



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - PPGQB**

**DIÓGENES MENESES DOS SANTOS**

**MICROSSISTEMAS ELETROFORÉTICOS EM MATERIAIS POLIMÉRICOS DE  
DUPLO CANAL COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA**

Maceió-AL

2014

**DIÓGENES MENESES DOS SANTOS**

**MICROSSISTEMAS ELETROFORÉTICOS EM MATERIAIS POLIMÉRICOS DE  
DUPLO CANAL COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane Caxico de A. Galdino

Co-orientador: Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva

Supervisora: Profa. Dra. Susan M. Lunte

Maceió-AL  
2014

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

S237m Santos, Diógenes Meneses.  
Microsistemas eletroforéticos em materiais poliméricos de duplo canal com detecção amperométrica / Diógenes Meneses dos Santos . – 2014.  
164 f. : il., gráfs. e tabs.

Orientadora: Fabiane Caxico de A. Galdino.  
Co-orientador: José Alberto Fracassi da Silva.  
Supervisão: Susan M. Iunte.  
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.

Bibliografia. f. 149-164.

1. Eletroforese em microchip. 2. Detecção eletroquímica. 3. Espécies reativas de oxigênio (ERO). 4. Espécies reativas de nitrogênio (ERN). 5. Microsistema eletroforético híbrido PDMS / vidro. 6. Microfluídicos de PMMA.

CDU: 543.545.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA




BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

## FOLHA DE APROVAÇÃO

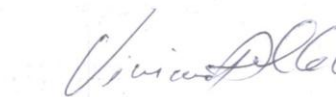
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **DIOGENES MENESES DOS SANTOS**, intitulada: “**Microssistemas Eletroforéticos em Materiais Poliméricos de Duplo Canal com Detecção Amperométrica**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 23 de maio de 2014, às 9 h, na Sala de Reuniões do IQB.

### COMISSÃO JULGADORA

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Fabiane Caxico de Abreu Galdino  
Orientadora - IQB-UFAL/PPGQB

  
Prof Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro  
IQ/UFG

  
Prof Dr. Marcos Vinicius Dias Vermelho  
IF/UFAL

  
Prof Dr. Vinicius Del Colle  
PPGQB - UFAL Arapiraca

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Janaina Herbele Bortoluzzi  
IQB - UFAL/ PPGQB

Dedico esse trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe Dalila Meneses dos Santos, minha esposa Rosemary Barboza Meneses, meus filhos Dharlly, Dhara, Dhanaylla e Diógenes Filho, meu irmão David Adam, meu padrasto Teixeira, meus avôs Alfredo (in memória) e João (in memória) e avós Severina e Sálvia.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço inicialmente a DEUS pelo dom da vida e por ter me concedido saúde, força de vontade, paciência e perseverança durante a realização deste trabalho.

À minha mãe, insubstituível, Dalila Meneses, responsável pela minha alfabetização, educação e formação como pessoa íntegra e honesta. Por todo AMOR e presença materna e paterna me aconselhado em todos os momentos de minha vida. GRATIDÃO ETERNA.

À minha querida esposa Rosemary e aos meus filhos Dharlly, Dhara, Dhanaylla e Diógenes Filho por toda paciência, amor e carinho demonstrados em todos os momentos e por serem uma das razões de minha constante luta em busca de crescimento e um futuro melhor.

Ao meu irmão David e ao meu padrasto José Teixeira por estarem presentes em todos os momentos me dando força e conselhos.

Aos meus avôs João (in memorium) e, de forma especial Alfredo de Meneses (in memorium) pelo exemplo de Homem e por ter sido meu pai de coração e responsabilidades, e avós Severina e Sálvia.

Aos meus tios e tias maternos João, Davi, Jacó (in memorium), Jair, Alfredo Filho (in memorium), Maria Aparecida (in memorium), Ivanilda, Cícera, Rita e Cristina e demais parentes e amigos por toda contribuição direta e indireta em todos os momentos de minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Fabiane Caxico, ao meu co-orientador Prof. Dr. Alberto Fracassi, à minha supervisora no doutorado sanduíche na Universidade de Kansas (USA) Profa. Dra. Susan Lunte por todo apoio, presteza, segurança, incentivo, paciência, respeito, puxadas de orelhas e compreensão durante todo o meu doutoramento, os quais devo o mérito pelo término desse trabalho.

Aos meus amigos de doutorado e laboratório de eletroquímica, de forma muito especial à Profa. Dra. Marília Arlan, Profa. Dra Adriana, Camila, Wilson, Francisco, Cleylton, Andréa, Fred, Adilson, Leonardo, Fátima, Thaissa, Gabi, Juliana, Marílya, Victor, Elton, Angladis, Orlando, Fabrícia, Iara, Antonio, Augusto, Allani, Anny, Andresa, Valdomiro, Kelly, Erivaldo, Ana Júlia e pelos momentos de discussões e troca de conhecimentos recíprocos e descontração.

Aos meus amigos de doutorado sanduíche do Ralph Adams Institute for Bioanalytical Chemistry (no Multidisciplinary Research Building) da Universidade de Kansas Bruno, Dulan, David, Pann, Ryan, Rachel, Anne, Joe, Tom, Nate, Jessica, Abdullah, Erin pelas discussões nas reuniões de grupo e ajuda na minha adaptação ao laboratório e cultura Norte Americana.

Aos meus grandes amigos Gary e Phillis, Mark e Kim, os quais foram o meu esteio em Lawrence nos momentos em que mais precisei. ETERNA GRATIDÃO.

Aos meus amigos Marcos Chinês, Tony, Amélia Berto, Sandro Melros, Dilton, Vinícios, Adeilton, Rodrigo, Marcelo Augusto, Gilvan, Vera, Risomar (in memória), Lula, Gorete, Josemildo, Alexandre, Daniele, Daniela, Alberto por todo incentivo.

À todos os professores de todas as etapas de minha vida escolar e acadêmica, Fabiane Caxico, Marília, Janaína, Paulo César, Mariano, Tonholo, Marcos Lenes, Rita, Benícia, Paulo Marinho, José Ivan, Célia Margarida (in memória), Ir. Adelita, Cristina, Petrucia e tia Fátima por toda paciência e contribuição na minha formação intelectual e de cidadão.

À minha amiga e mãe na educação Maria do Carmo por toda presteza, conselhos, consideração, oportunidade e carinho. ETERNA GRATIDÃO.

Ao Centro Educacional Cristo Redentor, nas pessoas da professora Rita de Cássia e Ir. Josefa Ferro e Ir. Maria Antônia, pela bolsa de estudos do ensino médio. ETERNA GRATIDÃO.

Ao Colégio São Francisco de Assis pelas bolsas de estudo dos meus filhos e por toda paciência.

À Escola Estadual Prof. Costa Rêgo, na pessoa das diretoras Dilma e Joely, por ter contribuído com meu afastamento.

À 5ª Coordenadoria Regional de Ensino e Secretaria de Educação do Estado, na pessoa da Profa. Mônica, por toda ajuda e colaboração.

A CAPES, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho no Brasil e nos Estados Unidos. E às agências financiadoras CNPq e FAPEAL pelo suporte financeiro.

## RESUMO

Os microssistemas eletroforéticos (MSE) são ferramentas poderosas para a separação de espécies em microssistemas de análises, onde pode ser facilmente combinada com detecção eletroquímica (DEQ) e tornando-se, portanto, um método de detecção ideal. No entanto, a influência da alta tensão no eletrodo de trabalho utilizada para a separação é um problema a ser contornado devido o aumento da relação sinal/ruído e possíveis danificações do eletrodo e/ou do potenciostato. Assim, foi proposto nesta tese um MSE híbrido de PDMS/vidro com configuração de duplo-canal acoplado a um potenciostato eletricamente isolado com objetivo de minimizar a influência do elevado potencial no canal de separação e melhorar a eficiência de separação das espécies e, subseqüentemente, melhorar os limites de detecção. O MSE contém dois canais paralelos separados 200  $\mu\text{m}$ , sendo um canal de separação e outro de referência, e cada um deles contendo um eletrodo de platina de 15 ou 50  $\mu\text{m}$  colocados cerca de 1 a 4  $\mu\text{m}$  dentro do canal. Um eletrodo serviu como eletrodo de trabalho, posicionado no canal de separação, e o outro eletrodo como eletrodo de referência, posicionado no canal de referência. Essa configuração associado ao potenciostato eletricamente isolado permitiu que os sinais amperométricos fossem medidos sem qualquer mudança de potencial ou de interferência oriunda da alta tensão de separação aplicada. Objetivando avaliar a eficiência da metodologia proposta nessa tese, amostras de nitrito e peroxinitrito (espécies reativas de nitrogênio – ERN), tirosina, peróxido de hidrogênio (espécie reativa de oxigênio – ERO), ácido ascórbico, glutathione e cisteína foram injetadas no canal contendo o eletrodo de trabalho, enquanto que simultaneamente o tampão de ácido bórico contendo TTAB pH 11 foi injetado no canal de referência contendo o eletrodo de referência. A partir desta configuração, obteve-se uma significativa diminuição no nível de ruído (cerca de 0,94 pA) e uma relativa melhora na resolução ratificadas pelos eletroferogramas, se comparado com a configuração que utiliza canal único. Os limites de detecção (LOD) para as espécies químicas supracitados foram de 0,58  $\mu\text{M}$ , 0,14  $\mu\text{M}$ , 0,75  $\mu\text{M}$ , 0,21  $\mu\text{M}$ , 0,82  $\mu\text{M}$ , não foi obtida para a cisteína, e 1,63  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A eficiência também pode ser vista através das análises de nitrito realizadas em amostras de perfusato de sangue de ovelhas e ratos, onde foram detectados uma concentração de 68,05  $\mu\text{M}$  e 22,04  $\mu\text{M}$ , respectivamente, através da metodologia proposta. Foi proposto também nessa tese, a microfabricação e avaliação de um microssistema eletroforético de PMMA com configuração de canal único acoplado a uma base feita do mesmo material para fixar o microchip, com detecção eletroquímica usando eletrodo de pasta de carbono. O objetivo da construção da base foi obter, através da fixação, reprodutibilidade de eventos. E a microfabricação do MSE de PMMA objetivou a viabilidade do seu uso em análises tendo como perspectiva o baixo custo por unidade confeccionada devido ao uso de laser de  $\text{CO}_2$  para a microfabricação, o qual possui um valor agregado consideravelmente menor, se comparado com os processos fotolitográficos. A avaliação desse sistema foi feita através das análises de padrões de serotonina e acetaminofeno, onde comprovou-se que a microfabricação desse sistema apresentou boa reprodutibilidade e repetitividade de eventos, tornando-se viável o seu processamento.

**Palavras-Chave:** Eletroforese em microchip. Detecção eletroquímica. ERO. ER Híbrido PDMS/vidro. PMMA.



## ABSTRACT

Electrophoretic microsystems (EM) are powerful tools for the separation of species of microsystems analyzes which can easily be combined with electrochemical detection (ECD) and therefore making it ideal for a method of detection. However, the influence of high voltage at the working electrode used for the separation is a problem to be overcome due to the increased signal/noise ratio and possible damage of the electrode and/or the potentiostat. Thus, it was proposed in this thesis one EM hybrid PDMS / glass configuration with dual-channel potentiostat coupled to an electrically isolated in order to minimize the influence of high potential in the separation channel and improve the separation efficiency of the species and subsequently, improve detection limits. The EM contains two separate parallel channels 200 microns and a channel separation and another reference, and each containing a platinum electrode 15 or 50  $\mu\text{m}$  placed about 1 to 4  $\mu\text{m}$  in the channel. An electrode served as the working electrode, positioned in the separation channel, and another electrode as reference electrode, placed in the reference channel. This configuration associated with the electrically isolated potentiostat allowed the amperometric signals were measured without any change or potential interference arising from the high voltage applied separation. Aiming to evaluate the effectiveness of the methodology proposed in this thesis, samples nitrite, tyrosine and peroxyxynitrite (reactive nitrogen species – RNS), hydrogen peroxide (reactive oxygen species – ROS), ascorbic acid, glutathione and cysteine were injected into the channel containing the working electrode, while simultaneously boric acid buffer pH 11 containing TTAB was injected into the reference channel containing the reference electrode. From this configuration, we obtained a significant reduction in noise level (about 0.94 pA) and a relative improvement in the resolution ratified by electropherograms, compared with using single channel configuration. The limits of detection (LOD) for the chemical species mentioned above were 0.58  $\mu\text{M}$ , 0.14  $\mu\text{M}$ , 0.75  $\mu\text{M}$ , 0.21  $\mu\text{M}$ , 0.82  $\mu\text{M}$ , was not obtained for cysteine and 1.63  $\mu\text{M}$ , respectively. The efficiency can also be seen by analyzing nitrite performed on samples of perfusate blood of sheeps and rats, where have been detected a concentration of 68.05  $\mu\text{M}$  and 22.04  $\mu\text{M}$ , respectively, by the proposed method. It was also proposed in this thesis, microfabrication and evaluation of a PMMA electrophoretic microsystem with single channel configuration coupled to a base made of the same material to fix the microchip with electrochemical detection using a carbon paste electrode. The purpose of the construction of the base was to obtain, by fixing, reproducibility of events. And the microfabrication of PMMA EM aimed the viability of its use in analysis perspective as having the lowest cost per unit made due to the use of  $\text{CO}_2$  laser for microfabrication, which has a value considerably lower, compared with photolithographic processes. The evaluation of this system was performed through the analysis standards of serotonin and acetaminophen, which proved that the microfabrication of this system showed good reproducibility and repeatability of events, making it viable processing.

**Keywords:** Microchip Electrophoresis. Electrochemical Detection. ROS. RNS. Hybrid PDMS/glass. PMMA.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Perfis de fluxo para líquidos sob (A) fluxo eletrosmótico (linear ou radial) e seu respectivo sinal (pico) e (B) fluxo induzido por diferença de pressão (laminar) e seus respectivos sinais (picos)..... 34
- Figura 2 - Velocidades na presença de um fluxo eletrosmótico. Os comprimentos das setas próximas aos íons indicam a grandeza de suas velocidades de migração ( $v$ ), a seta aponta para a direção de movimentação. O eletrodo negativo estaria à direita e o eletrodo positivo à esquerda dessa solução..... 35
- Figura 3 - Transferência padrão utilizando fotorresiste positivo e negativo. (A) revestimento do fotorresiste (negativo ou positivo), (B) fotolitografia (máscara de campo escuro ou máscara de campo claro), (C) revelação do fotorresiste, (D) deposição de metal, e (E) lavagem do fotorresiste com material em cima; permanece a estrutura transferida..... 43
- Figura 4 - Janela de potencial dos eletrodos de Pt, Hg e C em diferentes pH..... 68
- Figura 5 - Design do chip feito no CorelDRAW X5 e a forma ampliada da intersecção dos microcanais..... 82
- Figura 6 - Imagem do microchip montado com os microcanais preenchidos com azul de bromotimol..... 84
- Figura 7 - Imagem frontal da base montada dos microchips..... 85
- Figura 8 - Imagem da parte de trás da base montada dos microchips..... 86
- Figura 9 - Ilustração esquemática do sistema de microcanais no microssistema eletroforético (MSE) de duplo-canal, com uma configuração dentro do canal (in-channel) e detector eletroquímico. O canal duplo tem comprimento: 3,5 cm de canal de separação e canal de referência (a partir da intersecção dos canais com a extremidade do canal de separação) e 1,0 cm de braços laterais. Todos os canais têm a mesma secção transversal de dimensões de 40  $\mu\text{m}$  de largura e 15  $\mu\text{m}$  de profundidade, com exceção do canal de resíduos de amostra que é de 80  $\mu\text{m}$ . Todos reservatórios tem um diâmetro de 4 mm, o que é equivalente a um volume de 20  $\mu\text{L}$ , com exceção do reservatório de resíduos/GND, que é cerca de 50  $\mu\text{L}$ ..... 88
- Figura 10 - Imagens fotográfica dos moldes para o microchip de PDMS. A diferença entre as duas imagens é a distância entre os canais de separação e trabalho, em A é 160  $\mu\text{m}$  e em B 400  $\mu\text{m}$ ..... 88

Figura 11 -	Imagens fotográfica dos eletrodos de platina. (A) eletrodos de 15 $\mu\text{m}$ , e (B) eletrodos de 50 $\mu\text{m}$ .....	90
Figura 12 -	Esquema demonstrando a aplicação da tensão com seus respectivo sentidos de fluxo eletroforético.....	93
Figura 13 -	Voltamograma cíclico do eletrodo de pasta de carbono (20% de nujol e 80% de carbono grafite). Parâmetros físico-químico: tempo de equilíbrio igual a 1 s; 2 scans; potencial start de 0,0 V; potencial no 1 <sup>o</sup> vértice igual a 0,0 V; potencial no 2 <sup>o</sup> vértice igual a 0,75 V; potencial step de 0,005 V; solução de ferricianeto de potássio 1 mM em cloreto de potássio 0,1 M; velocidade de varredura de 0,1 V.....	97
Figura 14 -	Gráficos do potencial de separação vs. corrente elétrica, utilizando bórax (A) 10 mM e (B) 20 mM como eletrólito suporte. Parâmetros físico-químico: tempo de equilíbrio de 5 s; tempo de corrida de 1000 s; intervalos de 0,15 s; potencial no eletrodo de trabalho de 0,9 V; faixa de potencial aplicado de 0,0 a 1,0 kV.....	99
Figura 15 -	Imagem fotográfica do sistema de PMMA proposto.....	103
Figura 16 -	Voltamograma cíclico da serotonina 1 mM. Parâmetros físico-químico: tempo de equilíbrio igual a 1 s; 2 scans; potencial start de -0,8 V; potencial no 1 <sup>o</sup> vértice igual a -0,8 V; potencial no 2 <sup>o</sup> vértice igual a 0,90 V; potencial step de 0,90 V; velocidade de varredura de 0,1 V.....	104
Figura 17 -	Amperograma da serotonina 1 mM em bórax 20mM como eletrólito suporte. Parâmetros físico-químico: tempo de equilíbrio de 5 s; tempo de corrida de 1000 s; intervalos de 0,15 s; potencial no eletrodo de trabalho de 0,9 V; alta-voltagem de 0,5 kV.....	105
Figura 18 -	Amperograma do acetaminofeno 1 mM em bórax 20mM como eletrólito suporte. Parâmetros físico-químico: tempo de equilíbrio de 5 s; tempo de corrida de 1000 s; intervalos de 0,15 s; potencial no eletrodo de trabalho de 0,9 V; alta-voltagem de 0,5 kV.....	106
Figura 19 -	Imagem fotográfica do potenciostato eletricamente isolado modificado modelo 8151BP 2-canal Wireless (Pinnacle Tecnologia, Lawrence, KS, USA).....	111
Figura 20 -	Imagens de microscopia de fluorescência que descrevem a injeção pinched. (a) etapa de carga da amostra, (b) etapa de distribuição de amostra.....	114
Figura 21 -	Diagrama esquemático da válvula gating eletrocinética para a injeção de amostra. (A) Gating, a amostra foi transportado de	

canal S para o Canal SW, e foi bloqueada, ou fechada, por um tampão do canal B. (B) Injeção, a válvula foi aberta para a injeção da amostra, quando o fluxo de tampão de canal B foi retida. (C) Gating, fluxo de amostra foi fechado novamente para a prevenção da amostra de vazamento, ou de fuga, em Canal BW.....

116

Figura 22 - Imagens microscópicas do gating eletrocinético das injeções de amostras feitas nas intersecções do microchip de duplo-canal. Os canais de separação e referência tinham 3,5 cm de comprimento e 40  $\mu\text{m}$  de largura. Para esse teste foi usado fluoresceína em ácido bórico 10 mM contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) 2 mM como BGE. Os potenciais aplicados nos reservatórios da amostra e do BGE foram, respectivamente, 1200 V e 1400 V. (A) Imagem antes de ser aplicada a injeção. (B) Imagem do exato momento que está sendo aplicada a injeção. (C) Imagem após ser aplicada a injeção. Os resultados deste teste foram idênticas para os dois canais, de trabalho e de referência.....

117

Figura 23 - Eletroferogramas e ilustrações esquemáticas dos alinhamentos dos eletrodos. Parâmetros físico-químico: BGE (pH = 11) , 10 mM ácido bórico contendo 2 mM TTAB; WE = 1,1 V; intensidade de campo elétrico de separação eletroforética 400  $\text{Vcm}^{-1}$  e injeção ( $\downarrow$ ) de 1 s; configuração in-channel. (A) eletroferograma do branco com os eletrodos 200  $\mu\text{m}$  da saída dos microcanais; (B) eletroferograma do branco com os eletrodos 5  $\mu\text{m}$  da saída dos microcanais; (C) eletroferograma do branco com os eletrodos posicionados cerca da metade dentro e metade fora (7 a 8  $\mu\text{m}$ ) dos microcanais; (D) eletroferograma do branco com os eletrodos posicionados somente de 1 a 4  $\mu\text{m}$  no interior dos microcanais (corrente de fundo 2,8 nA).....

120

Figura 24 - Eletroferogramas de nitrito (100 mM), comparando os diferentes potenciais do eletrodo de trabalho (1,1, 1,0 e 0,9 V); BGE (pH = 11) , 10 mM ácido bórico contendo 2 mM TTAB; intensidade de campo elétrico de separação eletroforética 400  $\text{Vcm}^{-1}$  e injeção ( $\downarrow$ ) de 1 s.....

122

Figura 25 - (A) Eletroferogramas de nitrito ( 500  $\mu\text{M}$  ) comparando diferentes tamanhos de eletrodos , 15 e 50  $\mu\text{m}$  ( WE = 1,1 V). BGE (pH = 11) , 10 mM ácido bórico contendo 2 mM TTAB; intensidade de campo elétrico de separação eletroforética 400  $\text{Vcm}^{-1}$  e injeção ( $\downarrow$ ) de 1 s. (B) imagem microscópica do alinhamento dos eletrodos de platina de trabalho e de referência (RWE) de 50  $\mu\text{m}$  de comprimento; e (C) imagem microscópica do alinhamento dos eletrodos de platina de trabalho e de referência (RWE) de 15  $\mu\text{m}$  de comprimento.....

