

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TESE DE DOUTORADO

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS DESCARTÁVEIS PARA ANÁLISES RÁPIDAS

RAFAELA FERNANDA CARVALHAL PASSOS

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

CAMPINAS 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

 P268d
 Passos, Rafaela Fernanda Carvalhal. Desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos descartáveis para análises rápidas / Rafaela Fernanda Carvalhal Passos. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.
 Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.
 Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
 1. Eletrodos descartáveis. 2. Biossensores.
 3. Dispositivos em papel. 4. Cromatografia em papel.
 I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Development of disposable electrochemical devices for rapid analysis

Palavras-chaves em inglês: Disposable gold electrodes, Biosensor, Paper-based devices, Paper chromatography

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota (orientador), Profa. Dra. Lucia Helena Mascaro (DQ-UFSCAR), Profa. Dra. Cláudia Longo (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Fernando Aparecido Sígoli (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Hideko Yamanaka (DQ-UNESP-Araraquara)

Data de defesa: 20/08/2010

iv

A Deus...

À minha filha Maria Eduarda ...

Aos meus pais Maria Ely e Élcio, irmãos Ricardo e Renan e

"in memorian" às avós Ziláh e Maria ...

vi

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lauro T. Kubota, pela confiança, dedicação e estímulo, que com profissionalismo e amizade ensinou-me a enfrentar os desafios e a procurar soluções inteligentes para a realização deste trabalho;

Aos pesquisadores Angelo Luiz Gobbi e Maria Helena Piazetta do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pela colaboração essencial à realização deste trabalho;

À Marta Simão Kfouri e Daiana Suelen Machado pela confiança e profissionalismo;

Aos companheiros presentes nessa fase de aprendizado e estudo;

A todos os funcionários do Instituto de Química que colaboraram em muito para a realização deste trabalho;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Muito obrigada.

viii

Rafaela Fernanda Carvalhal

Data e Local de Nascimento: 22/04/1980, Londrina-Paraná.

1. Formação Acadêmica

Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Analítica Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2003-2005 Título da Dissertação: Desenvolvimento de Sensor Biomimético Empregando Monocamadas Auto-organizadas de Tióis sobre Eletrodos de Ouro Orientador: Lauro Tatsuo Kubota Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Graduação

Química; habilitações: Licenciatura Faculdades Osvaldo Cruz - FOC, 2006

Graduação

Química; habilitações: Bacharelado e Tecnológica Universidade Estadual de Londrina - UEL, 1999-2003 Título: Desenvolvimento de Sistema Digestor para Tecido Vegetal em Forno de Microondas Convencional Orientador: Mario Miyazawa Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2. Produção Científica

2.1. Publicações em Periódicos

Carvalhal, R. F., Machado, D.S., Mendes, R.K., Almeida, A.L.J., Moreira, N.H., Piazetta, M.H.O., Gobbi, A.L., Kubota, L.T. Development of a disposable amperometric biosensor for salicylate based on a plastic electrochemical microcell. Biosensors & Bioelectronics, v.25, p.2200 - 2204, 2010.

Carvalhal, R. F., Kfouri, M. S., Gobbi, A. L., Piazetta, M. H. O., Kubota, L. T. Electrochemical Detection in a Paper-Based Separation Device. Analytical Chemistry, v.82, p.1162 - 1165, 2010.

Mendes, R. K., Ferreira, D. C. M., Carvalhal, R. F., Peroni, L. A., Stach-Machado, D. R., Kubota, L. T. Development of an Electrochemical Immunosensor for Phakopsora pachyrhizi Detection. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.20, p.795 - 801, 2009.

Vidotti, M., Cerri, Carolina D., Carvalhal, R. F., Dias, J. C., Torresi, S. I. C., Kubota, L. T. Nickel hydroxide electrodes as amperometric detectors for carbohydrates in flow injection analysis and liquid chromatography. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, v.636, p.18 - 23, 2009.

Mendes, R. K., Carvalhal, R. F., Stach-Machado, D. R., Kubota, L. T. Surface plasmon resonance immunosensor for early diagnosis of Asian rust on soybean leaves. Biosensors & Bioelectronics, v.24, p.2483 - 2487, 2009.

Mendes, R. K., Carvalhal, R. F., Kubota, L. T. Effects of Different Self-assembled Monolayers on Enzyme Immobilization Procedures in Peroxidase Based Biosensor Development. Journal of Electroanalytical Chemistry, v.612, p.164 - 172, 2008.

Carvalhal, R. F., Mendes, R. K., Kubota, L. T. SAM Effects on Riboflavin: A Biomimetic Catalyst for Glucose Oxidation. International Journal of Electrochemical Science, v.2, p.973 - 985, 2007.

Possari, R., Carvalhal, R. F., Mendes, R. K., Kubota, L. T. Electrochemical Detection of cysteine in a flow system based on reductive desorption of thiols from gold. Analytica Chimica Acta, v.575, p.172 - 179, 2006.

Carvalhal, R. F., Freire, R. S., Kubota, L. T. Polycrystaline Gold Electrodes: A Comparative Study Of Pretreatment Procedures Used For Cleaning And Thiol Self-Assembly Monolayer Formation. Electroanalysis, v.17, p.1251 - 1259, 2005.

2.2. Resumo do trabalho científico apresentado em congresso

Kfouri, M. S., Carvalhal, R.F., Piazetta, M. H. O., Gobbi, A. L., Kubota, L. T. Desenvolvimento de um Biossensor Amperométrico Descartável para Lactato utilizando Papel em uma Microcélula Eletroquímica Plástica, 33 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia. A Química Construindo um Mundo Melhor, 2010.

Mendes, R. K., Carvalhal, R. F., Ferreira, D. C. M., Stach-Machado, D. R., Kubota, L. T. Desenvolvimento de Imunossensor para o diagnóstico precoce da ferrugem da soja usando ressonancia de plásmon de superfície como sistema de detecção,15º Encontro Nacional de Química Analítica, 2009, Salvador. 15º Encontro Nacional de Química Analítica, 2009.

Vidotti, M., Mendes, R. K., Torresi, S. I. C., Carvalhal, R. F., Kubota, L. T. Comportamento da Ressonância de Plásmon de Superfície de Filmes Finos de Hidróxido de Níquel nos Processos Eletroquímicos na Presença de Carboidrato, XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Fortaleza, 2009.

Carvalhal, R. F., Gobbi, A. L., Machado, D. S., Mendes, R. K., Kubota, L. T. Development of an amperometric biosensor for salicylate based on screen-printed electrodes, XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Fortaleza, 2009.

Machado, D. S., Carvalhal, R. F., Kubota, L. T. Desenvolvimento de um biossensor descartável para salicilato, XVI Congresso Interno de Iniciação Científica UNICAMP/2008, 2008, Campinas. XVI Congresso Interno de Iniciação Científica UNICAMP/2008, 2008.

Machado, D. S., Carvalhal, R. F., Kubota, L. T. Investigação sobre a Interferência de íons iodeto na formação de monocamadas auto-organizadas de tióis sobre eletrodos de ouro, 60^ª Reunião Anual de SBPC, 2008, Campinas. Energia, Ambiente e Tecnologia, 2008. v.1. p.79.

Carvalhal, R. F., Mendes, R. K., Kubota, L. T. SAM Effects on Riboflavin: A biomimetic Catalyst for Glucose Oxidation In: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Águas de Lindóia, 2007. (Apresentação oral, 10 min)

Carvalhal, R. F., Sotomayor, M. D. P. T., Mendes, R. K., Freire, R. S., Kubota, L. T. Determinação de Hidroquinona usando um sensor a base de um catalisador biomimético à tirosinase, XVII Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica, La Plata, 2006.

Mendes, R. K., Carvalhal, R. F., Kubota, L. T. Efeitos da Forma da Imobilização da enzima peroxidase em um biossensor para determinação de peróxido de hidrogênio usando eletrodos de ouro modificados com monocamadas

auto-organizadas, XVII Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica, La Plata, 2006. (Apresentação oral, 15 min)

Mendes, R. K., Carvalhal, R. F., Kubota, L. T. A comparative electrochemical and SPR Studies of Different Thiols self-assembled monolayers on Gold, XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Londrina, 2005.

Mendes, R. K., Carvalhal, R. F., Kubota, L. T. A comparative electrochemical and SPR Studies of Different Thiols self-assembled monolayers on Gold, XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Londrina, 2005. (Apresentação oral, 10 min)

Carvalhal, R. F., Possari, R., Mendes, R. K., Kubota, L. T. Adsorption/re-organization studies of self-assembled monolayers on polycrystalline gold by electrochemical reductive, XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Londrina, 2005. (Apresentação oral, 10 min)

Carvalhal, R. F., Possari, R., Mendes, R. K., Kubota, L. T. Electrochemical Detection of cysteine in a Flow system based on the reductive desorption of thiols from gold, XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Londrina, 2005.

Emprego do complexo [(phen)₂Cu-OH-Cu(phen)₂](ClO₄)₃ como catalisador biomimético à *tirosinase* no desenvolvimento de um sensor, Carvalhal, R. F., Possari, R., Freire, R. S., Kubota,L.T., 28^ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas. Anais da reunião anual da SBQ, 2005.

Eletrodos de ouro policristalino: estudo comparativo de técnicas de pré-tratamento de superfície para limpeza de eletrodos, Carvalhal, R. F., Freire, R. S., Kubota, L. T., 27^ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador. Anais da 27^ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004.

Redução dessortiva de monocamadas auto-organizadas de tióis em eletrodos de ouro policristalino, Carvalhal, R. F., Freire, R. S., Kubota, L. T., XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2004, Teresópolis. Anais do XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2004. (Apresentação oral, 10 min)

Modelagem do comportamento voltamétrico de um eletrodo de ouro quimicamente modificado com MPA e Cloreto de dipiridil cobre(II), Braga, J. W. B. B., Carvalhal, R. F., Poppi, R. J., Bruns, R. E., Freire, R. S., Kubota, L. T., 3ª Escola de Verão em Químiometria na PUC-Rio, 2004, Rio de Janeiro. CD da 3ª Escola de Verão em Químiometria na PUC-Rio, 2004.

Sensor biomimético para ácido ascórbico preparado com SAM de MPA e complexo de cobre(II) sobre eletrodo de ouro policristalino, Carvalhal, R. F., Sotomayor, M. D. P. T., Kubota, L. T., Freire, R. S. XII Encontro de Química da Região Sul, 2004, Guarapuava. Anais do XII Encontro de Química da Região Sul, 2004.

Digestão de Tecidos Vegetais em Forno de Microondas Doméstico, Carvalhal, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003, Poços de Caldas. Anais da reunião anual da SBQ, 2003.

Desenvolvimento de sistema digestor para tecido vegetal em forno de microondas, Carvalhal, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., X Seminário do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC, 2001, Londrina. Anais do X Seminário do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC. (Apresentação oral, 15 min.)

Comparação de métodos na determinação de nitrato do tecido vegetal, Carvalhal, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., IX Seminário do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC, 2001, Londrina. Anais do IX Seminário do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC. (Apresentação oral, 15 min.)

Semimicro digestão de amostras de tecido vegetal em forno de microondas doméstico, Grassi, V., Carvalhal, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A. 11º Encontro Nacional de Química Analítica, 2001, Campinas. Anais do 11º Encontro Nacional de Química Analítica.

Comparação de redutores na determinação de nitrato do tecido vegetal, Carvalhal, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., XXVIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 2001, Londrina. Anais do XXVIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo.

Comparação de métodos na determinação de nitrato do tecido vegetal, Carvalhal, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., IX Encontro de Química da Região Sul, 2001, Londrina. Anais do IX Encontro de Química da Região Sul.

Teor de nitrato nas folhas de alface produzidas em diferentes métodos de cultivo, Carvalhal, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., IX Encontro de Química da Região Sul, 2001, Londrina. Anais do IX Encontro de Química da Região Sul.

Preparo de amostras para determinação de metais pesados disponíveis do solo, Miyazawa, M., Carvalhal, R. F., Oliveira, E. L., Pavan, M. A, 23ª Reunião Brasileira de Manejo e Conservação do Solo e de Água, 2000, Ilhéus. Anais da 23ª Reunião Brasileira de Manejo e Conservação do Solo e de Água.

2.3. Prêmios

Melhor Tema Livre - Mostra de Projetos de Iniciação Científica PIBIC / UNICAMP, Agência de Inovação da Unicamp – INOVA, 2008. Título do Trabalho: Desenvolvimento de um biossensor descartável para salicilato.

2.4. Estágio em Pesquisa – Iniciação Científica

Comparação de Métodos na Determinação de Nitrato do Tecido Vegetal, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, 110488/01-6, Instituto Agronômico do Paraná, Mario Miyazawa, 03/2001 a 02/2002.

Desenvolvimento de Sistema Digestor para Tecido Vegetal em Forno de Microondas, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, 110488/01-6, Instituto Agronômico do Paraná, Mario Miyazawa, 03/2002 a 02/2003.

APRESENTAÇÃO

A motivação deste trabalho insere-se no desafio de desenvolver dispositivos eletroquímicos para a realização de análises rápidas para a determinação de compostos de interesse clínico. Dois sistemas eletroanalíticos foram desenvolvidos: um biossensor descartável para salicilato e a associação da cromatografia em papel com a detecção eletroquímica na confecção de uma ferramenta analítica para separação e detecção de ácido úrico e ácido ascórbico.

Este trabalho foi dividido em capítulos para melhor exposição, discussão e compreenção dos conteúdos pelo leitor. No primeiro capítulo, será apresentada uma introdução a respeito de sensores eletroquímicos, biossensores descartáveis e dispositivos eletroanalíticos para análises rápidas.

No segundo capítulo, será descrita a construção de eletrodos de filmes finos de ouro sobre poliéster e papel. No terceiro capítulo, será apresentado o desenvolvimento de um biossensor descartável para salicilato empregando a célula eletroquímica plástica previamente descrita. Finalmente, no quarto capítulo, o desenvolvimento de um dispositivo de separação em papel integrado a detecção eletroquímica será o foco das discussões que possibilitaram a separação e a análise de ácido úrico e ascórbico presentes em mistura.

Os últimos capítulos trazem uma conclusão geral e as perspectivas futuras do trabalho.

xiv

RESUMO

"DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS DESCARTÁVEIS

PARA ANÁLISES RÁPIDAS"

Autor: Rafaela Fernanda Carvalhal Passos

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Palavras chave: Eletrodos descartáveis, biossensores, dispositivos em papel, cromatografia em papel

Este trabalho apresenta o esforco dispendido na construção e caracterização de transdutores eletroquímicos sobre poliéster e papel, e também demonstra o emprego destas células eletroquímicas descartáveis no desenvolvimento de um biossensor para análises rápidas de salicilato em sangue, bem como a criação de um dispositivo de separação associado à detecção eletroquímica em papel. Cada célula eletroquímica é composta por um conjunto de três eletrodos de filmes finos construídos em ouro sobre poliéster ou papel cromatográfico por meio das técnicas de *sputtering* e *electron-beam*, respectivamente. Foi realizada a caracterização voltamétrica dos sistemas eletródicos empregando sondas redox como hexacianoferrato(II) de potássio, hexacianoferrato(III) de potássio e ácido ferrocenomonocarboxílico em meio eletrolítico, a fim de verificar a eletroatividade dos mesmos. Foi possível verificar que mesmo apresentando maior área eletroativa, os eletrodos de filmes finos construídos sobre papel apresentam uma menor densidade de corrente para as sondas redox em comparação com a célula eletroquímica construída em poliéster. Isto se deve à retenção das espécies eletroativas na fibra de celulose, fato que diminui a disponibilidade da espécie na superfície eletródica. Foi desenvolvido um biossensor amperométrico para a determinação de salicilato em sangue. O biossensor se baseia no emprego da enzima Salicilato hidroxilase imobilizada sobre a célula eletroquímica plástica. As condições experimentais otimizadas consistem em utilizar uma solução eletrolítica de tampão fosfato em pH 7.6 com 0.5 mmol L⁻¹ de NADH e 300 mV vs. Au como potencial aplicado durante as medidas. O biossensor apresentou adeguada sensibilidade (97.4 nA/mmol L⁻¹ de salicilato) e faixa linear de resposta para o analito (1.25 10^{-4} to 1.0 10^{-3} mol L⁻¹). O desempenho do biossensor foi verificado na determinação de salicilato em amostras de sangue dopadas com o analito e os resultados foram estatisticamente equivalentes àqueles obtidos com o método espectrofotométrico de Trinder em um nível de confiança de 95%. O dispositivo de separação cromatográfica em papel associado à detecção eletroquímica foi desenvolvido empregando a célula eletroquímica plástica e a célula eletroquímica sobre papel. O desempenho dos dispositivos foi avaliado na separação e quantificação de ácido úrico e áscórbico presentes em mistura. O método desenvolvido é uma alternativa para a determinação de compostos eletroativos em que o baixo custo e a simplicidade são essenciais.

xvi

ABSTRACT

"DEVELOPMENT OF DISPOSABLE ELECTROCHEMICAL DEVICES FOR RAPID ANALYSIS"

Author: Rafaela Fernanda Carvalhal Passos

Supervisor: PhD Lauro Tatsuo Kubota

Keywords: disposable electrodes, biosensors, paper-based devices, paper chromatography

This paper presents the efforts to the construction and characterization of electrochemical transducers on polyester and paper, and also demonstrates the use of these disposable electrochemical cells in the development of a biosensor for rapid analysis of salicylate in blood as well as the creation of a separation device associated electrochemical detection on paper. Each electrochemical cell consists of a set of three electrodes made of gold thin films on polyester or chromatographic paper using and electron-beam techniques, respectively. The electrochemical sputterina characterization of the systems with redox probes as potassium hexacyanoferrate(II), potassium hexacyanoferrate(III) and ferrocene monocarboxylic acid was performed in the electrolyte solution in order to evaluate the electroactivity of them. It was verified that even with higher electroactive area, the electrodes of thin films built on paper have a lower current density for the redox probes in comparison with the electrochemical cell constructed on polyester. This is due to retention of electroactive species in the cellulose fiber, a fact that reduces the availability of those species on the transducer surface. We developed an amperometric biosensor for the determination of salicylate in blood. The biosensor is based on the use of the salicylate hydroxylase enzyme immobilized on plastic electrochemical cell. The determined optimized experimental conditions are: an electrolyte solution of phosphate buffer at pH 7.6 with 0.5 mmol L^{-1} of NADH and 300 mV vs. Au as the applied potential during the measurements. The biosensor showed adequate sensitivity (97.4 nA / mmol L⁻¹ salicylate) and linear response range for the analyte $(1.25 \ 10^{-4} \text{ to } 1.0 \ 10^{-3} \text{ mol } \text{L}^{-1})$. The performance of the biosensor was found in the determination of salicylate in blood samples spiked with the analyte and the results were statistically equivalent to those obtained with the Trinder's spectrophotometric method, with a 95% confidence level. Prototypes of microfluidic paper-based separation devices with amperometric detection were developed and evaluated. The chromatographic separation on paper associated with electrochemical detection was developed using the plastic electrochemical cell and the gold electrochemical cell on paper. The performance of both devices was evaluated for separation and quantification of uric acid and ascorbic acid presented in the mixtures. The method is an alternative for the determination of electroactive compounds when low cost and simplicity are essential.

xviii

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURASx	xiii
ÍNDICE DE ESQUEMASx	xvi
ÍNDICE DE TABELASx	xvii
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOSxx	viii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO e OBJETIVOS I.1 Sensores Eletroquímicos I.1.1 Biossensores amperométricos	1 3 7
I.2 Eletrodos Descartáveis I.2.1 Fabricação de eletrodos descartáveis	12 14
 I.3 Análises Rápidas no Contexto do Diagnóstico Clínico I.3.1 Análises rápidas com biossensores amperométricos I.3.2 Análises rápidas com dispositivos eletroanalíticos sobre papel 	20 23 27
I.4 Objetivos	31
CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DESCARTÁVEIS EM OURO II.1 Resumo	. 33 35
II.2 Introdução	35
II.3 Metodologia Experimental II.3.1 Equipamentos e reagentes	36 36

II.3.2 Protocolo de manufatura da célula eletroquímica plástica: os ele	trodos
descartáveis de Titânio-Ouro sobre poliéster	37
II.3.3 Protocolo de manufatura da célula eletroquímica em papel: os ele	trodos
descartáveis de Ouro sobre papel	39
II.3.4 Avaliação do sistema de referência da célula eletroquímica plástica	40
II.3.5 Determinação da área eletroquímica superficial dos eletrodos de ouro	41
II.3.6 Perfil Eletroquímico de sondas redox sob eletrodos de ouro	41
II.4 Resultados e Discussão	42
II.4.1 Avaliação da Célula eletroquímica plástica	42
II.4.1.1 Avaliação do pseudo-eletrodo de referência	43
II.4.1.2 Caracterização voltamétrica da célula eletroquímica plástica	44
II.4.2 Avaliação da Célula eletroquímica em papel	46
II.4.2.1 Caracterização voltamétrica da célula eletroquímica em papel	46
II.4.3 Rugosidade das Células eletroquímicas descartáveis	51
II.4.4 Imagens das células eletroquímicas descartáveis	52
II.5 Conclusão Parcial	53
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSEN	SOR
AMPEROMÉTRICO DESCARTÁVEL PARA A DETERMINAÇÃO	DE
	55
III.1 Resumo	57
III.2 Introdução	57
III.3 Metodologia Experimental	57
III.3.1 Equipamentos	57
III.3.2 Reagentes	58
III.3.3 Construção da interface de reconhecimento	54
III.3.3.1 Efeito da Concentração de glutaraldeído	59
III.3.3.2 Efeito da Concentração de enzima	59
III.3.3.3 Efeito da Concentração de tampão	59
III.3.4 Caracterização eletroquímica da interface de reconhecimento	60

XX

III.3.4.1 Avaliação voltamétrica da interface de reconhecimento	60
III.3.4.2 Efeito do potencial aplicado na detecção amperométrica	60
III.3.4.3 Efeito do pH da solução eletrolítica	60
III.3.4.4 Efeito da concentração e do tipo do eletrólito de suporte	60
III.3.4.5 Efeito da concentração de NADH	61
III.3.5 Determinação de salicilato em sangue	61
III.3.5.1 Curva analítica para salicilato em eletrólito de suporte	61
III.3.5.2 Efeito da matriz complexa na resposta do biossensor	61
III.3.5.3 Protocolo de análise de salicilato em sangue emprega	ndo o
biossensor	62
III.3.5.4 Preparo de soluções e dopagem das amostras de sangue	63
III.3.5.5 Análise de salicilato em sangue empregando o método de Trin	der.63
III.4 Resultados e Discussão	64
III.4.1 Caracterização eletroquímica da interface de reconhecimento	64
III.4.2 Desempenho do biossensor na determinação de salicilato em sangue	72
III.5 Conclusão Parcial	76
CAPÍTULO IV – DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO	DE
SEPARAÇÃO EM PAPEL ASSOCIADO À DETEC	ÇÃO
	, 77
	70
IV.I Resumo	79
IV.2 Introdução	79
IV.3 Metodologia Experimental	80
IV.3.1 Equipamentos	80
IV.3.2 Reagentes	80
IV.3.3 Construção do dispositivo de separação	81
IV.3.4 Preparo de soluções	82
IV.3.5 Otimização do processo de separação	82
IV.3.5.1 Avaliação voltamétrica de Ácido úrico e Ácido Ascórbico sobre	а
célula eletroquímica plástica	82

xxi

IV.3.5.2 Efeito do pH do eluente na eficiência de separação8	3
IV.3.5.3 Efeito da concentração do eluente8	33
V.3.5.4 Efeito do comprimento da fase estacionária8	3
IV.3.5.5 Curva analítica para Ácido úrico e Ácido ascórbico8	3
IV.4 Resultados e Discussão8	3
IV.4.1 Dispositivo de separação e detecção em papel empregando a célu	ıla
eletroquímica plástica	33
IV.4.2 Dispositivo de separação e detecção em papel empregando a célu	ıla
eletroquímica em papel9	0
IV.5 Conclusão Parcial) 2
	~
CAPITULO V – CONCLUSOES GERAIS	3
CAPÍTULO VI - PERSPECTIVAS FUTURAS	7
	1
	.
VI.2 Manuscrito9	9

xxii

05
(

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Voltamograma cíclico da célula eletroquímica descartável (área do eletrodo de trabalho: 1,50 mm²) frente a dois diferentes sistemas de referência: eletrodo de calomelano saturado (SCE, do inglês saturated calomel electrode) e eletrodo de Au em solução contendo a sonda molecular [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ (5 mmol L⁻¹) em KNO₃ (0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0), 50 mV s⁻¹. Figura Inserida: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura da superfície dos eletrodos de ouro (500.000 X, 20 kV).

Figura 2. (a) Voltamograma cíclico da célula eletroquímica descartável em $[Fe(CN)_6]^{4-}$ / $[Fe(CN)_6]^{3-}$ a 5,0 mmol L⁻¹ em KNO₃ (0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0) em várias velocidades de varredura: 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mV/s. Área do eletrodo de trabalho: 1,50 mm². (b) gráfico da corrente de pico anódica (**•**) e catódica (\circ) versus a raiz da velocidade de varredura (v^{1/2}) para os experimentos realizados em (a). As linhas pontilhadas são regressões lineares para cada conjunto de pontos.

Figura 3. (a) Voltamograma cíclico da célula eletroquímica descartável em papel em 1,0 mmol L⁻¹ ácido ferrocenomonocarboxílico em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0) em 50 mV s⁻¹. Área do eletrodo de trabalho em papel: 2,5 mm². (-----) Célula eletroquímica umidecida por ação da capilaridade do papel sob a solução eletrolítica. (- - -) Célula eletroquímica em papel parcialmente imersa em solução eletrolítica.

Figura 4. (a) Voltamograma cíclico da célula eletroquímica descartável em papel em 1,0 mmol L⁻¹ de FeCp₂COOH em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0, 50 mV/s); (a') Voltamogramas cíclicos da célula eletroquímica descartável em papel em 1,0 mmol L⁻¹ de FeCp₂COOH em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0) em várias velocidades de varredura: 20, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mV/s, sendo que o gráfico apresenta a densidade de corrente de pico anódica (•) versus a raiz da velocidade de varredura (v^{1/2}) e as linhas pontilhadas são regressões lineares para cada conjunto de pontos. (b) Voltamograma cíclico da célula eletroquímica descartável em poliéster nas mesmas condições experimentais de (a); (b') Voltamogramas cíclicos da célula eletroquímica descartável em poliéster nas mesmas condições experimentais de corrente representada por J.

Figura 5. Resposta relativa referente à magnitude de corrente anódica obtida para a célula eletroquímica descartável em papel em 1,0 mmol L⁻¹ ácido ferrocenomonocarboxílico em diversos eletrólitos (0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0 a 50 mV s⁻¹). Eletrólitos estudados: KNO₃, tampão fosfato, PIPES e TRIS. Área do eletrodo de trabalho: 1,50 mm². Gráfico inserido: Estudo de pH realizado em Tampão fosfato em três diferentes pH: 6,0, 7,0 e 8,0.

