, R.G. Cooks, Z. Ouyang, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2463 – 2471.
- [47] W. Liu, S. Mao, J. Wua, J. Lin, *Analyst* 138 (2013) 2163 – 2170.
- [48] W. Dungchai, O. Chailapakul, C.S. Henry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5821 – 5826.
- [49] Z. Nie, C.A. Nijhuis, J. Gong, X. Chen, A. Kumachev, A.W. Martinez, M. Narovlyansky, G.M. Whitesides, *Lab Chip* 10 (2010) 477 – 483.
- [50] J. Noiphung, T. Songjaroen, W. Dungchai, C.S. Henry, O. Chailapakul, W. Laiwattanapaisal, *Anal. Chim. Acta* 25 (2013) 39 – 45.
- [51] Z. Nie, F. Deiss, X. Liu, O. Akbulut, G.M. Whitesides, *Lab Chip* 10 (2010) 3163 – 3169.
- [52] R.F. Carvalhal, M.S. Kfoury, M.H.O. Piazzetta, A.L. Gobbi, L.T. Kubota, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1162 – 1165.
- [53] E.J. Maxwell, A.D. Mazzeo, G.M. Whitesides, *MRS Bull.* 38 (2013) 309 – 314.
- [54] X. Li, D.R. Ballerini, W. Shen, *Biomicrofluidics* 6 (2012) 011301-1 – 011301-13.
- [55] R. Lobinski, Z. Marczenko, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 23 (1992) 55 – 111.

- [56] M.G. Mellon, *Anal. Chem.* 21 (1949) 3 – 6.
- [57] C. Rozand, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (2013) DOI 10.1007/s10096-013-1945-2
- [58] W. Wang, W. Wu, W. Wang, J. Zhu, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3896 – 3899.
- [59] N.R. Pollock, J.P. Rolland, S. Kumar, P.D. Beattie, S. Jain, F. Noubary, V.L. Wong, R.A. Pohlmann, U.S. Ryan, G.M. Whitesides, *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 1 – 10.
- [60] T.S. Park, W. Li, K.E. McCracken, J. Yoon, *Lab Chip* 13 (2013) 4832 – 4840.
- [61] G.G. Lewis, J.S. Robbins, S.T. Phillips, *Anal. Chem.* 85 (2013) 10432 – 10439.
- [62] H. Liu, X. Li, R.M. Crooks, *Anal. Chem.* 85 (2013) 4263 – 4267.
- [63] B.J. Toley, B. McKenzie, T. Liang, J.R. Buser, P. Yager, E. Fu, *Anal. Chem* 85 (2013) 11545 – 11552.
- [64] D. Sechi, B. Greer, J. Johnson, N. Hashemi, *Anal. Chem.* 85 (2013) 10733 – 10737.
- [65] K. Scida, B. Li, A.D. Ellington, R.M. Crooks, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9713 – 9720.
- [66] **Metrohm** (<http://www.metrohm.com/com/Produkte2/VA/910.html>) acessado em 17.01.2014.
- [67] **Bio Logic Instruments** (<http://www.bio-logic.info/instruments/pg581/>) acessado em 17.01.2014.
- [68] **Pine instruments** (<http://www.pineinst.com/echem/viewproductpage.asp?pageID=63&productID=47292>) acessado em 17.01.2014.
- [69] M. Li, Y. Li, D. Li, Y. Long, *Anal. Chim. Acta* 734 (2012) 31 – 44.
- [70] V.B. Nascimento, L. Angnes, *Quim. Nova* 21 (1998) 614 – 629.
- [71] B.A. Wring, J.P. Hart, *Anal. Chim. Acta* 231 (1990) 203 – 212.
- [72] J. Noiphung, T. Songjaroen, W. Dungchai, C.S. Henry, O. Chailapakul, W. Laiwattanapaisal, *Anal. Chim. Acta* 788 (2013) 39 – 45.
- [73] E.W. Nery, L.T. Kubota, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7573 – 7595.

- [74] D.D. Liana, B. Raguse, J.J. Gooding, E. Chow, **Sensors** 12 (2012) 11505 – 11526.
- [75] N. Ruecha, R. Rangkupan, N. Rodthongkum, O. Chailapakul, **Biosens. Bioelectron.** 52 (2014) 13 – 19.