123

- Figura 26 - (A) Ampliação do gráfico com foco na linha de base para verificar o ruído no intervalo de 5 s; a linha vermelha representa os resultados sem suavização (*smoothing*) e a linha preta representa os resultados com suavização (*smoothing*). (B) Eletroferograma de uma mistura equimolar nitrito (1), tirosina (2) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3), todos com a mesma concentração 3,125 μM. E = 1,1 V. BGE (pH = 11), ácido bórico 10 mM contendo TTAB 2 mM; potencial de separação eletroforética 400 Vcm<sup>-1</sup> e injeção (↓) de 1 s..... 125
- Figura 27 - Eletroferogramas de misturas equimolar 100 μM de: (A) nitrito (1), GSH (2), AA (3) e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4); (B) nitrito (1), GSH (2), tirosina (3), AA (4) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5); (C) nitrito (1), Cys (2), tirosina (3) e AA (4), (D) nitrito (1), tirosina (2) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3). E = 1,1 V; BGE (pH = 11) ácido bórico 10 mM contendo 2 mM TTAB; potencial de separação 400 Vcm<sup>-1</sup> e injeção (↓) de 1 s (parâmetros usados em todas as análises)..... 129
- Figura 28 - Curvas de referência para análise de: (A) nitrito; (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (C) tirosina; (D) GSH; (E) ácido ascórbico (AA); e (F) ONOO<sup>-</sup>. Microchip PDMS/vidro de duplo-canal com 3,5 cm de comprimento dos canais de separação e referência e alinhamento dos eletrodos dentro do canal (1 a 4 μm do eletrodo dentro do canal). Eletrodos de trabalho e referência de Pt (15 μm cada). E = 1,1 V aplicado no eletrodo de trabalho. BGE (pH = 11) - ácido bórico 10 mM contendo 2 mM TTAB. Alta voltagem aplicados nos reservatório da amostra de 1200 V e do BGE de 1400 V – potencial de separação de 400 Vcm<sup>-1</sup>. Faixa de concentração de 6,25 a 100 μM. Esses parâmetros foram usados para todos as análises..... 131
- Figura 29 - Eletroferogramas de padrões de ONOO<sup>-</sup> 500 μM. (A) 1 – nitrito, 2 – ONOO<sup>-</sup> e ★ degradação de ONOO<sup>-</sup>; (B) Comparação de diferentes potenciais do eletrodo de trabalho (1,1, 0,9, 0,7 e 0,5 V); BGE (pH = 11) ácido bórico 10 mM contendo 2 mM TTAB; potencial de separação 400 Vcm<sup>-1</sup> e injeção (↓) de 1 s (As condições experimentos foram utilizados nos dois procedimentos)..... 138
- Figura 30 - Eletroferogramas da determinação de nitrito nas amostras de perfusato de (A) ovelhas (★ nitrito); (B) ratos (★ nitrito); E = 1,1 V; BGE (pH = 11) de ácido bórico 10 mM contendo TTAB 2 mM; potencial eletroforético 400 Vcm<sup>-1</sup> e de injeção (↓) de 1 s; adição de 2 μL padrão de nitrito 10 mM em 20 μL da solução 1:1 de amostra do perfusato da ovelha ou rato e BGE..... 140

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação de resultados com e sem o efeito de suavização e das configurações de canais único e duplo.....	126
Tabela 2 - Comparação de LODs entre a metodologia e técnica propostas* e outras metodologias e técnicas.....	135

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB	Biossensor inibidor amperométrico (Amperometric inhibitor biosensor)
BGE	Eletrólito suporte (Background electrolyte)
CA-KS	Método cinético-espectrofotométrica quimiométrica assistida (Chemometric assisted kinetic spectrophotometric)
C <sup>4</sup> D	Condutividade sem contato capacitivamente acoplado a detecção (Capacitively coupled contactless conductivity detection)
CL	Cromatografia líquida
CZE	Eletroforese capilar por zona (Capillary electrophoresis per zone.)
DBP	Dibutil ftalato
DCL	Detecção de quimiluminescência
DEA/NO	Dietilamônio (Z) -1- (N , N-dietil - amino) diazen - 1 - ium - 1 ,2 - diolate
DEQ	Detecção eletroquímica
EC	Eletroforese capilar
ECD	Detecção eletrocatalítica.
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
MSE	Microssistema Eletroforético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FD	Detecção de fluorescência (Fluorescence Detection)
GC	Cromatografia gasosa (Gas Chromatography)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (High performance liquid chromatography)
IPA	Álcool isopropílico (isopropyl alcohol)

IRS	Espectroscopia de infravermelho (Infrared spectroscopy)
LIF	Fluorescência por laser induzido (Laser Induced Fluorescence)
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MCFE	Eletrodo de fibra de carbono modificado (Modified carbon fiber electrode)
MCNTE	Eletrodo de nanotubo de carbono modificado (Modified carbon nanotube electrode)
MGCE	Eletrodo de carbono vítreo modificado (Modified glassy carbon electrode)
MS	Espectroscopia de massa (Mass spectroscopy)
PD	Detecção de fosforescência (Detection of phosphorescence)
PDMS	poli(dimetil siloxano)
PM	Micromatrizes de proteína (Protein microarrays)
PMMA	Poli(metil metacrilato)
Prol/NO	Sal dissódico 1 - (hidrox - il - NNO - azoxi) -L- prolina
PSA	Antígeno específico da próstata (Prostate specific antigen)
RE	Eletrodo referência (Reference electrode)
SDS	Dodecilsulfato de sódio (Sodium dodecyl sulphate)
SOD	Superóxido dismutase
TTAB	Brometo de tetradeciltrimetilamônio (Tetradecyl trimethylammonium bromide)
TTAOH	Hidróxido de tetradeciltrimetilamônio (Tetradecyl trimethylammonium hydroxide)
UV	Detecção ultra violeta
UV/vis	Detecção de Ultravioleta/visível
VC	Voltametria cíclica



$\mu$ FIA	Análise por injeção em microfluxo ( $\mu$ Flow injection analysis)
$\mu$ TAS	Microssistemas para análises totais ( $\mu$ Systems for total analysis)
WE	Eletrodo de trabalho (Work electrode)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>MICROSSISTEMAS DE ANÁLISES QUÍMICAS ASSOCIADOS A MÉTODOS ELETROANALÍTICOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Miniaturização de dispositivos</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Conceitos básicos de separações por eletromigração em capilares..</b>	<b>30</b>
<b>3.3</b>	<b>Fotolitografia e laser de CO<sub>2</sub> como processo de microfabricação.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Influência do potencial de separação na detecção eletroquímica usada em eletroforese capilar e em microchip</b> .....	<b>50</b>
<b>3.5</b>	<b>Algumas aplicações usando microdispositivos</b> .....	<b>55</b>
<b>3.6</b>	<b>Monitoramento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio</b> .....	<b>61</b>
<b>3.7</b>	<b>Epítome dos principais métodos eletroquímicos de análises</b> .....	<b>66</b>
<b>3.8</b>	<b>Descrição e evolução dos eletrodos de pasta de carbono</b> .....	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Equipamentos e acessórios</b> .....	<b>77</b>
<b>4.2</b>	<b>Reagentes e soluções utilizados</b> .....	<b>78</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo das soluções de peroxinitrito e das amostras de perfusato de sangue de ovelhas e ratos</b> .....	<b>79</b>
<b>4.4</b>	<b>Preparo do eletrodo de pasta de carbono</b> .....	<b>80</b>
<b>4.5</b>	<b>Fabricação do microchip de PMMA</b> .....	<b>81</b>
<b>4.6</b>	<b>Construção do suporte para o microchip de PMMA</b> .....	<b>84</b>
<b>4.7</b>	<b>Fabricação do microchip híbrido PDMS/vidro</b> .....	<b>86</b>
<b>4.8</b>	<b>Fabricação dos eletrodos de platina (Pt)</b> .....	<b>89</b>
<b>4.9</b>	<b>Testes eletroforéticos para avaliar prováveis obstruções dos microcanais do microdispositivo de PMMA</b> .....	<b>91</b>
<b>4.10</b>	<b>Procedimento de eletroforese usando o microchip híbrido PDMS-vidro</b> .....	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES – PARTE I</b> .....	<b>95</b>
<b>5.1</b>	<b>Otimização do eletrodo de pasta de carbono</b> .....	<b>95</b>
<b>5.2</b>	<b>Determinação do raio do eletrodo de pasta de carbono</b> .....	<b>97</b>

5.3	Estudo do potencial de separação eletroforética.....	98
5.4	Determinação amperométrica de acetaminofeno e serotonina para averiguação da viabilidade do microchip de PMMA e do suporte para fixação.....	100
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES – PARTE II</b>	107
6.1	Efeitos da condutância e capacitância nos microchip com detecção eletroquímica.....	108
6.2	Injeção da amostra ( <i>gating</i> eletrocinético) em microchip de duplo-canal.....	113
6.3	Otimização do posicionamento dos eletrodos nos microcanais e do potencial elétrico aplicado no eletrodo de trabalho.....	118
6.4	Efeito na relação sinal/ruído ( <i>smoothing effect</i> ).....	124
6.5	Desempenho de separação e limites de detecção.....	127
6.6	Detecção e identificação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).....	137
6.7	Monitoramento de nitrito em amostras perfusadas de sangue de ovelhas e ratos.....	139
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	142
	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	144
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	145

## 1 INTRODUÇÃO

Uma das grandes necessidades, se não a principal, nos dias atuais e nas diversas áreas, sendo mais pontual em exatas e da terra, é a identificação e a quantificação de compósitos em quantidades cada vez menores.

Se tomarmos como exemplo a identificação e quantificação de substâncias que estão intrinsecamente ligadas a formação e evolução do câncer, como peroxinitrito (BRAJTER-TOTH; CHAMBERS, 2002; GUNASEKARA, et al., 2011), ou se diagnosticado em quantidades ínfimas e/ou no início da formação implicará em tratamentos mais eficazes e menos invasivos; ou se conseguirmos identificar e quantificar metais potencialmente tóxicos (BERGAMINI et al., 2006) ou toxinas no monitoramento de indústrias, nos diversos ramos, teremos como evitar desastres ambientais, ou se no início, fazer correções mais rápidas e eficazes.

Assim, a Química, sobre tudo a Analítica, vem incessantemente desenvolvendo métodos e técnicas as quais venham contribuir para identificar e quantificar quantidades, cada vez mais ínfimas, de analitos nos mais diversos tipos de matrizes. E para isso dispõe-se de várias técnicas, tais como: Espectrometria de Absorção Atômica, Espectrometria de Fluorescência Atômica, Espectrometria de Emissão Atômica, Espectrometria de Massa Atômica, Espectrometria Atômica de Raio X, Espectrometria de Absorção Molecular no UV-Vis, Espectrometria de Luminescência Molecular, Espectrometria de Infravermelho, Espectroscopia Raman, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massas, Microscopia, Cromatografia Gasosa e Líquida, Eletroforese Capilar e finalizando com as técnicas Eletroanalíticas (SKOOG, 1981; CHRISTIAN, 1986; SKOOG et al., 1998; BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C.; BRETT, A., 2001; BOCKRIS, 2002; ALEIXO, 2003; LANDERS, 2006; PAVIA et al., 2010; COLLINS et al., 2011).

Em relação as técnicas supracitadas, as eletroanalíticas, sobretudo aquelas em que a varredura de potenciais gera sinais analíticos na forma de correntes elétrica, têm protagonizado nas diversas aplicações e áreas em determinações de espécies químicas (CRESPILHO; REZENDE, 2004). As técnicas eletroanalíticas se

destacam, consideravelmente, por apresentar relevante robustez no que se refere a sensibilidade e reprodutibilidade de sinais.

Dentre as técnicas eletroanalíticas podemos citar a voltametria de redissolução anódica e catódica, voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, onde essa última tem significativa importância por caracterizar espécies eletroativas com grande versatilidade (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C.; BRETT, A., 2001; BOCKRIS, 2002).

Os problemas encontrados na realização das detecções, como a eletroquímica, são as propriedades específicas de cada matriz, se existem interferentes e em caso positivo se existem agentes mascarantes eficazes, se a amostra precisa de derivatização, se a espécie possui tempo de meia-vida favorável a metodologia e detecção propostas, como por exemplo detectar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, se os analitos a serem determinados tem comportamento físico-químico semelhantes em relação a detecção, em como introduzir as amostras na zona de detecção. Assim, fica perceptível que não é tão simples a escolha ou o desenvolvimento de metodologias analíticas, principalmente para determinações de espécies que possuem elevado índice de interferências e curto tempo de meia-vida.

As análises de maior sucesso em laboratórios de pesquisa ou de rotina envolvem sistemas que proporcionam em uma única etapa a amostragem, o tratamento de amostras, a separação dos analitos, se necessário, e a análise da espécie de interesse, e projetado para contornar as possíveis complexidades da amostra e a sua matriz correlata. No entanto, em geral, estes métodos requerem frequentemente um intenso e longo tempo de trabalho. E para superar esta barreira são necessários processos de análises automatizados, aumentar a sua rapidez de amostragem, melhorar a precisão, sensibilidade e reprodutibilidade. Quanto aos métodos de separação, entre o final da década de 70 e no início de 80, foi sugerido a eletroforese capilar de zona de alta eficiência como uma técnica de separação de solutos ionizados (HARRISON et al., 1992).

Eletroforese capilar (EC) é uma técnica de separação altamente poderosa e eficiente. Isto faz com que se torne o principal método de separação escolhido para

ser utilizado em sistemas de análise baseados em microchip, devido à facilidade de injeção e de separação através da aplicação de alta-voltagem em sistemas de microcanais sem complicações nas etapas analíticas (LACHER et al., 2004; CHEN; HAHN, 2007).

Pesquisas mostram que o primeiro sistema que interfaceou a detecção eletroquímica com eletroforese capilar de zona foi proposto em 1987 por Wallingford e Ewing (WALLINGFORD; EWING, 1987), e para a primeira miniaturização propuseram um dispositivo, o qual foi um sistema baseado nos princípios da cromatografia gasosa, em 1979 (TERRY et al., 1979).

A atual tendência é, além da miniaturização dos sistemas de EC convencionais e da diminuição do caminho de separação, a integração da detecção amperométrica (FISCHER et al., 2005; GHANIM; ABDULLAH, 2011). A grande vantagem dos detectores amperométricos integrados aos microssistemas eletroforéticos (MSE) está no fato de as mesmas técnicas litográficas poderem ser usadas para a fabricação dos microchips, assim como a produção dos eletrodos.

Dentre as técnicas usadas para detecção eletroquímica integradas aos MSE é a amperométrica a mais largamente utilizada por possuir a vantagem de alta sensibilidade quando comparado à condutometria e potenciometria (HARRISON et al., 1993; VÁZQUEZ et al., 2010).

Um foco bastante discutido inerente ao emprego da detecção eletroquímica integrado à MSE é a influência do potencial no canal de separação (LACHER et al., 2004). Assim, objetivando superar essa dificuldade têm sido publicadas várias pesquisas metodológicas de como isolar o detector amperométrico das interferências causadas pela alta-voltagem no canal de separação, tais como, as configurações de alinhamento de eletrodos: final-do-canal (do inglês *end-channel*), no-canal (do inglês *in-channel*) e fora-do-canal (do inglês *off-channel*) (FISCHER et al., 2009; GUNASEKARA. et al., 2011).

Dessas configurações o mais largamente usado é o final-do-canal, o qual o eletrodo de trabalho é posicionado dezenas de microns da saída do canal de separação. A configuração de eletrodos de trabalho no final-do-canal com detecção

amperométrica proporciona uma montagem muito fácil e um conveniente método para eliminar problemas associados com detecção da queda de alta-voltagem através do canal (HUANG et al., 1991; COLTRO et al., 2004; HULVEY et al., 2010), em adição à permissão suficiente do desacoplamento da voltagem de separação do eletrodo de trabalho e do detector (LACHER et al., 2004).

A importância marcante inerente ao microchip é o *design*, pois isso está diretamente relacionado com as etapas analíticas que se pretendem trabalhar ou serem integrados. É o *design* e a função que definem a sequência de ações que ocorrem no dispositivo, em que o "T" de injeção e do microcanal de separação é o mais comum dos *designs* apresentados em pesquisas publicadas. No entanto, se for necessário realizar algumas reações antes ou após a coluna analítica, como por exemplo, derivatização ou reações bioanalíticas (POZO-AYUSO et al., 2008; MARK et al., 2012), faz-se necessário a utilização de esquemas restritos, tais como adicionar reservatórios para realização de reações enzimáticas em pós colunas (POZO-AYUSO et al., 2008), múltiplos canais para otimizar a performance de análises genéticas, imunoenaios e separação de interesse (POZO-AYUSO et al., 2008; GHANIM; ABDULLAH, 2011; MARK et al. 2012).

Um estudo interessante foi feito tendo em vista a fabricação e avaliação entre configurações de canais único e duplo (POZO-AYUSO et al., 2008; CASTAÑO-ÁLVAREZ et al., 2009), o qual comprovou que uma configuração com duplo-canal e duplo-eletrodo de ouro posicionados um em cada canal tem sensibilidade, reprodutibilidade e separações simultâneas satisfatórias e promissoras.

Nesta tese, foi proposto a microfabricação e avaliação de dois sistemas microfluídicos. Um deles feito de PMMA com canal simples e uma base para fixar o microchip feitos do mesmo material objetivando diminuir o custo do microprocessamento usando laser de CO<sub>2</sub>. E pode-se observar que a microfabricação desse sistema apresentou boa reprodutibilidade e repetitividade de eventos e de fácil confecção.

No outro sistema foi feito um microchip híbrido de PDMS/vidro com duplo-canal em paralelo, sendo um deles usado para a separação e o outro como referência, integrado com um sistema de detecção eletroquímica, usando um

potenciostato eletricamente isolado, com dois eletrodos de platina, um em cada canal, sendo aplicado um potencial no eletrodo de trabalho posicionado no canal de separação e o outro eletrodo foi usado como pseudo-referência.

O sistema foi usado para avaliar a minimização da interferência da alta-voltagem durante a separação quando integrados o MSE com um potenciostato eletricamente isolado, assim como o efeito da relação sinal/ruído através do alinhamento dos eletrodos nos canais. Isto permitiu o desenvolvimento de uma ferramenta muito eficiente para a separação e determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. E para avaliar sensibilidade, sensibilidade, robustez, reprodutibilidade e repetitividade os resultados adquiridos com a metodologia proposta foram comparados com outras metodologias já publicadas na literatura.

A técnica escolhida para a etapa experimental deste trabalho foi um microsistemas com aplicações eletroforéticas integrado a detecção eletroquímica (MSE-DEQ), por apresentar diversas vantagens, tais como: simplicidade de instrumentação; custo relativamente baixo; economia no consumo de amostras e reagentes (~ 100 µL por amostragem); análises rápidas (~ 1 min por amostragem) e práticas devido à injeção das amostras automatizadas por programas de computador já pré-estabelecidos; possibilidade de tratamento de amostras em linha; dispersão controlada da amostra injetada; possibilitar separação de espécies; técnica de elevada versatilidade; alta reprodutibilidade de eventos; elevada repetitividade de sinal; excelente sensibilidade (podendo chegar a ~ fM, dependendo das espécies, do potenciostato e da metodologia aplicada) e precisão; detecção de espécies instáveis, como por exemplo peroxinitrito.

Todas essas vantagens fazem com que esta técnica se torne bastante atraente com crescimento exponencial, tendo registros em revistas e jornais da área sobretudo no âmbito internacional, como *Analytical Chemistry* e *Lab-on-Chip*, uma grande quantidade e diversidade de artigos escritos sobre análise baseados em microfabricação associado à eletroforese integrado a detectores eletroquímicos principalmente nas áreas de poluição, meio ambiente, na agricultura e sobretudo bioanálises, fazendo com que haja uma maior utilização nos Centros de Pesquisas e nas Universidades.



Para alcançar os propósitos desta tese foram otimizados os parâmetros experimentais, levando em consideração a separação eletroforética das espécies através da aplicação de alta-voltagem e quantificação das mesma usando detecção eletroquímica. Em seguida, foram definidos os parâmetros analíticos do procedimento proposto, e sua eficácia foi avaliada através dos resultados obtidos nas análises das amostras de perfusato de sangue de ovelhas e ratos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Construir e aplicar um microssistemas eletroforético de PMMA com detecção amperométrica.
- Desenvolver e avaliar um microssistema eletroforético híbrido de PDMS/vidro com uma configuração de duplo-canal em paralelo e duplo-eletrodo com distância fixa entre eles e posicionado um em cada canal, para a separação, identificação e monitoramento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (RNS).

### 2.2 Específicos

- ✓ Fazer o *design* do microssistema eletroforético de PMMA, para a realização da etapa de microfabricação.
- ✓ Fabricar o microssistema eletroforético com os microcanais e o suporte usando uma máquina de gravação a laser de CO<sub>2</sub> em colaboração com o Grupo de Eletroforese e Microdispositivos (GEM) da Universidade de Campinas, Unicamp; e as máscaras de PDMS e de vidro, assim como, dos eletrodos de pasta de carbono e de platina.
- ✓ Construir e integrar os microchips híbrido PDMS/vidro e de PMMA com detector amperométrico.
- ✓ Fazer a otimização da selagem do chip com dibutil ftalato, observando obstrução dos microcanais.
- ✓ Otimizar os parâmetros das condições experimentais do procedimento proposto (usando microssistema eletroforético híbrido PDMS/vidro com detecção eletroquímica) para obtenção de respostas eletroquímicas satisfatórias, tais como, concentração dos reagentes, a configuração do posicionamento dos eletrodos nos canais para avaliar o sinal analítico ausente de interferências e a relação sinal/ruído, o potencial no eletrodo de trabalho, a potencial de separação para procedimento eletroforético, a performance da resolução das espécies analisadas.

- ✓ Definir os parâmetros analíticos do procedimento desenvolvido (relação sinal/ruído, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, faixa de trabalho, frequência de amostragem) a partir das curvas de referência.
- ✓ Testar e aplicar a eficiência do microchip de PMMA com suporte integrado determinando paracetamol e serotonina.
- ✓ Comparar os resultados adquiridos com a metodologia proposta com outras metodologias publicadas na literatura.
- ✓ Empregar o sistema proposto (PDMS/vidro com detecção eletroquímica) em amostras de perfusato de sangue de ovelhas e ratos.