Figura 6. Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro com pico de redução de óxido de ouro em destaque. Eletrodo de ouro policristalino (gráfico superior), eletrodo de ouro depositado sobre poliéster (gráfico intermediário), eletrodo de ouro em papel (gráfico inferior). Condições experimentais: Tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0, 50 mV/s. A

medida realizada com o eletrodo de ouro policristalino empregou um eletrodo de calomelano saturado e um eletrodo auxiliar de platina.

Figura 7. Imagem da célula eletroquímica construída em poliéster. A área eletroativa dos eletrodos é delimitada por uma fita adesiva/isolante (*Fita Mágica[®], 810 Scotch, 3M*).

Figura 8. Imagem da célula eletroquímica construída em papel. A área eletroativa dos eletrodos é delimitada pelas trilhas de fotorresiste FUTUREX construídas por silk-screen.

Figura 9. Perfil voltamétrico da célula eletroquímica modificada com a interface de reconhecimento nas condições otimizadas. Varreduras anódicas foram registradas sob várias adições de salicilato de sódio sobre a superfície sensora. O gráfico inserido plota a corrente de pico anódica *versus* a concentração de salicilato de sódio presente em solução. Condições experimentais: Tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6, 20 mV s⁻¹, 1,0 mmol L⁻¹ de NADH em solução.

Figura 10. Efeito do potencial aplicado sobre a resposta amperométrica do biossensor. Condições experimentais: 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio em 1,0 mmol L⁻¹ de NADH, tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6 . Os sinais amperométricos do biossensor na ausência do analito foram omitidos a fim de descomplicar a apresentação da figura. Gráfico inserido: variação de corrente obtida com o biossensor de acordo com o potencial aplicado, as medidas foram realizadas aos 40 segundos após o inicio do registro amperométrico.

Figura 11. Efeito do pH na resposta amperométrica do biossensor. Condições experimentais: 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio em 1,0 mmol L⁻¹ de NADH, tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹. O potencial aplicado foi 300 mV vs. Au. Legenda: (a) corrente amperométrica na presença de salicilato; (b) corrente amperométrica na ausência do analito. Gráfico inserido: Respostas relativas à máxima variação de corrente obtida no estudo. Variações de corrente encontradas com o biossensor em diferentes potenciais hidrogeniônicos na ausência e presença do analito em 40 s.

Figura 12. Influência da quantidade de NADH na resposta amperométrica do biossensor. Condições experimentais: 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio em concentrações de NADH de 1,0 10⁻⁴ a 1,0 10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6. O potencial aplicado foi 300 mV vs. Au.

Figura 13. Efeito do tipo de eletrólito ou tampão na resposta amperométrica do biossensor. Condições experimentais: 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio em 0,5 mmol L⁻¹ de NADH em 0,2 mol L⁻¹ do eletrólito ou tampão em questão, pH 7,6. O potencial aplicado foi 300 mV vs. Au. Figura inserida: Efeito da concentração de tampão fosfato na resposta amperométrica do biossensor.

Figura 14. Calibração do biossensor por adição de padrão de salicilato em amostra de sangue capilar. Condições experimentais: meio contendo 0,5 mmol L⁻¹ of NADH em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato, pH 7,6, potencial aplicado de 300 mV *vs.* Au em diferentes concentrações de salicilato.

Figura 15. Perfil voltamétrico da célula eletroquímica plástica na ausência e presença de 0,25 mmol L⁻¹ de ácido úrico (gráfico superior) e na ausência e presença de 0,25 mmol L⁻¹ de ácido ascórbico. Varreduras anódicas foram registradas a 50 mV s⁻¹ em tampão acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 4,5.

Figura 16. Desempenho do dispositivo na separação e detecção de ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (UA). Amostras: A: eluente (0,10 mol L⁻¹ de tampão acetato, pH 4,5); B: 0,10 mmol L⁻¹ de UA preparado eluente; C: 0,10 mmol L⁻¹ de AA preparado em eluente e D: 0,10 mmol L⁻¹ de AA e UA diluídos em eluente. Alíquota de amostra: 2 μ L de solução amostral depositada sobre o papel. Potencial aplicado: 400 mV vs. Au.

Figura 17. Efeito do pH do eluente na eficiência de separação de misturas contendo ácido ascórbico e ácido úrico. Condições experimentais: 0,4 mmol L⁻¹ de ácido ascórbico e ácido úrico sendo que 2 μ L da mistura foi adicionado ao papel. Potencial aplicado: 400 mV vs. Au. Eluente: 0,10 mol L⁻¹ de tampão acetato de sódio em diferentes potenciais hidrogeniônicos.

Figura 18. Cronoamperografias do ácido ascórbico (AA) e do ácido úrico (UA) em misturas contendo diferentes concentrações de ambos compostos na faixa de concentração de 0,05 a 0,4 mmol L⁻¹. Gráficos de Δ i (altura do pico) *versus* a concentração de AA e UA estão inseridos. Alíquotas de amostra: 2 µL adicionadas no papel. Potencial aplicado: 400 mV vs. Au.

Figura 19. Desempenho do dispositivo na separação de ácido ascórbico e ácido úrico empregando a célula eletroquímica em papel com trilha construídas em parafina. Eluente: 0,10 mol L⁻¹ de tampão acetato, pH 4,5; Alíquota de amostra: 1 µL de solução amostral depositada sobre o papel contendo 0,20 mmol L⁻¹ de AA e UA diluídos em eluente. Potencial aplicado: 400 mV vs. Au; Largura da fase estacionária: 2,0 mm, Área do eletrodo de trabalho: 1,0 mm². Figura inserida: Gráfico plotado entre o tempo de retenção observado para o Ácido Úrico e a espessura da fase estacionária de papel.

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Principais categorias dos elementos de reconhecimento molecular empregados em biossensores e os principais modos de transdução de energia são indicados.

Esquema 2. Diagrama cíclico do mecanismo de resposta de um biossensor de segunda e terceira geração.

Esquema 3. Classificação dos biossensores e sensores amperométricos de acordo com o uso. Ilustração superior: exemplo de aplicação e ilustração inferior: perfil da resposta amperométrica obtida com o dispositivo.

Esquema 4. Etapas essenciais na fabricação de eletrodos descartáveis de filmes finos e espessos de ouro. Cada linha colorida representa um protocolo de fabricação.

Esquema 5. Representação esquemática do processo fotolitográfico para fotoresistes positivos e negativos.

Esquema 6. Fluxograma simplificado de análises clínicas por meio de laboratórios centralizados em relação ao diagnóstico do tipo point-of-care.

Esquema 7. Representação esquemática simplificada do processo fotolitográfico utilizado na construção da célula eletroquímica descartável. Imagem inserida dos eletrodos construídos para estudar a relação de área entre eletrodo auxiliar e trabalho.

Esquema 8. Descrição da célula eletroquímica construída em papel onde a área eletroativa dos eletrodos é delimitada pelas trilhas de fotorresiste construídas por silk-screen.

Esquema 9. Descrição do protocolo utilizado para a determinação de salicilato em sangue empregando o biossensor desenvolvido. Legenda: (a) amperograma obtido na preseça de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,6 e 0,5 mmol L⁻¹ de NADH; (b) amperograma obtido na presença do tampão descrito em (a) adido de 5,0 μ L de amostra de sangue; (c) amperograma obtido na presença da solução descrita em (b) acrecido de 5,0 μ L de solução padrão de salicilato de sódio 2,0 mmol L⁻¹. Resposta amperométrica obtida aplicando 300 mV *vs.* Au.

Esquema 10. Representação esquemática do mecanismo proposto para o biossensor para salicilato por Kubota e colaboradores (adaptado da referência [**Error! Reference source not found.**]).

xxvii

ÍNDICE DE TABELAS

célula eletroquímica plástica e suas dimensões.

Tabela 1. Exemplos de biossensores amperométricos descartáveis descritos na literatura desenvolvidos para a realização de análises clínicas.

Tabela 2. Dispositivos eletroanalíticos construídos sobre papel descritos na literatura.

Tabela 3. Caracterização voltamétrica da célula eletroquímica descartável construída com o sistema poliéster/Ti/Au. Condições experimentais: 5,0 mmol $Fe(CN)_6$]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ em 0,1 mol L⁻¹ KNO₃, pH 7,0.

Tabela 4. Análise de salicilato em amostras de sangue. Teste de recuperação e comparação de métodos entre o biossensor e a análise espectrofotométrica de salicilato em sangue.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ΔE_p	variação de potencial entre os picos anódico e catódico.
µPAD*	Dispositivos microfluídicos de análise em papel, do inglês "microfluidic paper-
	based analytical devices"
µPSD*	Dispositivos microfluídicos de separação em papel, do inglês "microfluidic paper-
	based separation devices"
AA	ácido ascórbico
BSA*	Albumina de soro bovino, do inglês "albumina de soro bovino"
CD-R*	Discos compactos graváveis, do inglês "compact disc- recordable"
CDTRODO	Eletrodos construídos com CD-R
CE*	Eletrodo auxiliar, do inglês "counter electrode"
DC	Corrente direta
DIN	Tipo específico de conector eletrônico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SCE*	eletrodo de calomelano saturado, do inglês "saturated calomel electrode"
EDS*	Espectroscopia de energia dispersiva, do inglês "energy dispersive
	spectroscopy"
E⁰	Potencial formal
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
ESA*	Área eletroquímica superficial, do inglês "electrochemical surface área"
FeCp ₂ COOH	Ácido Ferrocenomonocarboxílico
GNP*	Nanopartículas de ouro, do inglês "gold nanoparticles"
HEPES*	ácido n-[2-hidroxietil]piperazina-n-'2-etanosulfonico, do inglês, (n-[2-
	hydroxyethyl] piperazine-n-'2-ethanesulfonic acid]
HIV*	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês "Human Immunodeficiency Virus"
HPLC*	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês "high-performance liquid
	chromatography"
I _{pa}	corrente de pico anódico
I _{pc}	corrente de pico catódico
ITO*	Óxido de índio-estanho, do inglês indiun-tin oxide
IUPAC*	União internacional de química pura e aplicada, do inglês International Union of

	Pure and Applied Chemistry
LD	limite de detecção
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Sincrotron
min.	minuto
NADH*	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, do inglês "Nicotinamide adenine dinucleotide"
PA	para analise
PDMS*	Polidimetilsiloxano, do inglês "polydimethylsiloxane"
PIPES *	ácido piperazina –1,4bis(2-ethanosulfônico), do inglês, piperazine 1,4bis(2-
	ethanesulfonic acid]
POCT*	Análise rápidas, do inglês "point-of-care testing"
PVC	Cloreto de polivinila
Qóxido de Au	Carga relacionada à redução de óxidos de ouro presentes na superfície
	eletródica
Q _{Std}	Carga de referencia relacionada a redução de oxigênio sobre ouro policristalino
R	Coeficiente de correlação
RAIRS*	Espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho, do inglês "reflection
	absorption infra-red spectroscopy"
RE*	Eletrodo de referência, do inglês "reference electrode"
RF	Rádio-frequência
RSD*	Desvio padrão relativo, do inglês "relative standard deviation"
S	Devio padrão
TED	Transferência Eletrônica Direta
TRIS*	tris(hidroxi metil) amino metano, do inglês, tris(hydroxymethyl)aminomethane
UA*	Ácido úrico, do inglês "Uric Acid"
WE*	Eletrodo indicador, do inglês "working electrode"

*As siglas de tradição internacional foram mantidas em inglês.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

_____2

I.1 Sensores eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos compreendem uma face da Química Analítica para a qual, desde o seu nascimento, convergem tecnologias avançadas de distintas áreas do conhecimento. Nos últimos anos, a ciência dos materiais colocou em evidência nanotubos de carbono [1], esferas magnéticas [2-3], nanofios ou nanopartículas metálicas [4] que, desde então, são amplamente empregados como transdutores eletroquímicos. A busca das ciências biomédicas pela identificação de proteínas super expressadas por células cancerígenas e biomoléculas (biomarcadores) nos guiou até a obtenção de anticorpos ou aptameros que hoje são empregados na confecção da interface de reconhecimento de imunossensores eletroquímicos para a detecção precoce de câncer [5]. Existe também uma forte conecção entre o desenvolvimento de dispositivos sensores e a necessidade de resolver problemas práticos na indústria e na sociedade, fato que tem direcionado a busca por sensores miniaturizados, portáteis, fáceis de operar, que permitam a obtenção de resultados rápidos e disponham de adequada sensibilidade, seletividade e estabilidade.

As primeiras medidas eletroanalíticas foram realizadas com eletrodos metálicos à base Hg, Au, Pt, fibras de carbono ou mesmo pasta de carbono [6-7]. Estes eletrodos, conhecidos por eletrodos base, apresentavam baixa seletividade, no entanto, eram úteis à determinação de classes de compostos químicos. Outros problemas analíticos também comprometiam o emprego destes eletrodos como, por exemplo, a passivação gradual de sua superfície devido à adsorção de produtos da própria reação de óxidorredução utilizada na detecção, ou ainda, dos subprodutos destas reações que poderiam polimerizar-se sobre a superfície eletródica. Além disso, como foi citada, a seletividade para um determinado analito pode ser prejudicada em função da similaridade de sua característica redox com as de outras espécies químicas presentes na amostra e, a sensibilidade ser comprometida, devido à lenta cinética de transferência de elétrons entre o analito e o material eletródico [8].

Os estudos envolvendo as superfícies eletródicas revelaram que algumas espécies adsorviam sobre a interface metálica. Cheek e Nelson descreveram a imobilização de grupos funcionais sobre sílica em 1964, Jasinski incorporou ftalocianinas metálicas sobre eletrodos de pasta de carbono em 1965, Lane e Hubbard

descreveram uma forte quimiosorção de compostos eletroativos alílicos na superfície de eletrodos de platina em 1973 e, na mesma década, outros pesquisadores já verificavam a eletroformação de filmes poliméricos de pirrol [9-10]. Neste ambiente de intensas descobertas, Murray e colaboradores, em um trabalho que descrevia a ligação covalente de amina, piridina e etilenodiamina na superfície de eletrodos de SnO₂, introduziram a denominação "Eletrodo Quimicamente Modificado" (EQM) para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na interface eletródica [11]. O principal objetivo dessa modificação é controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução e, consequentemente, alterar a reatividade e a seletividade do eletrodo base.

Sensores químicos são dispositivos que respondem a um analito em particular ou a uma classe de substâncias por meio de uma reação química e podem ser empregados para a determinação qualitativa ou quantitativa destas espécies. Contudo, uma condição indispensável a um sensor químico é a de que o elemento de reconhecimento esteja intimamente conectado ao transdutor de sinal. Os sensores eletroquímicos compõem uma classe dos sensores químicos, nos quais um eletrodo é usado como elemento de transdução [12]. Neste sentido, todo EQM pode ser definido como um sensor eletroquímico.

É importante notar que desde o princípio, o emprego de eletrodos para a análise de compostos eletroativos foi motivada pela possibilidade de realizar a determinação diretamente na amostra, evitando a realização de etapas de preparo de amostra que, em geral, aumentam o tempo de análise, agregam incertezas às medidas e tornam a análise laboriosa. Podemos então afirmar que os sensores eletroquímicos são dispositivos que visam à realização de análises específicas, descomplicadas e em tempo real.

A busca pela melhoria na seletividade dos sensores eletroquímicos tem guiado o desenvolvimento de novas estratégias para a confecção de eletrodos modificados. Membranas e filmes poliméricos, materiais ou catalisadores inorgânicos e orgânicos foram imobilizados nos mais diversos tipos de eletrodos base. Contudo, quando catalisadores biológicos foram incorporados como elemento de reconhecimento do sensor verificou-se, em geral, amplificação química de sinal e ganho significativo na seletividade do dispositivo. Surgiram os biossensores, uma classe de sensores

químicos os quais incorporam um elemento de reconhecimento biológico intimamente conectado a um transdutor [13].





Os mais variados tipos de biomoléculas podem ser empregados na construção dos biossensores. E de acordo com a classificação mais empregada para os biossensores proposta por Arnold e Meyerhoff em 1988, quando enzimas, proteínas, tecidos ou células são incorporados na camada de reconhecimento configuram-se os biossensores biocatalíticos, enquanto que o emprego de ácidos nucleicos, anticorpos ou receptores caracterizam os biossensores de afinidade [14]. Em 1996, a IUPAC ampliou as possibilidades, pois recomendou que o elemento de reconhecimento biológico poderia ser baseado em uma reação química catalisada por, ou em equilíbrio com, macromoléculas isoladas, arquitetadas ou que são encontradas em ambiente biológico originalmente [15]. Estabeleceu-se uma nova classe de biossensores, os

sensores biomiméticos, isto é, sensores que empregam compostos que em algum aspecto imitam determinado sistema biológico e se baseiam em sistemas químicos mais simples. Neste sentido, os elementos mais amplamente usados tem sido: polímeros impressos, que imitam receptores naturais, como os anticorpos; complexos metálicos, que imitam sítios ativos enzimáticos; ciclodextrinas modificadas, que imitam sítios de ligação enzimáticos e monocamadas moleculares, que imitam membranas celulares. A classificação dos biossensores de acordo com os elementos de reconhecimento utilizados na sua construção é apresentada no Esquema 1

Os transdutores de energia utilizados nos biossensores são essencialmente os mesmos em operação nas demais técnicas instrumentais tradicionais. A maioria dos biossensores emprega o modo eletroquímico como forma de transdução de sinal devido ao baixo custo instrumental, facilidade de uso, portabilidade e simplicidade de construção do dispositivo. Nestes casos, a reação a ser monitorada tipicamente gera um sinal de corrente (amperometria), uma quantidade mensurável de carga acumulada ou potencial (potenciometria), outras propriedades condutoras de um meio entre os eletrodos (condutometria) ou da interface dos próprios eletrodos no monitoramento da resistência ou da reatância (espectroscopia de impedância eletroquímica). O modo térmico de transdução considera o fato de que todos os processos químicos e bioquímicos envolvem a liberação ou absorção de calor e este calor pode ser medido por termistores sensíveis. Os modos ópticos incluem técnicas que envolvem absorbância e fluorescência eletromagnética entre outros esquemas baseados em reflexões internas como a ressonância de plásmons de superfície (SPR). Por fim, o modo de transdução acústico que pode ser bem representado pela microbalança de cristal de guartzo (QCM) [16]. Os principais modos de transdução de sinal e os elementos de reconhecimento utilizados nos biossensores principais estão apresentados no Esquema 1.

I.1.1 Biossensores amperométricos

Os biossensores amperométricos apresentam vantagens em relação aos outros biossensores eletroquímicos porque eles combinam: alta sensibilidade; relativo baixo custo; baixo consumo de energia e podem ser facilmente miniaturizados [17]. Todos os biossensores amperométricos mensuram um fluxo de corrente como etapa básica do processo de transdução de energia, no entanto, existem diferentes mecanismos de resposta que dão origem a corrente medida. Para muitos compostos biológicos é possível encontrar uma enzima redox capaz de catalisar sua oxidação ou redução. Tanto a formação de um produto quanto o consumo de reagente podem ser usados como uma medida da concentração do substrato enzimático, isto é, do composto biológico de interesse. Os biossensores cujo mecanismo de resposta é baseado na eletroatividade do substrato enzimático ou de um produto da reação são chamados de biossensores de primeira geração.

O primeiro biossensor amperométrico foi um biossensor de primeira geração e foi criado por Updike e Hicks em 1967 para a detecção de glicose usando a enzima glicose oxidase associada a um eletrodo de Clark para oxigênio [18]. Este dispositivo funcionava bem, mas inúmeros problemas tiveram de ser controlados para tal. Primeiro, os níveis de oxigênio no meio deveriam ser controlados e mantidos constantes, caso contrário, o decréscimo na concentração de oxigênio não seria proporcional a concentração de glicose. Outro problema era que o alto potencial de redução aplicado para a redução de oxigênio (aprox. – 700 mV vs. Ag/AgCl) que permitia a interferência de outras espécies presentes na amostra. Devido a estas desvantagens pensou-se em substituir o oxigênio por outros agentes oxidantes, ou melhor, agentes de transferência de elétrons, os quais deveriam ser eletroquimicamente reversíveis, apresentar apropriados potenciais de oxidação e cujas concentrações fossem passíveis de controle.

Surgiam os biossensores de segunda geração que consistiam em biossensores amperométricos modificados com mediadores redoxes que medeiam a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo de acordo com o Esquema 2. Complexos de metais de transição sempre foram os mediadores mais empregados, em especial, aqueles à base de ferro como, por exemplo, ferroceno, hexacianoferrato, azul de metileno etc.

7



Esquema 2. Diagrama cíclico do mecanismo de resposta de um biossensor de primeira, segunda e terceira geração. O biossensor enzimático de primeira geração pode monitorar a formação de um produto eletroativo, como ilustrado, ou monitorar a depleção de um substrato na superfície eletródica.
Entretanto, os biossensores de segunda geração podem sofrer interferências podendo facilitar não somente a trasferência de elétrons direta entre o eletrodo e a enzima, mas também de outras reações. A principal vantagem dos biossensores baseados em transferência de elétrons direta, biossensores de terceira geração (Esquema 2), é a ausência de mediadores, fornecendo-lhes seletividade superior porque podem operar em um potencial mais próximo do potencial redox da própria enzima e, por isso, são menos sujeitos às reações interferentes. Entretanto, a transferência eletrônica direta (TED) depende da distância entre o centro redox enzimático e o eletrodo e muitas enzimas possuem seus sítios ativos profundamente protegidos por uma capa proteica isolante. A imobilização de nanopartículas metálicas junto às enzimas na camada de reconhecimento tem promovido o desenvolvimento de biossensores de terceira geração muito seletivos e sensíveis [19].



Esquema 3. Classificação dos biossensores e sensores amperométricos de acordo com o uso. Ilustração superior: exemplo de aplicação e ilustração inferior: perfil da resposta amperométrica obtida com o dispositivo. Adaptado da referência [21]. Outra forma de classificação dos biossensores e sensores amperométricos proposta por Kissinger agrupa os dispositivos de acordo a sua finalidade [20-21] conforme ilustrado no Esquema 3. São subdivididos em três grupos:

- i. Dispositivos de uso contínuo;
- ii. Dispositivos de uso intermitente e;
- iii. Dispositivos de uso único ou descartáveis.

Os dispositivos de uso contínuo são aqueles empregados, por exemplo, em análises in vivo, portanto, são completamente introduzidos na amostra de interesse por imersão ou na forma de implantes. Idealmente, o sensor gera um sinal de resposta que reflete a concentração do analito em função do tempo mas, na prática, a calibração não pode ser feita durante seu uso, as correntes de fundo não podem ser determinadas no sistema em estudo e os limites de detecção, em geral, são altos. Tais dispositivos apresentam variações imprevisíveis de resposta, no entanto, possuem a vantagem de exigir instrumentação simples e de baixo custo. Em geral, tais dispositivos são mais estudados em termos acadêmicos do que empregados comercialmente. Há alguns exemplos de biossensores de uso contínuo empregados em fermentadores, cultura de células ou implantados in vivo, contudo, são aptos unicamente para o monitoramento dos níveis de glicose, presente no meio em altas concentrações.

A literatura é vasta em sensores e biossensores amperométricos de uso intermitente. São dispositivos nos quais alíquotas da amostra são adicionadas em um meio, em fluxo ou não, em contato com a interface de reconhecimento do dispositivo. As amostras são processadas em seqüência, em equipamentos próprios para a realização de medidas em laboratório e podem ser automatizadas. O custo por análise, em geral, é modesto porque o sensor é usado, intermitentemente, durante meses. Os sensores e biossensores deste grupo apresentam excelente precisão, exatidão e sensibilidade podendo detectar níveis de concentrações em nanomolar. Estas vantagens advêm do fato de que a corrente de fundo é determinada e a calibração facilmente realizada durante o uso dos dispositivos.

Os sensores e biossensores descartáveis resumem em si o conceito de análise rápida, descomplicada e portátil. Estes sensores e biossensores amperométricos associam, em um equipamento robusto e portátil, células eletroquímicas descartáveis e processadores eletrônicos de sinal com mostradores numéricos. As células eletroquímicas são compostas por dois ou três eletrodos compostos por filmes finos metálicos ou impressos com tinta condutora, sendo que, um dos eletrodos é modificado com uma camada de reconhecimento seletiva. Bons exemplos deste tipo de biossensor são as fitas para a análise de glicose facilmente encontradas em farmácias do mundo todo por, aproximadamente, um dólar a unidade. Os processadores eletrônicos são virtualmente gratuitos, cerca de vinte dólares, devido à competição acirrada entre os cinco maiores fabricantes: Abbott Diabetes Care Inc., Bayer, Home Diagnostics, Life Scan Inc. e Roche. A aplicação da amostra engatilha um relógio e em um tempo préestabelecido, em geral, inferior a sessenta segundos, um determinado potencial é aplicado e a corrente é medida. A corrente é convertida em unidades de concentração e é indicada no mostrador. A calibração do sistema é realizada antes do uso por meio de soluções padronizadas fornecidas pelo fabricante, mas apesar deste e outros cuidados analíticos, a precisão e a exatidão das medidas são baixas com erros aceitáveis de até 10% em relação aos métodos de referência.

Dentre os três grupos citados, os dispositivos descartáveis englobam quase que a totalidade dos biossensores e sensores comercializados atualmente. Mas apesar da grande demanda comercial, a quantidade de trabalhos publicados na área não era expressiva até o final do século XX [20]. A situação começou a mudar com a maior difusão das técnicas de microfabricação e com a redescoberta da química dos colóides nas diversas aplicações analíticas encontradas para os materiais nanoestruturados a base de carbono e ouro [22-30].

As nanoestruturas apresentam muitas vantagens para a química analítica quando usadas na transdução de sinal ou como componente da camada de reconhecimento em um biossensor. Nanopartículas de ouro permitem a imobilização estável de biomoléculas preservando sua bioatividade, aumentam da taxa de transferência de elétrons heterogênea entre biomoléculas e superfícies eletródicas, aumentam a organização, a uniformidade e a quantidade de biomoléculas imobilizadas na interface de um transdutor devido à alta relação área/volume das nanopartículas. Com os trabalhos desenvolvidos na área houve um ganho significativo no desenvolvimento de sensores e biossensores mais sensíveis e seletivos, no entanto, dispositivos descartáveis amperométricos precisam ser construídos sobre subtratos de

baixo custo, caso contrário, seu emprego comercial se restringe.