- [76] X. Jiang, K. Chen, J. Wang, K. Shao, T. Fu, F. Shao, D. Lu, J. Liang, M.F. Foda, H. Han, **Analyst** 138 (2013) 3388 – 3393.
- [77] L. Li, W. Li, H. Yang, C. Ma, J. Yu, M. Yan, X. Song, **Electrochim. Acta** 120 (2014) 102 – 109.
- [78] W. Li, L. Li, S. Ge, X. Song, L. Ge, M. Yan, J. Yu, **Biosens. Bioelectron.** (2014) DOI: 10.1016/j.bios.2014.01.011.
- [79] S. Ge, W. Liu, L. Ge, M. Yan, J. Yan, J. Huang, J. Yu, **Biosens. Bioelectron.** 49 (2013) 111 – 117.
- [80] H. Ko, J. Lee, Y. Kim, B. Lee, C. Jung, J. Choi, O. Kwon, K. Shin, **Adv. Mater.** (2014) DOI: 10.1002/adma.201305014.
- [81] L. Liu, C.L. Qiu, Q. Chena, S.M. Zhang, **J. Alloys Compd.** 425 (2006) 144 – 148.
- [82] D.L. Robinson, A. Hermans, A.T. Seipel, R.G. Wightman, **Chem. Rev.** 108 (2008) 2554 – 2584.
- [83] A.F. Hoffman, G.A. Gerhardt, **J. Neurochem.** 70 (1998) 179 – 189.
- [84] M. Dijkstra, B. Kamp, J.C. Hoogvliet, W.P.V. Bennekom, **Langmuir** 16 (2000) 3852 – 3857.
- [85] A.J. Bard, L. Falkner, **Electrochemical methods – Fundamental and Applications**; ed. Wiley 2nd, New York, 2001.
- [86] H. Ron, I. Rubinstein, **Langmuir** 10 (1994) 4566 – 4573.
- [87] S.A. Klasner, A.K. Price, K.W. Hoeman, R.S. Wilson, K.J. Bell, C.T. Culbertson, **Anal. Bioanal. Chem.** 397 (2010) 1821 – 1829.
- [88] S.M.Z. Hossain, R.E. Luckham, M.J. McFadden, J.D. Brennan, **Anal. Chem.** 81 (2009) 9055 – 9064.
- [89] S.N. Tan, L. Ge, W. Wang, **Anal. Chem.** 82 (2010) 8844 – 8847.
- [90] D.D. Perrin, **Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution**, Butterworths, London, 1965.
- [91] J.F.C. Junior, **The vitamins – Fundamental aspects in nutrition and health**, 3a. ed, Elsevier academic press, San Diego, 2008.

- [92] **GE Healthcare** (<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/Home/pt/GELifeSciences-BR/>) acessado em 23.01.2013.
- [93] W. Li, H. Zhao, P.R. Teasdale, R. John, S. Zhang, **Anal. Chim. Acta** 464 (2002) 331 – 339.
- [94] N. Kabay, M. Demircioglu, S. Yayli, M. Yuksel, M. Saglam, P.R. Levison, **Sep. Sci. Technol.** 34 (1999) 41 – 51.
- [95] J. Sherma, G. Zweig, **Paper chromatography and electrophoresis**, vol. 2, Academic press, New York, 1971.
- [96] C.H. Collins, G.L. Braga, P.S. Bonato, **Fundamentos de cromatografia**, ed. UNICAMP, Campinas – SP, 2006.
- [97] M.P. Francescato, M. Geat, G. Stel, S. Cauci, **Clin. Chim. Acta.** 413 (2012) 312 – 318.
- [98] H.G. Wahl, **Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.** 23 (2009) 387 – 400.
- [99] P. Wang, L. Ge, M. Yan, X. Song, S. Ge, J. Yu, **Biosens. Bioelectron.** 32 (2012) 238 – 243.
- [100] A. Apilux, W. Dungchai, W. Siangproh, N. Praphairaksit, C.S. Henry, O. Chailapakul, **Anal. Chem.** 82 (2010) 1727 – 1732.
- [101] P.H.P.C. Tavares, P.J.S. Barbeira, **J. Appl. Electrochem.** 38 (2008) 827 – 832.
- [102] N. Kurra, G.U. Kulkarni, **Lab Chip** 13 (2013) 2866 – 2873.