### **3 MICROSSISTEMAS DE ANÁLISES QUÍMICAS ASSOCIADOS A MÉTODOS ELETROANALÍTICOS**

A tendência mundial à miniaturização não é uma busca nova ou recente, na verdade o crescimento e consolidação vem sendo almejada a séculos pela comunidade científica. Em diversas ramificações da ciência é comum, e alguns casos indispensáveis, o uso de microdispositivos ou dispositivos miniaturizados. Na química, em destaque a analítica, não seria diferente das outras áreas do conhecimento que está enveredando, também, no mundo das miniaturizações (COLTRO, 2007).

O trabalho pioneiro de Manz e Herrison (MANZ, 1992; HARRISON, 1992) com chips microfluídicos são de considerável interesse devido alto grau de integração, portabilidade, consumo mínimo de reagentes, alta performance e rapidez e que seu desenvolvimento seriam promissores para análises bioquímicas e farmacêuticas, diagnósticos clínico, monitoramento ambiental, investigações forenses, dentre outras (DUAN, 2010).

Desde a sua introdução em 1992 por Manz e colaboradores, (MANZ, 1992; HARRISON, 1992) microssistemas eletroforéticas (MSE) tem atraído a atenção da comunidade para as suas separações rápidas e de alta resolução, a integração de várias etapas de análise, baixo consumo de amostra e reagentes, processamento paralelo, entre outras funcionalidade interessante (WEST 2008; ARORA, 2010). Embora o ambiente de separação pode ser sensivelmente reduzido pelo uso de microcanais, a integração de sistemas de detecção não é tão simples. Desta forma, a detecção eletroquímica (DEQ), e, em particular, amperométrica e voltamétrica, atende aos requisitos de redução de ambientes celulares de detecção e integração com os protocolos de microfabricação. Há vários exemplos de aplicações EM-DEQ sucedidas, que podem ser verificadas em comentários já publicados (WEST, 2008; GHANIM; ABDULLAH, 2011 ).

### 3.1 Miniaturização de dispositivos

Desde Richard Feynman, em 1959, a humanidade testemunhou o desenvolvimento de tecnologia mais rápida de sua história: a miniaturização de dispositivos eletrônicos. Microeletrônica foi a mais importante tecnologia desenvolvida do século passado. Com circuitos integrados e progresso no processamento de informações a microeletrônica tem mudado a nossa forma de trabalhar, descobrir e inventar (NGUYEN; WERELEY, 2006).

A busca pela miniaturização de dispositivos eletrônicos a partir da década de 60, foi devido às necessidades de inovações de forma revolucionária na eletrônica e na informática e do progresso da tecnologia moderna. Essa revolução inovadora tornou-se notória quando observamos a miniaturização de rádios, televisores, gravadores, telefones, disco rígido e microcomputadores (COLTRO, 2007).

A química analítica se preocupou com a miniaturização na tentativa de melhorar e otimizar seus sistemas para, conseqüentemente, aumentar o desempenho analítico. Com tudo, as exigências de análise foram exigindo novas escalas, saindo da perspectiva do macro para o micro, oferecendo como contra partida vantagens como redução de volume de reagentes e amostra, passando para nanolitros e até mesmo picolitros, baixo custo de fabricação e redução de frequência analítica (LIVAK-DAHL; SINN; BURNS, 2011).

Em 1979, tivemos a primeira miniaturização na instrumentação analítica, que foi de um sistema cromatográfico em fase gasosa. Esse trabalho foi feito por Stephen C. Terry e colaboradores (TERRY et al., 1979), com apoio do Instituto Nacional para Segurança Profissional e Saúde e pela NASA e Laboratórios Eletrônicos de Stanford da Universidade de Stanford, Stanford-Califórnia.

Esse trabalho relatou a miniaturização de um sistema de análises à gás baseado nos princípios da cromatografia gasosa. A maioria dos componentes foi fabricada em silício usando fotolitografia e técnicas de cauterização química, que permitiu reduções de tamanhos de quase três ordens de magnitude, se comparado com as instrumentações convencionais de laboratórios. O microcromatógrafo foi construído em lâmina circular de silício com raio de 2,5 cm; onde, foi construída uma

válvula de injeção e uma coluna de separação de 1,5 m de comprimento no substrato (TERRY et al., 1979).

Eles realizaram a detecção utilizando um detector de condutividade térmica, que foi construído em outro substrato, e posteriormente prensado mecanicamente integrando-o ao substrato que continha a coluna de separação. Isso promoveu grandes repercussões e impactos, principalmente por realizar separações com relativa rapidez, porém, não foi aceito imediatamente pela comunidade científica, consequência da falta de habilidade e experiência tecnológica em métodos de separação. Com isso, houve limitação no desenvolvimento de pesquisas relacionadas à miniaturização, sendo direcionado ao desenvolvimento de sensores, microbombas e microválvulas, mais precisamente na década de 80 (COLTRO et al., 2007).

A década de 90 foi marcada pela retomada do desenvolvimento de pesquisas relacionadas com microssistemas de análises por Manz e colaboradores (COLTRO et al., 2007), retomada esta que se deve a apresentação de um microssistema cromatográfico em fase líquida fabricado em substrato de silício de dimensões, fantásticas, de 5 x 5 cm, contendo uma coluna tubular aberta de 6  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$  x 15 cm, a qual tinha uma eficiência de separação teórica de 8000 e 25000 pratos em 1 e 5 minutos, respectivamente. O volume total da coluna era de 1,5 nanolitros, com um detector condutimétrico com volume de cela de 1,2 picolitros, e conexões externas para uma bomba de cromatografia líquida e válvulas para aplicação de pressão (MANZ et al., 1990).

Paralelamente à apresentação desse microdispositivo foi proposto, também por Manz e colaboradores, o conceito de microssistemas para análises totais, representado pela sigla  $\mu\text{TAS}$ . O desenvolvimento do  $\mu\text{TAS}$  foi de grande relevância, pelo fato de permitir integrar várias etapas analíticas, tais como, introdução da amostra, pré-tratamento da amostra, reações químicas, separação analítica e detecção em um único sistema, e, devido a essa configuração os  $\mu\text{TAS}$  foram denominados “lab-on-chip” (COLTRO et al., 2007).

A área de sistemas de micro análises total (lab-on-chip), miniaturização ou sistemas microfluídica de análises, é um campo que está rapidamente se desenvolvendo, devido sua larga aplicação nas ciências naturais e da vida.

Sistemas microfluídicos, fabricados através da utilização de biomateriais, tem recebido uma enorme atenção nos últimos anos (DITTRICH et al., 2006). Pode-se citar como exemplo a fabricação de todo um sistema com um hidrogel versátil (CABODI et al., 2005), a produção de canais de gelatina reticulada com a enzima transflutaminase que ocorre naturalmente adequados para a cultura de células aderentes e análise (PAGUIRIGAN; BEEBE, 2006), o protótipo desenvolvimento de um dispositivo 3D feito inteiramente a partir de um termoplástico biodegradável (KING et al, 2004), a fabricação de hidrogéis de gradiente utilizando um processo de fotopolimerização e microfluídicos (BURDICK et al., 2004), dentre outras inovações.

Os  $\mu$ TAS podem ser fabricados através de tecnologia alternativa e com diferentes tipos de substrato planares, tecnologia esta que usa uma fonte energética para fazer a transferência de imagem dos microcanais para o substrato. Essa transferência é feita em um material denominado como fotorresiste, que é um polímero sensível à radiação. A radiação provoca uma interação entre o substrato e o feixe incidente, devido absorção de luz ou espalhamento inelástico das partículas que afetam a estrutura química do fotorresiste alterando a solubilidade do substrato, e com isso permite a revelação da imagem fotogravada (LANDERS, 2006; COLTRO et al., 2007). Essa tecnologia convencional é a mais utilizada e recebe a denominação de fotolitografia, que consiste em transferir estruturas micrométricas, da ordem de 10 a 100  $\mu$ m, para um substrato sólido, geralmente silício, com o auxílio de radiação UV ou raios-X (NGUYEN; WERELEY, 2006).

A maioria dos chips microfluídicos reportado no início foram fabricados usando materiais de vidro ou silício a partir de técnicas fotolitográficas. Porém, a aplicação deles é relativamente limitada por causa do alto custo e procedimento de fabricação complicada, outro fator é a limitação na modificação geométrica dos canais do chip. Na tentativa de sobressair dessas desvantagens, pesquisadores passaram a desenvolver chips de materiais diferenciados dos já citados.

Um material que tem um custo muito menor que os já supracitados é o polímero poli(metil metacrilato) (PMMA). Encontra-se, também, na literatura trabalhos com poli(dimetil siloxano) (PDMS), poli(carbonato) (PC), poli(éster), poli(estireno), poli(etileno tereftalato glicol) e poliolefinas (DOLNIK et al., 2000; Becker; Gartner, 2000).

O PMMA tem sido um dos polímeros mais comumente utilizados para microfluidos. Ele é particularmente útil para chips microfluídicos devido as características das propriedades químicas atraentes, baixo preço, excelente transparência óptica, facilidade de fabricação, biocompatibilidade e excelentes propriedades elétricas e mecânicas (BECKER; LOCASCIO, 2002).

O PMMA pode decompor-se em metacrilato de metilo (MMA), a uma temperatura elevada e pode ser reutilizada, tornando-se um material ideal para a preparação de "microchips verdes", ou seja, microchips que não agridem o ambiente. Além disso, suas propriedades químicas e físicas únicas oferecem uma grande promessa para a fabricação de microdispositivos com úteis funcionalidades (DUAN et al., 2010).

Duan e colaboradores fizeram uma pesquisa sobre o uso de PMMA, fazendo a confecção, selagem e aplicação. Eles optaram por esse polímero porque possui propriedades, tais como, baixo custo, excelente transparência óptica, que facilita a observação do sistema, fácil fabricação, biocompatibilidade e excelentes propriedades mecânica e elétrica. Um importante foco dado por eles foi a forma com que fizeram a selagem do chip, utilizando o dibutil ftalato (DBP) a uma temperatura de aproximadamente 90°C por 10 minutos, o que é considerado muito menor se comparada com a selagem dos chips de vidro (DUAN et al., 2010).

### **3.2 Conceitos básicos de separações por eletromigração em capilares**

Os avanços tecnológicos nas últimas décadas proporcionaram um grande salto nas ciências, sobre tudo as que envolvem separações analíticas. A década de 50 foi marcada pela introdução da cromatografia em fase gasosa; na década de 70



foi o desenvolvimento da cromatografia líquida e na década de 80 a implementação da terceira técnica de instrumentação de separação a eletroforese capilar (TAVARES, 1997).

A eletroforese capilar foi desenvolvida pelo sueco Arne Tiselius em 1930, através do método da fronteira móvel. O trabalho desenvolvido apresentou a separação parcial de algumas proteínas constituintes do soro sanguíneo, e através disto lhe foi concedido o prêmio Nobel em 1948. A partir desse feito, a eletroforese ocupou um excelente destaque entre as metodologias empregadas para biomoléculas (TAVARES, 1996; SKOOG, D. A. et al., 1998).

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferencial de espécies iônicas, neutras ou ionizáveis com base no seu movimento por meio de um fluido sob a influência de um campo elétrico aplicado. Se dois solutos têm mobilidades eletroforéticas diferentes, a separação geralmente ocorre. A separação é realizada em um meio tal como uma placa de gel semi-sólido. Géis fornecem suporte físico e estabilidade mecânica para o sistema tampão fluídico. Em alguns modos de eletroforese, o gel participa no mecanismo de separação, serve como uma peneira molecular. Meios como papel ou acetato de celulose são suportes alternativos. Estes meios são menos inerte do que géis, pois eles contêm grupos superficiais carregadas que podem interagir com a amostra ou o tampão fluídico (TAVARES, 1996; WEINBERGER, 2000).

As técnicas que empregam eletromigração em capilares têm se mostrado altamente eficientes e por isso vem crescendo e tornando populares em química analítica. Elas são aplicadas especialmente na bioanálise, na separação de íons orgânicos e inorgânicos pequenos, fármacos, explosivos, corantes, polímeros, proteínas e peptídeos, DNA e RNA, células, partículas, dentre outros (SILVA et al., 2007).

A eletroforese capilar teve um grande avanço e aceitação pela comunidade científica e isso se deve a algumas vantagens, tais como, simplicidade na instrumentação, eficiências de separação extremamente altas, tempo de análise relativamente curto, pequenas quantidades de amostra, reduzida quantidade de amostras, pelo fato do diâmetro interno dos capilares serem na ordem de

micrometros e comprimento na ordem de centímetros e conseqüentemente, baixo custo de análise e por sobressair as outras técnicas de separação devido à possibilidade de vários modos de separação efetuados em uma única coluna capilar e da diversidade dos compostos passíveis de análise em cada modo. Além disso, instrumentos comerciais automatizados permitem operação confiável em análises de rotina (TAVARES, 1997; WEINBERGER, 2000; SILVA, et al., 2007).

As separações realizadas a partir de técnicas de eletromigração em capilar utilizam capilares de diâmetro interno bastante reduzido e empregam campos elétricos elevados, que são baseados em diferentes princípios de separação as quais, em casos particulares, podem se sobrepor. Essas técnicas de separação incluem as eletroforéticas capilares e cromatográficas capilares que utilizam campo elétrico para bombeamento dos fluidos (TAVARES, 1997; WEINBERGER, 2000).

A instrumentação para a eletroforese capilar é suficientemente simples, onde um capilar de sílica fundida preenchido com um tampão, possuindo um diâmetro interno entre 10 e 100  $\mu\text{m}$  e comprimento de 40 a 100 cm, é posicionado entre dois reservatórios de tampão que também contêm eletrodos de platina. A amostra é introduzida em uma das extremidades, a detecção na outra e um potencial de 5 a 30 kV em corrente contínua é aplicado entre os eletrodos (SKOOG et al., 1998; WEINBERGER, 2000).

A amostra é introduzida por injeção sob pressão, na qual uma extremidade do capilar é inserida em um recipiente contendo a amostra e elevado por curto intervalo de tempo acima do nível do capilar para forçar a confluência da amostra para dentro do tubo. Outra forma de conseguir esse propósito é aplicar vácuo no tubo, pela extremidade do detector, ou através de fluxo eletrosmótico (SKOOG, et al., 1998; WEINBERGER, 2000; COSTA, 2008; MANOEL, 2011).

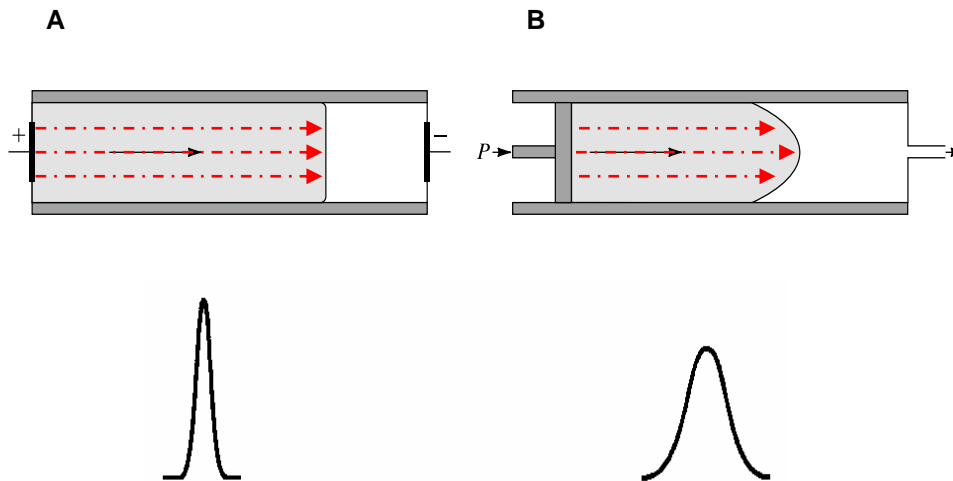
Outra importante característica da eletroforese capilar é a presença do fluxo eletrosmótico (EOF - electroosmotic flow), que é o fluxo em volume dividido pelo campo elétrico aplicado sobre o plug total ou capilar. Quando uma alta voltagem é aplicada por meio de um capilar de sílica fundida contendo uma solução tampão, um fluxo eletrosmótico é geralmente produzido, causando uma migração do solvente em direção ao cátodo em um intervalo de tempo, conhecido como tempo de migração

eletrosmótica ( $t_{eo}$ ) que é o tempo requerido para que o líquido percorra o caminho (comprimento) efetivo do capilar ( $L_{ef}$ ) que é comumente medido como o tempo de “migração” de um marcador neutro, conhecido como marcador do fluxo eletrosmótico e cuja mobilidade é assumida desprezível com relação ao analito, devido à eletrosmose que é definida como o movimento de um líquido através de uma membrana ou capilar como consequência da aplicação de um campo elétrico, onde a velocidade linear do fluxo dividida pelo campo elétrico aplicado é chamada de mobilidade eletrosmótica ( $\mu_{eo}$ ). O tempo de migração eletrosmótica não pode ser confundida com o tempo de migração ( $t_m$ ) de uma espécie, o qual é o tempo requerido para que a espécie química percorra o caminho efetivo do capilar que é a distância entre os pontos de injeção e detecção (SILVA, et al., 2007).

A causa do fluxo eletrosmótico é a dupla camada elétrica que se desenvolve na interface sílica/solução onde ocorre ionização dos grupos silanóis (Si–OH) da sílica presente no interior dos capilares quando em contato com o eletrólito de corrida com valor de pH maior que 3. Na superfície do capilar estão dispostos grupamentos dissociados (grupos silanoatos) que conferem carga negativa à parede. Estes grupos silanoatos atraem os prótons  $H^+$  provenientes da solução de corrida formando uma camada interna de cátions (camada fixa) próxima à parede do capilar. Esta camada não é suficiente para neutralizar todas as cargas negativas da parede do capilar e então se forma uma segunda camada de prótons (camada móvel) (SKOOG, et al., 1998; WEINBERGER, 2000; MANOEL, 2011).

Os cátions na camada difusa externa à dupla camada são atraídos para o cátodo, ou eletrodo negativo, e uma vez que estão solvatados arrastam o solvente com eles. A eletrosmose leva a um fluxo líquido da solução com um perfil radial (plano) de sua velocidade através do tubo porque o fluxo origina-se em suas paredes. Como apresentado na Figura 1 o perfil essencialmente radial permite que as moléculas dentro do capilar se movimentem com velocidades muito próximas, independentes de sua posição radial e, conseqüentemente, o fluxo eletrosmótico permite uma maior eficiência na separação dos picos (resolução) e não contribui significativamente para o alargamento de banda, como o fluxo gerado por pressão o faz em cromatografia líquida (TAVARES, 1996; TAVARES, 1997; SKOOG, et al., 1998; WEINBERGER, 2000; SILVA, et al., 2007; MANOEL, 2011).

**Figura 1 – Perfis de fluxo para líquidos sob (A) fluxo eletrosmótico (linear ou radial) e seu respectivo sinal (pico) e (B) fluxo induzido por diferença de pressão (laminar) e seus respectivos sinais (picos).**



Fonte: modificado de SKOOG et al., 1998; TAVARES, 1996.

Um fator significativamente relevante é a vazão do fluxo eletrosmótico. Ele se apresenta geralmente maior que a velocidade de migração eletroforética ( $v_{ep}$ ) dos íons individuais tornando-se efetivamente a bomba de fase móvel da eletroforese capilar de zona. Mesmo que as espécies migrem de acordo com as suas cargas positivas, negativas ou neutras, dentro do capilar, a vazão eletrosmótica é normalmente suficiente para arrastar todas as espécies para a mesma extremidade do capilar, de forma que todas possam ser detectadas quando elas passam por um ponto comum (SKOOG et al., 1998).

A velocidade de migração  $v$ , conforme Equação (1), de um íon em um campo elétrico é uma grandeza diretamente proporcional ao produto da mobilidade eletroforética ( $\mu_{ep}$ ) pelo campo elétrico ( $E$ ) em volts por centímetro aplicado na solução presente no capilar.

$$\mathbf{v} = \mu_{ef}\mathbf{E} = \mu_{ef}\frac{V}{L} \quad \text{Equação (1)}$$

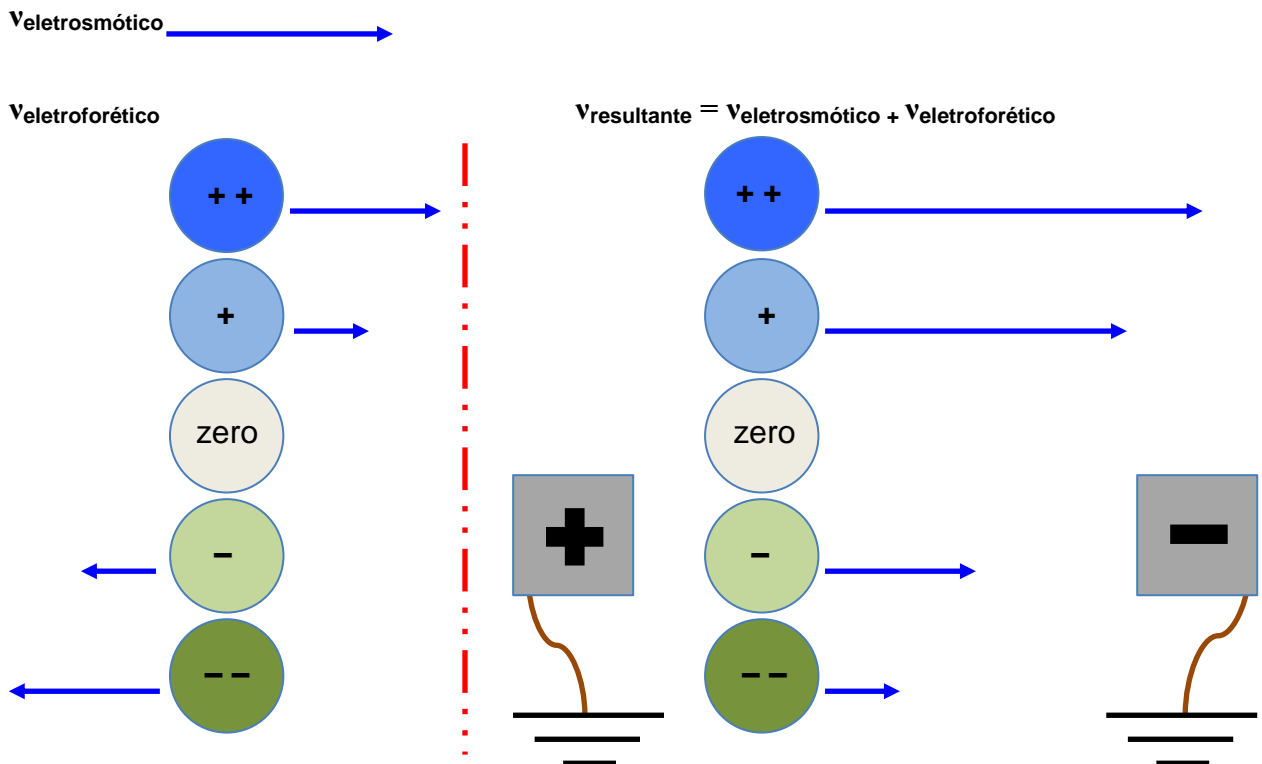
onde,  $V$  é a voltagem aplicada e  $L$  o comprimento do tubo entre os dois eletrodos (SKOOG et al., 1998; WEINBERGER, 2000).