Nos últimos três anos, substratos a base de papel despontam como uma alternativa interessante para os já existentes substratos plásticos, cerâmicos ou vítreos na construção de dispositivos analíticos descartáveis. Em 2009 surgiram os primeiros dispositivos bioanaliticos em papel e, desde então, tais dispositivos despontam como os mais aptos ao desenvolvimento de biossensores e sensores eletroquímicos descartáveis [31].

I.2 Eletrodos Descartáveis

A necessidade do desenvolvimento de eletrodos descartáveis se dá por vários motivos como, por exemplo, a restrição ao uso contínuo de muitos eletrodos metálicos ou à base de carbono devido à passivação ou degradação de sua superfície. Fato que exige a execução de procedimentos de limpeza ou de acondicionamento da superfície eletródica que são laboriosos e podem consumir grande parte do tempo disponível para a análise. Outras vezes, a própria amostra pode conter contaminantes biológicos que impedem o compartilhamento ou reuso da célula eletroquímica por diferentes indivíduos, como é o caso das análises clínicas. Nestes casos, é ideal o emprego de eletrodos descartáveis que devem respeitar algumas considerações para que possam ser classificados como tal [32]:

- i. Baixo custo de construção;
- Reprodutibilidade da área dos diferentes eletrodos construídos por meio do mesmo processo de manufatura;
- iii. Possibilidade de reprodução dos eletrodos em larga escala.

Os eletrodos gotejantes de mercúrio foram os primeiros eletrodos descartáveis empregados em experimentos eletroquímicos devido à possibilidade de renovação da superfície através da troca da gota. Entretanto, a alta toxicidade deste metal, a dificuldade em modificar quimicamente sua superfície e a estreita faixa de trabalho na região anódica contribuíram para sua gradual substituição e crescente importância dos eletrodos sólidos a base de metais como ouro, prata, platina e várias formas de carbono [32-33]. Como a eletroanálise se baseia em medidas interfaciais e com o objetivo de obter eletrodos descartáveis com estes materiais condutores surgiram os eletrodos de filmes finos (< 5 µm de espessura) ou espessos (> 5 µm de espessura) [34]. Estes eletrodos consistem em filmes de materiais condutores depositados em substratos isolantes. Em geral, quando se procura alta resolução, várias formas de deposição metálica a vácuo são usadas, como a evaporação e sputtering [35-39]. Mas se a resolução não é um fator tão crítico, permitindo a distância entre linhas de até 25 µm e filmes espessos são aceitáveis, a técnica de impressão é muito útil e mais empregada [40-44].

O ouro apresenta muitas características vantajosas que o qualificam positivamente como transdutores eletroquímicos: é um material razoavelmente inerte (não oxida em temperaturas inferiores ao seu ponto de fusão, reage muito lentamente com O₂ atmosférico); é substrato comumente utilizado em técnicas analíticas e espectroscópicas como ressonância de plasmons de superfície (SPR, sigla do nome em inglês), microbalança de cristal de quartzo (QCM, sigla do nome em inglês), espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho (RAIRS, sigla do nome em inglês) e elipsometria; é apto a estudos biológicos já que células podem aderir à superfície áurea sem riscos de toxidez para a sua estrutura e; é fácil de ser entalhado por meio de técnicas litográficas.

Provavelmente, devido ao seu custo elevado, o emprego de ouro na confecção de eletrodos descartáveis é inferior aos dos materiais a base de carbono. Mas na última década, a possibilidade de arquitetar a interface sensora utilizando compostos tiolados imobilizados na superfície de ouro formando monocamadas capazes de, organizadamente, ancorar biomoléculas de reconhecimento colocou o ouro no centro das atenções, principalmente, no que tange o desenvolvimento de transdutores eletroquímicos. Além disso, o ouro é um metal fácil de ser obtido na forma de colóide ou filmes. Filmes de ouro depositados sobre vidro ou sílica apresentam grande tendência a cristalinidade Au(111) e são essencialmente Au(111) quando o substrato é mica [45-47].

Os eletrodos de filmes metálicos são particularmente econômicos para a construção de eletrodos a partir de materiais de alto custo porque pequenas quantidades são necessárias para a formação do filme. Por exemplo, uma cela

eletroquímica descartável, como a empregada neste tabalho, com eletrodos de ouro de 1000 Å de espessura e uma área total de 0,15 cm² utiliza aproximadamente 90 µg de ouro, enquanto que um único fio de ouro com secção de área eletroativa idêntica (0,05 cm² x 1 cm) utiliza cerca de 1g. Apesar da enorme diminuição da quantidade de material utilizada, os eletrodos de filmes finos ou espessos não são proporcionalmente mais baratos que os macroeletrodos devido aos altos custos de fabricação. No entanto, a produção em larga escala permite diminuir drasticamento o custo final do dispositivo, permitindo que este se torne descartável.

É possível encontrar na literatura eletrodos descartáveis de ouro construídos por meio de diferentes técnicas de fabricação, mas há poucos em comercialização, como por exemplo, os eletrodos de ouro impressos em cerâmica da Pine Research Instrumentation que podem ser adquiridos por cerca de R\$ 70,00 a unidade [48] e os comercializados pela BVT Technologies por R\$ 4,00 a unidade [49]. Existem algumas tintas, a base de ouro, disponíveis comercialmente [50-51] e a tinta é umas das principais variáveis que influenciam nas características eletroquímicas dos eletrodos, pois as tintas possuem em suas composições solventes e aglutinantes que podem diminuir a reatividade interfacial do eletrodo. Além das tintas, o substrato e o protocolo utilizado para a construção dos eletrodos impressos podem influenciar no desempenho do eletrodo impresso. Substratos cerâmicos são os mais utilizados na confecção de eletrodos impressos em ouro, mas há alguns trabalhos que descrevem o emprego de poliéster e teraftalato de polietileno [52-55].

I.2.1 Fabricação de eletrodos descartáveis

Um determinado conjuto de processos são combinados de forma a gerar protocolos de manufatura de eletrodos descartáveis. Os principais protocolos de fabricação de eletrodos de filmes de ouro estão apresentados no Esquema 4. Do ponto de vista prático, é comum que a cela eletroquímica composta por três ou dois eletrodos condutores seja completamente descartável, no entanto, é possível que somente o eletrodo de trabalho seja descartável, conservando-se os outros elementos da cela analítica convencional nas análises subseqüentes [56].

O emprego de máscaras Físicas metálicas, mais conhecidas como máscaras de sombra, na confecção de eletrodos é antigo (Esquema 4, linha "a"). Sabe-se que a espessura e a fixação destas máscaras sobre o substrato devem ser avaliadas de forma a garantir a adequada formação dos eletrodos. Tem-se associado o uso de máscaras de sombras metálicas à deposição metálica por *sputtering* para a obtenção de eletrodos descartáveis [37].



Esquema 4. Etapas essenciais na fabricação de eletrodos descartáveis de filmes finos e espessos de ouro. Cada linha colorida representa um protocolo de fabricação.

A tecnologia de *screen-printing*, também conhecida por s*ilk-screen*, *é a* mais empregada na construção de eletrodos descartáveis (Esquema 4, linhas "c" e "f"). De acordo com Nascimento e Angnes, o processo consiste em forçar a tinta a passar através de uma tela para ser depositada sobre um substrato plano, geralmente de PVC, poliéster ou cerâmica de alumina [57]. O desenho definido pela trama aberta da tela é impresso no substrato. As etapas básicas da confeção de eletrodos descartáveis são: (i) preparação ou seleção da tinta; (ii) confeção da tela; (iii) impressão; (iv) secagem e (v) cura. A impressão pode ser feita manual ou automaticamente. A simplicidade de fabricação, as possibilidades de automação total do processo e de modificação dos eletrodos garantem a preferência das comunidades empresarial e acadêmica pela técnica de *screen-printing*. Fato comprovado pelo grande número de artigos publicados na área e a existência de várias celas eletroquímicas descartáveis disponíveis comercialmente.

A construção de eletrodos por eletrodeposição consiste em reduzir eletroliticamente cátions metálicos presentes em solução sobre substratos condutores (Esquema 4, linhas "d" e "e"). A superfície da camada de ouro eletrodepositada é criticamente dependente da composição da solução contendo dos cátions metálicos, do substrato e da forma de eletrodeposição que pode ser potenciostática ou galvanostática [58-59]. Battaglini e colaboradores construíram redes de eletrodeposição de ouro [58]. Os autores construíram trilhas em tinta de carbono e, sobre essas trilhas, eletrodepositaram ouro e observaram, por microscopia óptica, que o ouro depositado a presentava a rugosidade dependente daquela obtida com a tinta de carbono e que os eletrodos apresentavam comportamento idêntico ao de eletrodos de ouro policristalino.

Alguns eletrodos descartáveis são construídos por meio da eletrodeposição de nanopartículas de ouro (GNP, sigla do nome em inglês) sobre superfícies condutoras no intuito de obter interfaces com propriedades catalíticas superiores [60]. Foram eletrodepositadas GNPs sobre superfícies de eletrodos descartáveis de óxido de índioestanho (ITO, sigla do nome em inglês) para a determinação de peróxido de hidrogênio e do ânion superóxido [61-62].

A deposição metálica por evaporação à vacuo é muito utilizada na indústria eletrônica e é realizada em sistemas de alto-vácuo (10⁻⁵-10⁻⁸ torr) [34]. O alto vácuo é necessário para garantir alta dispersão das partículas evaporadas e um caminho suficientemente livre e inerte para que possa atingir o substrato. Em geral, os processos de evaporação são iniciados pela fusão do metal que se pretende depositar em um suporte condutor, que pode ser um filamento de tungstênio ou tântalo, seguido do aquecimento elétrico do material fundido até a sua vaporização. Materiais que possuem altíssimos pontos de fusão, como o carbono, podem ser evaporados pela técnica de aquecimento por *electrom-beam*. Neste caso, o material a ser depositado é bombardeado com elétrons de alta energia. A superfície do material é aquecida e vaporiza-se rapidamente.

A técnica de *sputtering* é realizada em um sistema gasoso, geralmente argônio, a baixa pressão (10-100 mtorr) [34]. Uma descarga elétrica é mantida entre dois

eletrodos, sendo que um dos eletrodos é feito do material que se quer depositar, o eletrodo alvo. Quando o alvo é polarizado negativamente, a uma voltagem de 1 a 3 kV, é bombardeado por íons argônio energético, os quais transferem energia ao material e causam a ejeção de íons ou átomos do alvo que, rapidamente, se depositam no substrato. Filmes formados por *sputtering*, geralmente, apresentam impurezas residuais oriundas do gás utilizado durante a deposição metálica. A deposição de filmes metálicos em superfícies condutoras é, na maior parte dos casos, realizada empregando a técnica de sputtering por corrente direta (*DC sputtering*). No entanto, quando se recobre uma superfície isolante pode ser necessário utilizar a técnica de sputtering por radio freqüência (*RF magnetron sputtering*), principalmente, quando o substrato pode ser destruído pelo aquecimento gerado durante a deposição por *DC sputtering*.

Particularmente nas técnicas de deposição metálica por evaporação e *sputtering*, é bastante fraca a adesão dos filmes de ouro sob o substrato. Nestes casos, é necessária a deposição prévia de um material intermediário com melhor aderência ao substrato, temos como exemplo os filmes de cromo e titânio são freqüentemente depositados antes da deposição de ouro.

A fotolitografia é um processo que permitiu a realização de muitos experimentos eletroquímicos que antes do desenvolvimento da microeletrônica e, consequentemente, dos microcircuitos eram impossíveis. No processo fotolitográfico o substrato, sobre o qual o dispositivo é fabricado, é recoberto com uma resina polimérica fotosensível também chamada fotorresiste. A camada de fotorresiste é seletivamente exposta à radiação, tipicamente radiação Ultra-violeta, por meio de uma máscara ou sequência de máscaras. O padrão desejado é obtido durante a etapa de revelação. As áreas do fotorresisteque permanecem após a revelação protegem algumas regiões do substrato. As regiões expostas podem ser submetidas a uma variedade de processos aditivos ou subtrativos no intuito de criar um padrão no substrato.

As máscaras podem ser positivas ou negativas. As máscaras positivas bloqueiam a radiação nas regiões dos eletrodos e permitem a passagem de luz nas demais regiões, mas ao contrário, as máscaras negativas permitem a passagem de radiação na região delimitada para os eletrodos e bloqueiam a luz nas demais regiões. A escolha do tipo de máscara depende do fotorresiste empregado e do protocolo que se pretende utilizar na confecção dos eletrodos. Os fotoresistes também são

classificados em positivos e negativos, conforme ilustrado no Esquema 5. Um fotorresiste positivo é inicialmente polimerizado e relativamente insolúvel, mas pode ser degradado e se tornar solúvel após a incidência de radiação. Um fotorresiste negativo é inicialmente solúvel, mas se torna insolúvel nas regiões irradiadas que sofrem polimerização. Os fotorresistes possuem duas funções principais: i. Responder à radiação, gerando uma imagem a partir da máscara utilizada e ii. Proteger o filme metálico durante as etapas posteriores do processo litográfico.



Esquema 5. Representação esquemática do processo fotolitográfico para fotorresistes positivos e negativos.

Quando se trata da microfabricação de eletrodos de ouro descartáveis é preciso, inicialmente, recobrir um substrato orgânico ou inorgânico com uma camada de ouro. Nesta etapa, emprega-se o *sputtering* ou a evaporação à vacuo para a deposição metálica. Em seguida, a litografia óptica é utilizada para delimitar a área e o formato dos eletrodos (Esquema 4, linha "b"). Alguns pesquisadores brasileiros têm desenvolvido

eletrodos descartáveis de ouro e prata a partir de discos compactos graváveis (CD-R, sigla do nome em inglês) [63]. CD-Rs são compostos por uma base de policarbonato recoberta, por meio de *sputtering*, com ouro ou prata, e por último, essa camada metálica é protegida por um ou mais filmes poliméricos. Os CDtrodos, como são chamados os eletrodos metálicos construídos a partir de CD-Rs, são construídos, simplesmente, expondo o filme metálico. Máscaras isolantes de *toner* têm sido empregadas no intuito de melhorar a definição da área eletródica dos CDtrodos (Esquema 4, linha "b"). Essas máscaras são feitas em impressoras a *laser* e transferidas sobre a superfície metálica por aquecimento. Nas pesquisas lideradas por Angnes e Bertotti foram realizadas análises de paracetamol, dipirona e cysteina utilizando estes dispositivos descartáveis [64-65].

Oliveira Brett e colaboradores desenvolveram biossensores para peróxido de hidrogênio e glicose sobre eletrodos de filmes finos de ouro construídos por sputtering por radio freqüência sobre cloreto de polivinila [66]. A enzima glicose oxidase foi imobilizada em mebranas poliméricas aderidas à superfície eletródica por meio de uma resina adesiva (rosin adhesive®) e a calibração do dispositivo realizada antes de qualquer determinação analítica de glicose ou peróxido. Kim e colaboradores construíram eletrodos descartáveis de ITO e de ouro em chips descartáveis no quais seriam realizadas a eletroforese capilar associada à detecção eletroquímica para a separação e análise de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) [67]. Por sua vez, Xin-Xia e colaboradores desenvolveram um biossensor descartável para lactato em plataformas de policarbonato recobertas com filmes finos de ouro modificados com nanopartículas de negro de platina [68]. Em todos os trabalhos citados acima as técnicas de sputtering e fotolitografia foram combinadas para a obtenção dos dispositivos eletroquímicos, os quais, destacam os autores, apresentavam características eletroquímicas similares à de macroeletrodos de ouro policristalino.

Dentre os eletrodos descartáveis discutidos até agora, nenhum consegue ter um custo tão competitivo quanto aqueles construídos sobre fibras de celulose. A construção de eletrodos sobre papel é uma nova tendência da Química Analítica na construção de dispositivos microfluídicos descartáveis, pois apresentam baixo custo, requerem pequenos volumes de amostra e de reagentes, empregam materiais renováveis e minimizam problemas com o descarte do dispositivo. Henry e colaboradores foram os primeiros a construir eletrodos sobre papel e utilizá-los na

construção de biossensores para a análise simultânea de glicose, lactato e urato. Os eletrodos foram construídos por meio de *screen-printing* utilizando tinta de carbono modificada com Azul da Prússia e tinta de prata/cloreto de prata [31]. Whitesides e colaboradores também utilizaram a mesma técnica para a construção de eletrodos em papel, mas realizaram a análise de metais pesados em águas com o eletrodo descartável [69]. Kubota e colaboradores construíram eletrodos descartáveis de ouro sobre papel utilizando a técnica de *sputtering* empregando máscaras de sombra para a obtenção dos eletrodos descartáveis em papel [70].

Neste trabalho, a técnica empregada na fabricação dos eletrodos foi deposição metálica de ouro por sputtering para a confecção de eletrodos de filmes finos de ouro sobre poliéster através de fotolitografia e sobre papel empregando máscaras de sombra.

I.3 Análises Rápidas no contexto do diagnóstico clínico

Análises do tipo "point-of-care" (POCT, do inglês point-of-care testing) estão em pleno desenvolvimento na área de diagnóstico clínico e é a grande aposta tecnológica do mercado de diagnóstico in vitro para o futuro [71]. Um dispositivo analítico do tipo "point-of-care" é um teste diagnóstico de uso portátil e descentralizado, empregado no local de cuidado de pacientes, isto é, em postos de pronto-atendimento ou consultórios médicos, hospitais, na própria residência do paciente ou em locais sem infra-estrutura ou mesmo aqueles assolados por acidentes ou desastres naturais. Tais dispositivos são essencialmente desenvolvidos para realizar testes biológicos complexos, no entanto, devem ser leves, portáteis e fáceis de operar [71-76].

O diagnóstico por meio de POCT empregando dispositivos sem controle de qualidade pode fornecer falsos resultados que podem comprometer a saúde do paciente e ainda, tornar mais custosa a busca pelo tratamento adequado. Portanto, tais dispositivos precisam passar por controle de qualidade rigoroso, apresentar um baixo custo por teste, se valer de amostragem conveniente e indolor e, ainda, proporcionar tempos mais curtos de análise.

O mercado dos dispositivos "point-of-care" tem a maior taxa de crescimento anual dentre os dispositivos de análise in vitro, que é de aproximadamente 10% [71]. De acordo com análises de mercado, as projecões indicam que o mercado nesta área irá crescer 2,25 bilhões de dólares nos Estados Unidos e 1,56 bilhões de dólares na Europa até 2012 [71]. O maior estímulo ao desenvolvimento destes dispositivos está associado à sua intrínseca portabilidade, e consequente possibilidade de atendimento rápido, ou mesmo imediato, das necessidades do paciente. O emprego de diferentes tecnologias e instrumentos permite reduzir para horas ou, em alguns casos, em minutos os tempos de análise. No Esquema 6, o processo convencional de análise clínica empregando laboratórios centralizados é comparado à realização de análises descentralizadas do tipo "point-of-care". Pode-se observar a quantidade de etapas que são descartadas de um procedimento tradicional quando o diagnóstico point-of-care é empregado.



"Análise Clínica em Laboratório centralizado"

Esquema 6. Fluxograma simplificado de análises clínicas por meio de laboratórios centralizados em relação ao diagnóstico do tipo point-of-care. Adaptado da referência [71].

A alta demanda por análises rápidas é determinada pelo aumento no número de casos diagnosticados de diabetes, pela globalização de doenças infecciosas, pelo número crescente de pessoas com doenças cardiovasculares ou outras doenças crônicas. As políticas de saúde pública também são responsáveis pelo incentivo do uso de dispositivos de análise rápida para acompanhamento de epidemias ou endemias [77-78]. Desde 1990, os kits vendidos para a realização de auto-diagnóstico ganharam popularidade e, atualmente, podem ser comprados para a realização de testes de gravidez, drogas de abuso, *Helicobacter Pylori*, glicose sanguínea, colesterol, câncer, e HIV [71-72]. Diariamente, novos dispositivos com características inovadoras e desempenho aperfeiçoado são introduzidos no mercado e o número de analitos que podem ser detectados ou quantificados é enorme e incluem metabólitos, proteínas, microorganismos, íons etc [72].

Os biossensores e sensores químicos são dispositivos analíticos versáteis que serviram de inspiração para construção do conceito de dispositivos do tipo "point-of-care" [73-74]. Nos países em desenvolvimento, nos quais laboratórios analíticos não são tão acessíveis, estes dispositivos são ferramentas atrativas para o diagnóstico e o monitoramento de doenças [31, 79-84]. Os desafios envolvidos no desenvolvimento destes dispositivos são muitos e coincidem com os desafios há tempos enfrentados pelos sensores e biossensores desenvolvidos para o diagnóstico clínico. Por exemplo, detectar compostos de interesse com alta sensibilidade e seletividade empregando volumes de amostras muito pequenos, superar o preconceito e a falta de confiabilidade atribuída a estes dispositivos por muitos profissionais da área médica, entre outros.

Biossensores e sensores eletroquímicos são mais atrativos para o diagnóstico clínico que outros métodos devido à simplicidade e robustez instrumental, ao custo reduzido de instrumentação, à sensibilidade e precisão satisfatória, possibilidade de automação e miniaturização, curto tempo de resposta e, em consequência destas propriedades, passíveis de fornecer um diagnóstico rápido.

Existem alguns imunosensores e genosensores descartáveis, mas será dado maior enfoque aos dispositivos descartáveis biocatalíticos, que são os mais difundidos comercialmente. Nos tópicos subseqüentes serão apresentados alguns trabalhos que vem sendo desenvolvidos no ramo do diagnóstico clínico empregando dispositivos eletroquímicos biocatalíticos sobre substratos poliméricos, cerâmicos e, em especial, empregando papel.

I.3.1 Análises rápidas com biossensores amperométricos descartáveis

Microdispositivos analíticos representam uma face muito promissora da Química Analítica, especialmente aqueles dispositivos adequados a produção em massa que resultam em aparelhos de baixo custo e que podem ser, então, descartáveis. Tais dispositivos minimizam o consumo de energia, espaço, amostras e reagentes, bem como a quantidade de resíduos. A fabricação de microcélulas eletroquímicas contendo os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar em uma célula única, pode ser considerada um fator crucial para o sucesso no desenvolvimento destes dispositivos, especialmente, devido à versatilidade. Haja vista todas as vantagens associadas à realização de análises em micro-escala há um esforço crescente para a miniaturização de biossensores e sensores.

Na década de 80 do século passado, foram introduzidos comercialmente os primeiros biossensores: os dispositivos do tipo point-of-care para a análise amperométrica de glicose. Esta nova forma de monitorar as condições clínicas de um paciente revolucionou a prática da clínica médica. Em junho de 1992, o sistema analítico i-STAT[®] começou a ser vendido para hospitais e, desde então, faz parte dos itens necessários nos atendimentos de urgência. Este sistema possuía cartuchos descartáveis para a determinação simultânea de vários cátions inorgânicos empregando eletrodos íons seletivos e de glicose por amperometria. O conceito básico do dispositivo i-STAT[®] foi proposto pelo Dr. Imants Lauks em 1985, mas o investimento necessário para desenvolvimento de um produto real foi feito por Edwin C. Whitehead [85]. Na década de 90, o desenvolvimento de dispositivos para a análise POCT ganhou novo impulso devido às tecnologias de microfabicação e microfluídica, que permitiram maior controle na manipulação de líquidos em escala reduzida.

Os glicosímetros ELITE[®] da Bayer e o *Accu-Chek Advantage*[®] da Roche são amperométricos e se baseiam na reação da enzima glicose oxidase (GOD, sigla do nome em inglês) com ferricianeto e, conseqüente, formação de ferrocianeto, de acordo com as reações [86-87]:

Glicose	+	$\text{GOD}_{\text{oxidada}} \rightarrow 0$	GOD _{reduzida} + glucolactona	(equação 1)
GOD _{reduzida}	+	$[Fe(CN)_6]^{3-} \rightarrow$	GOD _{oxidada} + [Fe(CN) ₆] ⁴⁻	(equação 2)
[Fe(CN) ₆] ⁴⁻		superfície eletródica	→ [Fe(CN) ₆] ³⁻ + e ⁻	(equação 3)

Em geral, uma diferença de potencial de 300 mV vs. Ag/AgCl é aplicada e a corrente difusional do ferrocianeto é registrada após um tempo que varia entre 10 e 40 segundos [86-89]. Como foi apresentada nas equações de 1 a 3, a concentração de ferroceno é proporcional à concentração de glicose na amostra.

Hilditch e Green publicaram, em 1991, um artigo de revisão sobre biossensores eletroquímicos descartáveis e agruparam os trabalhos de acordo com as espécies ou grupos que a reação eletroquímica monitora, aos quais denominou "analitos reais" [90]. No caso glicosímetros citados acima, o analito real é o ferrocianeto. A espécie de interesse clínico que o sistema como um todo é designado para determinar recebe a denominação de "analito efetivo". O analito efetivo, em geral, é associado à detecção eletroquímica do analito real por via enzimática, que garante a seletividade ao dispositivo.

Os dispositivos ExacTech[®] e Precision Q.I.D.[®] da Medisense utilizam o ferroceno como analito real. A reação eletroquímica se baseia na reação da glicose oxidase com glicose e íons ferricínio, formando ferroceno que é oxidado na superfície eletródica durante a aplicação de determinado potencial redox, conforme representado nas equações de 4 a 6 [91].

Ferroceno <u>superfície eletródica</u> Ferricínio ⁺ + e ⁻	(equação 6)
$GOD_{reduzida}$ + Ferricínio ⁺ \rightarrow Ferroceno + $GOD_{oxidada}$	(equação 5)
$Glicose + GOD_{oxidada} \rightarrow GOD_{reduzida} + Glucolactona$	(equação 4)

Muitas oxidases, desidrogenases e peroxidases têm sido empregadas na confecção de biossensores descartáveis. Contudo, o princípio analítico que envolve cada determinação também varia de dispositivo para dispositivo. Infelizmente, a maior

parte dos trabalhos relatados na literatura não chega à fase de comercialização. A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de biossensores amperométricos descartáveis descritos na literatura desenvolvidos para a realização de análises clínicas.

Analito efetivo	Analito real	Descrição	Região analítica	Aplicação	Ref.
Ácido Úrico	Ferrocianeto	Enzima: Uricase Mediador: Ferricianeto Amplificação de sinal: Ditiotreitol Eletrodo impresso	mg/dL	Sangue	[92]
Ácido Ùrico	Peróxido de hidrogênio	Enzima: Uricase Catalisador: Ftalocianina de Cobalto Eletrodo impresso	µmol/L	Urina	[93]
Etanol	Azul de metileno	Enzima: Alcool desidrogenase e o cofator NAD ⁺ Mediador: Azul de metileno Eletrodo impresso	mmol/L	Plasma sanguíneo	[94]
Etanol	Azul de metileno	Enzima: Alcool desidrogenase e o cofator NAD ⁺ Mediador: Azul de metileno Eletrodos impressos com nanotubos de carbono	mmol	Sangue	[95]
Colesterol	Peróxido de hidrogênio	Enzima: Colesterol Oxidase Catalisador: Fe ₃ O ₄ Eletrodo impresso + papel	mg/dL	-	[96]
Colesterol	Ferrocianeto	Enzima: Colesterol Oxidase Mediador: Ferricianeto Eletrodo impresso	mg/L	Sangue	[97]
Colesterol	P450scc Transferência eletrônica direta (TED)	Enzima: P450scc Meio contendo O ₂ Eletrodo impresso + MWNCT	µmol/L	-	[98]
Lactato	Peróxido de hidrogênio	Enzima: Lactato oxidase Eletrodo: ITO/Silício	mmol/L	Suor	[99]

Tabela 1. Exemplos de biossensores amperométricos descartáveis descritos na literaturadesenvolvidos para a realização de análises clínicas.