- [103] **Pentel** (<http://www.pentel.com/company/international-locations/>) acessado em 23.01.2013.
- [104] R.L. McCreery, **Chem. Rev.** 108 (2008) 2646 – 2687.
- [105] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P.J. Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernía, A. Costa-García, **Electrochim. Acta** 53 (2008) 3635 – 3642.
- [106] J. Wang, **Analytical Electrochemistry** 3 ed., Wiley, NY, 2006.
- [107] M. Santhiago, P.R. Lima, W.J.R. Santos, A.B. Oliveira, L.T. Kubota, **Electrochim. Acta** 54 (2009) 6609 – 6616.
- [108] N. Dossi, R. Toniolo, A. Pizzariello, E. Carrilho, E. Piccin, S. Battiston, G. Bontempelli, **Lab. Chip.** 12 (2012) 153 – 158.
- [109] J.L. Delaney, C.F. Hogan, J. Tian, W. Shen, **Anal. Chem.** 83 (2011) 1300 – 1306.
- [110] J.E. Baur, **Handbook of Electrochemistry**, cap. 19, pg. 829 – 848, ed. Elsevier, 2007.

- [111] P.N. Bartlett, K.F.E. Pratt, *J. Electroanal. Chem.* 397 (1995) 53 – 60.
- [112] J. Wang, *Chem. Rev.* 108 (2008) 814 – 825.
- [113] K. Kriz, L. Kraft, M. Krook, D. Kriz, *J. Agric. Food. Chem.* 50 (2002) 3419 – 3424.
- [114] R. Nenkova, D. Ivanova, J. Vladimirova, T. Godjevargova, *Sens. Act. B* 148 (2010) 59 – 65.
- [115] D.G. Hall, *Boronic acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis and medicine*, ed. Wiley, Weinhein, 2005.
- [116] L. Hu, S. Han, Z. Liu, S. Parveen, Y. Yuan, G. Xu, *Electrochem. Commun.* 13 (2011) 1536 – 1538.
- [117] G.A. El-sherbeny, A.A. Shindia, M.M.M. Sheriff, *Int. J. Agri. Biol.* 7 (2005) 953 – 958.
- [118] M.R. Andersen, L. Lehmann, J. Nielsen, *Genome Biol.* 10 (2009) R47.1 – 14.
- [119] M.I. Montenegro, M.A. Queirós, J.L. Daschbach, *Microelectrodes: Theory and applications*, v. 197, Kluwer Academic publishers, 1991.
- [120] G. Cui, S.J. Kim, S.H. Choi, H. Nam, G.S. Cha, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1925 – 1929.
- [121] P. Kalimuthu, S.A. John, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 2428 – 2432.
- [122] M.W. Aktar, D. Sengupta, A. Chowdhury, *Interdisc. Toxicol.* 2 (2009) 1 – 12.
- [123] S.E. Manahan, *Fundamentals of environmental chemistry*, CRC press, Boca Raton, 2000.
- [124] D.M. Whitacre, *Reviews of environmental contamination and toxicology*, Springer, New York, 2010.
- [125] R.P. Pohanish, *Sittig's handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens*, Willian Andrew Inc., 2008.
- [126] A. Mehdinia, T.B. Kayyal, A. Jabbari, M.O. Aziz-Zanjani, E. Ziaei, *J. Chromatogr. A* 1283 (2013) 82 – 88.
- [127] S. Paliwal, M. Wales, T. Good, J. Grimsley, J. Wild, A. Simonian, *Anal. Chim. Acta* 596 (2007) 9 – 15.
- [128] H. Zhang, M. Wang, J. Zhao, Z. Shi, *Anal. Methods* 4 (2012) 2177 – 2182.
- [129] A.C. Roy, V.S. Nisha, C. Dhand, M.A. Ali, B.D. Malhotra, *Anal. Chim. Acta* 777 (2013) 63 – 71.

- [130] J. Yan, M. Yan, L. Ge, J. Yu, S. Ge, J. Huang, *Chem. Commun.* 49 (2013) 1383 – 1385.
- [131] M. Winter, *Scan me: everybody's guide to the magical world of QR codes*, Westsong Publishing, Napa, 2011.
- [132] J. Waters, *QR codes for dummies*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2012.
- [134] M. Pontié, G. Thouand, F. Nardi, I. Tapsoba, S. Lherbette, *Electroanal.* 23 (2011) 1579 – 1584.