A velocidade resultante do analito ( $v_{\text{resultante}}$ ), conforme Equação (2), é a soma das velocidades eletroforética ( $v_{\text{ep}}$ ) e eletrosmótica ( $v_{\text{eo}}$ ).

$$V_{\text{resultante}} = V_{\text{eletrosmótico}} + V_{\text{eletroforético}} \quad \text{Equação (2)}$$

Esta quantidade pode ser medida experimentalmente dividindo-se o comprimento efetivo do capilar pelo tempo de migração ( $L_{\text{ef}} / t_m$ ). Dependendo dos sinais e magnitudes relativas destas velocidades, a velocidade resultante de um analito pode possuir o mesmo sentido da velocidade eletrosmótica ou o sentido contrário. Deve-se considerar que a velocidade resultante é a velocidade do íon medida como o seu deslocamento em relação à parede do capilar dividida pelo tempo. E o termo “velocidade aparente” também denomina a velocidade resultante ou total do analito (SILVA et al., 2007).

**Figura 2 – Velocidades na presença de um fluxo eletrosmótico. Os comprimentos das setas próximas aos íons indicam a grandeza de suas velocidades de migração ( $v$ ), a seta aponta para a direção de movimentação. O eletrodo negativo estaria à direita e o eletrodo positivo à esquerda dessa solução.**



Fonte: modificado de SKOOG et al., 1998.

O campo elétrico é a força que atua sobre a partícula carregada dividida pela sua carga elétrica. Considerando as técnicas de eletromigração capilar, esta força é tomada como a componente axial do campo, que é a diferença de potencial aplicada (V) nas extremidades do capilar dividida pelo comprimento total do capilar. Deve-se considerar também o campo elétrico radial proveniente da dupla camada elétrica formada nas proximidades da parede do capilar, a qual está envolvida no fenômeno da eletroosmose, e o comprimento total do capilar o qual é tipicamente maior que o comprimento efetivo (SILVA et al., 2007).

A mobilidade eletroforética ( $\mu$ ), conforme Equação (3), é diretamente proporcional à carga do íon e inversamente proporcional à força de retardamento por fricção sobre o íon, onde essa força é determinada pelo tamanho e formato do íon e pela viscosidade do meio, ou seja, é a taxa de migração observada,  $v$ , ou a velocidade eletroforética,  $v_{ep}$ , dividida pela magnitude do campo elétrico aplicado,  $E$ , em um dado meio. Essas mobilidades podem ser expressas com sinal negativo, pois a migração de solutos ou partículas pode ocorrer no sentido contrário àquele do campo elétrico, o qual é tomado como referência, e apenas valores aparentes podem ser determinados em um meio de suporte sólido (SKOOG et al., 1998; WEINBERGER, 2000; SILVA et al., 2007). Logo, a mobilidade eletroforética de um íon é dada por:

$$\mu_{ep} = \frac{ze}{f} \quad \text{Equação (3)}$$

onde,  $f$  é o coeficiente de atrito,  $z$  é o número de cargas elementares do íon e  $e$  é a carga elementar. O coeficiente de atrito aumenta com o tamanho do íon e com a viscosidade do eletrólito suporte. Para íons esféricos rígidos, de raio  $r$ , movendo-se em um meio de viscosidade  $\eta$ , o coeficiente de atrito pode ser estimado utilizando-se a Lei de Stokes:

$$f = 6\pi\eta r \quad \text{Equação (4)}$$

Os coeficientes de atrito para partículas que possuem outros formatos, como por exemplo o elipsoides, podem ser estimados, no entanto utiliza-se equações mais complexas (SILVA et al., 2007).

Outro fator indiscutivelmente importante é a mobilidade eletroforética efetiva ( $\mu_{ef}$ ) de uma espécie química. Para soluções de eletrólitos compostos de um ácido ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada que possui mobilidade zero, e a base ou ácido conjugado, cada qual com um valor particular de mobilidade. Então, da mesma maneira que os íons simples são caracterizados por um dado valor mobilidade iônica, o conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. Ela pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius, na qual qualquer substância presente em solução em diferentes formas, relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base rápido, migrará em um campo elétrico com um soluto único, possuindo uma certa mobilidade efetiva, assim, a mobilidade efetiva é dada pela somatória das mobilidades eletroforéticas de cada espécie individual ( $\mu_j$ ) de todas as  $n$  espécies relacionadas entre si por equilíbrios químicos, multiplicadas pela fração molar ou função de distribuição destas espécies ( $\alpha_j$ ), a qual é dada pela razão entre o número da carga  $z$  e o raio  $r$  do íon, conforme a Equação (5) (TAVARES, 1996; SILVA et al., 2007):

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \mu_j \quad \text{Equação (5)}$$

As funções de distribuição dependem da magnitude das constantes de dissociação do soluto, e determinam a predominância relativa das várias espécies num intervalo de pH. Logo, a Equação (5) sugere uma dependência indireta entre a mobilidade efetiva e o pH do meio (TAVARES, 1996), conseqüentemente, é de suma importância o controle do pH da solução ou eletrólito utilizado nos processos eletroforéticos para separação de compostos com caráter ácido-base, pois influencia diretamente no valor da mobilidade efetiva do íon, referente ao produto das mobilidades eletroforéticas das espécies em equilíbrio e a distribuição das concentrações relativas de cada espécie no pH considerado (TAVARES, 1997)

Assim sendo, a escolha de uma solução tampão adequada tem implicações diretas na otimização da separação. Sabendo-se da suscetibilidade do fluxo eletrosmótico à variações de pH faz-se necessário que o tampão apresente alta capacidade tamponante, baixo valor de absorvância no comprimento de onda selecionado para as análises com detecção espectrofotométrica, e baixa mobilidade,

para minimizar a geração de calor por efeito Joule (TAVARES, 1997; COSTA, 2008; MANOEL, 2011).

Pode-se afirmar também que a escolha do tampão está concatenado a considerações sobre a forma da banda, que via de regra, tampões contendo íons com mobilidade semelhante à do soluto previnem distorções no perfil da banda e minimizam o seu alargamento. E outro fator de relevante importância refere-se à mobilidade do co-íon, que é o composto do sistema tamponante que apresenta a mesma carga dos compostos analisados. Idealmente ele deve apresentar mobilidade igual ou mais próxima possível do analito, reduzindo conseqüentemente o alargamento e distorção no perfil do pico eletroforético (TAVARES, 1997; MANOEL, 2011).

Um problema que pode ocorrer em eletroforese capilar, quanto a detecção, está relacionado ao comportamento da mobilidade de alguma espécie iônicas relacionados ao tipo de potencial aplicado. Supondo uma espécie iônica com determinada carga, a qual se opõe ao sentido do fluxo eletrosmótico (EOF): se a mobilidade for menor ou igual ao EOF, o fluxo de tal espécie terá mesmo sentido que EOF possibilitando a detecção, podendo no segundo caso (igual ao EOF) tornar o tempo de detecção muito longo para essa espécie, tornando-se impraticáveis em alguns casos; se a mobilidade for maior que o EOF, o fluxo de tal espécie terá sentidos oposto ao EOF, impossibilitando sua detecção (COLOMBARA et al., 1997; HADDAD et al., 1999; BERGAMO, et al., 2011).

Uma maneira de superar essa dificuldade é otimizar o pH da solução tampão utilizado como eletrólito suporte ou fluídico (BGE - background electrolyte). Em alguns casos faz-se necessário a adição de aditivos no BGE para manipular o EOF, onde estudos apontam os surfactantes por oferecer uma maior oportunidade para a manipulação de seletividade, não somente para inversão do EOF, como também diminuir o tempo de migração das espécies. Os modificadores típicos do EOF são sais de amônio quaternário hidrofóbicos, tais como o brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB), brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB), e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), que são surfactantes catiônicos. O primeiro trabalho que identificou o uso de surfactantes catiônicos, visando a inversão do fluxo eletrosmótico foi publicado por Fuerstenau, onde foi estudado o efeito de sais



quaternários de alquilamônio na magnitude do potencial zeta de esferas de quartzo. Verificando uma inversão de sinal com o aumento da concentração de surfactantes com cadeias entre 10 e 18 carbonos, Fuerstenau postulou, pela primeira vez, a adsorção superficial de semi-micelas, agregados bidimensionais formados pela interação lateral das cadeias alifáticas (COLOMBARA et al., 1997; HADDAD et al., 1999; GONG et al., 2007; BERGAMO et al., 2011).

O modelo do mecanismo, atualmente aceito, pelo o qual a inversão do fluxo ocorre está baseado na formação de uma camada de semi-micelas na superfície interna do capilar. Supondo uma situação onde em fluxo eletrosmótico normal a superfície interna do capilar esteja negativamente carregada e os cátions, na proximidade da superfície, estejam arranjados de acordo com uma dupla camada elétrica. Com a adição de um surfactante catiônico ao eletrólito condutor, uma pequena quantidade de monômeros do surfactante desloca os cátions da dupla camada e são adsorvidos na superfície. As forças que governam a adsorção nesta etapa são de caráter coulômbico (forças de London), e atuam entre os sítios de carga negativa da superfície e as cabeças dos monômeros, carregadas positivamente (COLOMBARA et al., 1997; GONG et al., 2007).

A adsorção dos monômeros poderão alcançar um estágio onde todos os sítios de carga da superfície serão totalmente neutralizadas com o aumento da concentração do surfactante adicionado ao eletrólito condutor. Esta etapa é caracterizada pela formação da monocamada, na qual a cabeça dos monômero estará firmemente ligado à superfície e a cauda voltada para a solução. Se este arranjo não possuir carga efetiva na superfície, o fluxo eletrosmótico será suprimido. Se aumentar a concentração do surfactante na solução aumentará a possibilidade de interações coesivas entre as caudas, convertendo na camada dupla. A adsorção das semi-micelas na camada dupla acontece de forma que uma das cabeças fica firmemente ligada à superfície, enquanto que a cabeça diametralmente oposta estará voltada para a solução. Uma dupla camada composta de ânions será então organizada na solução interfacial e, sob ação de um campo elétrico, o fluxo eletrosmótico é invertido, ou seja, migra em direção ao anodo (COLOMBARA et al., 1997).

Existem vários modos de separação em eletroforeses. Na eletroforese por fronteira móvel, uma quantidade apreciável de amostra é colocada em um tubo, preenchido com tampão fluídico ou BGE. Ao aplicar o campo elétrico os componentes da amostra migram em certa direção com velocidades específicas, dependendo da mobilidade das espécies. Em eletroforese de zona a amostra no meio tamponante, como uma banda de pequena espessura, onde, aplicando o potencial, cada zona migra independentemente, com velocidades constantes mas diferenciada pela especificidade de sua própria mobilidade. As mobilidades da eletroforese em solução livre, gel e micelar pertencem a essa categoria. Já na isotacoforese, a amostra é inserida entre duas soluções, denominados eletrólito líder e terminador. Diferentes gradientes de potencial desenvolvem em cada banda, de tal forma que todos os cátions eventualmente migram com velocidades idênticas e constantes quando o campo elétrico é aplicado (TAVARES, 1996; WEINBERGER, 2000).

A maneira pela qual a amostra é introduzida no capilar tem implicação direta na análise quantitativa, como mencionado anteriormente. A reprodutibilidade da área do pico, ou altura, reflete a precisão da técnica de injeção. Em eletroforese capilar a amostra pode ser introduzidas no capilar por métodos eletrocínético ou hidrodinâmicos. Na injeção hidrodinamicamente a amostra é introduzida através da criação de um gradiente de pressão entre os reservatórios da amostra e do eletrólito de corrida, enquanto as extremidades do capilar estão mergulhadas nestes reservatórios. Utilizando a injeção eletrocínético, um determinado valor de potencial é aplicado entre os reservatórios da amostra e eletrólito durante um intervalo de tempo definido, enquanto a extremidade apropriada do capilar é inserida no reservatório da amostra, ao passo que a outra extremidade é colocada no reservatório do eletrólito de corrida (TAVARES, 1996; SILVA et al., 2007).

Nas últimas décadas, a eletroforese capilar tem conquistado a atenção de pesquisadores em todo o mundo, como uma poderosa técnica alternativa para a separação e monitoramento de compostos de interesse, farmacêutico, clínico, ambiental, dentre outros. Atualmente, microcanais contidos em estruturas baseadas em microdispositivos estão sendo utilizados com notável frequência em técnicas de

eletromigração capilar, devido ao avanço nos desenvolvimentos na área de nanotecnologias (TAVARES, 1997; WEINBERGER, 2000; SILVA et al., 2007).

### **3.3 Fotolitografia e laser de CO<sub>2</sub> como processo de microfabricação**

A litografia é a técnica mais usual para a fabricação de estruturas em microescala. Dependendo do tipo de feixe de energia, as técnicas de litografia pode ser ainda dividido em fotolitografia, litografia de elétron, litografia de raios-X, e litografia de íon (NGUYEN; WERELEY, 2006; KUMAR, 2010).

Dentre as técnicas litográficas supracitadas a fotolitografia é a técnica mais relevante para a fabricação de dispositivos microfluídicos, e foi utilizada nesse trabalho, por esse motivo será a única técnica discutida.

O processo fotolitográfico tem como foco a obtenção de uma máscara de fotorresiste sobre o substrato que fará a proteção seletiva deste substrato durante o processo subsequente da tecnologia planar, que constitui a base dos processos de fabricação dos dispositivos e circuitos integrados, resistores, diodos, transistores e microssistemas (FIORAVANTE JUNIOR, 2004).

Inicialmente são feitos os projetos das máscaras onde são determinados os padrões que serão transferidos para o filme de fotorresiste. E para tais processos, utiliza-se uma camada de emulsão de um polímero líquido fotossensível à luz UV chamado fotorresiste, que transfere padrões de estruturas micrométricas de uma máscara, na ordem de 10 a 100  $\mu\text{m}$ , para um substrato sólido (FIORAVANTE JUNIOR, 2004; FERNANDES; FERREIRA, 2006; FONSECA et al., 2007).

A máscara é uma placa de vidro transparente com metal (cromo) padrão sobre ele. Para aplicações microfluídicos com estruturas relativamente grandes, uma máscara impresso em um filme plástico transparente de alta resolução filmadora é uma opção de baixo custo e prototipagem rápida (NGUYEN; WERELEY, 2006; LANDERS, 2006; COLTRO et al., 2007; KUMAR, 2010).

O processo de fotolitografia consiste de uma sequência de etapas. Tendo na primeira etapa é deposição sobre o substrato uma fina camada de fotorresiste através de centrifugação em um *spinner*, e subsequentemente à aplicação do fotorresiste é realizada uma cura em temperatura adequada usando uma estufa ou placa quente para a evaporação do solvente e solidificação do fotorresiste. Em sequência, a camada de fotorresiste é exposta à luz UV através de uma máscara em uma fotoalinhadora. A máscara contém partes claras e opacas que definem o padrão que será transferido ao filme de fotorresiste (FIORAVANTE JUNIOR, 2004; NGUYEN; WERELEY, 2006; LANDERS; 2006; RUANO-LÓPEZ et al., 2006 FERNANDES; FERREIRA, 2006; COLTRO et al., 2007; KUMAR, 2010).

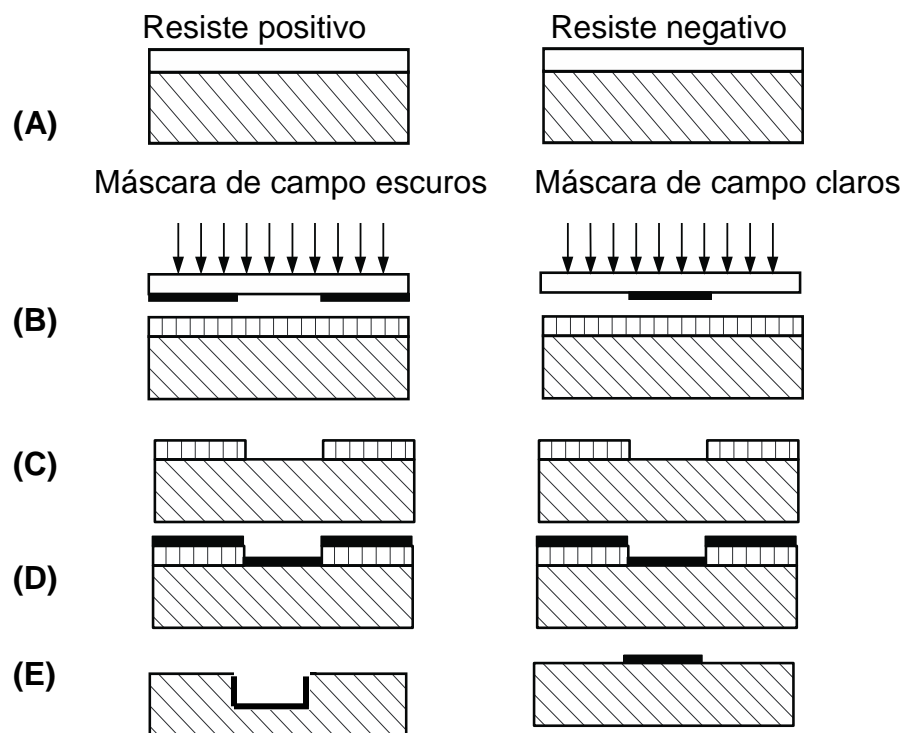
Têm-se dois tipos de fotorresiste, positivo ou negativo. O fotorresiste positivo é inicialmente um polímero insolúvel na solução utilizada como revelador, no qual quando exposto à luz ultravioleta se degrada ficando solúvel na solução reveladora. O fotorresiste negativo é inicialmente solúvel na solução utilizada como revelador e durante a exposição se polimeriza tornando-se insolúvel. Os mecanismos de fotopolimerização e de degradação do polímero dependem do tipo de fotorresiste utilizado. Ou seja, se usar o fotorresiste positivo, as áreas do filme de fotorresiste expostas à luz ultravioleta apresentam um aumento na taxa de dissolução em solvente específico, enquanto que utilizando fotorresiste negativo, as áreas do fotorresiste expostas à luz UV apresentam diminuição na taxa de dissolução em solvente específico. Subsequentemente à exposição é realizada a revelação química do fotorresiste. O revelador dissolve as partes expostas ou não expostas dependendo do tipo de fotorresiste utilizado no processo, e após o processo de revelação, tem-se a máscara de fotorresiste responsável pela proteção do substrato durante o processo subsequente que pode ser de corrosão ou deposição de filmes (FIORAVANTE JUNIOR, 2004; NGUYEN; WERELEY 2006; LANDERS, 2006; RUANO-LÓPEZ et al., 2006).

O processo de corrosão química do filme não protegido pelo fotorresiste pode ser feita por solução líquida específica, por exemplo, solução de ácido fluorídrico para a corrosão de  $\text{SiO}_2$ , ou por um plasma com radicais reativos específicos, o mais usual atualmente, por exemplo, plasma de  $\text{CF}_4$  com  $\text{H}_2$  para corroer  $\text{SiO}_2$ . Por meio de um plasma consegue-se definir geometrias com dimensões menores e com

paredes verticais das janelas, devido à característica anisotrópica da corrosão. Já no processo de deposição, o metal é evaporado sobre o substrato com fotorresiste revelado, fixando-se sobre as zonas livres de resina e sobre a resina resultante do processo de fotogração. Após a evaporação o metal depositado sobre a resina é removido pela dissolução da resina que o suporta (FIORAVANTE JUNIOR, 2004; NGUYEN; WERELEY, 2006; LANDERS, 2006; RUANO-LÓPEZ et al., 2006).

A Figura 3 apresenta a diferença da transferência de padrão utilizando o fotorresiste positivo e negativo.

**Figura 3 - Transferência padrão utilizando fotorresiste positivo e negativo. (A) revestimento do fotorresiste (negativo ou positivo), (B) fotolitografia (máscara de campo escuro ou máscara de campo claro), (C) revelação do fotorresiste, (D) deposição de metal, e (E) lavagem do fotorresiste com material em cima; permanece a estrutura transferida.**



Fonte: modificado de NGUYEN; WERELEY, 2006.

Em síntese, o processo fotolitográfico consiste em:

- ✓ Escolher o substrato adequado para a interação desejada no método escolhido ou proposto;

- ✓ Sua correspondente limpeza para remover partículas e contaminações da superfície, assim como alguns vestígios de impurezas orgânicas, inorgânicas e metálicas;
- ✓ Depois da limpeza, a lâmina de silício pode ser coberta com um material que servirá para formar uma camada de barreira cuja função é proteger o substrato, ou partes do substrato em processos de dopagem, corrosão por íons ou deposição de filmes, onde o material mais comum é o dióxido de silício;
- ✓ Fotografação dos microcanais no fotorresiste, que é um polímero fotossensível, corrosão do substrato e a selagem dos microcanais de forma permanente, como por exemplo os microchips feitos somente de vidro, ou de forma reversível, como os microchips híbridos de PDMS/vidro (COLTRO et al., 2007).