Continuação	da Tabela 1.				
Lactato	Ferrocianeto	Enzima: Lactato oxidase Mediador: Ferricianeto Catalisador: Negro de platina Eletrodo de filme fino de ouro	mmol/L	Plasma sanguíneo	[100]
Glutationa	Peróxido de hidrogênio	Enzima: Glutationa peroxidase Catalisador: Ftalocianina de cobalto Eletrodo impresso	µmol/L	Sangue	[101]
Salicilato	Catecol	Enzima: Salicilato hidroxilase Cofator: NADH Eletrodo impresso	mmol/L	-	[102]
Salicilato	Catecol	Enzima: Salicilato hidroxilase Cofator: NADH Benzoato de sódio Eletrodo impresso	mmol/L	Plasma sanguíneo	[104]
Dopamina	Ferroceno e tetrametilbenzidina	Enzima:polifenol oxidase Eletrodo impresso – ciclodextrina	nmol/L	-	[105]
Glicose	Ferrocianeto	Enzima: Glicose Oxidase Mediador: Ferricianeto Eletrodo impresso	mmol/L	Sangue	[106]
Glicose	Ferroceno	Enzima: Glicose Oxidase Mediador: Ferroceno Eletrodo impresso	mmol/L	-	[107]
Glicose	Hexaminrutênio (III)	Enzima: Glicose Oxidase Mediador: Cloreto de Hexaminrutênio (III) Eletrodo impresso	mmol/L	Sangue e Plasma sanguíneo	[108]
Glicose	Peróxido de hidrogênio	Enzima: Glicose Oxidase Pré-tratamento da amostra com PbO ₂ Eletrodo de filme espesso	mmol/L	-	[109]
Glicose	Tetratiofulvaleno	Enzima: Glicose Oxidase Mediador: Tetratiofulvaleno Eletrodo impresso	mmol/L	-	[110]
Glicose	Ftalocianina de cobalto	Enzima: Glicose Oxidase Mediador: Ftalocianina de cobalto Eletrodo impresso	mmol/L	Plasma bovino	[111]

Percebe-se uma predominância no desenvolvimento de dispositivos utilizando eletrodos construídos pela técnica de impressão e voltados para a determinação de glicose, seguido pelos de lactato e colesterol. A simplicidade de construção da interface de reconhecimento é crucial à comercialização dos dispositivos. A forma de imobilização da biomolécula, de mediadores e outros aditivos devem ser adequados à produção em larga escala dos dispositivos e garantir a atividade e estabilidade destes componentes. Existe uma tendência a favor da formação da interface de reconhecimento em uma única etapa ("*one step deposition*", do inglês) devido à maior simplicidade e aplicabilidade à produção em massa dos dispositivos [112].

I.3.2 Análises rápidas com dispositivos eletroanalíticos sobre papel

Papel é um ótimo material de suporte para o desenvolvimento de dispositivos analíticos devido a várias vantagens já demonstradas ou vislumbradas. Em primeiro lugar, papel é fabricado em abundância e a custo baixo, tornando os dispositivos em papel economicamente acessíveis. Em segundo lugar, técnicas de impressão e de recobrimento em papel já são bem estabelecidas, as quais podem ser adaptadas para o recobrimento de papel com espécies químicas ou biológicas. Um terceiro ponto relevante é que dispositivos com dimensões pequenas podem ser construídos em papel, exigindo diminutas quantidades de reagentes para a construção do dispositivo e de amostras para análise. Além disso, configuram-se dispositivos com descarte simplificado.

Embora o uso de papel em bioanalítica não seja algo novo, o seu emprego nunca esteve tão em evidência como tem se encontrado nos últimos dois anos [114]. Duas grandes redes de pesquisa, a *SENTINEL*, no Canadá, e a *VTT Tecnical Research Centre*, na Finlândia, têm se dedicado ao desenvolvimento de bioensaios sobre papel e contam com parceiros comerciais como a Ahlstrom, FUJIFILM Dimatix, Stora Enso Oyj, Sun Chemical e Cascades Canada [115-117]. Além disso, um grupo de pesquisa em Harvard começou a desenvolver ferramentas analíticas portáveis em papel [69,79-81,83-84]. Os trabalhos publicados por estes centros de pesquisa têm se destacado pela versatilidade e simplicidade das ferramentas analíticas desenvolvidas.

No final de 2009, surgiram os trabalhos pioneiros na detecção eletroquímica em papel com os trabalhos independentes dos grupos de pesquisa de Charles S. Henry e George M. Whitesides [31,69]. A Tabela 2 apresenta os dispositivos eletroanalíticos

construídos sobre papel desenvolvidos para a realização de análises rápidas disponíveis na literatura.

Finalidade	Descrição do dispositivo	Região analítica	Aplicação	Ref.
Dispositivo amperométrico para a análise rápida de glicose, lactato e urato em urina.	Constrói eletrodos impressos em papel e delimita regiões hidrofílicas, nas quais imobiliza as enzimas glicose oxidase, lactato oxidase e uricase. Regiões delimitadas por fotolitografia.	mmol/L	Urina sintética	[31]
Dispositivo para a análise rápida de glicose (a) e Chumbo (b).	Constrói eletrodos impressos em papel e delimita um canal hidrofílico onde a amostra percola por capilaridade até os eletrodos. Regiões delimitadas por fotolitografia. Glicose determinada amperometricamente e chumbo determinado por voltametria de redissolução anódica.	mmol/L(a) ppb (b)	Urina sintética (a) - (b)	[69]

 Tabela 2. Dispositivos eletroanalíticos construídos sobre papel descritos na literatura.

Dispositivo para Papel contendo as enzimas Colesterol oxidase e colesterol mg/dL - [96] a análise rápida esterase foi adido sobre o eletrodo impresso modificado com Fe₃O₄ de colesterol para minimizar interferentes.



total

Ilustração adaptada da Ref. [96]

Dispositivo para a análise rápida de ouro e ferro	Regiões hidrofóbicas delimitam as áreas eletroquímicas e ppm colorimétricas de teste. Na zona eletroquímica faz-se a determinação de Au(III) por voltametria de onda quadrada enquanto que na zona colorimétrica se determina Fe(III) com o reagente fenantrolina. Ilustração adaptada da Ref. [118]	Águas residuais de refino de ouro	[118]
	Eletrodos Zona eletroquímica de teste		
	← Zona colorimétrica		
	de teste		

Percebe-se que a fotolitografia tem se tornado uma ferramenta muito útil no desenvolvimento dos dispositivos em papel. Como a pesquisa na área é muito recente, existem poucos artigos descritos na literatura, contudo, já se observa uma predominância no desenvolvimento de dispositivos direcionados à área de diagnóstico clínico.

Os biossensores apresentam alto grau de seletividade devido à presença de uma biomolécula de reconhecimento biológico que tem especificidade para um determinado substrato, contudo, tais dispositivos podem sofrer interferência analítica de moléculas cuja estrutura seja similar ao substrato de interesse. Existem estratégias analíticas que podem ser empregadas para minimizar o efeito de interferêntes ou mesmo o efeito de matriz, mas, em alguns casos, o biossensor acaba por ter sua seletividade estendida a alguns compostos ou a uma classe de compostos. Neste contexto, técnicas de separação como a eletroforese e a cromatografia tem papel vital no processo de análise de amostras.

Em junho de 2010, Van den Berg e colaboradores construíram o primeiro dispositivo point-of-care apto à determinação de espécies iônicas presentes no sangue por meio de eletroforese capilar associada à detecção condutométrica [119]. O *Medimate Multireader*®, como é chamado o dispositivo, foi otimizado para a análise de lítio em sangue no monitoramento e tratamento de pacientes com distúrbio bipolar. O dispositivo apresenta inúmeras inovações tecnológicas como, por exemplo, o chip descartável é previamente preenchido com uma solução tampão e, somente no momento do uso, um selo é removido e permitirá a adição da amostra em uma

abertura. Canais de evaporação permitem que a solução de preenchimento seja parcialmente evaporada e auxilie no preenchimento do dispositivo com a amostra de sangue. Um reservatório com gás foi introduzido para controlar a pressão interna do chip e, consequentemente, a formação de bolhas. O *Medimate Multireader*® permitiu a análise de lítio na faixa de concentração de 0,4 a 4,0 mmol L⁻¹ e com uma precisão de 10% em relação à espectrofotometria de chama. O tempo necessário para a análise é de somente 3,5 minutos, mas a estabilidade de estocagem é baixa, sendo de apenas um mês. Os autores não apresentaram o custo por análise, mas indicaram que seria equiparável a uma análise utilizando o método padrão. O dispositivo está sendo otimizado para a determinação de fosfato, sódio, potássio, L-Dopa e creatinina em sangue e sódio em urina.

Os diferentes processos de separação como a adsorção, partição, troca-iônica e exclusão por tamanho tornaram a cromatografia um dos métodos de separação mais importantes na Química Analítica. Além disso, a integração da separação cromatográfica a sistemas de detecção cada vez mais versáteis e robustos tem permitido a realização de análises mais sensíveis e seletivas aos mais variados tipos de substâncias. Inusitadamente, neste trabalho será apresentada a associação da cromatografia em papel com a detecção eletroquímica na confecção de um dispositivo sensor.

I.4 Objetivos

Este trabalho visa o desenvolvimento de células eletroquímicas descartáveis em papel e em poliéster e o emprego destes transdutores descartáveis no desenvolvimentos de dispositivos eletroquímicos para análises rápidas.

Dois sistemas eletroanalíticos foram desenvolvidos neste trabalho. O primeiro dispositivo a ser construído foi o biossensor descartável para salicilato no qual a célula eletroquímica plástica foi empregada. Foi desenvolvida e caracterizada uma interface de reconhecimento para salicilato empregando a enzima salicilato hidroxilase e o biossensor foi aplicado na análise de sangue capilar. A análise de salicilato em sangue é relevante em casos onde se suspeita de intoxição por salicilato, principalmente, emergências médicas onde é necessário rapidamente determinar o tipo de intoxicação para prontamente iniciar o tratamento. A análise rápida de salicilato no sangue também é importante no controle dos níveis de salicilato em pacientes que ingerem altas doses de salicilato diariamente, como nos casos de doenças reumáticas e lupus, pois as doses terapêuticas são muito próximas da dose tóxica.

Por último, foram desenvolvidos dois protótipos de um dispositivo de separação em papel associado a detecção eletroquímica. Os protótipos foram aplicados na separação e quantificação de misturas contendo ácido áscórbico e ácido úrico. A eletroanálise de ácido úrico é intensamente interferida pela presença de ácido ascórbico e este problema analítico tem sido resolvido com o uso de eletrodos quimicamente modificados ou mesmo com o emprego de técnicas de separação aplicadas previamente à analise eletroquímica.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DESCARTÁVEIS EM OURO

II.1 Resumo

Nesta seção será apresentado o protocolo utilizado na confecção dos eletrodos descartáveis e a caracterização dos dispositivos. Duas células eletroquímicas descartáveis foram confeccionadas:

- Célula eletroquímica plástica, composta por eletrodos de Titânio-Ouro sobre poliéster e;
- ii. Célula eletroquímica em papel, composta por eletrodos de Ouro sobre papel.

Toda a etapa de microfabricação dos eletrodos descartáveis foi realizada em colaboração com o Laboratório Nacional de Luz Sincrotrom (LNLS) e sob orientação do pesquisador Angelo Luiz Gobbi.

II.2 Introdução

O ouro tem sido escolhido como um material muito adequado para o desenvolvimento de sistemas de detecção eletroquímica, no entanto, provavelmente devido ao seu custo elevado, o seu emprego no desenvolvimento de eletrodos descartáveis não é tão difundido, principalmente, se compararmos com o uso de materiais à base de carbono. Contudo, o desenvolvimento de transdutores a base de filmes finos de ouro tem ganho importância devido à alta reatividade interfacial destes eletrodos em comparação com os eletrodos impressos com tintas de ouro [33,42].

A utilização de células eletroquímicas descartáveis é muito prática, porém, é preciso conhecer a natureza eletroquímica das reações na sua interface para que venha a ser utilizada com confiabilidade. Dependendo da forma como foram construídas, dos materiais empregados e do substrato, diferentes interfaces são obtidas e, consequentemente, os sinais analíticos podem ser distintos. O desenvolvimento e a caracterização de transdutores na fabricação de dispositivos eletroanalíticos para a realização de análises rápidas constituem o objetivo do capítulo.

II.3 Metodologia experimental

II.3.1 Equipamentos e reagentes

Os experimentos voltamétricos foram realizados em um potenciostato PGSTAT30 da marca Autolab e o software utilizado para o controle das medidas eletroquímicas foi o GPES 4.9 (*Eco Chemie BV, Holanda*). O cabo original que conecta os três eletrodos ao potenciostato foi substituído. Um cabo adaptado composto por um conector *DIN* (conector padronizado pelo "*Deutsches Institut für Normung*", *DIN*, o instituto de padrões da Alemanha) conectado ao potenciostato e com um terminal constituído por um *slot* de computador permitiu o contato elétrico com os eletrodos descartáveis. Um microscópio eletrônico de varredura, *JEOL JSM 6360 LV-* 30 kV, equipado com um EDS (*NORAN System SIX Model 300*) foi utilizado para observar imagens dos eletrodos impressos. Uma balança, *Sartorius BP 211D balance*, e um pHmetro, *350 Corning pH/ion analyser*, foram utilizados.

A fabricação dos eletrodos em poliéster empregou uma fotoalinhadora, *MJB3* - *Karl Suss*, com uma lâmpada de 9,5 mW cm⁻² de intensidade, um equipamento de espalhamento de fotoresiste, *spinner Headway research inc.*, um banho de ultra-som, *T*- *1425 UNIQUE*, com controle de tempo e chapas aquecedoras, *Tecnal TE-0181*. Para a fabricação dos eletrodos de ouro sobre papel empregou-se um equipamento de Electron-beam *Univex-300, Leybold* e uma impressora de cera parafínica *Phaser 8560 DN, Xerox.*

Os reagentes utilizados nos experimentos foram: hexacianoferrato(III) de potássio (K₃Fe(CN)₆, J. T. Baker, USA), hexacianoferrato(II) de potássio (K₄Fe(CN)₆.3H₂O, J. T. Baker, USA), ácido ferrocenomonocarboxílico (FeCp₂COOH, Sigma-Aldrich, USA), etanol absoluto (CH₃CH₂OH, Synth, Brasil). Hidróxido de sódio (NaOH, Synth, Brasil), ácido nítrico (HNO₃, Synth, Brasil), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄.12 H₂O, J. T. Baker, USA) e fosfato de sódio monobásico anidro (NaH₂PO₄, J. T. Baker, USA) e fosfato de sódio monobásico anidro (NaH₂PO₄, J. T. Baker, USA) e cloreto de potássio (KCI, Vetec, Brasil) foram utilizados como eletrólitos de suporte. Para a fabricação dos eletrodos em poliéster utilizou-se de fotorresiste positivo (*S1811, Shipley Co.*), detergente (*Extran MA 02, Merk*), álcool isopropílico (*J. T. Baker*), um revelador (*AZ 351, Clariant*), transparências para xerografia *Image light*[®] e fita adesiva/isolante (*Fita Mágica - 810 Scotch, 3M*). Para a

fabricação dos eletrodos em papel empregou-se papel cromatográfico da Whatman 1Chr e o fotorresiste *Futurrex*.

Todos os reagentes químicos, exceto se diferentemente descrito, são de grau analítico e foram utilizados sem prévia etapa de purificação. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada (Sistema Mili-Q de purificação de água, Millipore Inc., USA) com resistividade maior que 18 MΩ/cm.

II.3.2 Protocolo de manufatura da célula eletroquímica plástica: os eletrodos descartáveis de Titânio-Ouro sobre poliéster

Os eletrodos foram impressos sobre um filme de poliéster de 100 µm utilizado comercialmente como transparência para retroprojeção. A fabricação dos eletrodos de Ti-Au em transparência seguiu o seguinte processo: O poliéster foi limpo e em seguida recoberto com um fotorresiste empregando um equipamento de espalhamento ("spinner", do inglês). A limpeza do substrato de poliéster foi realizada por meio da sua imersão em um banho ultrassônico com o detergente Extran durante cinco minutos, em seguida, foi lavado com álcool isopropílico e, por último, seco em atmosfera de nitrogênio. O spinner foi empregado para recobrir o poliéster com uma emulsão de um fotorresistepositivo e o procedimento foi concluído em 30 segundos a 4000 rotações por minuto. Após esta etapa, o solvente do fotorresistefoi volatilizado ao se colocar o sistema em um chapa de aquecimento a 90 °C por cinco minutos em um procedimento conhecido como "pré-bake". Empregando uma máscara positiva que delimitava as regiões que deveriam receber luz U.V., o sistema foi irradiado por 20 segundos através de uma fotoalinhadora. A máscara continha o desenho de três eletrodos dispostos de forma integrada. A etapa de revelação foi realizada ao expor a camada de fotorresistedegradado em contato com a solução fortemente básica do revelador diluído em água na proporção de 1:3 (v/v), sob constante agitação durante 1 minuto. Uma camada de, aproximadamente, 20 nm de Titânio e uma segunda camada, de cerca, de 200 nm em Au foram depositadas sobre o substrato por sputtering. Todo o fotorresistedepositado sob a camada metálica foi removido do substrato deixando a estrutura de três eletrodos por meio da técnica conhecida por "lift-off". O Esquema 7 ilustra todo o processo descrito acima.



Esquema 7. Representação esquemática simplificada do processo fotolitográfico utilizado na construção da célula eletroquímica descartável. Imagem inserida dos eletrodos construídos para estudar a relação de área entre eletrodo auxiliar e trabalho.

O formato dos eletrodos descartáveis é simples: os eletrodos auxiliar e referência possuem uma área de 3,00 mm² e o eletrodo de trabalho apresentou uma área de 1,50 mm². A melhor relação entre as áreas do eletrodo de trabalho e o auxiliar foi obtida por meio de um estudo onde a área do eletrodo auxiliar foi mantida constante, enquanto, a área do eletrodo de trabalho variou de 0,03 a 3,00 mm² como foi ilustrado no Esquema 7. A área eletroativa dos eletrodos e a região de contato eletrônico com o potenciostato foram delimitadas por meio de uma fita adesiva/isolante perpendicularmente disposta na parte central dos eletrodos.

II.3.3 Protocolo de manufatura da célula eletroquímica em papel: os eletrodos descartáveis de Ouro sobre papel

Uma máscara de sombra foi construída em cobre por processos de fotolitografia e corrosão. Esta máscara física foi posicionada sobre papel cromatográfico 1Chr da Whatman. Em seguida, um filme de ouro foi depositado sobre o sistema por *electronbeam* a uma pressão base de 2,1 10⁻⁶ mBar empregando um alvo de ouro importado com 99,9999% de pureza. O equipamento foi ajustado para a deposição de 200 nm de ouro sobre o substrato. Para criar canais no papel para orientar o fluxo da solução e para isolar a região eletroativa dos três eletrodos de ouro, na face anterior do papel, duas linhas foram construídas de duas formas diferentes: i. por meio da técnica de silkscreen utilizando o fotorresiste Futurrex ou; ii. Imprimindo linhas com cera utilizando a impressora Phaser 8560 DN da Xerox.

A serigrafia foi realizada em telas de seda com canais de diferentes espessuras e comprimentos que, posteriormente, foram serigrafados com o fotorresiste Futurrex sobre o verso do papel contendo os eletrodos de filme metálico.

A construção dos canais utilizando cera (solid ink, do inglês) foi realizada da seguinte maneira: antes de depositar os eletrodos metálicos, linhas de cera em papel cromatográfico foram impressas na impressora Phaser 8560DN, Xerox. Em seguida as folhas de papel eram aquecidas em chapa de aquecimento à temperatura nominal de 70 °C. Com este procedimento a cera se fundia e penetrava no papel construindo os canais em toda a espessura do papel. Há uma expansão de aproximadamente 0,5 mm da linha impressa da cera quando este procedimento é realizado.



Esquema 8. Descrição da célula eletroquímica construída em papel (área branca em torno dos eletrodos) onde a área eletroativa dos eletrodos é delimitada pelas trilhas de parafina impressas em papel (em preto). Foto do dispositivo real com um aumento de aproximadamente seis vezes.

A máscara física foi construída de forma a gerar eletrodos com o seguinte formato: os eletrodos auxiliar e referência possuem formato retangular com uma área de 3,00 mm² e o eletrodo de trabalho apresentou uma área de 2,50 mm² para canais de 5 mm. Os eletrodos auxiliar e referência foram construídos com largura de 1,0 mm e o eletrodo de trabalho com largura de 0,5 mm, desta forma, quanto mais largo o canal construído com as trilhas, maior a área dos eletrodos.

II.3.4 Avaliação do sistema de referência da célula eletroquímica plástica

Neste estudo foram utilizados os eletrodos de Ti-Au sobre poliéster. O sistema de referência foi avaliado e comparado a um sistema de referência padrão: o eletrodo de calomelano saturado (SCE, sigla do nome em inglês). Sua estabilidade também foi avaliada monitorando o perfil voltamétrico obtido com o dispositivo em função do tempo em soluções contendo 2,5 mmol L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆ e de K₄Fe(CN)₆ preparadas em KNO₃, 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0

II.3.5 Determinação da área eletroquímica superficial (ESA) dos eletrodos de ouro

A área eletroativa dos eletrodos foi determinada por meio da determinação da quantidade de óxido de ouro presente na superfície eletródica, por ser um método bastante confiável e adequado para obtenção da área microscópica exibida por superfícies de ouro [120-123]. A determinação da área eletroquímica do eletrodo de trabalho foi realizada através da integração da área de pico de redução da curva voltamétrica do ouro, obtidas a 25 °C, entre - 0,3 e +0,9 V vs. Au, a 50 mV s⁻¹, em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. A carga necessária para a redução de uma camada de óxido de ouro sobre a superfície de ouro policristalino foi considerada 390 ± 10 μ C cm⁻² para efeito de cálculos [120]. Então, ESA é a razão entre a carga relacionada à redução do óxido de ouro da superfície estudada (Q_{óxido de Au}) e Q_{Std}. Geralmente, os valores de ESA podem ser expressos como fator de rugosidade, que é simplesmente o valor de ESA expresso por unidade de área geométrica superfícial [120]. O cálculo da área eletroativa para a célula eletroquímica em papel foi realizado com os eletrodos cuja área foi delimitada com o fotorresistefuturrex.

II.3.6 Perfil Eletroquímico de sondas redox sob eletrodos de ouro

Fez-se uso hexacianoferrato(II) de potássio e hexacianoferrato(III) de potássio como molécula sonda do comportamento e reatividade de superfícies de ouro dos eletrodos da célula eletroquímica plástica. As soluções foram preparadas em KNO₃, 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 contendo 2,5 mmol L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆ e de K₄Fe(CN)₆. As medidas voltamétricas foram realizadas entre os potenciais de -700 e 700 mV vs. Au.

Para a avaliação célula eletroquímica em papel fez-se uso de ácido ferroceno monocarboxílico como molécula sonda. As soluções foram preparadas em tampão 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 contendo 1,0 mmol L⁻¹ de ácido ferrocenomonocarboxílico. Foram avaliados os efeitos dos eletrólitos KNO₃, fosfato de sódio, PIPES e TRIS na resposta eletroquímica do sensor estudado. Foram preparadas soluções aquosas dos eletrólitos e dos tampões descritos acima na concentração de 0,1 mol L⁻¹, e o pH das soluções foi ajustado para 7,0. Foi avaliado o efeito que diferentes potenciais hidrogeniônicos exercem na resposta eletroquímica da célula eletroquímica em papel. Foi preparado 500 mL de uma solução aquosa de fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ que foi igualmente dividida em 3 porções. Cada alíquota recebeu o ajuste para um valor único de pH entre

os seguintes: 6,0, 7,0 e 8,0. As medidas voltamétricas foram realizadas entre os potenciais de -150 e 400 mV vs. Au.

II.4 Resultados e Discussão

II.4.1 Avaliação da Célula eletroquímica plástica

Construir uma plataforma confiável para o desenvolvimento de dispositivos eletroanalíticos descartáveis era uma etapa essencial do trabalho. Muitos substratos foram testados como poliéster, vidro, kapton[®], resinas fenólicas, PVC etc. No entanto, o poliéster apresentou os melhores resultados quanto à reprodutibilidade e eletroatividade do ouro depositado. A dureza do vidro e das resinas fenólicas dificultava a obtenção dos eletrodos individuais. Nestes substratos eram produzidos 12 eletrodos por batelada e a etapa final de corte, no qual os eletrodos eram separados para o uso, promovia a perda de inúmeras unidades devido ao procedimento manual necessário para esta operação. Muitos eletrodos acabavam riscados e aqueles confeccionados sobre vidro permaneciam com arestas cortantes que tornavam o seu manuseio arriscado. No intuito de utilizar tesouras comuns na etapa final de corte, pensou-se em empregar PVC na construção dos eletrodos, mas este material se deformava durante a manufatura dos eletrodos na etapa de evaporação de solvente do fotorresiste.

Na busca de um material que não sofresse deformação a altas temperaturas surgiu a idéia de empregar transparências para xerografia como substrato. Estas transparências são feitas em poliéster, um material flexível e transparente, que não se deforma em temperaturas inferiores a 150 °C e é facilmente cortado, dado que a espessura das folhas vendidas comercialmente é de apenas 100 µm. Outro material que se mostrou adequado para a confecção dos eletrodos descartáveis foi o Kapton[®], um filme de poliimida desenvolvido pela Dupont que é estável em ampla faixa de temperatura e é muito empregado na confecção de circuitos impressos flexíveis. A caracterização eletroquímica mostrou que o desempenho dos eletrodos confeccionados em Kapton[®] e em poliéster era similar, portanto, devido ao baixo custo do poliéster, este foi escolhido como substrato ideal.

II.4.1.1 Avaliação do pseudo-eletrodo de referência

Assim como os eletrodos de trabalho e auxiliar, o eletrodo de referência também foi confecionado em ouro. Porém, o mesmo não apresenta todos os requisitos de um eletrodo de referência padrão, desta forma, é classificado como um sistema de pseudo-referência.