- [135] E.V. Anslyn, D.A. Dougherty, *Modern physical organic chemistry*, University Science, Mill Valley , 2005.[]
- [136] M. Santhiago, L.T. Kubota, *Sens. Act. B* 177 (2013) 224 – 230.
- [137] **EPA** (<http://nepis.epa.gov>) acessado em 26.01.2014.
- [138] **EPA** (<http://water.epa.gov>) acessado em 26.01.2014
- [139] P. Mulchandani, C.M. Hangartner, Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 523 – 527.
- [140] H. Yin, Y. Zhou, S. Ai, X. Liu, L. Zhu, L. Lu, *Microchim. Acta* 169 (2010) 87 – 92.
- [141] A.C. Roy, V.S. Nisha, C. Dhand, M.A. Ali, B.D. Malhotra, *Anal. Chim. Acta* 777 (2013) 63 – 71.
- [142] A.K.M. Kafi, A. Chen, *Talanta* 79 (2009) 97 – 102.
- [143] A. Arvinte, M. Mahosenaho, M. Pinteala, A. Sesay, V. Virtanen, *Microchim. Acta* 174 (2011) 337 – 343.
- [144] K. Štulík. C. Amatore, K. Holub, V. Mareček, W. Kutner, *Pure Appl. Chem.* 8 (2000) 1483 – 1492.
- [145] A. Schulte, W. Schuhmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 8760 – 8777.
- [146] X. Huang, A.M. O'Mahony, R.G. Compton, *Small* 5 (2009) 776 – 788.
- [147] A.K. Satpati, A.J. Bard, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9498 – 9504.
- [148] S. Bruckenstein, J. Janiszewska, *J. Electroanal. Chem.* 538 (2002) 3 – 12.
- [149] M. Gulppi, S. Griveau, S. Bedioui, J.H. Zagal, *Electrochim. Acta* 46 (2001) 3397 – 3404.

- [150] Z. Galus, ***Fundamentals of Electrochemical Analysis***, ed. Ellis Horwood Press, New York, 1976.
- [151] X. Huang, L. Aldous, A.M. O'Mahony, F.J. del Campo, R.G. Compton, ***Anal. Chem.*** 82 (2010) 5238 – 5245.
- [152] C. Lee, Y. Tan, A.M. Bond, ***Anal. Chem.*** 80 (2008) 3873 – 3881.
- [153] Y. Lin, R. Trouillon, M.I. Svensson, J.D. Keighron, A. Cans, A.G. Ewing, ***Anal. Chem.*** 84 (2012) 2949 – 2954.
- [154] Z. Lin, Y. Takahashi, Y. Kitagawa, T. Umemura, H. Shiku, T. Matsue, ***Anal. Chem.*** 80 (2008) 6830 – 6833.
- [155] R. Kalantari, R. Cantor, H. Chen, G. Yu, J. Janata, M. Josowicz, ***Anal. Chem.*** 82 (2010) 9028 – 9033.
- [156] T.J. Davies, R.G. Compton, ***J. Electroanal. Chem.*** 585 (2005) 63 – 82.
- [157] T.S.S. Dikshith, ***Hazardous Chemicals: Safety Management and Global Regulations***, CRC press, 2013.
- [158] C. Baird, ***Química Ambiental***. 2^a. Ed, Porto Alegre: Bookman, 2002.
- [159] M.L. Richardson, ***Chemistry, Agriculture and the Environment***. Cambridge: Bookcraft, 1991.
- [160] J.A. Maglothin, I.B. Wilson, ***Biochem.*** 13 (1974) 3520 – 3527.
- [161] R.E. Luckham, J.D. Brennan, ***Analyst*** 135 (2010) 2028 – 2035.
- [162] S. Wu, X. Lan, W. Zhao, Y. Li, L. Zhang, H. Wang, M. Han, S. Tao, ***Biosens. Bioelectron.*** 27 (2011) 82 – 87.
- [163] W. Tang, J. Wu, ***Anal. Methods*** 6 (2014) 924 – 929.
- [164] Z. Han, C. Chi, B. Bai, G. Liu, Q. Rao, S. Peng, H. Liu, Z. Zhao, D. Zhang, A. Wu, ***Anal. Chim. Acta*** 720 (2012) 126 – 133.