Geralmente, fotolitografia é categorizado como a impressão de contato, a impressão de proximidade e impressão de projeção. Nas duas primeiras técnicas, a máscara é trazido para perto do substrato. Impressão de contato permite que a máscara toque a camada de fotorresiste (NGUYEN; WERELEY, 2006; LANDERS, 2006).

A capacidade de um sistema de reproduzir detalhes de uma imagem é definido como resolução, poder de definição ou definição deste sistema. Geralmente costuma-se empregar o termo resolução do processo no lugar de resolução. Neste sentido, resolução significa a mínima dimensão que se pode obter de acordo com os critérios adotados no processo, ou seja, as menores dimensões que se pode obter no fotorresiste que estejam livres de falhas indesejáveis e que tenham um perfil adequado para a realização do processo subsequente (FIORAVANTE JUNIOR, 2004; NGUYEN; WERELEY, 2006; LANDERS, 2006).

A resolução é dada pelo número de pares de linhas e espaços de mesma largura que podem ser percebidos como distintos numa dimensão de 1 mm. Logo, o poder de resolução de 2000 linhas/mm tem o significado de capacidade de reproduzir traços de 0,25  $\mu\text{m}$  de largura. A resolução do sistema de impressão depende do produto de um fator de 1,5 pela raiz quadrada da multiplicação do comprimento de onda e a distância entre a máscara e a camada do fotorresiste. Isto

implicará que para um comprimento de onda constante quanto maior a distância entre a máscara e a camada de fotorresiste, mais profundo será o canal. No entanto, é comprovado experimentalmente que a imagem apresenta irregularidades (borrada) em canais muito profundos (FIORAVANTE JUNIOR, 2004; NGUYEN; WERELEY, 2006; KUMAR, 2010).

A resolução do sistema de impressão de projeção é estimado como a razão entre o comprimento de onda e o dobro da abertura numérica do sistema de lentes de imagem. Durante as impressões de contato e de projeção é oferecido uma resolução da ordem de 1 micrometro, a impressão de proximidade tem uma resolução mais baixa da ordem de alguns microns. Profundidade do foco de impressão de projeção (0,1 a 0,25  $\mu\text{m}$ ) é fraca em comparação com a impressão de proximidade (cerca de 5  $\mu\text{m}$ ). A maioria dos sistemas de fotolitografia utiliza uma lâmpada de mercúrio como fonte de luz, que tem um espectro numa faixa de 365 a 546,1 nm (NGUYEN; WERELEY, 2006; LANDERS, 2006).

Fotolitografia de fotoresistes grossos tem um grande impacto na fabricação de dispositivos microfluídicos. Dispositivos microfluídicos usam fotoresistes grossos diretamente como material funcional ou como um molde para a moldagem do polímero, como o PDMS, bem como galvanoplastia de metais, como os eletrodos de platina largamente usados em detecções eletroquímicas em eletroforese em microchip. Neste caso, o processo de litografia deve oferecer uma alta relação de aspecto, que é a relação entre a espessura do resiste e a menor dimensão da estrutura (NGUYEN; WERELEY, 2006; KUMAR, 2010).

Devido à espessura e à elevada relação de aspectos exigidas deve ser usado feixe de alta energia ou fotorresistes especiais tais como éter glicídico polifuncional derivado do Novolac bis-fenol-A, ou simplesmente SU-8, o qual é um resiste negativo de mais alta resolução já desenvolvido, que tem sua estrutura química baseada na resina epóxi (molécula que contém um ou mais grupos 1,2-epoxi) e solúvel em solventes orgânicos. Grossas camadas de resiste pode ser conseguido com várias etapas de centrifugação, ou com revestimento viscoso de resiste a uma velocidade de rotação mais lenta. Devido a melhor profundidade de foco oferecido pela proximidade da impressão ser da ordem de 5  $\mu\text{m}$ , uma camada mais espessa

do resiste do que a essa profundidade pode degradar a resolução (NGUYEN; WERELEY, 2006; LANDERS, 2006; RUANO-LÓPEZ et al., 2006; KUMAR, 2010).

A resolução da fotolitografia é limitado pelo comprimento de onda. Para a fabricação de nanoestruturas com tamanho da ordem de dezenas de nanômetros, o efeito de interferometria pode ser utilizado. Esta técnica é chamada de litografia interferométrica (LI). LI é um processo simples, em que dois feixes de luz coerente interfere para gerar uma onda estacionária. Os gradeamentos têm um período espacial de metade do comprimento de onda da luz interferente. Se o laser ultravioleta é usado, estruturas menores do que 100 nm, pode ser criado por LI (NGUYEN; WERELEY, 2006; KUMAR, 2010).

Os processos fotolitográficos com todas as suas etapas de processamento é uma área do conhecimento que está direta ou indiretamente ligada as muitas linhas de pesquisas em âmbitos tecnológicos os quais buscam melhor compreender tais processos ou descobrir novos agentes materiais ou instrumentais que possam proporcionar melhores performances e controle de parâmetros dos processos de microfabricação.

A fabricação de dispositivos microfluídicos a base de polímeros tornaram-se uma promissora opção em comparação com os materiais já estabelecidos, tais como silício e de vidro, devido a algumas vantagens, tais como baixo custo, facilidade de fabricação e as propriedades do material obtidos em massa. Esta tecnologia de fabricação pode ser dividida em dois grupos: as técnicas de replicação, em que uma estrutura principal está replicada sobre o material de polímero, e a técnica direta, no qual cada dispositivo é fabricado separadamente. Para um pequeno número de dispositivos, métodos de replicação, tais como estampagem a quente e de moldagem por injeção são complexo e caros em comparação com uma técnica direta, tais como a ablação a laser (NAYAK et al., 2008; HONG et al., 2010).

A microfabricação a laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* - Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação) é um método promissor para a confecção de microdispositivos poliméricos empregando microcanais. As propriedades únicas dos lasers permitem cortes confiáveis, de baixo custo e alta produtividade, e este processo também demonstra significativas



vantagens na qualidade e repetitividade. É uma alternativa altamente precisa, rápida e sem contato para usinagem, e por ser um processo sem contato, não ocorre o desgaste de ferramentas, comumente visto em outros métodos. Têm-se apresentado na literatura várias aplicações da ablação a laser, tais como, corte por laser de CO<sub>2</sub> de diferentes plásticos poliméricos, tais como o polietileno, polipropileno e policarbonato, fabricação de sistemas microfluídicos de polimetil metacrilato (PMMA) usando laser de CO<sub>2</sub> (NAYAK et al., 2008; HONG et al., 2010).

O mecanismo de ablação a laser é uma combinação complexa de processos fotoquímicos e fototérmicos. Isto significa que algumas ligações químicas das substâncias são quebradas diretamente durante o processo de absorção de fótons, enquanto outras são quebradas termicamente pelo calor liberado das moléculas excitadas, as quais não se quebram fotoquimicamente (NAYAK et al., 2008; HONG, et al., 2010).

As densidades de potência normalmente obtidas com lasers de corte e sinterização variam de 1 a 5 MW/cm<sup>2</sup>. Tais densidades de potência, contudo, não são suficientes para se obter um corte limpo, e um jato de gás direcionado à posição focal é normalmente usado para remover material fundido e vaporizado da zona de corte. O movimento da peça em relação ao foco do feixe laser leva a um corte limpo e estreito em quase todos os tipos de materiais. Em geral, as altas velocidades de corte em superfícies planas e tridimensionais deixam o material relativamente sem distorções, de tal maneira que as peças cortadas podem ser imediatamente utilizadas. Os lasers mais utilizados para o corte são os de CO<sub>2</sub> e de Nd:YAG, tanto pulsados como contínuos (NAYAK et al., 2008; HONG et al., 2010).

O laser de CO<sub>2</sub> é o tipo de laser moleculares mais usual e um dos mais eficientes. O dispositivo de geração de laser de CO<sub>2</sub> consiste em três partes principais: o meio ativo (espécie química que determina o comprimento de onda radiação emitida), o ressonador (ou cavidade ótica com dois espelhos de diferente grau de reflexão) e uma fonte eletromagnética que fornece energia para excitação do meio ativo. Este tipo de laser utiliza uma mistura de gases de dióxido de carbono, nitrogênio e hélio, onde o nitrogênio facilita o processo de excitação das moléculas de CO<sub>2</sub>. A geração do laser de CO<sub>2</sub> envolve a excitação eletrônica da molécula de nitrogênio por colisão dentro de uma descarga gasosa, seguido por transferência de

energia ressonante para um nível vibracional da molécula de dióxido de carbono. O hélio tem a função de esvaziar os níveis de energia mais baixos do laser para manter o processo de inversão de população e também de estabilizar a descarga elétrica dissipando calor da zona de geração do laser (LIMA, 2014).

A potência do laser necessária para corte e sinterização varia consideravelmente com o material a ser processado, além disso, a densidade da potência do laser e o tamanho do comprimento de onda influenciam na eficiência do corte e da sinterização. Dependendo do tipo de material a ser processado este irá interagir diferentemente com o laser, devido ao comprimento de onda que cada laser apresenta (LEITE, 2007).

O laser de CO<sub>2</sub> é mais recomendado para cortar e sinterizar materiais orgânicos, tais como polímeros e ceras, pelo fato destes materiais absorverem melhor a radiação do laser no comprimento de onda 10,6 µm. O laser de Nd:YAG é mais usado para sinterizar materiais inorgânicos, tais como materiais metálicos e cerâmicos, também pelo fato destes materiais absorverem melhor a radiação do laser em 1,06 µm (LEITE, 2007).

O processo de corte a laser mais comum é o que provoca a fusão do material. Neste processo, durante o corte, a função principal do laser é de uma fonte de calor muito intensa. A diferença para outras fontes de calor é a densidade de potência no foco de um laser comercial de alta potência pode chegar a megawatts por milímetros quadrado. A temperatura no foco pode chegar a valores comparáveis ao da fusão nuclear, e se o feixe for absorvido pela superfície, esta será imediatamente evaporada (LIMA, 2014).

Alguns parâmetros de processo devem ser ajustados para otimizar um corte a laser, tais como: potência de saída do laser, modo de operação (contínua ou pulsada) e a qualidade do feixe. Na operação pulsada, outros parâmetros também são importantes, como potência pico, taxa de repetição e largura temporal do pulso laser. A óptica de focalização é também de fundamental importância para um bom sistema laser, sendo os principais parâmetros o comprimento focal da lente e a posição do ponto focal em relação à superfície da peça. Outros parâmetros a serem controlados são a velocidade de corte e a aceleração, a pressão, tipo e pureza do

gás de assistência, diâmetro do bico e sua distância até a superfície da peça (LIMA, 2014).

Em contraste ao laser de UV, o laser de CO<sub>2</sub> emite radiação infravermelha de um comprimento de onda maiores, 10,6 µm, conseqüentemente, produz uma largura mínima de canais, e potência, geralmente, de até 50 W. Isto significa que o feixe de laser de CO<sub>2</sub> sempre produzirá uma ablação fototermicamente. Além disso, o laser de CO<sub>2</sub> emite radiação continuamente. E as radiações eletromagnéticas emitidas pelo laser de CO<sub>2</sub> interage com as ligações C–C, C–O e C–N, o que o torna apropriado para interações com material orgânico (NAYAK et al., 2008; COSTA, 2009; HONG et al., 2010).

Sempre que o feixe de laser é focalizado à superfície do substrato polimérico, a temperatura do ponto irradiado subirá tão rapidamente que o material, primeiramente derrete e, em seguida, decompõe-se e vaporiza-se, deixando a abertura no substrato. Se o feixe de laser mover-se através da superfície do substrato será criada uma abertura no local da superfície correspondente aos pontos de incidência do feixe. A abertura é conduzida para longe do ponto aquecido em todas as direções pelo gás aquecido do polímero vaporizado, enquanto a maioria da ressolidificação do material fundido na sequência do feixe. Assim, o feixe de laser móvel é capaz de cortar estruturas, tais como canais e cavidades no substrato a base de polímero (NAYAK et al., 2008; HONG et al., 2010).

O poli(metil-metacrilato) (PMMA), por ser um termoplástico facilmente abrasado, conseqüentemente, torna-se um excelente substrato para a fabricação de micro sistema, dentre outras, devido a sua fácil modelagem. Abaixo da temperatura  $T_g$  (temperatura abaixo da qual um polímero amorfo se torna duro e frágil, estado vítreo, e acima da qual o mesmo polímero é macio, estado “borrachoso”), ele permanece em um estado vítreo. Quando a temperatura aumenta para além de  $T_g$ , ela atinge um estado semelhante a borracha. Em temperaturas entre 170 e 210 °C, ocorre deformações ao longo das cadeias das moléculas. Tem sido apresentado na literatura, que por causa do grande comprimento da cadeia de PMMA, o número de monómeros produzidos por evento de iniciação é de aproximadamente 1000, e o produto substancialmente dominante liberado a partir da fase em massa é do monômero metacrilato de metila (MMA) . O produto esperado a partir da

decomposição do PMMA usando o feixe de laser de CO<sub>2</sub> em onda contínua é, segunda a literatura, o monômero de MMA (NAYAK et al., 2008).

Em suma, é aceito que o PMMA degrada termicamente por despolimerização da cadeia, produzindo MMA como o único produto de decomposição. Este tipo de degradação é, nas suas características gerais, o inverso de polimerização. É um processo de cadeia caracterizado pela iniciação, propagação e terminação. A parte principal de decomposição ocorre em cerca de 360 °C, dependendo da velocidade de aquecimento. Existem, pelo menos, dois processos de decomposição: uma envolve a despolimerização iniciada pelos grupos terminais de vinila e o outro ocorre nas ligações saturados entre carbonos (C–C), incluindo os grupos terminais carbono ligado a hidrogênio (C–H) (NAYAK et al., 2008).

A desvantagem apresentada pelos métodos de fabricação baseado em laser é que a radiação do laser provoca alterações físico e/ou químicas nas vizinhanças das ablações, podendo dificultar a selagem ou até mesmo inviabilizando-a, e conseqüentemente, em muitos casos o perfil da secção transversal das ablações é gaussiana, não tendo muita flexibilidade enquanto a isso (COSTA, 2009).

### **3.4 Influência do potencial de separação na detecção eletroquímica usada em eletroforese capilar e em microchip**

Um foco muito discutido na detecção eletroquímica (DEQ) em eletroforese capilar (EC) e eletroforese em microchip é a influência do potencial de separação nas colunas capilares e nos microcanais (LACHER et al., 2004). Com o objetivo de superar esta dificuldade foram publicadas várias pesquisas com propósito de isolar o detector amperométrico da interferência causada pela alta voltagem nos canais de separação, tais como configuração do alinhamento dos eletrodos dentro e fora do canal de separação (do inglês “*end-channel*”, “*in-channel*” e “*off-channel*”) (FISCHER, 2009). A configuração mais amplamente usada para o alinhamento dos eletrodos é o “*end-channel*”. Nesta configuração o eletrodo de trabalho é posicionada dezenas de microns da extremidade (saída) do canal de separação (VANDAVEER IV, 2004; COLTRO et al., 2004).

A configuração “end-channel” com detecção amperométrica proporciona uma montagem muito fácil e conveniente método para eliminar os problemas associados com a queda da alta tensão na detecção através do microcanal ou capilar (HUANG et al., 1991; WALLENBORG et al., 1999; COLTRO et al., 2004; HULVEY et al., 2010), além de permitir desacoplamento suficiente do potencial de separação do eletrodo de trabalho e do detector (LACHER et al., 2004). No entanto, esta configuração produz uma alta corrente de fundo, baixa sensibilidade e diminuição da eficiência de separação por causa da difusão das espécies a serem analisadas que ocorre devido à área que se situa entre a saída do canal de separação e o eletrodo trabalho (WALLENBORG et al., 1999).

Na tentativa de contornar os problemas produzidos pela configuração “*end-channel*” foi proposto por LUNTE e colaboradores o uso de um desacoplador de paládio (Pd) em um microchip híbrido PDMS/vidro para permitir o posicionamento do eletrodo de trabalho dentro do canal (“*in-channel*”) e conseqüentemente adquirir uma melhoria relevante do desempenho de separação de espécies químicas e diminuir a relação sinal/ruído (LACHER et al., 2004).

Foi proposto recentemente por Gabriel e colaboradores um microdispositivo eletroforético de PMMA e um desacoplador a base de uma esponja feita de açúcar comercial e PDMS posicionado no microdispositivo. Este microdispositivo consistiu em quatro reservatórios de 3,0 mm de largura, um injetor duplo T de cisão de 200 µm, um canal de separação de 4,8 cm de comprimento efetivo, e uma série de canais para ligar os reservatórios. Um reservatório adicional, foi posicionado a 200 µm do reservatório de resíduos, e encheu-se com uma "esponja" de PDMS/açúcar (proporção em massa de 10:1) que foi utilizado como um desacoplador. O desacoplamento foi utilizado para minimizar a formação de bolhas no canal de separação e diminuir o ruído na etapa de detecção (GABRIEL et al., 2014).

A esponja de PDMS foi escolhido como desacoplador, segundo Gabriel, porque é simples e pode ser facilmente produzido, sem incorrer em despesas adicionais significativas ou uso de componentes metálicos, como camadas finas ou fios. Mais importante ainda, esta abordagem foi implementada para evitar a formação de bolhas na superfície do eletrodo e reduzir o nível de ruído de análise

causada pela interferência da corrente eletroforética sobre o circuito de detecção. E para testar a eficiência analítica do microdispositivo de PMMA, que foi fabricado por gravação a laser de CO<sub>2</sub>, foi demonstrada através da realização de análises de uma série de compostos fenólicos, de dopamina, 2-aminofenol, e catecol. E foi observado que o uso do desacoplador possibilitou uma boa separação e impediu a formação de bolhas na superfície do eletrodo. (GABRIEL et al., 2014).

Outra proposta do grupo da Profa. Dra. Susan Lunte usando também a configuração “in-channel” foi o uso de um potenciostato eletricamente isolado. A pesquisa permitiu com relevante eficiência contornar os problemas inconvenientes apresentados na configuração “end-channel”. Esta configuração tem a particularidade de inserção do eletrodo diretamente no canal de separação sem a necessidade do uso de desacoplamento. E para ser possível posicionar o eletrodo de trabalho dentro do canal sem interferências produzidas pela alta tensão foi utilizado um potenciostato eletricamente isolado (MARTIN et al., 2002; GUNASEKARA et al., 2011).

Na tentativa de eliminar a ampliação de banda na detecção amperométrica foi proposta a configuração “off-channel” (VANDAVEER IV et al., 2004). Nesta configuração, o eletrodo é posicionado no canal de separação, de modo semelhante à configuração “in-channel” com detecção amperométrica. No entanto, é necessário utilizar um desacoplador para isolar o detector do potencial de separação. O desacoplamento desvia eficazmente a separação de tensão do terra (ground) e estabelece uma região eletroforéticamente livre, em que os analitos são empurrados para o eletrodo de trabalho por meio do fluxo eletrosmótico (EOF) (LACHER et al., 2004).

Interessantes estudos foram realizados com o objetivo de avaliar a performance entre as configurações de simples e duplo-canal (POZO-AYUSO et al., 2008; CASTAÑO-ÁLVAREZ et al., 2009). Os microchips de canal simples e dupla foram avaliadas usando um detector amperométrico e configuração “end-channel” com base em um (para o designe de canal único) ou dois (para o designe de dois canais) eletrodos de 100 µm de ouro alinhados na saída do canal de separação.

Os parâmetros que afectam a separação de vários compostos fenólicos, como dopamina, p-aminofenol e hidroquinona, foram estudados nos microchips de vidro. Assim, a influência do potencial de separação, o potencial de detecção e o BGE (background electrolyte) foram examinados no microchip de canal único para em seguida servir de parâmetros para avaliar microchip de duplo-canal. A configuração de duplo-canal demonstrou ser bastante favorável para melhorar a performance da separação de espécies que usando o canal simples, geralmente, não tem uma boa performance (POZO-AYUSO et al., 2008).

Outros problemas apresentados pelo eletroforese microchip e capilar usando detecção amperométrica com o eletrodo de trabalho dentro do canal (configuração in-channel) devido ao potencial aplicado ao canal de separação é o aumento do ruído e, alguns casos, o surgimento de picos sistemáticos que podem dificultar a leitura dos picos das espécies de interesse, e até mesmo danificar o eletrodo de trabalho e/ou o potenciostato.

Na tentativa de contornar os problemas supracitados Klett e colaboradores fizeram uma relevante investigação relacionada ao efeito da posição do eletrodo de referência em relação ao eletrodo de trabalho na extremidade do capilar. As medições das diferença de potencial entre o eletrodo de referência e de trabalho foram feitas ambas em circuito aberto, e o campo elétrico induzido da eletroforese capilar mudou o pico de potencial do óxido de ouro para um pico de redução na ausência de um desacoplamento do campo elétrico, o que proporcionou a eliminação da influência do campo elétrico no final da coluna do eletroforese capilar em detecção eletroquímica (KLETT et al., 2001).

O mesmo grupo intensificou essa pesquisa com a apresentação em um novo esquema de detecção “potentiostatless” para detecções amperométricas em eletroforese capilar baseado na utilização de microbandas de eletrodos posicionados em diferentes locais do eletroforese capilar, conseqüentemente, em diferentes campo elétrico. A pesquisa demonstrou que o elevado potencial de separação no eletroforese capilar pode ser controlado através do posicionamento das microbandas no capilar com detecção amperométrica em eletroforese capilar, e os resultados indicaram que a abordagem foi altamente adequados para inclusão em microchips integrados (KLETT; NYHOLM, 2003).

Uma nova metodologia de detecção amperométrica usando configuração “in-channel” foi proposta por Chen e Hahn com objetivo de evitar a interferência da alta voltagem aplicada no canal de separação. Eles usaram um design para o microchip híbrido PDMS/vidro com duplo-canal em paralelo, em vez de canal simples, sendo um o canal de separação onde foi posicionado o eletrodo de trabalho e o outro era o canal de referência com o eletrodo de referência colocado nele. Os eletrodos de trabalho e de referência foram feitos de ouro e posicionados equidistantes 200  $\mu\text{m}$  da extremidade em cada canal. Isso foi demonstrado através da separação de neurotransmissores (CHEN; HAHN, 2007).