Figura 1. Voltamograma cíclico da célula eletroquímica descartável (área do eletrodo de trabalho: 1,50 mm²) frente a dois diferentes sistemas de referência: eletrodo de calomelano saturado (c) e eletrodo de Au (b) em solução contendo a sonda molecular $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ (5 mmol L⁻¹) em KNO₃ (0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0), 50 mV s⁻¹. Figura Inserida: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura da superfície dos eletrodos de ouro, 20 kV. Legenda: (a) célula eletroquímica plástica com pseudo-referência em ouro em solução tampão na ausência da sonda molecular.

Na Figura 1, o pseudo-eletrodo de referência em Au foi comparado ao eletrodo de referência de calomelano e foi verificado que o potencial redox da sonda molecular Fe(CN)₆^{4-/3-} desloca-se para potenciais mais negativos, cerca de -172 mV *vs.* SCE. A estabilidade do pseudo-eletrodo de referência de ouro foi monitorada durante 1 hora em KCI 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. A Figura 1 mostra, ainda, o desenho do dispositivo descartável

com a correspondente imagem por microscopia eletrônica de varredura da sua superfície. Nela observa-se que as partículas de ouro são bem definidas e homogêneas quanto ao tamanho e a forma e que este aspecto é, particularmente, interessante para a obtenção de dispositivos reprodutíveis, especialmente, quando o sistema de referência depende das suas propriedades.

II.4.1.2 Caracterização voltamétrica da célula eletroquímica plástica

A magnitude da área eletroquímica da superfície eletródica é uma característica importante para um sistema que servirá de suporte para um biossensor amperométrico. A área eletroquímica (ESA, sigla do nome em inglês) do eletrodo descartável é, em média, 2,5 vezes maior do que sua área geométrica (Tabela 3). A ESA é proporcional à rugosidade microscópica observada na superfíce dos eletrodos de ouro e é um fator importante para a imobilização da camada de reconhecimento.

Tabela 3. Caracterização voltamétrica da célula eletroquímica descartável construída com o sistema poliéster/Ti/Au. Condições experimentais: 5,0 mmol $Fe(CN)_6$]⁴⁻/[$Fe(CN)_6$]³⁻ em 0,1 mol L⁻¹ KNO₃, pH 7,0.

Área	$\Delta E_{p} * / V$	$\Delta E_{p} * / V$	i _{pa} /i _{pc}	Área
Geométrica*	a 50 mV s ⁻¹	a 500 mV s ⁻¹	a 50 mV s ⁻¹	Eletroquímica*
/ mm²				(ESA) / mm ²
0,30	0,29 ± 0,01	0,36 ± 0,01	1,12 ± 0,02	0,70 ± 0,09
0,75	0,16 ± 0,03	0,31 ± 0,03	1,12 ± 0,01	2,21 ± 0,16
1,50	0,14 ± 0,03	0,26 ± 0,02	1,07 ± 0,01	3,70 ± 0,11
3,00	0,09 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,98 ± 0,01	6,91 ± 0,40
* (n=6)	•	•	•	·

As respostas eletroquímicas da sonda molecular hexacianoferrato(II/III) nos eletrodos de filmes finos de ouro foram avaliadas para microcélulas eletroquímicas que apresentavam diferentes áreas dos eletrodos de trabalho. Como mostra a Tabela 3, a ΔE_p para todos os sistemas estudados foi superior àquele esperado para o sistema monoeletrônico reversível (59 mV). No entanto, o ΔE_p diminui quando a velocidade de
varredura diminui e quando a área do eletrodo de trabalho aumenta. Adicionalmente, a razão i_{pa}/i_{pc} diminui quando a area dos eletrodos de trabalho aumenta. O fotorresiste empregado na etapa de microfabricação é do tipo positivo e sua composição se baseia na resinas Novolac[®] composta por um copolímero entre fenol e formaldeído. A resina Novolac[®] é solúvel em soluções aquosas de hidróxidos alcalinos. Foi verificado que o sobrepotencial observado no sistema não é oriundo de fotorresisteresidual sobre a superfície dos eletrodos de trabalho, mas, provavelmente, devido à resistência ôhmica intrínseca do sistema.



Figura 2. (a) Voltamograma cíclico da célula eletroquímica descartável em $[Fe(CN)_6]^{4-}$ / $[Fe(CN)_6]^{3-}$ a 5,0 mmol L⁻¹ em KNO₃ (0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0) em várias velocidades de varredura: 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mV/s. Área do eletrodo de trabalho: 1,50 mm². (b) gráfico da corrente de pico anódica (\blacksquare) e catódica (\circ) versus a raiz da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) para os experimentos realizados em (a). As linhas pontilhadas são regressões lineares para cada conjunto de pontos.

Em geral, a área do eletrodo auxiliar deve ser muito maior do que a área do eletrodo de trabalho para que não ocorra uma supressão da reação a ser monitorada no último. As microcélulas eletroquímicas com eletrodos de trabalho menores que 3,00 mm² apresentaram correntes de fundo muito pequenas. Entretanto, as microcélulas com eletrodos de área 0,30 e 0,75 mm² apresentaram baixas taxas de repetibilidade na sua construção (aproximadamente 50 %). Desta forma, as microcélulas com eletrodos de 1,50 mm² foram escolhidas como as mais adequadas, pois

apresentaram significativa diferença de área entre os eletrodos de trabalho e o auxiliar, alta repetibilidade de construção e excelente comportamento eletroquímico (Figura 2).

Na Figura 2, pode-se observar que o comportamento da corrente de pico em função da velocidade de varredura indica que a velocidade da reação da sonda redox é governada pela difusão do par $Fe(CN)_6]^{4-/}[Fe(CN)_6]^{3-}$ para a superfície do eletrodo planar. O conjunto de dados eletroquímicos indica que nenhuma reação paralela está acontecendo e que, em baixas velocidades de varredura, a cinética da transferência eletródica é rápida o suficiente para manter a concentração das espécies redox na interface em valores próximos daqueles previstos pela equação de Nernst.

II.4.2 Avaliação da Célula eletroquímica em papel

II.4.2.1 Caracterização voltamétrica da célula eletroquímica em papel

Todas as faces do eletrodo de ouro impresso em papel são ativas, porém, somente aquela em contanto com o papel tem contato eletrolítico quando o papel é umidecido. Quando esta célula eletroquímica é colocada em recipiente contendo grande volume de solução eletrolítica uma das faces está em contato direto com o papel, enquanto que a outra fica em contato direto com a solução eletrolítica. A Figura 3 mostra que a corrente observada com o dispositivo imerso em eletrólito é significativamente maior do que a área obtida com a célula eletroquímica umidecida por ação da capilaridade do papel sob a solução eletrolítica.

Este resultado evidencia o efeito do papel em reter a espécie eletroativa, diminuindo a sua disponibilidade na superfície eletródica. Esta diminuição da corrente varia de acordo com o papel empregado e, neste trabalho, foi utilizado o papel Chr 1 da Whatman e a redução verificada foi de cerca de 50%, em média (n=3) , pois nas condições descritas na Figura 3, a corrente anódica observada quando a face coberta por papel era eletroativa foi de 1,3 μ A, enquanto que aquela obtida com uma face livre e outra coberta com papel foi de 4,1 μ A. Observa-se também que os potenciais de pico permanecem constantes quando o contato eletrolítico é feito somente através de papel umidecido.



Figura 3. (a) Voltamograma cíclico da célula eletroquímica descartável em papel em 1,0 mmol L^{-1} ácido ferrocenomonocarboxílico em tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH = 7,0) a 50 mV s⁻¹. Área do eletrodo de trabalho em papel: 2,5 mm². (-) Célula eletroquímica umidecida por ação da capilaridade do papel sob a solução eletrolítica. (---) Célula eletroquímica em papel em papel com os eletrodos imersos em solução eletrolítica.

A estabilidade do pseudo-eletrodo de referência de ouro em papel foi avaliada monitorando-se o perfil voltamétrico obtido com a célula eletroquímica em papel durante 1 hora. Durante este período não foi observada nenhuma mudança nos potenciais de pico anódico e catódico e a diferença na magnitude de corrente de pico anódico entre o primeiro e o último voltamograma obtido durante este período foi de, aproximadamente, 7,0 %.

O potencial formal (E²) é característico da espécie eletroativa e é uma forma ajustada do potencial padrão, pois varia de acordo com os coeficientes de atividade das espécies presentes na solução de medida e com as características da interface condutora. Foi verificado que os E² do ácido ferrocenomonocarboxílico, calculado nas codições experimentais da Figura 4 (a) e (b), utilizando o eletrodo de ouro construído em papel e sobre poliéster, são diferentes. Considerando-se experimentos realizados em sextuplicata, o E² para o FeCp₂COOH na célula eletroquímica em papel obtido foi de 190 mV, enquanto que utilizando a célula eletroquímica plástica o E² para o

FeCp₂COOH encontrado foi de 86 mV. Como o coeficiente de atividade da espécie eletroativa foi fixado, a mudança no potencial formal se deve a diferenças na eletroatividade da interface dos eletrodos construídos em papel e em poliéster, apesar de ambos serem construídos em ouro. Portanto, os sistemas de pseudo-referência empregados em cada célula eletroquímica são diferentes e irão fornecer diferentes potenciais relativos ao eletrodo de calomelano padrão.

Foi avaliado se a diferença nos E^o obtidos para o FeCp₂COOH sobre as duas células eletroquímicas era devido a diferentes formas de deposição do ouro em cada sistema, já que o ouro foi depositado sobre o poliéster por meio de *sputtering*, enquanto que, sobre o papel cromatográfico, foi depositado por *electron-beam*. Neste sentido, foram construídas algumas células descartáveis em papel pela técnica de *sputtering* e determinou-se o E^o para o FeCp₂COOH neste sistema. Observou-se que as duas células eletroquímicas descartáveis construídas sobre papel apresentaram o mesmo E^o para o FeCp₂COOH, indicando que o potencial formal da espécie independe da forma pela qual o ouro foi depositado. Provavelmente, a camada de papel intimamente ligada à superfície eletródica interfere no comportamento das espécies que se difundem para o eletrodo. A presença de grupos hidroxila do biopolímero pode atuar na formação de interações intermoleculares capazes interferir na dinâmica de transferência de massa ou mesmo de transferência de elétrons de espécies eletroativas para os transdutores construídos em papel.

Na Figura 4, pode-se observar que o comportamento da corrente de pico em função da velocidade de varredura indica que a velocidade da reação da sonda redox é governada pela difusão do par [FeCp₂COOH]/[FeCp₂COOH]⁺ para a superfície do eletrodo planar de ouro sobre o papel e sobre o poliéster. O conjunto de dados eletroquímicos indica que nenhuma reação paralela ocorre e que a separação dos potenciais de pico é inferior a 90 mV. Este perfil indica que a cinética da transferência elétrons é mais lenta do que a prevista para sistemas reversíveis, porém, rápida o suficiente para manter a concentração das espécies redox na interface em valores próximos daqueles previstos pela equação de Nernst.



Figura 4. (a) Voltamograma cíclico da célula eletroquímica descartável em papel em 1,0 mmol L^{-1} de FeCp₂COOH em tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH = 7,0, 50 mV/s); (a') Voltamogramas cíclicos da célula eletroquímica descartável em papel em 1,0 mmol L^{-1} de FeCp₂COOH em tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH = 7,0) em várias velocidades de varredura: 20, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mV/s, sendo que o gráfico apresenta a densidade de corrente de pico anódica (**•**) versus a raiz da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) e as linhas pontilhadas são regressões lineares para cada conjunto de pontos. (b) Voltamograma cíclico da célula eletroquímica descartável em poliéster nas mesmas condições experimentais de (a); (b') Voltamogramas cíclicos da célula eletroquímica descartável em poliéster nas mesmas condições experimentais de scortas em (a'). Densidade de corrente representada por J.



Figura 5. Resposta relativa referente à magnitude de corrente anódica obtida para a célula eletroquímica descartável em papel em 1,0 mmol L⁻¹ ácido ferrocenomonocarboxílico em diversos eletrólitos (0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0 a 50 mV s⁻¹). Eletrólitos estudados: KNO₃, tampão fosfato, PIPES e TRIS. Área do eletrodo de trabalho: 1,50 mm². Gráfico inserido: Estudo de pH realizado em Tampão fosfato em três diferentes pH: 6,0, 7,0 e 8,0.

A Figura 5 apresenta o efeito do tipo de eletrólito de suporte e do pH no comportamento do par redox [FeCp₂COOH]/[FeCp₂COOH]⁺ utilizando a célula eletroquímica em papel. O pK_a do ácido ferrocenomonocarboxílico é igual a 6,78 [121]. Verificou-se que, em pH 7, as menores correntes de pico foram observadas em KNO₃, magnitudes intermediárias foram obtidas com PIPES e TRIS e as maiores correntes de pico obtidas em tampão fosfato. Na Figura 5 também pode-se notar que o E^o da sonda molecular se desloca para valores mais positivos à medida o pH do meio diminui. Em meio básico, a sonda redox apresenta-se desprotonada, [FeCp₂COO⁻]/[FeCp₂COO⁻]⁺, adquirindo carga negativa neste meio. Por este motivo, a oxidação do sítio ativo é facilitada em meio básico devido à compensação de cargas que ocorre no estado oxidado. Este fenômeno justifica o deslocamento de E^o para valores mais próximos de zero à medida que o pH aumenta.

II.4.3. Rugosidade dos eletrodos das células eletroquímicas descartáveis

O fator de rugosidade calculado para o eletrodo construído sobre poliéster é de 2,5, enquanto que para o eletrodo de ouro sobre papel é de 4,2. Os dois eletrodos descartáveis apresentam alta rugosidade se comparados com eletrodos de ouro policristalino, que dependendo do pré-tratamento, apresentam fatores de rugosidade que variam de 1,2 até 1,8 [122].



Figura 6. Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro com pico de redução de óxido de ouro em destaque. Eletrodo de ouro policristalino (gráfico a), eletrodo de ouro depositado sobre poliéster (gráfico b), eletrodo de ouro em papel (gráfico c). Condições experimentais: Tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0, 50 mV/s. A medida realizada com o eletrodo de ouro policristalino empregou um eletrodo de calomelano saturado e um eletrodo auxiliar de platina.

A Figura 6 destaca a área sob os picos de redução de óxido de ouro para três eletrodos de trabalho diferentes: o eletrodo de ouro policristalino e os eletrodos de ouro

sobre poliéster e sobre papel. Como o fator de rugosidade é proporcional à carga obtida durante a redução do óxido de ouro, que por sua vez, é proporcional à área do pico de redução do óxido, a Figura 6 ilustra claramente a diferença de área obtida nos três sistemas. Verifica-se que o ouro depositado tem rugosidade maior em substratos que por si só apresentam rugosidade elevada, como é o caso do papel.

II.4.4 Imagens das células eletroquímicas descartáveis

Algumas imagens obtidas dos dispositivos são apresentadas abaixo.



Figura 7. Imagem da célula eletroquímica construída em poliéster. A área eletroativa dos eletrodos é delimitada por uma fita adesiva/isolante (*Fita Mágica[®], 810 Scotch, 3M*).



Figura 8. Imagem da célula eletroquímica construída em papel. A área eletroativa dos eletrodos é delimitada pelas trilhas de (a) parafina impressas com a impressora *Phaser, Xerox* em preto ou (b) trilhas de fotorresiste Futurrex construídas por silk-screen em bege. Na parte inferior dos eletrodos de ouro, na região que não faz contato elétrico com o conector, os eletrodos recebem uma camada de fotorresisteFuturrex para que o papel fique mais rígido e assim facilite sua introdução no conector.

II.5 Conclusão parcial

Foram caracterizadas duas plataformas eletroquímicas confiáveis que podem, seguramente, ser empregadas no desenvolvimento de dispositivos analíticos descartáveis. Considerando-se o valor do ouro e o processo de manufatura dos eletrodos o custo aproximado de cada dispositivo é de, aproximadamente, dois dólares. Este valor ainda é pouco competitivo, mas como o processo de manufatura dos eletrodos pode ser automatizado, acredita-se que este valor seja reduzido.

Os eletrodos apresentaram característivas eletroquímicas adequadas como transdutores, principalmente quando baixas velocidades de varredura são empregadas devido ao fato de responder de forma aproximada daquela prevista pela equação de Nernst.

Os eletrodos foram caracterizados quanto à rugosidade e este é um fator que deve ser conhecido, pois pode influenciar na etapa de formação da interface de reconhecimento de um sensor. Além disso, o sistema de pseudo-referência foi estudado e comparado com um sistema de referência padrão bem conhecido.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO DESCARTÁVEL PARA A DETERMINAÇÃO DE SALICILATO EM SANGUE

III. 1 Resumo

Nesta seção apresentaremos a construção de um biossensor eletroquímico descartável para o monitoramento dos níveis de salicilato no sangue. A construção do biossensor é baseada na imobilização da enzima salicilato hidroxilase com glutaraldeído e albumina de soro bovino sobre uma microcélula eletroquímica descartável.

III. 2 Introdução

Os maiores avanços e esforços para o desenvolvimento de biossensores para salicilato foram realizados, em sua maioria, até o final do século XX. Um trabalho de revisão realizado por Kubota e colaboradores [124] compilou a maior parte dos trabalhos desenvolvidos na área com poucas exceções [125-127]. Em geral, o foco dos trabalhos era o desenvolvimento de métodos de análise rápidos e confiáveis e, para isso, buscavam acoplar um biossensor para salicilato a sistemas de análise em fluxo. Apesar da enorme necessidade de um dispositivo portátil que permitisse a determinação rápida dos níveis de salicilato no sangue para a sinalização de casos de intoxicação acidental ou intencional, um biossensor descartável para análise de salicilato em sangue foi descrito somente neste trabalho. Anteriormente, foram descritos na literatura dois trabalhos envolvendo a determinação de salicilato empregando eletrodos descartáveis de carbono sobre PVC, no entanto, adequados somente para amostras de plasma sanguíneo [102,104].

III. 3 Metodologia experimental

III.3.1 Equipamentos

Foi utilizada a célula eletroquímica plástica e os conectores apropriados descritos no capítulo anterior. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato Autolab PGSTAT30 utilizando o software GPES 4.9 (*Eco Chemie BV, Holanda*).

O banho de ultra-som utilizado era da marca UNIQUE T-1425, apresentava freqüência de 25 kHz e um pico máximo de potencia de 54 W. Uma balança analítica

Sartorius BP 211D, de 5 casas decimais, foi utilizada para as tomadas de massa dos compostos químicos.

III.3.2 Reagentes

As soluções aquosas foram preparadas com água deionizada (Mili-Q Water Purifier System, Millipore Inc., USA) com resistividade > 18 M Ω /cm. Toda vidraria utilizada foi limpa em HNO₃ 10% (v/v) e água deionizada a fim de evitar contaminações. Abaixo estão descritos os reagentes utilizados, bem como sua procedência: Salicilato hidroxilase de *pseudomonas sp.* (SH, Sigma-Aldrich, USA), β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (β -NADH, Sigma, USA), Glutaraldeído grau I, 25 % (Sigma, USA), albumina de soro bovino (BSA, Sigma, USA) e salicilato de sódio (Merck, Alemanha).

Somente reagentes de grau P. A. foram usados para preparar as soluções como ácido piperazina -1,4bis(2-etanosulfônico) (PIPES, Sigma, USA), Tris(hidroximetil) amino metano (TRIS, Sigma, USA), ácido n-(2-hidroxietil)piperazina-n-'2-etanosulfônico (PIPES, Sigma, USA), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄.12 H₂O, J. T. Baker, USA) e fosfato de sódio monobásico anidro (NaH₂PO₄, J. T. Baker, USA), cloreto de potássio (KCI, Vetec, Brasil), ácido bórico e ácido cítrico (Merck, Alemanha).

III.3.3 Construção da inteface de reconhecimento

Antes de serem utilizadas, as células eletroquímicas plásticas eram lavadas com ácido sulfúrico diluído a 0,1 mol L⁻¹ e, em seguida, lavadas com água em abundância. Por último, os eletrodos eram secos em temperatura ambiente. Este pré-tratamento foi avaliado e melhorava efetivamente a reversibilidade da sonda $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ sobre a superfície dos eletrodos descartáveis, provavelmente, devido à remoção de alguma sujidade da superfície dos eletrodos.

A imobilização da enzima salicilato hidroxilase foi realizada da seguinte forma: dissolveu-se 1,0 mg da enzima em 100 μ L de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,6) contendo 0,5 % (v/v) de glutaraldeído e 1,0 mg de BSA. Uma alíquota desta solução, somente 5,0 μ L, foi colocada sobre a superfície eletródica do eletrodo de trabalho da célula eletroquímica plástica. Esta solução foi seca à temperatura ambiente durante 1 hora. Esta superfície modificada foi empregada como a interface de reconhecimento do biossensor.

As medidas foram realizadas em uma gota de solução aquosa disposta sobre uma região previamente delimitada por uma fita de material isolante na célula eletroquímica plástica. O volume de solução utilizado em cada medida foi de 20,0 µL, mas volumes de até 80,0 µL podem ser utilizados.

III.3.3.1 Efeito da concentração de glutaraldeído

A concentração de glutaraldeído presente na solução contendo a enzima foi estudada em dois níveis: 0,5 e 2,0%. Como a solução comercial utilizada neste estudo apresentava a concentração de 25 %, o preparo das duas soluções foi realizada diluindo-se a solução mais concentrada de glutaraldeído em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,6 até a obtenção das concentrações desejadas. Em seguida, a solução contendo a enzima foi preparada utilizando-se destas soluções. Três eletrodos foram construídos com cada solução e a resposta voltamétrica obtida em cada sistema foi avaliada e comparada na presença e ausência de 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio. A faixa de potencial estudada foi de -100 a 500 mV *vs.* Au a 50 mV s⁻¹ em eletrólito composto por tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6 e 1,0 mmol L⁻¹ NADH.

III.3.3.2 Efeito da concentração de enzima

Foram preparadas quatro diferentes soluções contendo cada uma 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 mg da enzima salicilato hidroxilase por mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. A concentração de glutaraldeído nestes estudos foi fixada em 0,5% (v/v) e a de BSA em 1,0 mg mL⁻¹. Em seguida, três eletrodos foram construídos com cada solução e a resposta voltamétrica obtida em cada sistema foi avaliada e comparada na presença e ausência de 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio. A faixa de potencial estudada foi de - 100 a 500 mV *vs.* Au a 50 mV s⁻¹ em eletrólito composto por tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6 e 1,0 mmol L⁻¹ NADH.

III.3.3.3 Efeito da concentração do tampão

A concentração de fosfato de sódio presente na solução contendo a enzima foi estudada em dois níveis: 0,1 mol L⁻¹ e 0,2 mol L⁻¹. Para este estudo, foram preparadas duas soluções de fosfato de sódio nas concentrações desejadas utilizando fosfato de sódio monobásico e o pH das soluções foi ajustado para pH 7,6. Em seguida, a solução contendo a enzima foi preparada utilizando-se destas soluções e três eletrodos foram

construídos com cada solução. O aspecto dos eletrodos e a resposta voltamétrica obtida em cada sistema foram avaliados e comparados na presença e ausência de 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio. A faixa de potencial estudada foi de -100 a 500 mV *vs*. Au a 50 mV s⁻¹ em eletrólito composto por tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6 e 1,0 mmol L⁻¹ NADH.

III.3.4 Caracterização Eletroquímica da interface de reconhecimento

III.3.4.1 Avaliação voltamétrica da interface de reconhecimento

O perfil voltamétrico da célula eletroquímica descartável modificada com a camada de reconhecimento enzimática foi obtido em presença e ausência de salicilato de sódio. A faixa de potencial estudada foi de -100 a 500 mV *vs.* Au a 20 mV s⁻¹ em eletrólito composto por tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6 e 1,0 mmol L⁻¹ NADH. Soluções contendo diferentes concentrações de salicilato foram adicionadas sobre a superfície eletródica.

III.3.4.2 Efeito do potencial aplicado na detecção amperométrica

A influência do potencial aplicado na detecção amperométrica de salicilato pelo biossensor foi avaliada na faixa de potencial de -50 a 400 mV. Neste estudo, a resposta amperométrica obtida em cada potencial aplicado foi comparado na presença e ausência de 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio em eletrólito composto por tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6.

III.3.4.3 Efeito do pH da solução eletrolítica

Os pH estudados foram 6,5, 7,0, 7,6 e 8,0. O efeito do pH da solução eletrolítica foi avaliado comparando-se a variação de corrente obtida na resposta amperométrica do biossensor na presença e ausência de 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio em eletrólito composto por tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, em diferentes pH. As soluções foram preparadas utilizando fosfato de sódio monobásico e o pH das soluções foi ajustado utilizando ácido fosfórico ou hidróxido de sódio.

III.3.4.4 Efeito do tipo e da concentração do eletrólito de suporte

Foram avaliados os efeitos dos eletrólitos HEPES, PIPES, TRIS, Tampão fosfato, tampão Mc-Ilvaine (citrato de sódio e fosfato de sódio) e tampão Britton-Robinson

(ácido bórico, ácido cítrico e fosfato de sódio) na resposta eletroquímica do sensor estudado.

Foram preparadas soluções aquosas dos eletrólitos HEPES, PIPES, TRIS e fosfato de sódio na concentração de 0,2 mol L⁻¹, e o pH das soluções foi ajustado para 7,6 com ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio. O tampão Britton-Robinson foi preparado pela adição de 0,04 mol L⁻¹ de ácido bórico, 0,04 mol L⁻¹ de ácido cítrico e 0,04 mol L⁻¹ de fosfato de sódio e o pH foi ajustado com hidróxido de sódio até que atingisse o pH 7,6 [128]. O Tampão Mc-Ilvaine pH 7,6 foi preparado misturando-se 6,4 mL de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido cítrico com 93,6 mL de uma solução 0,2 mol L⁻¹ de fosfato de sódio [129].

O efeito da concentração do eletrólito foi avaliado variando-se a concentração do tampão fosfato na faixa de 0,01 até 0,2 mol L⁻¹. As demais condições experimentais foram fixadas durante a realização deste estudo.

III.3.4.5 Efeito da concentração de NADH

Fixando-se a concentração de salicilato de sódio em 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹, a concentração de NADH no sistema variou de 1,0 10⁻³ a 1,0 10⁻⁴ mol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6. A resposta amperométrica foi avaliada a partir da variação de corrente obtida na resposta amperométrica do biossensor na presença e ausência de salicilato de sódio em eletrólito aplicando 300 mV *vs*. Au durante a medida.