Um dos objetivos do uso da configuração de duplo canal relatado por Chen e colaboradores foi permitir que fosse aplicado em ambos os eletrodo de trabalho e referência o mesmo potencial elétrico e as suas flutuações. E isso seria devido ao fato de que as flutuações no potencial de separação não provocaria interferência no detector amperométrico, pois ambos os eletrodos seriam perfeitamente correlacionados no tempo e magnitude de injeções e separações, e eles justificavam que com essa estratégia conseguiriam cancelar as medidas entre os dois eletrodos (CHEN; HAHN, 2007; CHEN; HAHN, 2011; CHEN et al., 2011).

Outra vantagem do posicionamento dos eletrodos no método da configuração de duplo-canal relatada por Chen e colaboradores foi que a corrente elétrica entre o eletrodo de trabalho e contra-eletrodo não passavam através do eletrodo de referência e, conseqüentemente, o efeito de resistência elétrica foi minimizada e durante a detecção a variação corrente elétrica foi insignificante (CHEN; HAHN, 2007; CHEN et al., 2011). Isso foi comprovado através da identificação de aminofenóis numa amostras de água de descarte de um refinador de gás natural (CHEN; HAHN, 2011).

O mesmo grupo propôs um novo detector baseado em nanobanda de eletrodo e integrado com um microchip híbrido PDMS/vidro de duplo-canal para melhorar o desempenho do sistema de detecção eletroquímico no eletroforese microchip na configuração “in-channel”. Esse trabalho demonstrou-se excelente para separação e monitoramento de aminofenóis através de uma detecção mais sensível devido o aumento na eficiência de separação relatada no trabalho (CHEN et al. 2011).



### 3.5 Algumas aplicações usando microdispositivos

A vasta maioria das pesquisas, quanto a aplicação dos dispositivos microfluídicos, está direcionado à ciências biológicas e da vida. Uma recente aplicação para os dispositivos microfluídicos, conferem análises de drogas, resíduos de explosivos, enzimas, anticorpos, peptídeos, DNA e outras amostras biológicas (AUROUX et al., 2002; LIVAK-DAHL et al., 2011; YEO et al., 2011; GUIHRN, 2014).

Um passo importante para o desenvolvimento de um sistema portátil de dispositivos para diagnóstico ponto-de-uso (point-of-use) envolveu integração de um sistema transdutor altamente sensível com o módulo também sensível. Chatterjee e colaboradores publicaram um trabalho, que envolveu sinais de transdução e microssistemas, bastante promissor.

Eles desenvolveram um sensor microfluídico que explora a ressonância ferromagnética, excitada em gotas magnéticas etiquetadas. Esse dispositivo consiste de um circuito de micro-ondas em que uma linha de abertura e um guia de onda coplanar são integrados com a área do sensor ativado bioquimicamente. As gotas magnéticas são imobilizadas na área do sensor por reações bio-específicas. Um sinal de micro-onda aplicado à linha de abertura é acoplado ao guia de onda coplanar somente na presença das gotas magnéticas na área do sensor funcionalizado. A ressonância ferromagnética nas gotas aumentou ainda mais a junção. Essa técnica de detecção indutiva foi baseada na miniaturização, e sua fabricação é de baixo custo e pode ser adaptada para detecção de uma gama extensiva de moléculas para as quais os ligantes bio-específico sejam disponíveis (CHATTERJEE et al., 2011).

Neste trabalho foi avaliado a variação da produção do sinal em função da localização das gotas magnéticas. Subsequentemente, um protótipo do dispositivo foi construído por biotinylation (adição de moléculas de biotina a determinadas proteínas) da área do sensor e integrado com um chip microfluídico fabricado em poli(dimetil siloxano) (PDMS). Preliminarmente, foram realizados experimentos nos protótipos usando estreptavidina (proteína tetramérica composta de subunidades idênticas, onde cada subunidade associa-se a uma unidade da molécula de biotina) funcionalizada nas gotas magnéticas etiquetadas. Segundo os

autores desta pesquisa, o dispositivo apresentou uma resposta distinta e facilmente discernida do sinal de fundo (CHATTERJEEA et al., 2011).

Uma aplicação muito interessante foi apresentada por Ambrosi e colaboradores sobre manipulações magnéticas e eletrocinéticas em um microchip para aplicações de esferas baseadas em imuno-sensoriamento.

O trabalho foi baseado em uma combinação da manipulação magnética e eletroforética com detecção eletroquímica para um versátil microfluídico ser aplicado como um biossensor baseado em esfera. Nesse sistema a detecção amperométrica foi realizada posicionando o eletrodo fora do canal (configuração “*off-channel*”) organizado por meio de um célula voltamétrica construída nos microcanais e o eletrodo de trabalho de ouro colocado na saída. Posteriormente, partículas superparamagnéticas foram introduzidas e controladas dentro do canal por meio de um magneto externo permanente em combinação com a eletrogeração de fluxo a qual permite carregar reproduzivelmente (AMBROSI et al., 2011).

Realizou-se a detecção específica de fenol como produto eletroativo da fosfatase alcalina com objetivo de obter a prova de conceito, ou validação, da sensibilidade em quantificação de proteína. A aplicabilidade do dispositivo foi demonstrado pela detecção de imunoglobulina (IgG) de coelhos como proteína modelo depois de um imunoenensaio realizado em partículas magnéticas como plataforma de imobilização. Uma comparação foi realizada entre a detecção eletroquímica usando o dispositivo desenvolvido por eles e a detecção óptica padrão, a qual revelou uma performance similar, entretanto, foi usado quantidades extremamente menores de reagentes com tempo de análise mais curto. Esse novo dispositivo, chip eletroforético com base magnética, desenvolvido poderá ser aplicado com interesse não só para outras proteínas, mas também para análise de DNA, contagem de células e controle ambiental (AMBROSI, A. et al, 2011).

Um trabalho que pode ser citado como aplicação de microdispositivos na área da saúde e da vida, e que parece ser uma linha bastante promissora, foi publicado por Triroj e colaboradores. O trabalho teve como proposta a construção de um chip baseado na microfluídica contendo uma coleção de nanoeletrodos numa plataforma

miniaturizada com sensor bioquímico para detecção de antígeno específico da próstata.

A célula de três eletrodos no chip consistia de uma coleção 5 x 5 de nanoeletrodos de trabalho com raios entre 60 e 120 nm, um eletrodo de referência que foi tratado com plasma de  $\text{Cl}_2$  e um contra eletrodo de Au. A coleção de eletrodos foi fabricado a partir da geração de poros com raios de alta semelhança em uma camada isolante de alumínio, usando um feixe de íon focalizado de gás iodo. Em seguida, foi feito um substrato de vidro com o eletrodo padrão montado com uma placa de microcanais de poli(metilsiloxane) dando um volume de 180 nL para cada canal. A calibração da voltametria cíclica foi feita com uma espécie redox padrão a qual exibiu um aumento significativo da densidade da corrente em duas ordens de magnitude, se comparada com a obtida de um microeletrodo. Esse sistema foi aplicado num chip de nanoeletrodos funcionalizado com um biossensor complexo de antígeno específico da próstata (PSA), consecutivamente, detectaram PSA baseado num método de imunoensaio (TRIROJ et al., 2011).

Esse trabalho apresentou diversas vantagens, tais como: testes no ponto de cuidado (do inglês point-of-care testing), principalmente em diagnósticos para o câncer, promove tratamentos menos invasivos devido a possibilidade de diagnosticar a doença na fase inicial; o microdispositivo tem a possibilidade de detectar uma quantidade muito pequena de biomoléculas, com sinal analítico significativo; o uso da interface molecular favoreceu acesso aos centros eletroativos da enzimas redox; a comunicação elétrica favoreceu à alta sensibilidade para o reconhecimento biomolecular; o design do microdispositivo preveniu do vazamento de corrente elétrica, aumentou o campo gerado próximo ao eletrodo promovendo penetração do elétron no centro ativo da proteína, impedindo sobreposição da zona de depleção e multiplicando a resposta da corrente; a dimensão crítica do raio do eletrodo, 100 nm, é comparada com a espessura da dupla camada elétrica, conseqüentemente, aumentou o transporte de massa, garantindo que a atividade catalítica não fosse controlada pela difusão do substrato para o eletrodo, e a transferência cinética de elétrons na superfície do eletrodo (TRIROJ et al., 2011).

Um importante trabalho foi publicado por Martin e colaboradores objetivando o fabrico de um eletroforese microchip capilar que permitisse o posicionamento do

eletrodo dentro do canal (configuração “in-channel”) em detecções eletroquímicas sem o uso de um desacoplador, e sem sofrer interferência devido ao potencial de separação, e para isso propuseram um potenciostato isolado eletricamente (MARTIN et al., 2002).

O efeito da posição do eletrodo de trabalho sobre o desempenho de separação, em termos de altura do prato e pico de inclinação, do dispositivo microchip eletroforese capilar de poli(dimetilsiloxano) com detecção eletroquímica foi avaliado comparando a configuração fora do canal (“end-channel”), a qual era a mais amplamente utilizada, com o método proposto com nova abordagem de configuração do posicionamento do eletrodo (MARTIN et al., 2002).

Usando catecol como o analito de teste, descobriu-se que, usando a configuração “in-channel” houve uma diminuição da altura total dos pratos teóricos por um fator de 4,6 e reduziu o pico de inclinação por um fator de 1,3. Uma tendência semelhante foi observada para o íon inorgânico nitrito. Além disso, um derivado de aminoácido fluorescente e eletroquimicamente ativo foi usada para comparar diretamente o desempenho de separação entre o método proposto e o esquema de detecção amplamente utilizado que é o fluorescência induzida por laser (LIF). Neste caso, verificou-se que a altura do pratos teóricos e pico de inclinação para ambos os esquemas de detecção eram essencialmente iguais, e o desempenho de separação do método proposto foi comparável à detecção usando o LIF (MARTIN et al., 2002).

LI, X. e colaboradores propuseram um interessante trabalho com um método acoplando espectrometria de massa a um eletroforese em microchip (MCE-MS) para rápida análise quiral.

A plataforma MCE-MS foi proposta implantado um microchip híbrido vidro/PDMS com um emissor nanoeletrospray monolítico. O MCE para a separação enantiomérica foi conseguida por meio da técnica de enchimento parcial. Eles testaram um novo designe de chips com um canal, “braço”, conectando para o meio do canal de separação MCE para entregar o seletor quiral. A separação enantiomérica de 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA), ácido glutâmico (Glu), e serina (Ser), os compostos de teste selecionados, foram atingidas dentro de 130 s com

valores de resolução ( $R_s$ ) de 2,4, 1,1, e 1,0, respectivamente. O sistema MCE-MS para quiral proposto foi sensível e teve limites de detecção de 43 nM para l-DOPA e 47 nM para d-DOPA (LI et al., 2013).

A plataforma analítica apresentou ser bem adequado para estudos de preferência estereoquímica em células vivas, pois a cultura de células, a injeção da amostra, a separação quiral e a detecção MS foram integrados em uma única plataforma. O metabolismo de DOPA em células neuronais SH-SY5Y humanas foram estudadas como um sistema modelo. Incubação em chip de células SH-SY5Y com DOPA racêmica foi realizada, e a solução de incubação foi injetado em linha a intervalos de tempo. Verificou-se que a concentração de l-DOPA diminuiu gradualmente à medida que aumentou o tempo de incubação, enquanto a concentração de coexistente d-DOPA manteve-se constante. Os resultados indicaram firmemente que as células SH-SY5Y metabolizou l-DOPA efetivamente enquanto d-DOPA esquerdo permaneceu intacto (LI et al., 2013).

Um trabalho recente foi publicado por Zhai e colaboradores. Eles propuseram um chip microfluídico de vidro/PDMS simples para pré-tratamento on-line da amostra e detecção de condutividade sem contato, que consistia de um vidro de espessura de 0,17 mm e um substrato PDMS incorporado com uma coluna monolítica de extração em fase sólida (SPE). Usando este sistema integrado em microchip, extração de amostra, injeção, separação e detecção foram realizadas automaticamente na sequência. Uma amostra de auramina O foi concentrada por SPE molecularmente impresso (MISPE), eluída a amostra do reservatório, e injetadas por eletromigração para dentro do canal de separação para a separação eletroforética e detecção por condutividade sem contato. O limite de detecção calculados ( $S/R = 3$ ) foi  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A coluna monolítica foi utilizado para extrair quantitativamente auramina O, obtendo-se um fator de enriquecimento de linha de cerca de 12. O sistema de microchip demonstrou ser confiável e aplicável à análise de auramina O em amostras de alimentos (ZHAI et al., 2014).

Outro trabalho recente baseado em eletroforese em microchip foi proposto por Mitra e colaboradores, onde analisaram ensaios em temperaturas elevadas e alta intensidade de campo de separação. Eles usaram dispositivos microfluídicos com canais de separação de 11 cm de comprimento para realizar separações em

temperaturas entre 22 (ambiente) e 45 °C e forças de campo elétrico de 100 a 1000 V/cm. Para avaliar o desempenho de separação, N-glicanos foram utilizados como um sistema de modelo e marcadas com 8-aminopyrene-1,3,6-trissulfônico para conferir carga para a eletroforese e os tornar fluorescente. Tipicamente, o aumento da difusividade, a temperaturas mais elevadas conduz a um aumento da dispersão axial e desempenho de separação pobre; no entanto, demonstra-se que as forças de campo suficientemente elevada compensa o impacto do aumento da difusividade, a fim de manter a eficiência de separação. Eficiências para estas separações sem solução (analito) são as mesmas nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C com intensidades de campo separação  $\geq 500$  V/cm (MITRA et al., 2014).

Recentemente Garcia e Escarpa propuseram recentemente um microsistema eletroforético (MSE) com detecção eletroquímica como uma ferramenta poderosa na análise de alimentos. Segundo a literatura, o junção do MSE com detecção eletroquímica e nanotecnologias é uma área de pesquisa muito recente, no entanto torna-se bastante atraente, sobretudo sabendo que os nanomateriais podem melhorar significativamente o desempenho analítico dos MSE. Eles relataram o acoplamento entre MSE e nanofios de cobre (CuNWs) para a análise seletiva de monossacarídeos em amostras de mel (GARCIA; ESCARPA, 2014).

Em termos de aplicabilidade real, o estudo da confiabilidade analítica dos MSE é uma questão de suma importância. Para este fim, um grupo representativo de nove amostras de mel foram analisadas e os resultados foram comparados com os obtidos anteriormente por HPLC. Abordagem MSE-CuNWs permitiu a separação de glicose e frutose em menos que 250 s sob separação otimizada (NaOH 20 mM + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10 mM, pH 12; potencial de separação + 1000 V) e condições de detecção (E = 0,70 V em NaOH 20 mM + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10 mM , pH 12). Uma excelente estabilidade de EOF durante a análise da amostra foi obtida com tempos de migração para RSD < 2 % e , para as correntes amperométricos < 9 % . Os conteúdos quantitativos para glicose e frutose individual obtidos utilizando ME-CuNWs em comparação com os obtidos por HPLC foram altamente de acordo com erros < 10%, indicando a confiabilidade da abordagem. O excelente desempenho analítico obtido confirmou a potência analítica da abordagem do ME-CuNWs, aumentando a maturidade da

tecnologia de microchip e abrindo novos caminhos para a futura implementação de aplicações na área de análise de alimentos (GARCIA; ESCARPA, 2014).

### **3.6 Monitoramento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio**

Os radicais livres e oxidantes derivados de radicais livres desempenham papéis importantes em sistemas biológicos e têm sido implicadas na patologia de muitas doenças. O grande problema para determinar o papel de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) é o tempo de meia-vida curta que essas espécies possui e que são difíceis de medir in vivo. ERO nas células e tecidos têm sido demonstradas por uma série de métodos. Efeitos de sequestrantes de radicais livres, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase, e antioxidantes tais como a vitamina E têm sido detectados indiretamente. Muitos dos métodos utilizados nos estudos de radicais livres fornece uma avaliação global do estresse oxidativo, mas não mostram a informação específica sobre os locais sub-celulares in-situ de distribuição de radicais livres específicos, como pode ser revelado por abordagens citotóxicas (ROVER JÚNIOR et al., 2001; ARMSTRONG, 2002; RIBEIRO et al., 2005 ; HUBER et al., 2008;).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante com predomínio dos oxidantes, com dano consequente (VASCONCELOS et al., 2007).

O organismo humano sofre ação constante de ERO e ERN geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou provenientes dos alimentos. As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxil ( $\text{HO}^{\bullet}$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) e alcóxila ( $\text{RO}^{\bullet}$ ); e os não-radicalares:

oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. EROs são um conjunto de moléculas que são gerados a partir da redução parcial do oxigênio molecular ( $O_2$ ). Deste modo, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, e hidroxil, os principais EROs, são formados pela redução sequencial de  $O_2$ . Além disso, ERO se distinguem de outras moléculas contendo oxigênio, devido à sua meia-vida relativamente curta. ERO são subprodutos de numerosas vias metabólicas, mas as mitocôndrias são o principal local celular onde  $O_2$  é reduzida. Assim, a produção de ERO é diretamente proporcional à atividade celular, o que é relativamente elevado no embrião, enquanto que a atividade das células diferencial de contribuir para a definição de padrões de desenvolvimento (RIBEIRO et al., 2005; BARREIROS et al., 2006; HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2010).

ERN são produzidos em células aeróbias durante o metabolismo basal e estímulos fisiopatológicos. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ( $NO^*$ ), óxido nitroso ( $N_2O_3$ ), ácido nitroso ( $HNO$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ) e peroxinitritos ( $ONOO^-$ ). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas. O óxido nítrico ( $NO$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) são dois importantes ERN produzidos em células. O  $NO$  é uma molécula biológica importante que participa numa série de processos fisiológicos, incluindo a sinalização neuronal, regulação da pressão sanguínea, a resposta imune, proliferação celular e da apoptose. Estas espécies têm sido implicados em várias doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. O  $NO$  reage com o superóxido para produzir  $ONOO^-$ , que é uma espécie altamente reativa capaz de participar do estresse oxidativo, nitratação e nitrosilação in vivo. Nitrito é um metabólito principal de  $NO$  e é mais estável em relação ao  $NO$ . Por conseguinte, a produção de  $NO$  em sistemas biológicos podem ser identificados utilizando concentração do nitrito (ARMSTRONG, 2002; BARREIROS et al., 2006; GUNASEKARA et al., 2012).

Devido aos fatores supracitados, dentre outros, existe um interesse acentuado pela comunidade científica em identificar e quantificar as ERO e ERN. A literatura apresenta o desenvolvimento de várias metodologias com aplicações de diferentes técnicas com o objetivo de separar, monitorar e detectar tais espécies.



Uma pesquisa relevante foi publicada por Hulvey e colaboradores. A pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento de metodologia analítica utilizando-se da construção de um microdispositivo para realizar a separação eletroforética e detectar amperometricamente peroxinitrito e outras espécies eletroativas. Esta espécie responsável pelo estresse oxidativo instiga a comunidade científica, de áreas multidisciplinares com relevante interesse em desenvolver formas de determinar a mesma (HULVEY et al., 2010).

Essa metodologia permitiu uma separação eletroforética em um tempo relativamente baixo, na ordem de 25 s para o  $\text{ONOO}^-$ , e alta resolução temporal em comparação a eletroforese capilar, que depende de vários minutos. Sendo a análise mais rápida, permite detectar o  $\text{ONOO}^-$  antes de acontecer significativa degradação, e conseqüentemente consegue aumentar a resolução temporal, permitindo localizar mais precisamente a mudança de dinâmica em sistemas químicos (HULVEY et al., 2010).

Essa demonstrou ter significativa relevância científica, pois, devido sua robustez e sensibilidade, poderá em aplicações futuras, ser usado como dispositivo para monitorar espécies transientes geradas por sistemas biológicos.

Vázquez e colaboradores desenvolveram um eletroforese em microchip híbrido PDMS/vidro com dupla detecção, amperométrica e condutométrica sem contato (VÁZQUEZ et al., 2010).

Neste trabalho o método desenvolvido foi utilizado para determinações simultâneas de espécies iônicas e eletroativas. Para isso aplicaram uma separação eletroforética dos principais metabólitos resultantes da degradação de peroxinitrito a baixo pH (3,5), sendo as espécies eletroativa, o nitrito, e a não eletroativa, o nitrato, onde conseguiram a separação em 50 s, usando ácido láctico a 30 mM e hidróxido de tetradeciltrimetilamônio (TTAOH) a 0,75 mM, como tampão transportador. Uma vantagem observada no uso simultâneo de ambos os detectores foi prever informações complementares dadas pela combinação das características individuais oferecidas por cada modo de detecção. Assim, enquanto ambos os íons eram detectados por condutometria sem contato com boa eficiência, o nitrito era, também, detectado amperometricamente de forma simultânea com um significativo

aumento na sensibilidade comparado a detecção por condutometria sem contato. Uma vantagem associada a plataforma microfluídica foi procedimento seguido na fabricação do microchip e a sensibilidade dos eletrodos. O método usado para a fabricação do eletrodo da detecção condutométrica foi muito robusto, extremamente barato se comparado a outras técnicas, simples e versátil; oferece boa flexibilidade no posicionamento do ponto de detecção ao longo do canal de separação, favorecendo a otimização do método de separação; e, a integração do eletrodo de trabalho para detecção amperométrica no microchip feito, que permite substituição fácil e simples (VÁZQUEZ et al., 2010).

Gunasekara e colaboradores explorou o uso de um eletroforese microchip de configuração de alinhamento de eletrodos “in-channel” com detecção eletroquímica utilizando um potenciostato isolado eletricamente para a separação e detecção em canais de vários ânions biologicamente importantes (GUNASEKARA et al., 2011).

Empregou-se potencial de separação com voltagem de polaridade negativa e brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB), como um modificador do tampão usado como eletrólito suporte e objetivando inverter o fluxo eletrosmótico, para a separação de nitrito, glutatona, o ácido ascórbico e a tirosina. Foi observado que quando o potencial de meia-onda mudou de aproximadamente 500 mV negativo o resultados para os padrões de nitrito e o  $H_2O_2$  foram semelhantes para as configurações “in-channel” e “end-channel”. E foram observadas eficiências de separação mais elevadas para ambas, nitrito e  $H_2O_2$  com a configuração “in-channel” de detecção. Os limites de detecção foram de aproximadamente duas vezes mais baixa e a sensibilidade foi de aproximadamente duas vezes mais elevada para a detecção de nitrito, quando comparado com a configuração “in-channel”. A aplicação deste dispositivo microfluidico para a separação e a detecção de marcadores relacionados com o estresse oxidativo foi demonstrado com sucesso (GUNASEKARA et al., 2011).

Outro trabalho relevante publicado por Gunasekara e colaboradores foi um eletroforese microchip com detecção eletroquímica utilizada para monitorizar o óxido nítrico (NO) a partir de dietilamônio (Z) -1 - (N , N-dietil - amino) diazen - 1 - ium - 1 ,2 - diolate (DEA/NO) e sal dissódico 1 - (hidrox - il - NNO - azoxi) -L- prolina (proli/NO). NO foi gerado através de hidrólise ácida dos sais NONOate. Os produtos de hidrólise ácida foram introduzidos num canal de separação de 5 cm usando

injeção “gated” e a separação foi realizada utilizando polaridade reversa e um eletrólito carreador consistindo de ácido bórico 10 mM e brometo de tetradeciltrimetilamônio 2mM a pH 11 (GUNASEKARA et al., 2011).

A detecção eletroquímica foi realizada usando um potenciostato isolado numa configuração “in-channel”. Potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho, geralmente maior do que 1,0 V vs Ag/AgCl como eletrodo de referência, permitiu a detecção direta de nitrito, NO, DEA/NO, e Proli/NO. A resolução da linha de base foi excelente para a separação de Proli/NO e NO, no entanto, foi pobre (  $1,0 \pm 0,2$  ) entre DEA/NO e NO. O nitrito estava presente em todas as amostras testadas.

Um trabalho mais recente foi publicado por Scott e colaboradores. Eles propuseram o desenvolvimento de um sensor baseado em separação todo em vidro usando microdiálise acoplada a eletroforese microchip com detecção amperométrica (SCOTT et al., 2013).

O sistema incluiu uma interface de fluxo “gated” para injetar alíquotas de amostras discretas de perfusato microdiálise no sistema de um eletroforese microchip. A detecção eletroquímica foi realizada com um eletrodo de platina com uma configuração “in-channel” usando um potenciostato eletricamente isolado. Para facilitar a ligação do eletrodo na configuração “in-channel” foi empregado um processo de fabricação, que proporcionou os eletrodos de trabalho e de referência alinhados com a superfície do vidro. Foram realizadas separações com este sensor tanto na forma normal, quanto com a polaridade invertida. O sistema foi avaliado *in vitro* para o monitoramento contínuo da produção de peróxido de hidrogênio a partir da reação da glicose oxidase com glicose. Experiências de microdiálise foram realizadas utilizando uma sonda circular BASi com um tempo de atraso total de cerca de cinco minutos e um tempo de subida de menos de 60 segundos. O principal objetivo do método proposto foi usar esse chip em conjunto com um sistema de análise portátil para o monitoramento contínuo de drogas e neurotransmissores em animais livremente vagando, como ovelhas, por exemplo (SCOTT et al., 2013).

### 3.7 Epítome dos principais métodos eletroquímicos de análises

A voltametria é uma técnica eletroquímica na qual informa qualitativamente e quantitativamente um composto ou espécie química através da resposta de uma corrente elétrica a partir de um potencial, feita durante a eletrólise de dada espécies eletroativa em uma cela eletroquímica constituída de três eletrodos (BARD; FAULKNER, 2001).

O eletrodo de trabalho é feito de material inerte ao meio, como ouro platina, carbono, mercúrio, e se for constituído de eletrodo gotejante, a técnica recebe o nome de polarografia. O eletrodo de referência, que usa-se geralmente o eletrodo de prata/cloreto de prata, deve possuir uma área superficial relativamente maior que a área do eletrodo de trabalho, este fator tem como objetivo não polarizar o eletrodo de referência para mantê-lo com potencial constante durante o processo eletroquímico, ao passo que o eletrodo de trabalho de área menor é polarizado assumindo o potencial aplicado nele (BOCKRIS, 2002).

O eletrodo chamado de contra-eletrodo ou auxiliar, o qual geralmente utiliza-se o fio de platina, foi desenvolvido para resolver as limitações das células de dois eletrodos, servindo para assegurar o sistema potencioestático, logo, ao aplicarmos uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência, sabendo primeiramente que o sistema é conectado a um amplificador operacional, a resistência do eletrodo de referência aumenta ao passo que o eletrodo auxiliar diminui, e, com isso, a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando assim, distúrbios no eletrodo de referência que funcionará sem interferências e mantendo o seu potencial constante durante a medida, podendo usar inclusive eletrodos de referência com dimensões pequenas (BRETT, C.; BRETT, A., 2001; BARD; FAULKNER, 2001; BOCKRIS, 2002).

Quando aplicamos um potencial entre os eletrodos de trabalho e referência em forma de varredura, variando a uma velocidade constante em função do tempo, o potencial e a corrente resultante são registrados concomitantemente originando o voltamograma, ou seja, a curva da corrente versus o potencial obtido (BOCKRIS, 2002; ALEIXO, 2003).

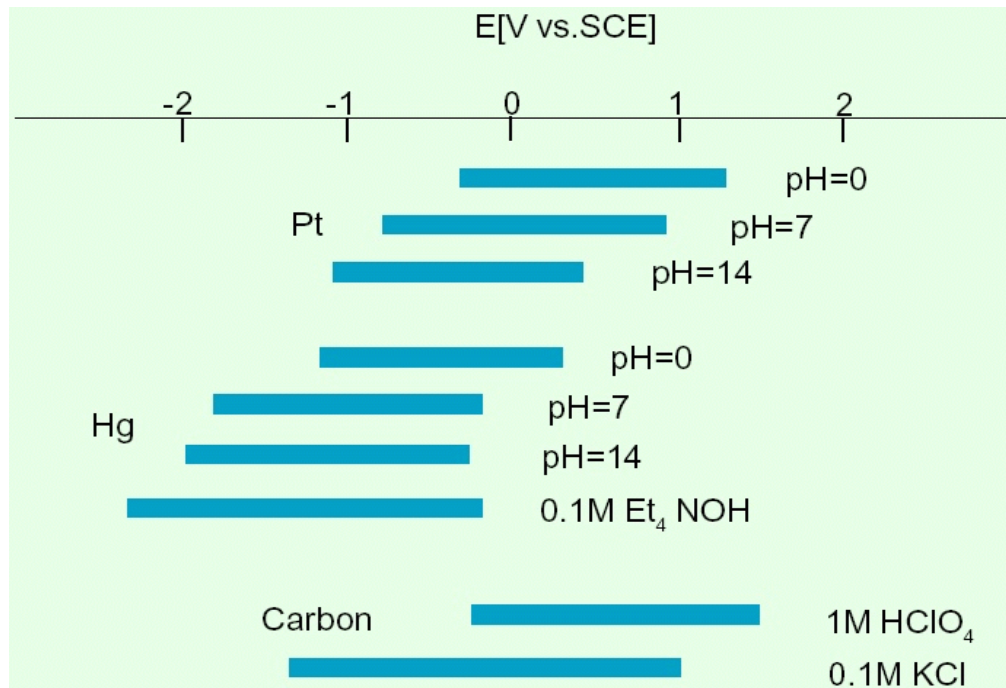
A primeira técnica voltamétrica desenvolvida foi a polarografia. Os primeiros estudos polarográficos foram feitos por Heyrovsky e Kuceras em 1922, utilizando o eletrodo gotejante de mercúrio como eletrodo de trabalho e calomelano saturado como eletrodo de referência (BARD; FAULKNER, 2001).

Se tratando de eletrodo de trabalho, o eletrodo de mercúrio gotejante, ou não, foi o mais importante por apresentar vantagens, como: faixa de potenciais de +0,3 V a -2,3 V, região de potencial que ocorrem as reações eletródicas da maioria dos íons metálicos e de considerável número de espécies orgânicas. A gota de mercúrio fica imóvel na ponta do capilar e o voltamograma é registrado nessa única gota, e deste modo ele é um eletrodo de superfície renovável, minimizando, ou até mesmo, evitando problemas, como por exemplo envenenamentos superficiais (BRAJTER-TOTH; CHAMBERS, 2002).

E, dentre os eletrodos sólidos, o eletrodo de platina é um dos mais importantes, onde, dependendo do eletrólito suporte utilizado pode atuar na região de cerca de +1,1 V a -0,5 V versus eletrodo de calomelano saturado (ECS), sendo bastante atrativo pela região anódica. Outro eletrodo sólido bastante atrativo devido sua atuação na região anódica é o eletrodo de ouro, o qual pode trabalhar em intervalos de potencial de +1,5 V a -0,8 V vs ECS. Já os eletrodos de carbono, principalmente o de carbono vítreo, é muito utilizado nos dias atuais, pois dependendo do meio utilizado, o eletrólito suporte, ele pode atuar em um intervalo de potencial de +1,5 V a -1,1 V versus ECS. Embora esses eletrodos possam ser usados na região catódica, todos eles possuem um desempenho inferior ao eletrodo de mercúrio, isso está relacionado com as propriedades que envolvem a renovação da superfície e a possibilidade de formar amálgamas com vários metais (GRIMSHAW, 2000; BRETT, C.; BRETT, A., 2001; BARD; FAULKNER, 2001; BOCKRIS, 2002; ALEIXO, 2003).

A Figura 4 apresenta a janela de potencial dos eletrodos de platina (Pt), mercúrio (Hg) e carbono (C) relacionados ao meios básico, neutro e ácido.

**Figura 4 - Janela de potencial dos eletrodos de Pt, Hg e C em diferentes pH.**



Fonte: BOCKRIS, 2002.

A Figura 4 apresenta o comportamento dos eletrodos a diferentes pH. No eletrodo de Pt o potencial anódico é deslocado para o catódico a medida que a solução se torna básica. O eletrodo de Hg apresenta um comportamento semelhante ao de Pt, no entanto, em hidróxido de tetraetilamônio (Et<sub>4</sub>NOH) 0,1 M há uma ampliação da janela de potencial. Em relação ao eletrodo de C em solução de KCl 0,1 M consegue-se uma ampliação na janela de potencial similarmente ao eletrodo de Hg.

A partir da década de 60 iniciou-se a busca de desenvolvimento de novos tipos de eletrodos de trabalho para serem usados em aplicações voltamétrica e amperométricas, como por exemplo, os eletrodos quimicamente modificados.

Do ponto de vista analítico a voltametria clássica é bastante limitada para as necessidades dos dias atuais, ela possui uma sensibilidade relativamente baixa com limite de detecção de cerca de 1  $\mu$ M. A atual conjuntura para análises pode exigir quantificação de traços com concentrações na ordem de até 1 fM. A baixa sensibilidade está diretamente ligada a corrente capacitiva, a qual é a corrente necessária para carregar a dupla camada e principal componente da corrente de fundo, que constitui a corrente residual. E essa corrente surge devido a fenômeno

relacionados com a dupla camada elétrica (BARD; FAULKNER, 2001; ALEIXO, 2003).

Uma inovação importante na busca de melhoria instrumental foi a discriminação da corrente capacitiva da faradáica, esta última é a corrente relativa à reação de oxiredução da espécie em estudo no eletrodo, e isso foi possível com o desenvolvimento das técnicas de pulso, sobretudo de pulso diferencial (BRETT, C., BRETT, A., 2001). Essa instrumentação foi desenvolvida proporcionando medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial realizados em intervalos de tempo ínfimos. E devido a corrente capacitiva ser compensada ao registrar as diferenças de corrente, houve um aumento na sensibilidade da técnica, promovendo um limite de detecção na ordem 1 nM (BOCKRIS, 2002; ALEIXO, 2003).

A voltametria de pulso diferencial é uma das técnicas eletroanalíticas mais utilizada, isso se deve às vantagens significativas inerentes à detectabilidade e resolução, comparado as outras técnicas eletroanalíticas. Porém, uma outra técnica, que do ponto de vista analítico vem sendo incorporado em vários instrumentos, inclusive comerciais, é a voltametria de onda quadrada de varredura rápida.

Essa instrumentação foi desenvolvida por Baker em 1957, no entanto, a tecnologia nessa década não favoreceu a sua utilização, e ela só foi implementada nos polarógrafos na década de 80, sobretudo a varredura rápida, a qual é conhecida, também, de onda quadrada de Osteryoung, em homenagem ao pesquisador norte-americano que a desenvolveu. A principal vantagem apresentada por esta técnica, se comparada com voltametria de pulso diferencial, é a rapidez com que o experimento é executado com sensibilidade semelhante ou um pouco melhor que a outra técnica (BARD; FAULKNER, 2001; BOCKRIS, 2002). Por exemplo, se um experimento típico de voltametria de pulso diferencial requerer três minutos para sua total execução, pode ser feita em voltametria de onda quadrada em segundos.

Mesmo com todas as vantagens das técnicas supracitadas, elas possuem grande limitação para atender as análises de traços, onde o limite de detecção pode ser menor que 1 nM. Uma possibilidade para contornar esse problema é a utilização de processos de pré-concentração do composto em análise, fazendo com que a

corrente faradáica aumente de forma a superar a corrente de fundo. Isso faz com que detecte limites inferiores a 1 nM. Com isso, a pré-concentração apresenta excelente vantagem nas análises voltamétricas, pois se torna bastante fácil e conveniente a sua utilização por poder realizar essa etapa no próprio eletrodo de trabalho. Essa técnica recebe o nome de voltametria de redissolução, anódica e catódica (BARD; FAULKNER, 2001).

Na determinação por voltametria de redissolução, o analito é eletrodepositado em um microeletrodo, geralmente a partir de uma solução sob agitação mecânica. Depois de dado tempo, que deve ser medido com precisão, interrompe-se a eletrólise, cessa a agitação e determina o analito voltametricamente. Na segunda etapa citada o analito é redissolvido ou retirado do microeletrodo, daí o nome associado ao método. Na redissolução anódica, o microeletrodo comporta-se como o cátodo durante a etapa de deposição e como ânodo durante a etapa de redissolução, que é quando o analito é oxidado de volta à sua forma original. Na redissolução catódica, o microeletrodo comporta-se como um ânodo durante a etapa de eletrodeposição e como um cátodo durante a retirada do analito (BARD; FAULKNER, 2001).

A voltametria de redissolução anódica é largamente utilizada na determinação de metais potencialmente tóxicos, levando em consideração que vários deles podem ser eletrodepositados. Nesta técnica a etapa de pré-concentração consiste de uma eletrodeposição, com potencial constante e controlado, da espécie eletroativa em um eletrodo estático ou estacionário, conseqüentemente a essa etapa, tem-se uma etapa de repouso e uma de determinação, onde essa última consiste na redissolução de volta à solução da espécie anteriormente eletrodepositada (BARD; FAULKNER, 2001; BOCKRIS, 2002).

A voltametria de redissolução é uma técnica muito sensível e conveniente para análises de espécies traços, porém ela é relativamente restrita a metais que apresentam solubilidade no mercúrio. Esta técnica também é aplicada a alguns compostos iônicos e orgânicos, que formam compostos pouco solúveis com o mercúrio e ficam depositados na superfície do eletrodo (BOND, 1999).



A voltametria de redissolução também apresenta limitações e por isso foi desenvolvido a voltametria adsortiva por redissolução, técnica esta que é embasada por pré-concentração feita pela adsorção da espécie eletroativa de interesse na superfície do eletrodo. No caso de metais, é feito através de seus íons complexos adicionando-se à solução contendo o íon metálico um complexante, conseqüentemente, o produto complexo formado é acumulado junto à superfície do eletrodo. Com isso, a pré-concentração não depende da solubilidade do metal, como no caso da voltametria de redissolução. E, devido a essas características, essa técnica pode ser aplicada a um número ilimitado de substâncias orgânicas, precisando apenas que elas tenham propriedades de superfície-ativa e eletroativa para serem adsorvidas na superfície do eletrodo de trabalho. Quanto ao limite de detecção, pode chegar a ordem de 1 fM (BOND, 1999; CHRISTIAN; ALEIXO, 2003).

Outra técnica eletroquímica a saber é a detecção condutométrica capacitivamente acoplado sem contato ( $C^4D$ ). Ela ganhou muita popularidade como detecção usados em microchips de eletroforese desde a sua introdução em eletroforese capilar convencional (EC), em 1998 (VÁZQUEZ et al., 2010).

Em 1998 Zemann e colaboradores publicaram o trabalho sobre um detector de condutividade capacitivamente acoplado sem contato para ser aplicado em eletroforese capilar (ZEMANN et al., 1998). O detector era constituído por dois eletrodos posicionados em torno do cilindro e o revestimento de poliamida no exterior do capilar de sílica fundida, com um intervalo de detecção de 2 mm.

Os eletrodos formava um condensador cilíndrica e a condutividade elétrica da solução era medida entre os eletrodos. Objetivando minimizar a influência de reatância, que é a resistência oferecida à passagem de corrente elétrica por um indutor ou capacitor num circuito, do líquido foi utilizado uma baixa frequência ultrassônica para o acoplamento da tensão de corrente alternada. Para uma versão melhorada do detector, duas cânulas de seringa (tubo de plástico, borracha ou metal, de calibre variável, com formas e objetivos diversos, aberto em ambas as extremidades, destinado a ser introduzido no corpo), foram utilizados como eletrodos e o capilar foi simplesmente montado no tubo. Isto permite uma colocação fácil do detector em várias posições ao longo do capilar. O limite de detecção de cátions e

ânions inorgânicos foi de 200 ppb conforme para o sódio e cloreto, respectivamente (ZEMANN et al., 1998).

Silva e Lago publicaram, também em 1998, um trabalho muito relevante sobre a produção de um detector oscilométrico para ser aplicado em eletroforese capilar. Neste trabalho foi apresentado dois anéis de prata com 2 mm separados por 1 mm pintados sobre o revestimento de poli(imida) de um capilar de sílica fundida de diâmetro interno de 75  $\mu\text{m}$  e 360  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo e utilizados como eletrodos para medições oscilométrica (SILVA; LAGO, 1998).

Um gerador de função foi utilizado para aplicar um sinal sinusoidal ao longo de um dos eletrodos, a outra foi ligada a um conversor de corrente-tensão. O sinal retificado foi proporcional à entrada da célula implicando em uma função da condutividade da solução interna na região dos eletrodos . Eletroferogramas de cátions alcalinos e alcalino-terrosos mostraram boa relação sinal-ruído. As condições típicas de eletroforese, o limite de detecção para o lítio foi de 1,5  $\mu\text{M}$  , e houve boa linearidade até uma concentração de 2 mM. Detecção de condutividade indireta de sais de amônio quaternário foi conseguido usando acetato de potássio tampão de corrida, que mostrou resultados similares aos de detectores condutométricas convencionais (SILVA; LAGO, 1998).

Detecção da condutividade é uma técnica de detecção universal, que envolve a medição das diferenças de condutividade da solução de eletrólito, em comparação com a das zonas de analitos. A integração de  $\text{C}^4\text{D}$  com o dispositivo de microfluidos é bastante simples, devido à ausência de contato físico dos eletrodos de detecção, com a solução de eletrólito. Além disso, a facilidade de miniaturização e instrumentação de baixo custo têm desempenhado um papel importante no sucesso do  $\text{C}^4\text{D}$  no campo de eletroforese em microchip (VÁZQUEZ et al., 2010).

A técnica eletroquímica mais amplamente utilizada em microdispositivos de análises é a amperometria. Método eletroquímico de análise quantitativa que determina a concentração de uma solução, baseado na medida de intensidade de corrente elétrica (LUNTE et al., 1996; WANG, 2006). A detecção amperométrica tem várias vantagens para utilização com sistemas de eletroforese em microchip, por

exemplo, a facilidade de miniaturização, a sensibilidade e seletividade, e geralmente apresentam baixos limites de detecção (LACHER, 2001).

A detecção amperométrica é caracterizada pela aplicação de um potencial constante para o eletrodo de trabalho e a medição da corrente elétrica em função do tempo, conforme Equação (6). O potencial aplicado facilita as reações redox de substâncias a serem analisadas, enquanto que a corrente de saída é proporcional à concentração dos analitos (VANDAVEER IV et al., 2004). Além disso, a resposta da corrente é diretamente proporcional ao número de mols de analito oxidado ou reduzido na superfície do eletrodo de trabalho, tal como descrito pela lei de Faraday (LUNTE et al., 1996; BARD; FAULKNER, 2001; BOCKRIS, 2002):

$$i_t = \frac{dQ}{dt} = nF \frac{dN}{dt} \quad \text{Equação (6)}$$

onde  $i_t$  é a corrente gerada na superfície do eletrodo no tempo  $t$ ,  $Q$  é a carga na superfície do eletrodo,  $t$  é o tempo,  $n$  é o número de moles de elétrons transferidos por mols de analito,  $N$  é o número de mols de analito oxidados ou reduzidos, e  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ). Amperometria é um modo popular de detecção em eletroforese capilar e microchip, devido à sua facilidade de operação e contribuições para que haja mínima corrente de fundo. A seletividade é conseguido através da escolha criteriosa do potencial de detecção, com o potencial ótimo sendo selecionado por meio da construção de um voltamograma hidrodinâmico (LUNTE et al., 1996; BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, C.; BRETT, A.; 2001; BOCKRIS, 2002).

### 3.8 Descrição e evolução dos eletrodos de pasta de carbono

Com o desenvolvimento das técnicas eletroanalíticas, os sensores eletroquímicos tornaram-se mais atrativos nas diversas áreas de pesquisas. Assim, vários trabalhos vêm sendo publicados em revistas especializadas, nas quais autores descrevem diferentes tipos de eletrodos utilizados na quantificação de espécies eletroativas (CRESPILHO; REZENDE, 2004).

O primeiro eletrodo de pasta de carbono foi desenvolvido por Ralph N. Adams, do Departamento de Química da Universidade de Kansas, Lawrence-Kansas, em 1958. Essa descoberta está ligada à busca de um eletrodo de carbono com possibilidade de ser renovável para ser aplicado em uma ampla faixa de potenciais positivos, pois o eletrodo de mercúrio metálico, de gota pendente ou não, é impossibilitado à aplicação devido à sua oxidação (ADAMS, 1958; VIEIRA; LUPETTI; FATIBELLO-FILHO, 2003). Em 1963, Adams utilizou pela primeira vez o eletrodo de pasta de carbono para determinar ouro e prata, utilizando a voltametria de redissolução anódica (ADAMS, 1958).