II.3.5 Determinação de salicilato em sangue

III.3.5.1 Curva analítica para salicilato em eletrólito de suporte

Foram feitas adições de diferentes soluções contendo várias concentrações de salicilato de sódio em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,6 contendo 0,5 mmol de NADH. A faixa de concentração estudada foi de 1,25 10⁻⁴ até 2,0 10⁻³ mol L⁻¹ de salicilato de sódio. A resposta amperométrica foi avaliada a partir da variação de corrente obtida na resposta amperométrica do biossensor na presença e ausência de salicilato de sódio, em eletrólito aplicando-se 300 mV *vs*. Au durante a medida.

III.3.5.2 Efeito da matriz complexa na resposta amperométrica do biossensor

O efeito da matriz sangue na resposta do biossensor foi observado comparandose o perfil de concentração *versus* resposta amperométrica (sensibilidade) obtida com o dispositivo em amostras de sangue dopadas com salicilato de sódio na faixa de concentração de 1,25 10⁻⁴ até 2,0 10⁻³ mol L⁻¹ em relação ao perfil obtido com a mesma concentração de salicilato presente em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,6 contendo 0,5 mmol de NADH. Foram dopadas sete amostras de sangue com diferentes concentrações de salicilato de sódio. A resposta amperométrica foi avaliada a partir da variação de corrente obtida na resposta amperométrica do biossensor para a amostra dopada e não dopada com salicilato de sódio aplicando 300 mV *vs*. Au durante a medida.

III.3.5.3 Protocolo de análise de salicilato em sangue empregando o biossensor



As análises foram realizadas de acordo com o protocolo ilustrado no Esquema 9.

Esquema 9. Descrição do protocolo utilizado para a determinação de salicilato em sangue empregando o biossensor desenvolvido. Legenda: (a) amperograma obtido na presença de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,6 e 0,5 mmol L⁻¹ de NADH; (b) amperograma obtido na presença do tampão descrito em (a) adido de 5,0 μ L de amostra de sangue; (c) amperograma obtido na presença da solução descrita em (b) acrecido de 5,0 μ L de solução padrão de salicilato de sódio 2,0 mmol L⁻¹. Resposta amperométrica obtida aplicando-se 300 mV *vs*. Au.

Inicialmente, 20 µL de solução tampão (contendo 0,5 mmol L⁻¹ de NADH) foram gotejadas sobre o biossensor e, após 5 minutos, uma medida amperométrica foi

registrada. Em sequência, 5,0 μ L da amostra de sangue eram adicionados e, após 1 minuto, o sinal amperométrico era registrado. Em seguida, 5,0 μ L de uma solução padrão de salicilato (2,0 mmol L⁻¹) eram adicionados e, após 1 minuto, o sinal amperométrico era registrado.

III.3.5.4 Preparo de soluções e dopagem das amostras de sangue

Uma solução estoque de salicilato de sódio a 0,01 mol L⁻¹ foi preparada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,6. Cinco diluições subseqüentes foram feitas em tubos Eppendorf por meio da adição de uma alíquota da solução estoque de salicilato (20, 50, 100, 200, 400 μ L) a 7,09 mg de NADH. O volume de cada Eppendorf foi ajustado para 1,0 mL com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,6. As amostras de sangue dopadas com salicilato foram preparadas adicionando-se 20 μ L da solução padrão diluída de salicilato à 20 μ L da amostra de sangue. A concentração final de salicilato nas amostras de sangue era de 0,10, 0,25, 0,50, 1,00 e 2,00 mmol L⁻¹.

III.3.5.5 Análise de salicilato em sangue empregando o método de Trinder

A confiabilidade das determinações amperométricas de salicilato em sangue foi verificada usando o método espectrofotométrico proposto por Trinder [130]. Amostras de sangue foram coletadas por punção venosa e receberam EDTA como agente anticoagulante. As amostras foram dopadas adicionando-se 25, 50 ou 200 µL de uma solução 0,01 mol L⁻¹ de salicilato de sódio e as concentrações de salicilato adicionadas foram de 0,25, 0,50 e 2,00 mmol L⁻¹. Estas amostras foram as mesmas utilizadas para a determinação de salicilato empregando-se o biossensor para efeito de comparação de métodos e, neste caso, o sangue foi diluído na proporção 1:1 utilizando solução tampão contendo NADH, conforme descrito no item III.3.5.3. Verificou-se, pelo método de Trinder, que as amostras não possuíam teores detectáveis de salicilato antes da adição do analito.

Para a realização do método de referência foi necessário preparar uma solução estoque do reagente colorimétrico: 4,0 gramas de cloreto de mercúrio foram dissolvidos em 85 mL de água. Em seguida, 4,0 gramas de nitrato férrico foram dissolvidos em 12,0 mL de solução aquosa de HCI 0,75 mol L⁻¹. As soluções foram misturadas e o volume final da solução ajustado para 100 mL. Foram preparadas soluções padrões de salicilato e com elas uma curva analítica foi construída com cinco pontos. As amostras

foram analisadas em triplicata. Para cada 1,0 mL de amostra de sangue, 5,0 mL de reagente colorimétrico era adicionado a elas. Após a adição do reagente colorimétrico, era necessário centrifugar as amostras a 2000g por 2 minutos e o líquido sobrenandante era recolhido para dar seguimento à análise espectrofotométrica que foi realizada em uma cubeta de 10 mm de caminho óptico e a 540 nm.

III. 4 Resultados e discussões

III.4.1 Caracterização eletroquímica da interface de reconhecimento

A melhor forma de se desenvolver a interface biossensora foi avaliada. Inicialmente, a imobilização da enzima salicilato hidroxilase foi realizada por meio da interação de grupos tiois de resíduos de cisteína da própria enzima e a superfície de ouro da microcélula eletroquímica. Esta estratégia de imobilização gerou um dispositivo com baixa robustez e estabilidade.

Alternativamente, foi preparada uma interface biossensora dispensando uma solução contendo salicilato hidroxilase, glutaraldeído e albumina de soro bovino (BSA, do inglês bovine serum albumin) sobre o eletrodo de trabalho. Esta estratégia de imobilização manteve a estabilidade funcional do biossensor, pois o glutaraldeido formou ligações cruzadas entre as macromoléculas de enzima e o BSA proporcionou um ambiente mais próximo ao ambiente fisiológico próprio da enzima.

O efeito da concentração de enzima na camada de reconhecimento do biossensor foi avaliado ao se estudar a resposta obtida com o biossensor na detecção de salicilato de sódio. O biossensor construído com soluções de enzima a 20 mg/mL apresentaram baixa repetibilidade e baixo sinal de corrente para o analito, mas, dentre as outras concentrações testadas (2,5, 5,0 e 10,0 mg/mL) a que apresentou a maior resposta de corrente foi 10,0 mg/ mL. Portanto esta concentração foi considerada a mais adequada. A concentração do tampão fosfato empregada no preparo da solução enzimática tem papel fundamental na formação da interface de reconhecimento. Ao utilizar a concentração de 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato foi obtida uma camada homogênea que não sofria trincas após o processo de secagem. Ao aperfeiçoar esta condição houve uma melhora significativa na repetibilidade de construção do dispositivo.

Outra variável importante do processo de fabricação do dispositivo é a concentração de glutaraldeído empregada na formação da camada de reconhecimento. Concentrações inadequadas de glutaraldeído podem diminuir sensivelmente a atividade enzimátiva ou levar à baixa estabilidade de formação da camada de reconhecimento. Fernándes-Lafuente e colaboradores estudaram a imobilização de oxidases sobre diversos substratos empregando-se glutaraldeído [131-132]. Os autores verificaram que baixas concentrações de glutaraldeído são suficientes para modificar os grupos amino primários das enzimas estudadas com somente uma molécula de gluraraldeído, que permitia a formação de ligações cruzadas entre as enzimas e, em alguns casos, aumentava a estabilidade da enzima imobilizada. Com base nas informações obtidas na literatura, foram estudadas duas concentrações de glutaraldeído: 0,5 e 2,0 %. Empregando-se os biossensores construídos com solução de enzima a 0,5 % de glutaraldeído foram obtidas magnitudes de corrente superiores na detecção de salicilado.Portanto, esta concentração foi definida como adequada para a construção da camada de reconhecimento.

O esquema de detecção do biossensor se baseia na catálise enzimática da reação de oxidação de NADH e salicilato, mediante a redução de oxigênio, gerando catecol, dióxido de carbono, água e NAD⁺. O biossensor monitora a oxidação do catecol formado durante a conversão enzimática do salicilato, conforme mecanismo proposto por Kubota e colaboradores [126]. O salicilato convertido à catecol é, por sua vez, oxidado à o-quinona na superfície eletródica. A o-quinona reage com o NADH presente em solução e regenera o catecol, que volta a ser oxidado na superfície eletródica gerando um incremento de corrente elétrica conforme ilustrado no Esquema 10. A Figura 9 mostra claramente o aumento da corrente de oxidação de catecol à medida que a concentração de salicilato de sódio aumenta na solução. Outros testes foram realizados a fim de verificar se o eletrodo modificado estava se comportando conforme o mecanismo proposto como, por exemplo, a verificação da ausência de onda anódica na ausência de NADH.



Esquema 10. Representação esquemática do mecanismo proposto para o biossensor para salicilato por Kubota e colaboradores. Adaptado da referência 126.



Figura 9. Perfil voltamétrico da célula eletroquímica modificada com a interface de reconhecimento nas condições otimizadas. Varreduras anódicas foram registradas sob várias adições de salicilato de sódio sobre a superfície sensora. O gráfico inserido plota a corrente de pico anódica *versus* a concentração de salicilato de sódio presente em solução. Condições experimentais: Tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6, 20 mV s⁻¹, 1,0 mmol L⁻¹ de NADH em solução.

A Figura 9 apresenta o perfil voltamétrico do biossensor cuja superfície de reconhecimento foi construída com uma solução contendo 1,0 mg da enzima salicilato hidroxilase em 100 µL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,6) contendo 0,5 % (v/v) de glutaraldeído e 1,0 mg de BSA. Somente 5,0 µL desta solução são necessários para efetiva modificação da superfície do eletrodo de trabalho da célula eletroquímica plástica. A modificação da superfície eletródica em uma única etapa é uma tendência quando há intenção de se comercializar o dispositivo biossensor, devido à maior facilidade de automação do processo de manufatura da camada de reconhecimento.

A influência do potencial amperométrico aplicado no desempenho do biossensor foi investigada na faixa de potencial de -50 a +400 mV vs. Au. O sinal de corrente monitorado (Δ i) é a diferença entre a corrente obtida antes e após a adição do analito a 50 s, na condição de estado estacionário. Foi verificado que o sinal analítico é insignificante até que atinja 100 mV, mas a partir deste potencial, à medida que o potencial aumenta, a resposta do biossensor aumenta exponencialmente, como apresentado na Figura 10. De forma a preservar a atividade enzimática e minimizar a corrente amperométrica oriunda de possíveis compostos interferentes presentes no sangue, a matriz amostral de interesse, o potencial de + 300 mV *vs*. Au foi escolhido como o potencial mais adequado a ser aplicado no dispositivo analítico para a análise de salicilato.



Figura 10. Efeito do potencial aplicado sobre a resposta amperométrica do biossensor. Condições experimentais: 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio em 1,0 mmol L⁻¹ de NADH, tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6 . Os sinais amperométricos do biossensor na ausência do analito foram omitidos a fim de descomplicar a apresentação da figura. Gráfico inserido: variação de corrente obtida com o biossensor de acordo com o potencial aplicado, as medidas foram realizadas aos 40 segundos após o inicio do registro amperométrico.

O efeito do pH do eletrólito na resposta amperométrica do biossensor foi estudado. Pode-se observar, na Figura 11, que na faixa de pH de 6,5 a 8,0, a maior magnitude de corrente é obtida em pH próximo a 7,5. Sabe-se que o pH onde a atividade enzimática em solução é máxima é em pH 7,6, portanto, este pH foi escolhido para a realização dos experimentos subsequentes.



Figura 11. Efeito do pH na resposta amperométrica do biossensor. Condições experimentais: 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio em 1,0 mmol L⁻¹ de NADH, tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹. O potencial aplicado foi 300 mV vs. Au. Legenda: (a) corrente amperométrica na presença de salicilato; (b) corrente amperométrica na ausência do analito. Gráfico inserido: Respostas relativas à máxima variação de corrente obtida no estudo. Variações de corrente encontradas com o biossensor em diferentes potenciais hidrogeniônicos na ausência e presença do analito em 40 s.

Conforme relatado anteriormente, a resposta do biossensor depende tanto da quantidade de salicilato oxidado pela enzima na presença de NADH, quanto da quantidade de quinona que é quimicamente reduzida a catecol pelo NADH presente em solução. Desta forma, a quantidade de catecol que é eletroquimicamente oxidada na superfície do eletrodo depende da concentração de NADH. Para o biossensor descartável a melhor sensibilidade foi obtida mantendo a razão entre [NADH]/[salicilato] entre 1 e 2. Um certo excesso de NADH parece ser necessário devido à dificuldade deste cofator enzimático em se aproximar do sítio ativo enzimático durante a catálise. No entanto, um grande excesso do cofator pode causar uma certa competição pelo sítio ativo enzimático com o substrato. Este comportamento pode ser o responsável pela diminuição da corrente de pico anódica para catecol à medida que a razão entre [NADH]/[salicilato] se torna muito alta.



Figura 12. Influência da quantidade de NADH na resposta amperométrica do biossensor. Condições experimentais: 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio em concentrações de NADH de 1,0 10⁻⁴ a 1,0 10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6. O potencial aplicado foi 300 mV vs. Au.

A Figura 12 mostra uma tendência ao declínio da resposta do biossensor quando a razão de [NADH]/[salicilato] é superior a 2 e inferior a 1. O fato de o sinal analítico para um determinado substrato estar vinculada à concentração relativa deste em relação à concentração do cofator enzimático presente em solução pode explicar o fato de todos os biossensores para salicilato desenvolvidos na literatura apresentarem uma faixa analítica não tão ampla.



Figura 13. Efeito do tipo de eletrólito ou tampão na resposta amperométrica do biossensor. Condições experimentais: 2,5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de salicilato de sódio em 0,5 mmol L⁻¹ de NADH em 0,2 mol L⁻¹ do eletrólito ou tampão em questão, pH 7,6. O potencial aplicado foi 300 mV vs. Au. Figura inserida: Efeito da concentração de tampão fosfato na resposta amperométrica do biossensor.

O último parâmetro estudado foi a influência do eletrólito e da sua concentração na resposta do biossensor. Para o estudo foram empregados: tampão fosfato, PIPES, HEPES, TRIS e os tampões universais Britton-Robinson e Mc-Ilvaine. As concentrações de tampão testadas foram 0,02, 0,05, 0,1 e 0,2 mol L⁻¹. A melhor resposta do biossensor foi obtida em tampão fosfato na concentração de 0,1 mol L⁻¹, como pode ser verificado da Figura 13. Alguns estudos mostraram que o ânion fosfato pode formar um complexo de transferência de carga com os anéis piridínicos do NADH facilitando sua oxidação [133-134].Portanto, talvez por este motivo, a catálise enzimática seja facilitada em meio contendo fosfato, como pode ser observada também com tampões universais Britton-Robinson e Mc-Ilvaine. Com base nestes resultados, é sugerido o uso de tampão fosfato para a realização das medidas amperométricas, mas, é necessário que

as soluções eletrolíticas sejam preparadas imediatamente antes do uso com a finalidade de garantir a concentração de NADH nas soluções.

III.4.2 Desempenho do biossensor na determinação de salicilato em sangue

O monitoramento dos níveis de salicilato no sangue é de grande importância em casos de suspeita de intoxicação ou na terapia de doença crônicas [124]. Quando os níveis de salicilato no plasma sanguíneo ultrapassam 2,2 mmol L⁻¹ o composto tem atividade tóxica e os efeitos colaterais estão relacionados à inibição da enzima ciclooxigenase, disturbios ácido-base e irritação gástrica.

Durante a validação analítica do biossensor foi verificado o efeito da presença da matriz amostral, o sangue, no desempenho do dispositivo. O efeito foi investigado ao se comparar a sensibilidade obtida com o biossensor para a molécula de salicilato na presença e na ausência da matriz amostral. As sensibilidades obtidas em cada caso foram diferentes, o que permite concluir que a matriz amostral apresenta significativa influência na resposta do biossensor. Desta forma, o método da adição de padrão foi aplicado para a determinação de salicilato em sangue. É válido mencionar que o biossensor apresentou uma faixa linear maior em sangue dopado com salicilato (0,125 mmol L⁻¹ até 1,00 mmol L⁻¹) do que solução de salicilato em tampão (0,125 mmol L⁻¹ até 0,500 mmol L⁻¹). Este fato também foi verificado no trabalho publicado por Green e colaboradores [104]. A conversão enzimática de salicilato é limitada pelo suprimento de oxigênio disponível no meio de reação, e como a concentração de oxigênio dissolvido em soluções aquosas à temperatura ambiente é da ordem de mmolar, em geral, os biossensores dependentes de oxigênio são limitados em altas concentrações do analito. Contudo, guando o meio eletrolítico recebe a amostra de sangue, uma carga de compostos menos polares que água pode vir a aumentar a solubilidade do oxigênio no meio eletrolítico, causando um aumento na faixa linear de resposta do dispositivo. Esta hipótese pode explicar o comportamento observado nos biossensores desenvolvidos para salicilato.

O cálculo da concentração de salicilato na amostra foi realizado considerando a variação de corrente obtida entre o sinal amperométrico obtido para o branco e a amostra ($\Delta i_{amostra}$), considerando-se que 5,0 µL de amostra foram adicionadas aos 20 µL de tampão, diluindo-se cinco vezes. A variação de corrente obtida após a adição subseqüente de uma alíquota de padrão gera o que chamamos de Δi_{total} . Portanto, a

 Δi_{total} é composta pelo $\Delta i_{padrão}$ e pelo $\Delta i_{amostra}^*$, variações de corrente que são proporcionais a concentração de salicilato relacionadas à adição de 5,0 µL de solução padrão de salicilato e de 5,0 µL de amostra em um volume total de 30,0 µL de solução sobre os eletrodos. Considerando-se estas informações, podemos montar um sistema de equações que irão fornecer a concentração da amostra:

$\Delta i_{total} = \Delta i_{amostra}^* + \Delta i_{padrão}$; sendo que:	(Equação 7)
∆i _{amostra} * = [Amostra]/6 e	(Equação 8)
Δi _{padrão} = [Padrão]/6 ; portanto	(Equação 9)

 $\Delta i_{total} = [Amostra]/6 + [Padrão]/6$ (Equação 10)

Mas como foi afirmado acima, temos o dado experimental, Aiamostra:

Δi_{amostra} = [Amostra]/5 (Equação 11), portanto podemos reescrever a equação 10 da seguinte forma:

 $\Delta i_{total} = (5/6)\Delta i_{amostra} + \Delta i_{padrão}$ (Equação 12)

Encontrado o Δi_{padrão}, tem-se a relação direta entre variação de corrente e concentração de salicilato adicionado ao sistema pela solução padronizada. Pode-se então, por simples regra de três, calcular a concentração da amostra considerando-se sua diluição no sistema.



Figura 14. Calibração do biossensor por adição de padrão de salicilato em amostra de sangue capilar. Condições experimentais: meio contendo 0,5 mmol L⁻¹ of NADH em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato, pH 7,6, potencial aplicado de 300 mV *vs.* Au em diferentes concentrações de salicilato.

Uma curva de calibração obtida para um biossensor recém preparado apresentou a faixa linear de resposta de 0,125 mmol L⁻¹ à 1,00 mmol L⁻¹. A equação obtida para a curva analítica foi $\Delta i(nA) = 97,4 (\pm 4,9)$ [salicilato, mmol L⁻¹] + 15,2 (± 2,9), com coeficiente de correlação de 0,997 para n=5 (Figura 14). A ordem de adição das soluções padrão e da amostra de sangue influenciam significativamente no desempenho analítico do biossensor. É importante, primeiramente, adicionar uma alíquota de solução tampão contendo o cofator enzimático, em seguida, a amostra de sangue e, por último, a solução padrão de salicilato.

O desempenho analítico do biossensor foi verificado por meio da determinação de salicilato em amostras de sangue dopadas com salicilato. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, satisfatórias taxas de recuperação foram obtidas nas determinações de salicilato, indicando que o biossensor pode ser aplicado na determinação de salicilato em amostras de sangue sem significativa influência da matriz amostral, empregando-se o método da adição de padrão. Por meio de uma comparação de métodos entre o dispositivo e o método espectrofotométrico de Trinder

foi possivel verificar, aplicando um teste-t com 95 % de confiança, que os resultados fornecidos por ambos os métodos não são estatisticamente diferentes. Somente três das cinco amostras de sangue foram utilizadas para a realização da comparação de métodos como é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Análise de salicilato em amostras de sangue. Teste de recuperação e comparação de métodos entre o biossensor e a análise espectrofotométrica de salicilato em sangue.

Amostras	Concentração	Concentração	Recuperação	Concentração de salicilato	
de	inicial de	adicionada de	do	determinada	
sangue	salicilato	salicilato	biossensor	experimentalmente ^a	
	(mmol L ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)	(%)	(mmol L ⁻¹)	
				Biossensor	Método padrão
1	0,00	0,10	101,9	0,10 ± 0,01	-
2	0,00	0,25	109,1	0,28 ± 0,04	$0,26 \pm 0,06$
3	0,00	0,51	100,6	0,51 ± 0,08	0,51 ± 0,05
4	0,00	1,01	119,3	1,21 ± 0,05	-
5	0,00	2,02	99,4	2,01 ± 0,06	$2,02 \pm 0,04$

^aMédia ± desvio padrão (n = 3).

Empregando-se as condições previamente estabelecidas, o dispositivo foi testado em relação a sua repetibilidade. O desvio padrão relativo dos resultados obtidos com um conjunto de eletrodos (n = 6) foi de 4,4%.

A estabilidade de estocagem do biossensor desenvolvido foi avaliada por um período de sete meses, com os dispositivos secos e resfriados ($6 \pm 1 \, {}^{\circ}$ C). A resposta do biossensor para uma amostra de sangue contendo 2,0 mmol L⁻¹ de salicilato foi periodicamente monitorada à temperatura ambiente. O biossensor manteve-se estável e apresentou > 90 % da resposta inicial por 4 meses. Após este período, o biossensor continua ativo. No entanto, a camada de reconhecimento leva muito mais tempo para se reidratar, o que impossibilita a realização de análises rápidas com o dispositivo.

III. 5 Conclusão Parcial

O biossensor é construído sobre células eletroquímicas plásticas com eletrodos de ouro que integram os três eletrodos necessários à realização da medida eletroquímica. Desta forma, um mínimo volume de amostra e de reagentes são empregados a fim de proceder a análise (5 a 50 µL). O volume de material de descarte, incluindo o próprio dispositivo, é mínimo e este fato é muito relevante, já que este resíduo apresenta risco biológico. As células eletroquímicas construídas com eletrodos de ouro permitiram a construção de dispositivos estáveis e biocompatíveis com o sistema enzimático imobilizado sobre a superfície eletródica. Tais dispositivos podem ser acoplados a amperímetros portáteis que propiciam a análise rápida de salicilato em sangue.

O biossensor apresentou o maior tempo de estocagem dentre os dispositivos desenvolvidos na literatura e a faixa linear de resposta, apesar de não ser a mais ampla descrita na literatura, é adequada à determinação de salicilato em sangue para o esclarecimento de possíveis casos de intoxicação por salicilato.

Algumas adequações no dispositivo deverão ser realizadas no intuito de simplificar a forma de introdução da amostra e das soluções padrão. Um dispositivo comercial não deve depender do emprego de pipetas volumétricas para o controle do volume das soluções e amostras que chegam a zona reacional do biossensor. Neste sentido, uma alternativa plauzível é o emprego de tiras de papel sobre o eletrodo de forma a permitir o acesso controlado da amostra sobre a área eletroativa do sensor. Foi com este intuito que nasceu a idéia, que culminou no desenvolvimento do dispositivo de separação e detecção eletroquímica em papel.

DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO DE SEPARAÇÃO EM PAPEL ASSOCIADO À DETECÇÃO ELETROQUÍMICA

CAPÍTULO IV

IV. 1 Resumo

Nesta seção apresentaremos a combinação da cromatografia em papel com a detecção eletroquímica no desenvolvimento de um dispositivo analítico quantitativo de separação em papel com detecção amperométrica. A célula eletroquímica plástica

descrita no Capítulo 2 foi acoplada a uma fita de papel onde a separação cromatográfica ocorreu. O desempenho do dispositivo foi demonstrado na separação e a quantificação de ácido úrico e ascórbico em misturas. O método desenvolvido é uma alternativa para a determinação de compostos onde são essenciais o baixo custo e a simplicidade.



IV. 2 Introdução

Diversos dispositivos que permitem a realização de análises descomplicadas, rápidas, e de baixo custo, tais como papéis indicadores de pH, "dipstick test assays" etc. foram introduzidos entre os séculos XI e XVII [135-138]. A maioria dessas técnicas ainda está em uso devido ao seu desempenho satisfatório na realização de análises descentralizadas. Recentemente, o papel foi subdividido em canais empregando resinas fotosensíveis, PDMS ou mesmo cera, no intuito de criar dispositivos microfluídicos para a realização de múltiplos bioensaios [79-83]. Em um artigo interessante, foi descrito um método capaz de quantificar múltiplos analitos utilizando papel subdividido em câmaras, as quais foram modificadas com reagentes sensíveis à glicose ou à proteína [84]. O resultado colorimétrico das reações era digitalizado com a câmera de um telefone celular e as imagens transmitidas ao laboratório, onde previamente padronizadas especialistas as comparavam com imagens е correlacionadas a uma determinada concentração do analito. O resultado da análise era, então, retransmitido e o tratamento do paciente iniciado rapidamente. Neste mesmo trabalho, foi introduzido o termo "µPADs" para classificar, genericamente, aqueles dispositivos analíticos construídos sobre papel, em que a adição de amostras

ou de padrões é realizada pela ação da força de capilaridade e não através de bombas ou microbombas (µPADs, do inglês Microfluidic Paper-Based Analytical Devices).

A eletroquímica sempre forneceu técnicas analíticas caracterizadas pela simplicidade instrumental, portabilidade e custo relativamente baixo. Devido a estas características, a integração de técnicas eletroquímicas com a microfluídica em papel é extremamente vantajosa. Fitas de papel ou mesmo canais criados sobre papel podem funcionar com colunas cromatográficas que podem ser acopladas a eletrodos impressos ou eletrodos de filmes metálicos. Em geral, canais construídos em papel são plataformas versáteis e de baixo custo, adequados ao desenvolvimento de dispositivos analíticos do tipo point-of-care ou para o desenvolvimento de sensores para o monitoramento ambiental ou controle de qualidade em indústrias.

IV. 3 Metodologia experimental

IV.3.1 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato Autolab PGSTAT30 interfaciado a um computador, mas este aparato pode ser facilmente substituído por um amperímetro portátil. O cabo original que permite a conecção dos eletrodos indicador, auxiliar e de trabalho foi substituído por um cabo adaptado composto por um conector DIN que se liga ao potenciostato e por um slot que permite a conecção com o eletrodo descartável. O software utilizado foi o GPES 4.9 (*Eco Chemie BV, Holanda*).

O banho de ultra-som utilizado era da marca UNIQUE T-1425, apresentava freqüência de 25 kHz e um pico máximo de potencia de 54 W. Uma balança analítica Sartorius BP 211D, de 5 casas decimais, foi utilizada para as tomadas de massa dos compostos químicos.

IV.3.2 Reagentes

As soluções aquosas foram preparadas com água deionizada (Mili-Q Water Purifier System, Millipore Inc., USA) com resistividade > 18 M Ω /cm. Toda vidraria utilizada foi limpa em HNO₃ 10% (v/v) e água deionizada, a fim de evitar contaminações. Logo abaixo estão descritos os reagentes utilizados, bem como sua procedência: Ácido ascórbico e ácido úrico (Sigma-Aldrich, USA), acetato de sódio e
ácido acético (Merck, Alemanha) e papel cromatográfico com 0,18 mm de espessura (1 Chr, Whatman). As soluções tampão de fosfato foram preparadas utilizando misturas adequadas do ácido fraco e do sal do ácido fraco correspondente, a fim de obter o pH desejado.

IV.3.3 Construção do dispositivo de separação empregando a célula eletroquímica plástica

O dispositivo está ilustrado no Esquema 11. Foi fabricado de forma bem simples, pressionando uma fita de papel de 60 x 7 mm de papel Whatman na interface ativa da microcélula eletroquímica em ouro. A separação foi realizada através de uma fase estacionária de papel e a detecção eletroquímica iniciada quando a solução eletrolítica (eluente) atingia a região eletroativa da microcélula eletroquímica.



Esquema 11. Vista esquemática do dispositivo de separação. Legenda: WE, eletrodo de trabalho; RE, eletrodo de referência; CE, eletrodo auxiliar. Figura inserida: ilustração da célula eletroquímica plástica e suas dimensões.

Como as medidas eletroquímicas só podem ser iniciadas na presença de solução eletrolítica e esta condição só é atingida no momento em que a fase móvel atinge os eletrodos, é necessário que a interface seja transparente para que o operador possa iniciar manualmente o registro do sinal.

Outra característica muito importante do dispositivo é a quantidade de papel deixada na porção posterior da fase estacionária. Esta porção extra de papel extra tem a finalidade de manter o fluxo de fase móvel contínuo durante toda a etapa de sepação e registro de sinal.

IV.3.4 Preparo de soluções

Iniciamente, soluções estoque de ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (UA) a 1.0 mmol L⁻¹ foram preparadas em ácido acético e acetato de sódio, respectivamente. Em seguida, misturas com concentrações conhecidas de AA e UA foram preparadas em tampão acetato. Exatos 2,0 µL destas soluções foram dispensados sobre o papel cromatográfico para a realização da separação e detecção eletroquímica.

As soluções de tampão acetato foram preparadas por meio de misturas do ácido fraco e do sal do ácido fraco. Inicialmente foram preparadas soluções estoque de ácido acético a 2,0 mol L⁻¹ e acetato de sódio a 2,0 mol L⁻¹. Para preparar 100 mL de solução tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ em pH 3,4, misturou-se 9,50 mL de solução estoque de ácido acético com 0,50 mL de solução estoque de acetato de sódio e o volume final foi ajustado para 100 mL. Para o preparo de solução tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ em pH 4,5, misturou-se 5,85 mL de solução estoque de ácido acético com 4,15 mL de solução estoque de acetato de sódio e o volume final foi ajustado para 100 mL. Para o preparo de solução tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ em pH 4,5, misturou-se 5,85 mL de solução estoque de ácido acético com 4,15 mL de solução estoque de acetato de sódio e o volume final foi ajustado para 100 mL. Para preparar 100 mL de solução tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ em pH 5,9, misturou-se 0,50 mL de solução estoque de ácido acético com 9,50 mL de solução estoque de acetato de sódio e o volume final foi ajustado para 100 mL de solução tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ em pH 5,9, misturou-se 0,50 mL de solução estoque de ácido acético com 9,50 mL de solução estoque de acetato de sódio e o volume final foi ajustado para 100 mL estato de sódio e 0,2 mol L⁻¹ em pH 5,9, misturou-se 0,50 mL de solução estoque de ácido acético com 9,50 mL de solução estoque de acetato de sódio e o volume final foi ajustado para 100 mL estato de sódio e o volume final foi ajustado para 100 mL estato de sódio e 0,2 mol L⁻¹ em pH 5,9, misturou-se 0,50 mL de solução estoque de ácido acético com 9,50 mL de solução estoque de acetato de sódio e o volume final foi ajustado para 100 mL.

IV.3.5 Otimização do processo de separação

IV.3.5.1 Avaliação voltamétrica de Ácido úrico e Ácido Ascórbico sobre a célula eletroquímica plástica

Os perfis voltamétricos da célula eletroquímica plástica para os analitos ácido úrico e ácido ascórbico foram obtidos a 50 mV s⁻¹ na faixa de concentração de 0,25 mmol L⁻¹. A faixa de potencial estudada foi de --600 a 600 mV *vs.* Au em eletrólito composto por tampão acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 4,5.

IV.3.5.2 Efeito do pH do eluente na eficiência de separação

Os pH estudados foram 3,4, 4,5 e 5,9. O efeito do pH da solução eletrolítica foi avaliado comparando a eficiência na separação para AA e UA na presença 0,4 mmol L⁻¹ dos analitos durante a separação e detecção. O potencial aplicado durante a medida amperométrica foi de 400 mV vs. Au.

IV.3.5.3 Efeito da concentração do eluente

O efeito da concentração do eletrólito ou eluente foi avaliado variando-se a concentração do tampão acetato na faixa de 0,01 até 0,30 mol L⁻¹. O potencial aplicado durante a medida amperométrica foi de 400 mV vs. Au.

IV.3.5.4 Efeito do comprimento da fase estacionária

Três diferentes comprimentos da fase estacionária foram testados: 5, 10 e 20 mm. Para tal, foi simplesmente necessário aumentar o comprimento da fita de papel.

IV.3.5.5 Curva Analítica para Ácido úrico e Ácido ascórbico

Foram feitas adições de diferentes soluções contendo várias concentrações de ácido úrico e ascórbico preparadas em tampão acetato 0,1 mol l⁻¹. Soluções estoque de ácido úrico e ácido ascórbico foram preparadas na concentração de 1,0 mmol L⁻¹ e foram diluídas em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 nas seguintes concentrações de ambos analitos: 0,05, 0,07, 0,1, 0,2 e 0,4 mmol L⁻¹. Aliquotas destas soluções foram utilizadas na avaliação analítica do dispositivo.

IV. 4 Resultados e Discussão

IV.4.1 Dispositivo de separação e detecção em papel empregando a célula eletroquímica plástica

As oxidações do ácido úrico e do ácido ascórbico ocorrem na mesma faixa de potencial, por este motivo a determinação de um dos compostos é sempre interferida pela presença do outro. Normalmente, é necessário que o paciente se abstenha por algumas horas ou dias de alimentos ou suplementos alimentares que contenham ácido ascórbico (vitamina C) quando for se submeter à quantificação de ácido úrico. Neste dispositivo o potencial aplicado de 400 mV vs. Au foi escolhido após a realização de um

estudo voltamétrico no qual foram verificados os picos de oxidação de AA e UA sobre a microcélula eletroquímica de ouro em condições hidrostáticas. Na Figura 15, observa-se que o potencial de pico anódico para o ácido úrico localiza-se em 400 mV vs. Au enquanto que o potencial de pico para o ácido ascórbico se dá em 600 mV vs. Au. Com o intuito de definir o potencial adequado para a realização das medidas amperométricas foram aplicados os potenciais de 400 e 500 mV e os sinais amperométricos obtidos foram comparados. A resposta amperométrica aumenta com o aumento do potencial para os dois analitos. No entanto, é preciso atentar que a faixa de trabalho deste eletrodo se limita a potenciais de oxidação em torno de 700 mV vs. Au. O sinal obtido em 400 mV vs. Au consistia em, aproximadamente. 90% do sinal obtido em 500 mV vs Au, em média para os dois analitos. Portanto, no intuito de empregar o menor potencial possível, foi definido que o potencial de trabalho seria de 400 mV vs. Au.



Figura 15. Perfil voltamétrico da célula eletroquímica plástica na ausência e presença de 0,25 mmol L⁻¹ de ácido úrico (gráfico superior) e na ausência e presença de 0,25 mmol L⁻¹ de ácido ascórbico. Varreduras anódicas foram registradas a 50 mV s⁻¹ em tampão acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 4,5.

Em linhas gerais, o dispositivo funciona da seguinte maneira: à medida que o solvente avança por ação da capilaridade ele encontra e dissolve a amostra contendo a mistura de AA e UA, os quais são transportados através do papel junto com o solvente, de acordo com a sua solubilidade e sua adsorção nas fibras polares de celulose. O pH do eluente foi ajustado para pH 4,5, entre os valores de pKa do ácido ascórbico (pK_a 4,1) e do ácido úrico (pK_a 5,4). Consequentemente, o ácido ascórbico fica ionizado e muito mais solúvel na fase móvel do que o ácido úrico. Além disso, a geometria molecular e a presença de menos ligações polares no íon ascorbato, o caracteriza como menos polar que o urato. Então, a retenção do ácido úrico nas fibras de celulose é mais intensa, como pode ser observado na Figura 17.

O tipo de papel, a sua espessura e o comprimento da coluna influenciam sensivelmente na eficiência da separação. O comprimento da fase estacionária foi estabelecido como a distância entre o ponto de injeção da amostra e a região do papel que se localiza sobre a área eletroativa da célula eletroquímica de ouro. Três diferentes comprimentos da fase estacionária foram testados: 5, 10 e 20 mm. A resolução (R) promovida pela fase estacionária é uma medida guantitativa da habilidade em separar dois analitos. A resolução obtida com a fase estacionária de 5 mm foi de 0,85, enquanto que para a de 10 mm a resolução foi de 1,04 e para a fase constituída por 20 mm de papel a resolução obtida foi de 1,48. Confirmamos o fato de que o aumento no comprimento da fase estacionária promove um aumento na resolução dos picos devido ao aumento do número de pratos teóricos durante a separação. Contudo, o aumento do número de pratos traz consigo um conseguência indesejável que é o aumento no tempo requerido para a separação. O aumento do tamanho da fase estacionária de 10 mm para 20 mm interferiu grandemente no tempo de retenção do AU, pois aumentou o tempo de análise em aproximadamente cinco minutos. Na coluna mais curta, os picos de AA e UA ficaram parcialmente sobrepostos e na coluna mais longa, o tempo de analise foi considerado relativamente longo. Buscando a melhor relação entre o tempo necessário para a análise e a resolução dos picos escolheu-se o comprimento de coluna de 10 mm. Na Figura 16- gráfico D, pode-se observar que os picos referentes ao ácido ascórbico e o ácido úrico foram suficientemente separados.



Figura 16. Desempenho do dispositivo na separação e detecção de ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (UA). Amostras: A: eluente (0,10 mol L⁻¹ de tampão acetato, pH 4,5); B: 0,10 mmol L⁻¹ de UA preparado eluente; C: 0,10 mmol L⁻¹ de AA preparado em eluente e D: 0,10 mmol L⁻¹ de AA e UA diluídos em eluente. Alíquota de amostra: 2 μ L de solução amostral depositada sobre o papel. Potencial aplicado: 400 mV vs. Au.

A força iônica da fase móvel apresentou um efeito significante na altura dos picos do AA e UA. A altura do pico do ácido ascórbico aumenta em valores de força iônica de 0,05 até 0,20 mol L⁻¹ e decresce para valores maiores de força iônica. Por sua vez, a altura de pico para o UA diminui à medida que a força iônica diminui de 0,05 a 0,10,

mas se mantém constante para valores de força iônica superiores. Um fato observado interessante foi que a repetibilidade das medidas de ambos analitos era significativamente menor quando se empregava a concentração de 0,20 mol L⁻¹ de tampão acetato como eluente. Considerando-se estes fatos experimentais, determinou-se que a concentração mais adequada seria a de 0,10 mol L⁻¹ de tampão acetato.



Figura 17. Efeito do pH do eluente na eficiência de separação de misturas contendo ácido ascórbico e ácido úrico. Condições experimentais: 0,4 mmol L⁻¹ de ácido ascórbico e ácido úrico sendo que 2 µL da mistura foi adicionado ao papel. Potencial aplicado: 400 mV vs. Au. Eluente: 0,10 mol L⁻¹ de tampão acetato de sódio em diferentes potenciais hidrogeniônicos.

Na Figura 17, as cronoamperografias da separação das misturas de AA e UA são apresentadas para diferentes valores de pH. À medida que o pH aumenta, a altura do pico de ácido ascórbico diminui. Em pH 3,4, a solubilidade do ácido úrico na fase

móvel se torna crítica, ficando parcialmente retido na fase estacionária. Em pH 4,5, o ácido úrico está em sua forma molecular, mas em pH 5,9 está ionizado.

Por definição, o tempo de retenção é o tempo necessário para que um analito atinja o detector a partir do momento em que foi injetado na coluna de separação. Consequentemente, na Figura 17, os tempos de retenção das espécies químicas devem ser determinados da seguinte forma: o tempo registrado na cronoamperografia adido do tempo necessário para que o solvente percorra a coluna e atinja o detector eletroquímico (2,5 ± 0,1 min, para uma coluna de 10 mm com 6 mm de largura). Em geral, o tempo de análise empregando-se o dispositivo proposto é mais longo do que tempo necessário para a realização de uma determinação de ácido úrico e ácido ascórbico por HPLC. Contudo, o dispositivo de separação em papel não requer instrumentação sofisticada, é portátil, fácil de operar e apresenta baixo custo por análise. Além disso, diferentes configurações podem ser propostas para o dispositivo de separação em papel, o que pode, provavelmente, diminuir o tempo gasto por corrida cromatográfica.

A principal vantagem dos dispositivos denominados µPADs reside no fato de apresentarem o mais baixo custo dentre os dispositivos descartáveis de análise. A inclusão de eletrodos de ouro nestes dispositivos aumenta em cinco vezes o custo do dispositivo se a produção em larga escala for considerada para a estimativa. Entretanto, o emprego do dispositivo de separação em papel com detecção eletroquímica diminui o custo de uma análise em mais de vinte vezes se comparado a uma análise por HPLC.

Curvas de calibração foram calculadas para cada composto de forma a determinar a uniformidade da resposta analítica em relação a uma faixa de concentrações (Figura 18). Tanto a altura do pico, quanto a área sobre o pico de AA e UA podem ser empregadas para construir a curva analítica, pois para ambos são obtidas sensibilidades semelhantes. A altura de pico foi escolhida devido à facilidade em se obter a medida. Os ácidos úrico e ascórbico apresentaram limites de detecção semelhantes em torno de 0,02 mmol L⁻¹, então, quantidades tão baixas quanto 40 pmols de AA e UA podem ser precisamente determinadas. O limite de detecção foi determinado usando a equação 3σ /slope, onde σ é o desvio padrão. A sensibilidade (152 nA L mmol⁻¹ para AA e 64 nA L mmol⁻¹ para UA) e a faixa linear foram superiores para AA, como mostrado na Figura 18.



Figura 18. Cronoamperografias do ácido ascórbico (AA) e do ácido úrico (UA) em misturas contendo diferentes concentrações de ambos compostos na faixa de concentração de 0,05 a 0,4 mmol L⁻¹. Gráficos de ∆i (altura do pico) *versus* a concentração de AA e UA estão inseridos. Alíquotas de amostra: 2 µL adicionadas no papel. Potencial aplicado: 400 mV vs. Au.

Os níveis normais de ácido úrico no plasma sanguíneo estão na faixa de 0,1 a 0,4 mmol L⁻¹, enquanto que os níveis normais de vitamina C estão na faixa de 0,05 a 0,1 mmol L⁻¹ [139-140]. Com base nas regiões de linearidade obtidas com o dispositivo proposto na separação e deteção de AA e UA, o dispositivo pode ser empregado na determinação destes analitos no plasma, com certa restrição para o ácido úrico, levando em consideração que mais experimentos devem ser realizados a fim de verificar o efeito da matriz amostral no desempenho do dispositivo.

IV.4.2 Dispositivo de separação e detecção em papel empregando a célula eletroquímica em papel

Foram realizados os testes iniciais para verificar se o processo de separação dos analitos ácido úrico e ácido ascórbico ocorre quando o eletrodos são construídos intimamente sobre o papel. Ao se empregar o sistema no qual as trilhas eram construídas com o fotorresiste Futurrex não foi observado separação da mistura, contudo ao testar os dispositivos construídos com trilhas em parafina a separação foi verificada.

Na Figura 19, pode-se observar que a separação utilizando a célula eletroquímica em papel ocorre na mesma sequência de eluição que foi observada utilizando a célula eletroquímica plástica pressionada sobre o papel. Neste novo sistema foi possível avaliar o efeito da largura da fase estacionária de papel sobre o tempo de retenção das espécies estudadas. O gráfico inserido na Figura 20 ilustra o comportamento do tempo de retenção observado para o UA em função da largura da fase estacionária de papel. O tempo de retenção do ácido ascóbico apresentou variação de poucos segundos, mas o tempo de retenção do ácido úrico diminuiu linearmente à medida que a fita de papel utilizada como a fase estacionária era mais estreita. Há também uma diminuição da largura de pico para ambos os analitos quando se emprega tiras de papel mais estreitas, isto pode ser explicado com base na diminuição do espalhamento lateral do analito na fase estacionária.

Durante a fabricação do papel as fibras de celulose são alinhadas, desta forma todo papel produzido industrialmente apresenta um sentido da fibra de celulose. Foi verificado o efeito do direcionamento da fibra da celulose do papel na separação cromatográfica de AA e UA. As maiores magnitudes de corrente foram obtidas quando o canal de separação era disposto paralelamente à direção da fibra de celulose. Foi Verificado uma diminuição de aproximadamente 30 % e de 25 % na corrente de pico do AA e de UA, respectivamente, quando o sentido da fibra era perperdicular ao do canal de separação em comparação com o sinal obtido quando a fibra estava direcionada paralelamente ao canal de separação. Portanto, a construção dos dispositivos de separação em papel deve sempre respeitar um dos direcionamentos da fibra de celulose no intuito de garantir a repetitividade das medidas.



Figura 19. Desempenho do dispositivo na separação de ácido ascórbico e ácido úrico empregando a célula eletroquímica em papel com trilhas construídas em parafina. Eluente: 0,10 mol L⁻¹ de tampão acetato, pH 4,5; Alíquota de amostra: 1 µL de solução amostral depositada sobre o papel contendo 0,20 mmol L⁻¹ de AA e UA diluídos em eluente. Potencial aplicado: 400 mV vs. Au; Largura da fase estacionária: 2,0 mm, Área do eletrodo de trabalho: 1,0 mm². Figura inserida: Gráfico plotado entre o tempo de retenção observado para o Ácido Úrico e a espessura da fase estacionária de papel.

IV. 5 Conclusão Parcial

Neste trabalho é demonstrada a construção de um dispositivo capaz de realizar a separação cromatográfica e a determinação quantitativa de compostos eletroativos, como ácido ascórbico e ácido úrico, em dois protótipos de dispositivos de separação em papel associado à detecção eletroquímica. A real contribuição deste trabalho está no desenvolvimento de um dispositivo simples, seletivo, descartável e de baixo custo que pode solucionar problemas analíticos que geralmente requerem instrumentação sofisticada. Neste contexto, o sistema aqui apresentado não se limita a aplicações relacionadas ao diagnostico clínico, mas pode ser adaptado a aplicações forênsicas, industriais ou mesmo de cunho ambiental.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES GERAIS

As células eletroquímicas descartáveis construídas sobre poliéster e sobre papel demostraram ser ótimas plataformas para o desenvolvimento de dispositivos bioanalíticos. A célula eletroquímica construída sobre poliéster pode ser empregada com confiabilidade no desenvolvimento de metodologias analíticas que exijam a imobilização de biomoléculas ou outros compostos sobre o eletrodo de trabalho de ouro. A célula eletroquímica construída sobre papel pode ser utilizada no desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas que permitam a separação de alguns componentes da amostra previamente à detecção.

Os eletrodos de ouro construídos sobre papel apresentam maior área eletroativa do que aqueles construídos sobre poliéster. Contudo, a magnitude de corrente obtida com os eletrodos de ouro sobre papel é relativamente menor, devido ao fato de que as fibras de celulose diminuem o acesso dos compostos eletroativos à superfície eletródica. O potencial formal da espécie FeCp₂COOH foi significativamente diferente quando determinado empregando a célula eletroquímica plástica e empregando a célula eletroquímica em papel, que indica que o substrato no qual os eletrodos foram construídos influencia na eletroatividade da superfície eletródica. O sistema de pseudo-referência dos eletrodos descartáveis, apesar de ambos serem construídos em ouro, apresentam características eletroquímicas distintas. O fotorresiste Futurex e a cera de parafina empregados na construção dos dispositivos foram efetivos para isolar a área eletroativa dos eletrodos construídos em poliéster e em papel.

A célula eletroquímica plástica foi empregada no desenvolvimento de um biossensor enzimático. A superfície biossensora foi construída empregando a enzima salicilato hidroxilase e a caracterização eletroquímica desta superfície indicou que a enzima apresenta-se adequadamente imobilizada sobre a superfície eletródica permitindo a realização de análises rápidas mesmo após um prazo de quatro meses de estocagem do dispositivo. O biossensor construído foi validado por meio da realização de um teste de recuperação e realizando uma comparação de métodos com o método espectrofotométrico de Trinder. O biossensor apresentou adequada sensibilidade e precisão na determinação de salicilato em amostras de sangue capilar.

Utilizando a célula eletroquímica plástica como elemento de transdução foi construído um sistema de separação e detecção eletroquímica em papel, no qual uma fita de papel cromatográfico era disposto sobre o eletrodo. O dispositivo foi adequado para a separação e detecção de ácido úrico e ácido ascórbico em misturas. A célula

eletroquímica em papel, em condições experimentais equivalentes ao sistema anteriormente descrito, foi avaliada na separação e detecção dos mesmos analitos e foi considerada igualmente adequada. Contudo, a separação cromatográfica só foi efetiva quando as trilhas que isolavam a região da fase estacionária eram construídas em cera parafínica.

Cabe ressaltar que o dispositivo construído integralmente em papel tem um potencial comercial muito grande, pois a sua utilização é mais simples e dispensa a necessidade de pressionar a fase estacionária contra os eletrodos, uma etapa manual e delicada da montagem do primeiro protótipo.

A associação da separação cromatográfica em papel com a detecção eletroquímica abriu uma nova linha de pesquisa voltada para o desenvolvimento de dispositivos descartáveis e de baixo custo que podem solucionar problemas analíticos que geralmente requerem instrumentação sofisticada.

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS

Nesta seção será apresentado o manuscrito escrito para compor o editorial da revista eletrônica *Bioanalysis*, edição de outubro de 2010, do Grupo *Future Science*. Os autores foram convidados pelo corpo editorial da revista para a redação deste artigo de opinião devido as contribuições científicas na área. A contribuição da autora desta tese no editorial foi significativa.

VI.1 Manuscrito

The potential and application of microfluidic paper-based separation devices

Rafaela Fernanda Carvalhal^{a,b}, Emanuel Carrilho^{b,c}, Lauro Tatsuo Kubota^{a,b}

a. Analytical Chemistry Department, Institute of Chemistry State University of Campinas-UNICAMP, SP, P.O. Box 6154, Campinas, Brazil

b. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, Institute of Chemistry State University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, P.O. Box 6154, Brazil
c. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Pauo – USP, 13560-970
São Carlos-SP, P.O. Box 780, Brazil

Key-words: paper chromatography; disposable devices; real-time analysis; microfluidic paper-based analytical devices; electrochemical detection

The separation of the analyte from potential interferents or from other chemical species of interest is a vital step in analytical chemistry. Chromatography includes а diverse group of separation methods that in conjunction with electrophoresis are the most applied ones to separate closely components complex related of mixtures. Nowadays, there are few limitations related to the knowledge of the forces and mechanisms involved in the chromatographic separation process and the centralized laboratories currently have the knowledge on separation science and the satisfactory technology to analyze the chemical constituents of a complex matrix sample in a specific and sensitive way. There is also, however, a global demand for strategies that allows rapid acquisition of analytical results immediately after the decision of

performing the analysis. To achieve this goal, high levels of technology are incorporated in advanced analytical devices, which must be (i) simple enough to be operated by non technical personnel, (ii) inexpensive as possible to be used even in developing regions, and (iii) sufficiently accurate to guide the decision-making process. Point-of-Care devices-whether diagnostic the polymeric or glass microfluidic systems or the lateral-flow and dipstick assayswere conceived trying to support the necessity of such kind of analysis. In 2007 Whitesides and co-workers [1], however, introduced the microfluidic paper-based analytical devices (µPADs), which have superior features to fulfill the requirements of (i) inexpensive, (ii) multiplex, (iii) simple, and (iv) quantitative analysis [1 - 5]. Those devices are based on microchannels of hydrophilic paper patterned by walls or lines of hydrophobic polymerpoly(dimethylsiloxane) (PDMS), photoresist, or wax [3,5,6]-and, the movement of eluent and sample is governed by capillarity [7].

Microfluidic paper-based separation devices (µPSD) are a subclass of those devices in which a chromatographic separation takes place as the solvent moves up the paper

channel. The fundamentals of the devices are simple but the achievements could be huge. Kubota and co-workers developed the first µPSD and relied on the separation of ascorbic and uric acids from aqueous mixtures and electrochemical detection for quantitation [8]. As minute-amounts of analyte reaches the detector, it is highly sensitive imperative to use techniques. Nonetheless, is important to mention that (i) instrumental simplicity, (ii) moderate cost, and (iii) high portability are also essential to develop these kinds of devices. To meet such requirementes electrochemical and optical methods are well suited as detectors. The colorimetric detection based on visual detection systems is adequate when a "yes" or "no" answer is sufficient for the diagnosis [9]. On the other hand, when a quantitative analysis is required, colorimetric assays based on reflectance or transmittance of light [2,4] preferentially, and, the electrochemical detection [8,10,11] are suitable options as low cost detection system. The fabrication of electrodes for µPADs and µPSDs can be (i) deposited as thin-layer of metal, (ii) screen-printed, and even (iii) silk-screened.

We foresee that the next great advance probably will use stable

chemically modified electrodes in order o improve the detection sensitivity and the chase after rapid and easy ways to calibrate the system [11]. Using for instance, a pre-stored internal standard in a unique channel, or using multiple channels to simultaneously run prestored standards and the sample could be a means to achieve such calibration. The latter strategy will require the design of an array of electrodes on paper devices. At Figure 1 is possible to observe the prospects in the development of µPSD.



Figure 1. Examples of expectations of development in microfluidic paper-based separation devices (µPSDs).

The separation process could be greatly improved if different cellulose chromatographic papers are employed. Different thickness of paper will give different linear flow rates, different

different sample capacity, and separation efficiency. Another possibility that is very promising is the use of chemically modified cellulose fibers to promote separations by using quelation, adsorption, ionic exchange, hydrophilic, or hydrophobic interactions within the paper stationary phase. There are commercially available ion exchange modified cellulose with papers diethylaminoethyl or with phosphate groups, and papers that are composites combining cellulose and large pore silica gel [12]. Such papers can be used to separate catecholamines, tryptophan metabolites, thyroid hormones, oxalic acid and other clinically relevant compounds to be electrochemically detected in such simple and disposable devices. The catecholamines play a major role in the function of the body's nervous system and knowledge of catecholamine levels are of significance in the diagnosis and management of hypertension, neural tumors, Parkinson's disease and schizophrenia [13,14]. The new µPSDs employing cation-exchange papers could probably separate important methylated catecholamines found in urine for diagnosis and monitoring of neural tumors and other neurodegenerative clinical diseases. Another area of

interest, which can benefit from the use of those paper-based separation devices with ionic exchange with electrochemical detection, is the treatment of psychiatric diseases like depression by the monitoring of some specific compounds found in the tryptophan metabolism [15].

Different analytical strategies can be implemented in order to associate a separation process on paper to an analytical protocol. Garnier and coworkers have created a rapid blood typing test using specific-antigen to trigger blood agglutination [16]. The chromatographic paper was modified with specific and non-specific antigens at their surface and the separation profile left by agglutinated red blood cells and plasma allows the blood typing.

Lateral-flow essays are based on a separation process between the analyte and the other components of a sample. In this sense, the bioactive papers can be extremely helpful to the development of colorimetric paperbased separation devices. Recently, Brennan and co-workers have prepared lateral-flow bioactive papers with sol-gel derived silica inks for the detection of acetylcholinesterase inhibitors in food samples [17-18]. The biosensor was able to detect pesticides with excellent detection limits in the range of nmol L⁻¹. Zhu and coworkers prepared a treeshaped paper strip for the semiquantitative determination of proteins with the calibration step integrated on the test strip [19]. Considerations about the radial capillary penetration into paper will improve that kind of device and probably will improve the analyte detectability.

The µPADs and µPSDs demand reduced sampling volumes-usually a few microliters—and offer the additional possibility of collecting and storing the dried sample on paper. The samples can be collected on the field and the analysis carried out when it is convenient. Simple functional elements such as filters and switches can be introduced in the dispositive in order to promote the cleanliness of the sample or to create reaction chambers [20]. The paper matrix also offers the opportunity of formation of electroactive derivatives from non-electroactive compounds, thus enlarging the range of substances under the analysis.

The robustness of paper-based separation devices must be attested in working conditions. The variations in brightness during the day can interfere in colorimetric measurements and the conditions of measurement without daylight have to be established. The efficiency of a separation process can vary with the change in temperature and the vapor pressure of the solvent so, the effect of the environmental conditions such as humidity and temperature must be evaluated in order to have accurate results. Another point that should be addressed is the increase of storage stability of the developed devices, most of them does not support six months of storage and that period is important for commercialization of point-of-need or point-of-care devices.

The sciences behind the fluid flow in a paper matrix were extensively studied in the past century and probably have been focused by the printing companies around the world [21-24]. The proper application of the knowledge on flow and distribution of solutions on paper will improve the achievements in the area of analytical paper-based devices and based on the present achievements it will be beneficial for both scientific and industrial communities. The global demand of point-of-care and point-of-need devices is growing at accelerated pace and the simple, low-cost paper-based devices for rapid analysis are the technology of choice to develop such robust and flexible devices.

Bibliography

- 1. Martinez AW, Phillips ST, Butte MJ, Whitesides GM. Patterned paper as a platform for inexpensive, low volume, portable bioassays. Angew Chem Int Ed, 46, 1318-1320 (2007).
- 2. Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, Thomas III SW, Sindi H, Whitesides GW. Simple telemedicine for developing regions: Camera phones paper-based and microfluidic for off-site devices real-time. diagnosis. Anal. Chem. 80 (10), 3699-3707 (2008).
- Martinez AW, Philips ST, Wiley BJ, Gupta M, Whitesides GW . FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. Lab Chip 8, 2146-2150 (2008).
- Ellerbee AK, Phillips ST, Siegel AC, Mirica KA, Martinez A, Striehl P, Jain N, Prentiss M, Whitesides GM. Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluid devices by measuring the transmission of light through paper. Anal Chem 81 (20), 8447-8452 (2009).
- Bruzewicz DA, Reches M, Whitesides GM. Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. Anal Chem 80 (9), 3387-3392 (2008).
- Carrilho E, Martinez AW, Whitesides GM. Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. Anal Chem 81 (16), 7091-7095 (2009).
- Washburn EE. The dynamics of capillary flow. Phys Rev 17 (3), 273-283 (1921).
- Carvalhal RF, Kfouri, MS, de Oliveira Piazetta MH, Gobbi AL, Kubota, LT. Electrochemical detection in a paperbased separation device. Anal Chem 82 (3), 1162-1165 (2010).
- Wang W, Wu W, Wang W, Zhu J. Tree-shaped paper strip for semiquantitative colorimetric detection of protein with selfcalibration. J. Chromatogr A 1217, 3896-3899 (2010).
- 10. Nie ZH, Nijhuis CA, Gong JL, Chen X, Kumachev A, Martinez AW,

Narovlvansky M, Whitesides GM. Electrochemical sensing in paperbased microfluid devices. Lab Chip 10, 477-483 (2010).

- 11. Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. Anal Chem 81(14), 5821-5826 (2009).
- 12. http://www.whatman.com/Chromatog raphyPaper.aspx
- Manickum T. Simultaneous analysis of neuroendrocrine tumor markers by HPLC-electrochemical detection. J. Chromatogr B 877, 4140-4146 (2009).
- 14. Tsunoda M. Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. Anal Bioanal Chem 386, 506–514 (2006).
 - 15. Miura H, Ozaki N, Sawada M, Isobe K, Ohta T, Nagatsu T. A link between stress and depression: shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression. Stress 11(3), 198-209 (2008).
 - 16. Khan MS, Thouas G, Shen W, Whyte G, Garnier G. Paper diagnostic for instantaneous blood typing. Anal Chem 82, 4158-4164 (2010).
 - 17. Hossain SMZ, Luckham RE, Smith AM, Lebert JM, Davies LM, Pelton RH, Filipe CDM, Brennan JD. Development of a bioactive paper sensor for detection of neurotoxins

using piezoelectric inkjet printing of sol-gel-derived bioinks. Anal Chem 82, 5474-5483 (2009).

- 18. Hossain SMŻ, Kuckham RE, McFadden MJ, Brennan JD. Reagentless bidirectional lateral flow bioactive paper sensors for detection of pesticides in beverage and food samples. Anal Chem 81, 9055-9064 (2009).
- 19. Wang W, Wu W, Zhu J. Tree-shaped paper strip for semiquantitative colorimetric detection of protein with self-calibration. J Chromatogr A 1217, 3896-3899 (2010).
- 20. Li X, Tian J, Nguyen T, Shen W. Paper-based microfluidic devices by plasma treatment. Anal Chem 80, 9131-9134 (2008).
- 21. Wood SE, Strain HH. Flow and distribution of solutions in filter paper: Influence in paper chromatography. Anal Chem 26, 260-264 (1954).
- 22. Borhan A, Rungta KK. An experimental study of the radial penetration of liquids in thin porous substrates. J Colloid Interface Sci 158, 403-411 (1993).
- 23. Takahashi A, Häggkvist M, Li T. Capillary penetration in fibrous matrices studied by dynamic spiral magnetic resonance imaging. Phys Rev 56, 2035-2042 (1997).
- 24. Danino D, Marmur A. Radial capillary penetration into paper: Limited and unlimited reservoirs. J Colloid Interface Sci 166, 245-250 (1994).

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFIA

- C. B. Jacobs, M. J. Peairs, B. J. Venton, Anal. Chim. Acta, 2010, 662, 105.
- 2. J. Wang, G. D. Liu, A. Merkoci, Anal. Chim. Acta, 2003, 482, 149.
- 3. I. Hsing, Y. Xu, W. Zhao, Electroanalysis, 2007, 19, 755.
- 4. Y. Li, H. J. Schluesener, S. Xu, Gold Bulletin, **2010**, 43, 29.
- 5. J. F. Rusling, Bioanalysis, **2010**, 2, 847.
- 6. J. Barek, J. Zima, Electroanalysis, 2003, 15, 467.
- R. N. Adams, Anal. Chem. **1958**, 30, 1576, Apud in I. Svancara, K. Vytras, K. Kalcher, A. Walcarius, J. Wang, Electroanalysis, **2009**, 21, 7.
- 8. R. S. Freire, C. A. Pessoa, L. T. Kubota, Quim. Nova, 2003, 26, 381.
- 9. R. Jasinski, J. Electrochem. Soc., 1965, 112, 526.
- 10. R. F. Lane, A. T. Hubbard, J. Phys. Chem., **1973**, 77, 1401.
- 11. P. R. Moses, L. Wier, R. W. Murray, Anal. Chem., **1975**, 47, 1882.
- J. Janata, Principles of Chemical Sensors. Springer, New York, p.1 10, 2006.
- 13. B. R. Eggins, Chemical sensors and biossensors, John Wiley & Sons Ltd, England, **2004**.
- 14.N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, W. R. Heineman, Chem. Soc. Rev., **2010**, 39, 1747.
- 15.D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, Sens. Actuators (B), **1996**, 30, 81.
- 16.B. R. Eggins, Biossensors: An introduction, John Wiley & Sons Ltd, England, 1997.
- 17. J. R. Stetter, W. R. Penrose, S. Yao, J. Electrochem. Soc., **2003**, 150, 511.
- 18.S. J. Updike, J. P Hicks, nature, **1967**, 214, 986.
- 19. X. Zhang, Q. Guo, D. Cui, Sensors, **2009**, 9, 1033.
- 20. P. Kissinger, Curr. Separations, **1997**, 16, 101.
- 21.P Kissinger, Biosens. Bioelectron., 2005, 20, 2512.
- 22. Y. P. Teng, X. B. Wu, Q. Zhou, C. Chen, H. L. Zhao, M. B. Lan, Sens. Actuators B, **2009**, 142, 267.
- 23. W. Yuan, Y. Wu, J. Wang, J. Di, Bioprocess. Biosyst. Eng., 2009, 32, 531.
- 24. Y. Wu, J. Zheng, Z. Li, Y. Zhao, Y. Zhang, Biosens. Bioelectron., **2009**, 24, 1389.
- 25. P. Luo, G. M. Xie, Y. Liu, H. J. Xu, S. X. Xu, S. X. Deng, F. Z. Song, Clin. Chem. Lab. Med, **2008**, 46, 1641.
- 26. Y. Lin, J. Wang, G. Liu, H. Wu, C. M. Wai, Y. Lin, Biosens. Bioelectron., **2008**, 1659.
- 27.T. Tangkuaram, C. Ponchio, T. Kangkasomboon, P. Katikawong, W. Veerasai, Biosens. Bioelectron., **2007**, 22, 2071.
- 28.G. Zhao, X. Zhan, Electrochim. Acta, **2010**, 55, 2466.
- 29.S. Viswanathan, C. Rani, A. V. Anand, J. A. Ho, Biosens. Bioelectron., **2009**, 24, 1984.
- 30. S. Sánches, M. Pumera, E. Fàbregas, Biosens. Bioelectron, 2007, 23, 332.
- 31. W. Dungchai, O. Chailapakul, C. S. Henry, Anal. Chem., 2009, 81, 5821.
- D. Lowinsohn, E. M. Richter, L. Angnes, M. Bertotti, Electroanalysis, 2006, 18, 89.
- 33. H. E. A. Ferreira, D. Daniel, M. Bertotti, E.M. Richter, J. Braz. Chem. Soc., **2008**, 18, 1538.

- 34.J. L. Anderson, N. Winograd, Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, P. T. Kissinger, W. R. Heineman, Eds; Marcel Dekker: New York, 1996.
- 35.C. M. A. Brett, S. Kresak, T. Hianik, A. M. O. Brett, Electroanalysis, **2003**, 15, 557.
- 36. J. Cheng, P. Jandik, N. Avdalovic, J. Chromatogr., 2003, 997, 73.
- 37.C. Kokkinos, A. Economou, M. Koupparis, Talanta, 2009, 77, 1137.
- 38.C. Kokkinos, A. Economou, I. Raptis, T. Speliotis, Anal. Chim. Acta, **2008**, 622, 111.
- 39. P. Jusková, V. Ostatná, E. Palecek, F. Foret, Anal. Chem., 2010, 82, 2690.
- 40. M. Tudorache, C. Bala, Anal. Bioanal. Chem., 2007, 388, 565.
- 41.N. A. Choudry, D. K. Kampouris, R. O. Kadara, C. E. Banks, Electrochem. Commun., **2010**, 12, 6.
- 42. R. García-Gonzáles, M. Teresa Fernándes-Abedul, A. Pernía, A. Costa-García, Electrochim. Acta, **2008**, 3242.
- 43.O. D. Renedo, M. A. Alonso-Lomillo, M. J. A. Martínez, Talanta, **2007**, 73, 202.
- 44.N. A. Choudry, R. O. Kadara, N. Jenkinson, C. E. Banks, Electrochem. Commun., **2010**, 12, 406.
- 45. A. Widrig, C. Chung, M. D. Porter, J. Electroanal. Chem. 1991, 310, 335.
- 46. Y. Golan, L. Margulis, I. Rubinstein, Surf. Sci. **1992**, 264, 312.
- 47.S. D. Evans, K. E. Goppert-Bearducci, E. Urankar, L. J. Gerenser, A. Ulman, Langmuir, **1991**, 7, 2700.
- 48.http://www.pineinst.com/echem/viewproduct.asp?ID=46681, acessado em 20 de junho de 2010.
- 49. http://www.bvt.cz/home/products, acessado em 20 de junho de 2010.
- 50. http://www2.dupont.com/MCM/en_US/assets/downloads/prodinfo/PrintedEl ectronics_ProductOverview.pdf, acessado dia 20 de junho de 2010.
- 51. http://www.matweb.com/search/GetMatIsByManufacturer.aspx?navletter= G&manID=546&manname=Gwent+Electronic+Materials+Ltd., acessado dia 20 de junho de 2010.
- 52. M. F. Bergamini, A. L. Santos, N. R. Stradiotto, M. V. B. Zanoni, J. Pharm. Biomed. Anal., **2005**, 39, 54.
- 53. J. Maly, J. Masojidek, A. Masci, M. Ilie, E. Cianci, V. Foglietti, W. Vastarella, R. Pilloton, Biosens. Bioelectron., **2005**, 21, 923.
- 54. S. Laschi, I. Palchetti, M. Mascini, Sens. Actuator B, 2006, 114, 460.
- 55. D, Purvis, O. Leonardova, D. Farmakovsky, V. Cherkasov, Biosens. Bioelectron., **2003**, 18, 1385.
- 56. J. Wang, L. Wang, J. Di, Y. Tu, Talanta, **2009**, 77, 1454.
- 57. V. B. Nascimento, L. Angnes, Quim. Nova, 2005, 21, 614.
- 58.G. Priano, G. González, M. Günther, F. Battaglini, Electroanalysis, **2008**, 20, 91.
- 59. K. Bhavsar, A. Fairchild, E. Alonas, D. K. Bishop, J. T. La Belle, J. Sweeney, T. L. Alford, L. Joshi, Biosens. Bioelectron., **2009**, 25, 506.
- 60. Y. Song, Y. Ma, Y. Wang, J. Di, Y. Tu, Electrochim. Acta, 2010, 55, 4909.
- 61. Y. Wang, Y. Wu, J. Wang, J. Di, Bioprocess. Biosyst. Eng., 2009, 32, 531.
- 62. J. Wang, L. Wang, J. Di, Y. Tu, Talanta, 2009, 77, 1454.
- 63. E. M. Richter, D. P. de Jesus, C. A. Neves, C. L. do Lago, L. Angnes, Quim. Nova, **2003**, 26, 839.

- 64. D. Lowinsohn, E. M. Richter, L. Angnes, M. Bertotti, Eletroanalysis, **2006**, 18, 89.
- 65. H. E. A. Ferreira, D. Daniel, M. Bertotti, E. M. Richter, J. Braz. Chem. Soc. **2008**, 19, 1538.
- 66. M. H. Gill, J. P. Sardinha, M. T. Vieira, M. Vivan, D. Costa, C. Rodrigues, F.-M. Matysik, A. M. Oliveira Brett, Biotechnol. Tech., **1999**, 13, 595.
- 67. J.-H. Kim, C. J. Kang, Y.-S. Kim, Biosens. Bioelectron., 2005, 20, 2314.
- 68. L. Chun-Xiu, L. Hong-Min, Y. Qing, C. Xin-Xia, Chin. J. Anal. Chem., **2009**, 37, 624.
- 69. Z. Nie, C. A. Nijhuis, J. Gong, X. Chen, A. Kumachev, A. Martinez, M. Narovlyansky, G. M. Whitesides, Lab on a Chip, **2010**, 10, 477.
- 70. R. F. Carvalhal, M. S. Kfouri, M. H. O. Piazetta, A. L. Gobbi, L. T. Kubota, Anal. Chem, **2010**, 82, 1162.
- 71. A. Warsinke, Anal. Bioanal. Chem. 2009, 393, 1393.
- 72. P. Von Lode, Clin. Biochem. 2005, 38,591.
- 73. J. Wang, Biosens. Bioelectron. 2006, 21, 1887.
- 74. X. Xu, S. Zhang, H. Chen, J. Kong, Talanta **2009**, 80, 8.
- 75. K. N. Konstantinov, R. A. Sitdikov, G. P. Lopez, P. Atanassov, R. L. Rubin, Biosens. Bioelectron. **2009**, 24, 1949.
- 76. J. J. Wang, J. Pharm. Biomed. Anal. 1999, 19, 53.
- 77. A. F. Rossi, D. Khan, Clin. Biochem. 2004, 37, 456.
- 78.G. J. Kost, N. K. Tran, M. Tuntideelert, S. Kulrattanamaneeporn, N. Peungposop, Am. J. Clin. Pathol. **2006**,126,513.
- 79. A. W. Martinez, S. T. Philips, G. M. Whitesides, Proc. Natl. Acad. Sci. **2008**, 105, 19606.
- 80. D. A. Bruzewicz, M. Reches, G. M. Whitesides, Anal. Chem. **2008**, 80, 3387.
- 81. E. Carrilho, A. W. Martinez, G. M. Whitesides, Anal. Chem. **2009**, 81, 7091.
- 82. Y. Lu, W. Shi, L. Jiang, J. Qin, B. Lin, Electrophoresis. 2009, 30, 1497.
- 83. E. Carrilho, S. T. Philips, S. J. Vella, A. W. Martinez, G. M. Whitesides, Anal.Chem. **2009**, 81, 5990.
- 84. A. W. Martinez, S. T. Philips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi, G. M. Whitesides, Anal.Chem. **2008**, 80, 3699.
- 85.G. Davis, Commercial Biossensors: Applications to Clinical, Bioprocess and Environmental Samples, G. Ramsay, Ed; John Wiley & Sons: New York, 1998.
- 86. V. T. Rao, C. Martin, J. Wright, F. Kiechle, M. G. Bissell, A. O. Okorodudu, Clin. Chem., **1996**, 42, S144.
- 87. V. T. Innanen, F. Barqueira-de Campos, Clin. Chem, 1995, 41, 1537.
- 88. Z. Chen, C. Fang, H. Wang, J. He, Electrochim. Acta, 2009, 55, 544.
- 89. M. J. Lenhard, G. S. DeCherney, R. E. Maser, B. C. Patten, J. Kubik, Diabetes Care, **1995**, 18, 686.
- 90. P. I. Hilditch, M. J. Green, Analyst, **1991**, 116, 1217.
- 91. A. Cass, G. Davis, G. Francis, H. Hill, W. Aston, I. Higgins, E. Plotkin, R. Zwanziger, Anal. Chem., **1984**, 56, 667.
- 92. Z. Chen, C. Fang, H. Wang, J. He, Z. Deng, Sens. Actuators B, **2008**, 129, 710.
- 93. M. A. T. Gilmartin, J. P. Hart, B. J. Birch, Analyst, **1994**, 119, 243.

- 94. P. Luo, Y. Liu, G. Xie, X. Xiong, S. Deng, F. Song, Forens. Sci. Inter., **2008**, 179, 192.
- 95. J. Zhen, C. S. Zou, Y. Wang, Y. Zhu, S. X. Deng, G. M. Xie, J. Wang, Chin. J. Anal. Chem., 2010, 38, 389.
- 96. W-C. Shih, M-C. Yang, M. S. Lin, Biosens. Bioelectron., 2009, 24, 1679.
- 97. W. H. Wang, F. Tang, X. W. Xu, Z. C. Chen, Rare Metal Mat. Eng., 2006, 35, 321.
- 98.S. Carrara, V. V. Shumyantseva, A. I. Archakov, B. Samorì, Biosens. Bioelectron., **2008**, 24, 148.
- 99. J. Weber, A. Kumar, A. Kumar, S. Bhansali, Sens. Actuators B, 2006, 117, 308.
- 100. C. X. Liu, H. M. Liu, Q. D. Yang, Q. Tian, X. X. Cai, Chin. J. Anal. Chem., **2009**, 37, 624.
- 101. S. A. Wring, J. P. Hart, B. J. Birch, Electroanalysis, **1992**, 4, 299.
- 102. D. Zhou, P. Nigam, J. Jones, R. Marchant, J. Chem. Tech. Biotech., **1995**, 64, 331.
- R. F. Carvalhal, D. S. Machado, R.K. Mendes, A.L.J. Almeida, N. H. Moreira, M. H. O. Piazetta, A. L. Gobbi, L. T. Kubota, Biosens. Bioelectron., **2010**, 25, 2200.
- 104. J. E. Frew, S. W. Bayliff, P. N. B. Gibbs, M. J. Green, Anal. Chim. Acta, **1989**, 224, 39.
- 105. Y. Tu, H. Chen, Anal. Biochem., **2001**, 299, 71.
- 106. Z. Chen, C. Fang, H. Wang, J. He, Electrochim. Acta, **2009**, 55, 544.
- 107. R. Nagata, S. A. Clark, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, Anal. Chim. Acta, **1995**, 304, 157.
- 108. G. Cui, J. H. Yoo, B. W. Woo, S. S. Kim, G. S. Cha, H. Nam, Talanta, **2001**, 54, 1105.
- 109. G. Cui, S. J. Kim, S. H. Choi, H. Nam, G. S. Cha, Anal. Chem., **2000**, 72, 1925.
- 110. Q. Chen, P. V. A. Pamidi, J. Wang, W. Kutne, Anal. Chim. Acta, **1995**, 306, 201.
- 111. E. Crouch, D. C. Cowell, S. Hoskins, R. W. Pittson, J. P. Hart, Biosens. Bioelectron., **2005**, 21, 712.
- 112. M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret, Sens. Actuators B, **2000**, 69, 153.
- 113. O. D. Renedo, M. A. Alonso-Lomillo, M. J. Arcos Martínez, Talanta, **2007**, 73, 202.
- 114. W. Zhao, A. van den Berg, Lab Chip, **2008**, 8, 1988.
- 115. http://www.medicalnewstoday.com/articles/112161.php, acessado na internet dia 04 de julho de 2010.
- 116. S. Di Risio, N. Yan, J. Adhesion Sci. Tech., **2010**, 24, 661.
- 117. 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.*, **2009**, *81*, 5474.
- 118. A. Apilux, W. Dungchai, N. Praphairaksit, C. S. Henry, O. Chailapakul, Anal. Chem., **2010**, 82, 1727.
- 119. A. Floris, S. Staal, S. Lenk, E. Staijen, D. Kohlheyer, J. Eijkel, A. Van den Berg, Lab on a Chip, **2010**, 10, 1799.
- 120. S. Trasati, O. A. Petrii, Pure Appl. Chem., **1991**, 5, 711.

- 121. R. A. Benkeser, D. Goggin, G. Scholl, J. Am. Chem. Soc., **1954**, 76,4025.
- 122. R. F. Carvalhal, R. S. Freire, L. T. Kubota, Electroanalysis, **2005**, 17, 1251.
- D. E. Weisshaar, B. D. Lamp, M. D. Porter, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 5860.
- 124. G. Oliveira-Neto, L. Rover Jr., L. T. Kubota, Electroanalysis, **1999**, 11, 527.
- 125. C. Martín, E. J. Domíngues, J. Pharm. Biomed. Anal., **1999**, 19, 107.
- 126. R. M. De Carvalho, G. Oliveira Neto, L. T. Kubota, Electroanalysis **2001**, 13, 131-136.
- 127. L. Rover Jr., G. Oliveira-Neto, J. R. Fernandes, L. T. Kubota, Talanta **2005**, 1, 547.
- 128. H. T. S. Britton, R. A. Robinson, J. Chem. Soc., **1931**, 1456.
- 129. T. C. McIlvaine, J. Biol. Chem., **1921**, 49, 183.
- 130. P. Trinder, Biochem. J., **1954**, 57, 301.
- 131. R. Fernández-Lafuente, C. M. Rosell, V. Rodriguez, J. M. Guisan, Enzyme Microb. Technol., **1995**. 17, 517.
- F. López-Gallego, L. Betancor, C. Mateo, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. Dellamora-Ortiz, J. M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, J. Biotech., 2005, 119, 70.
- 133. L. Rover Jr., J. C. B. Fernandes, G. Oliveira-Neto, L. T. Kubota, E. Katekawa, S. H. P. Serrano, Anal. Biochem., **1998**, 260, 50.
- 134. S. G. A. Alivisatos, F. Ungar, G. Abraham, Nature, **1964**, 203, 973.
- 135. R. Boyle in *Experiments upon Colors* apud Bishop, E. *Indicators*: Pergamon Press, Oxford, 1972.
- 136. R. Stock, C. B. F. Rice, *Chromatographic Methods:* John Wiley & Sons, New York, 1974.
- 137. D. L. Clegg, Anal. Chem. **1951**, 22, 48.
- 138. R. H. Muller, Anal. Chem. **1949**, 21, 1429.
- 139. Tsuji, H.; Seabra, M. E. G.; Matsubara, B. B.; Burini, R. C. Rev. Bras. Patol. Clin. **1993**, 29, 83.
- 140. Tietz, N. W. *Clinical Guide to Laboratory Tests:* W. B. Saunders Company, **1995**.