A pasta de carbono é uma mistura de carbono grafite com um aglutinante, geralmente nujol (óleo mineral), para compactar o pó e deixá-la mais uniforme possível. Adams utilizou uma proporção de 1 g de carbono grafite e 7 mL de bromoformio (ADAMS, R. N., 1958). Considerações relevantes a serem seguidas são a uniformidade no tamanho do pó do grafite, a alta pureza química e a baixa capacidade de adsorção de oxigênio e impurezas eletroativas. O aglutinante deve ser um líquido orgânico quimicamente inerte, de baixa volatilidade, livre de impurezas, eletroativa, imiscível com a solução do analito e com o eletrólito, ser bastante aglomerante para preencher os espaços entre as partículas do grafite (VIEIRA; LUPETTI; FATIBELLO-FILHO, 2003).

Em 1963, Theodore Kuwana e William G. French do Departamento de Química da Universidade da Califórnia, Riverside-Califórnia, investigaram o comportamento eletroquímico de líquido orgânicos incorporados à pasta de carbono (KUWANA; FRESCH, 2006).

Eles relataram que a eletro-oxidação ou eletro-redução de compostos orgânicos é frequentemente desempenhada em solventes orgânicos por causa das limitações de solubilidade. Porém, é frequente a formação de íons a partir dos compostos que oxidam ou reduzem, os quais, se solúveis e estáveis com sais, podem ser dissolvidos e eletrolisados em soluções aquosas; e se, o produto desta posterior eletrólise, por outro lado, for insolúvel em meio aquoso, dificulta a interpretação dos dados porque a corrente-potencial irregular é causada pela precipitação ou formação de filme na superfície do eletrodo (KUWANA; FRESCH, 2006).

Contornando este problema, foram eletrolisados vários compostos orgânicos em solução aquosa de um eletrodo de pasta de carbono, os quais foram intimamente misturados com compostos orgânicos insolúveis (KUWANA; FRESCH, 2006). A partir disso, surge o conceito de agente modificador, definido como qualquer espécie química com propriedades de melhorar a sensibilidade e a estabilidade de um eletrodo de pasta de carbono.

A denominação eletrodo quimicamente modificado foi utilizado inicialmente por Moses e colaboradores, do Laboratório de Química Kenan da Universidade de Carolina do Norte em 1975, onde eles modificaram eletrodos de SnO<sub>2</sub> com aminas, piridil e ligantes etilenodiamina e monitoraram a reação e confirmação da interação química, principalmente com aminas, com Espectroscopia Fotoelétrica de Raio-X (MOSES, 1975;).

O principal objetivo da modificação de eletrodos é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo conseqüentemente, o desenvolvimento de eletrodos mais versáteis para vários fins e aplicações, tais como catálise de reações orgânicas e inorgânicas e transferências de elétrons em moléculas de interesse. Segundo a literatura, a maior parte de aplicações de eletrodos quimicamente modificados envolve técnicas voltamétricas ou amperométricas, ou ainda a utilização como eletrodos de íon-seletivos (PEREIRA et al., 2002).

A primeira modificação em eletrodo de pasta de carbono com enzimas foi proposto por Wojciech Matuszewski e Marek Trojanowicz do Departamento de Química da Universidade de Warsaw, Pasteura-Polônia em 1988. Eles prepararam o eletrodo de pasta de carbono modificado com a mistura de 100 mg de pó de grafite, 5 mg de glucose oxidase e 10 mL de óleo de silicone. A determinação foi feita amperometricamente, obtendo um limite de detecção de 20 µM de glucose para cada 750 µL de volume de amostra. Obtiveram uma frequência analítica de 120 amostras por hora e uma estabilidade do sensor desenvolvido de 3 semanas sem diminuição significativa na sensibilidade (MATUSZEWSKI; TRAJANOWICZ, 1988). A partir dessa primeira modificação, várias outras modificações foram desenvolvidas utilizando diversos materiais biológicos.

O desenvolvimento de eletrodo de pasta de carbono modificado quimicamente possui como relevantes e atraentes vantagens de melhorar seletividade e diminuir o limite de detecção do analito de interesse; o procedimento é geralmente simples; a regeneração da superfície do eletrodo é feita através da renovação da pasta da ponta do eletrodo; e aumentar a seletividade nas determinações, esse último muito almejado pelos analíticos (VIEIRA, 2003; BERGAMINI, 2006).

A confecção ou preparo de um eletrodo quimicamente modificado exige saber, primeiramente, quais as características analíticas, ou bioanalíticas, desejadas ou indispensáveis do sensor. Todas as pesquisas desenvolvidas, até hoje, estão concatenadas a otimização da robustez desses dispositivos. Conseqüentemente todo avanço nas pesquisas envolvendo modificação de eletrodos, possibilitou uma considerável evolução destes sensores.

No entanto, apesar de toda as vantagens apresentados, deve-se levar em consideração que a primeira etapa do processo de desenvolvimento da modificação do eletrodo é arguir se o eletrodo sem a modificação, como por exemplo o eletrodo de pasta de carbono, já não é suficientemente seletivo e quantifica as espécies na faixa de limite necessário.

## 4 EXPERIMENTAL

### 4.1 Equipamentos e acessórios:

- ✓ Potenciostato/galvanostato da Autolab® PGSTAT 12 (AUT73222) interfaceado a um microcomputador, sistema, o qual é controlado pelo software GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.7 Eco Chemie B.V. Utrecht, The etherlands;
- ✓ Potenciostato/galvanostato PalmSens da Electrochemical Sensor Interfaces, Versão 1.11;
- ✓ Potenciostato isolado modificado modelo 8151BP 2-canal Wireless (Pinnacle Tecnologia, Lawrence, KS, USA);
- ✓ Fonte de alimentação de alta voltagem com 4 canais (HV Rack, Ultravolt Inc., Ronkonkoma, NY, USA), controlada por um software de escrita em LabVIEW (National Instruments, Austin, TX, USA);
- ✓ Máquina de gravação a laser, de resolução de 1200 dpi, do fabricante Gravograph Industrie International, Saint Luc-França, modelo L-Solution 100, BP15-Z.I.-10600 La Chapelle;
- ✓ Prensa termostática;
- ✓ Microscópio eletrônico invertido (Nikon Ti-L, Melville, NY, USA).
- ✓ Cuba de ultrassom da Cristófoli Equipamentos de Biossegurança LTDA (USC070236) de capacidade 2,5L, frequência ultrasônica 42kHz e potência 220V;
- ✓ Micropipetas Eppendorf de volume variável;
- ✓ Ponteiras de micropipeta (Eppendorf);
- ✓ Balança analítica MICRONAL MARK 200;
- ✓ Vidrarias em geral, tais como: béqueres, balões, provetas, pipetas, entre outras vidrarias de diversas graduações volumétricas;
- ✓ pHmetro (Marte Mark 2000);
- ✓ Papel indicador universal pH 0 – 14 (Merck);
- ✓ SU-8 10 fotorresiste e SU-8 revelador (Micro-Chem, Newton, MA, USA);
- ✓ Fotorresiste AZ 1518 e 300 MIF revelador (Mays Química, Indianapolis, IN, USA);

- ✓ Máscara de filme fotolitográfico (50.000 dpi; Infinite Graphics, Minneapolis, MN, EUA), de 100 mm (4 ") de silício (Si) (wafers de silício, Boise, ID, EUA), vidro de borossilicato flutuador (4" x 1.1 mm; precisão de vidro e óptica, Santa Ana, CA, USA);
- ✓ Coater de rotação 100 Cee (Brewer Science, Rolla, MO, USA);
- ✓ Chapa de aquecimento programável (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA);
- ✓ AutoCad LT 2004 (Autodesk, San Rafael, CA, USA);
- ✓ Impressora para filme de transparência com resolução de 50.000 dpi (Infinite Graphics, Minneapolis, MN, USA);
- ✓ Fonte de UV de fluxo i-line (ABM, San Jose, CA, EUA);
- ✓ Substratos revestidos de platina (Pt) por película de vidro (2000 Å Pt camada sobre 200 Å Ti, Faculdade de Microfabricação, Ralph Adams Institute of Bioanalytical Chemistry, University of Kansas, KS, USA);
- ✓ Sylgard 184 Silicone Elastomer kit: PDMS (Ellsworth Adhesives, Germantown, Wisconsin, EUA), titânio (Ti ) etchant (TFTN; Transene, Danvers, MA, USA);
- ✓ Fio de cobre (calibre 22; Westlake Hardware, Lawrence, KS, USA);
- ✓ Pasta coloidal de Ag (Ted Pella, Redding, CA, EUA);
- ✓ MiliQ ( 18,3 MΩ cm) (Millipore, Kansas City, MO, USA);
- ✓ Perfurador de biópsia de 4 mm de diâmetro (Harris Uni-core, Ted Pella Redding, CA, USA);
- ✓ Perfilador de superfície (Alpha Step-200, Tencor Instruments, Mountain View, CA, USA).

## 4.2 Reagentes e soluções utilizados

Neste trabalho todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico, ou P. A., da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), Fisher Scientific (Fair Lawn , NJ, EUA), Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI), Vetec Química (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, BR) e Merck (São Paulo, SP, BR), e as soluções foram preparadas em água deionizada.

1. Ácido clorídrico concentrado, HCl.
2. Ácido nítrico concentrado, HNO<sub>3</sub>.
3. Cloreto de potássio, KCl.



4. Ferricianato de potássio,  $C_6N_6FeK_3$ .
5. Serotonina (5-hidroxitriptamina),  $N_2OC_{10}H_{12}$ .
6. Acetaminofeno (paracetamol),  $C_8H_9NO_2$ .
7. Tetraborato de sódio (bórax),  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ .
8. Nujol (petrolato líquido).
9. Carbono grafite em pó.
10. Nitrito de sódio,  $NaNO_2$ .
11. Ácido bórico,  $H_3BO_3$ .
12. Brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB),  $C_{17}H_{38}NBr$ .
13. Tirosina (ácido(S)-2-Amino-3-(4-hidroxifenil)-propanoico),  $C_9H_{11}NO_3$ .
14. Acetona,  $CH_3COCH_3$ ;
15. Álcool isopropílico (IPA - isopropyl alcohol),  $C_3H_7OH$ .
16. Peróxido de Hidrogênio 30%,  $H_2O_2$ .
17. Hidróxido de sódio,  $NaOH$ .
18. Peroxinitrito,  $ONOO^-$ .
19. Glutationa (GSH ou forma reduzida), (ácido (2S)-2-amino-4-(((1R)-1-[(carboximetil) carbamoyl]-2-etil-sulfonil] carbamoyl} butanoico),  $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ .
20. Ácido ascórbico (AA), (3-oxo-L-gulofuranolactona (5R)-5-[(1S)-1,2-diidroxietil]-3,4-diidroxifurano-2(5H)-ona),  $C_6H_8O_6$ .
21. Cisteína (Cis), ((R)-2-amino-3-sulfanil-propanóico),  $C_3H_7NO_2S$ .
22. Triclorometano (Clorofórmio),  $CHCl_3$ .

#### 4.3 Preparo das soluções de peroxinitrito e das amostras de perfusato de sangue de ovelhas e ratos:

**Solução de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) 42 mmol L<sup>-1</sup>** – Após a compra, o padrão de  $ONOO^-$  de concentração 420 mM (dados fornecidos pelo fabricante), foi estocado sob uma temperatura de -80 °C e antes do preparo da solução foi colocado no gelo até o total degelo; após o total degelo; em seguida a solução padrão foi diluída em tampão ácido bórico (10 mM) pH 11 contendo TTAB (2 mM) a 42 mM. O preparo dessa solução era realizado sempre no momento da análise porque o  $ONOO^-$  é muito instável. Todas as outras concentrações foram diluídas a partir dessa última concentração.

**Preparo das amostras de sangue de ovelhas e ratos** - As amostras de sangue de ovelhas e ratos foram coletados por meio de uma sonda de microdiálise loop BASi com membrana 1 cm de comprimento e peso molecular de corte de 30 kDa. A sonda tem 16 cm de tubulação fixa que proporciona um tempo de atraso de 5 minutos para uma taxa de fluxo de 1  $\mu\text{L}$  por minuto. Foi utilizada para a perfusão uma bomba de seringa do tipo cateter de microdiálise (CMA) a uma taxa de fluxo de 1  $\mu\text{Lmin}^{-1}$ . A primeira hora era apenas linha de base de perfusão do tampão fosfato 50 mM (pH = 7,6) com NaCl 119 mM. Depois, a seringa foi ligada a nitroglicerina injetável, a qual possui efeitos vasodilatadores periféricos e consequente redução das necessidades de oxigênio pelo miocárdio, a uma concentração de 4,8  $\text{mg mL}^{-1}$ , e a coleta de amostras foi realizada durante 2 horas. O perfusato foi coletado em intervalos de 10 minutos para que cada vial (frasco) obtivesse um volume de amostra coletada de 10  $\mu\text{L}$ . Foi usado o mesmo procedimento de coleta de amostra tanto para as ovelhas, quanto para os ratos.

#### **4.4 Preparo do eletrodo de pasta de carbono**

O preparo da pasta de carbono, segundo a literatura, geralmente tem uma proporção de 30% de óleo mineral e 70% de carvão ativado em pó. No entanto, essa proporção não foi favorável para realizar detecções amperométricas para volumes de soluções na escala de  $\mu\text{L}$ . Assim, a pasta de carbono foi preparada a partir de carvão ativado em pó, nujol como óleo mineral, utilizando a seguinte proporção: 20% de óleo mineral, nujol, adicionado à 80% de carvão ativado em pó. Isto implicou em concentração de: carvão ativado 0,80  $\text{mgmg}^{-1}$  (%m/m) e 0,20  $\text{mgmg}^{-1}$  (%m/m). (ADAMS, 1958; CRESPILO; VIEIRA; LUPETTI; FATIBELLO-FILHO, 2003; REZENDE, 2004)

O preparo da pasta exigiu alguns cuidados para se obter êxito na repetitividade e na reprodutibilidade. O primeiro está ligado à forma de pesagem dos constituintes da pasta, onde a melhor forma foi pesar os dois constituintes juntos, pois a pesagem separada não garantia a massa real do carvão ativado e do óleo quando tivéssemos que juntá-los para transformar em pasta.

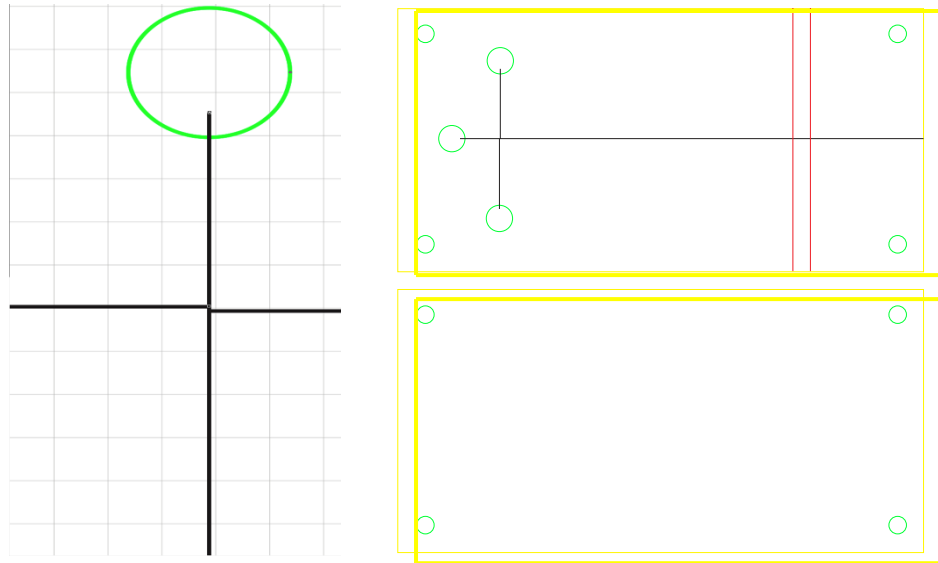
O segundo está ligado à mistura dos constituintes, que deve ser a mais homogênea possível, isso envolve também a quantidade de nujol, porém quanto mais nujol for colocado menos condutora, será a pasta, atrapalhando conseqüentemente a resposta eletroquímica desejada. A melhor forma de se obter êxito no quesito condutância foi colocar a quantidade de óleo mineral sobre o carvão ativado e macerar até se tornar em uma pasta homogênea e compacta. O terceiro foi colocar a pasta no eletrodo de forma compacta para permitir boa condutância, para isso foi utilizada uma ponteira de micropipeta eppendorf de 200  $\mu\text{L}$ , onde a pasta foi pressionada para ficar compactada e, conseqüentemente, tornar-se bom condutor.

Por último foi colocado um conector de ouro, soldado em fio de cobre, em contato com a pasta; o qual serviu como contato entre a pasta e o transdutor.

#### **4.5 Fabricação do microchip de PMMA**

A fabricação do microchip foi realizada em três etapas. A primeira etapa foi direcionada ao *design* do chip, onde usou-se um programa de computador de fácil manuseio, o CorelDRAW X5, conforme mostrado na Figura 5. O desenho foi feito dividindo o microchip em duas partes: primeiramente os microcanais foram desenhados em formato de cruz num retângulo de dimensões 3,0 x 6,0 cm, onde o maior microcanal, equivalente a parte vertical da cruz, mede exatamente 4,5 cm, o menor, equivalente a parte horizontal da cruz, exatamente 1,5 cm, e em três das quatro extremidade da cruz foi feito um círculo de 3,0 mm de diâmetro para servir de reservatório. No segundo momento do desenho foi feito a base retangular com dimensões iguais a parte contendo os microcanais, 3,0 x 6,0 cm.

**Figura 5 - Designe do chip feito no CorelDRAW X5 e a forma ampliada da intersecção dos microcanais.**



Fonte: Autor, 2011.

Na segunda etapa foi realizada a gravação e o corte do chip anteriormente desenhado no substrato de poli(metil metacrilato) (PMMA) de 2 mm de espessura. Isso foi possível utilizando a Máquina de Gravação a Laser de CO<sub>2</sub>. Esta máquina foi interfaceada a um microcomputador, onde cada cor referente ao desenho (feito no CorelDRAW X5) foi relacionado com a potência do laser (profundidade do corte desejado) e a ordem de ação da máquina. Assim, primeiro eram feitos os microcanais, seguido dos três reservatórios e os quatro orifícios nas extremidades e por último o corte do microchip. Os orifícios nas extremidades foram idealizados para facilitar o alinhamento das duas faces do microchip antes da selagem irreversível.

A cor preta do desenho representa, para o programa utilizado no interfaceamento, a primeira ação e menor potência e foi utilizado para a construção dos microcanais. As cores amarela e verde do desenho tem a mesma potência, sendo diferente apenas a ordem de ação, onde a primeira ação foi referente a cor verde e a segunda a amarela. Essa ordem foi feita estrategicamente para obter a reprodutibilidade no corte dos reservatórios. Uma vez que a gravação e os cortes eram feitas na chapa de PMMA, cortando primeiro o microchip, o mesmo não ficava de forma fixa para permitir a reprodutibilidade no corte dos orifícios (reservatórios)

de um microchip para outro, logo eram feitos primeiro os reservatórios e em seguida o corte do microchip. As linhas vermelhas não foram utilizadas para esse sistema.

Na terceira etapa foi otimizada e efetivada a selagem das duas partes do chip microfluídico, uma lisa sem desenho, e outra com os microcanais e orifícios para reservatórios.

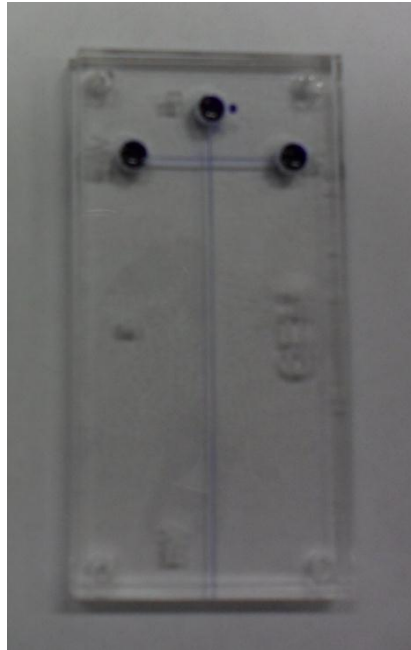
A selagem seguiu os seguintes passos:

1. Limpeza das duas partes do microchip com água deionizada, por 1 min, no ultrassom;
2. Limpeza, por 1 min, com isopropanol no ultrassom;
3. Secagem das placas usando ar comprimido;
4. Espalhamento de 60  $\mu\text{L}$  do selador dibutil ftalato (DBP) a 10% (m/v) em isopropanol na parte lisa do microchip para evitar que os microcanais fossem obstruídos;
5. Após espalhamento o microchip com o selador foi deixado por 2 min sob temperatura ambiente para evaporar o isopropanol;
6. O microchip foi colocado em uma prensa termostática por 10 min a uma temperatura de 90 °C, sob uma pressão constante;
7. A temperatura da prensa termostática foi diminuída para 25°C e então foi retirada a pressão da prensa.

Após a selagem do microchip foi colocado azul de bromotimol nos microcanais para melhorar a visualização no microscópio óptico, com o objetivo de observar se os microcanais estavam obstruídos pelo selador.

Na Figura 6 está demonstrado o microchip montado com os microcanais preenchidos com azul de bromotimol.

**Figura 6 - Imagem do microchip montado com os microcanais preenchidos com azul de bromotimol.**



Fonte: Autor, 2011.

#### **4.6 Construção do suporte para o microchip de PMMA**

A fabricação do suporte para o microchip foi realizada em três etapas semelhantes à fabricação do microchip.

Assim como no microchip, a primeira etapa foi direcionada ao design, onde foi usado o mesmo programa, CorelDRAW X5. O desenho foi feito dividindo o suporte em dez partes distintas e de tamanhos e formas diferentes.

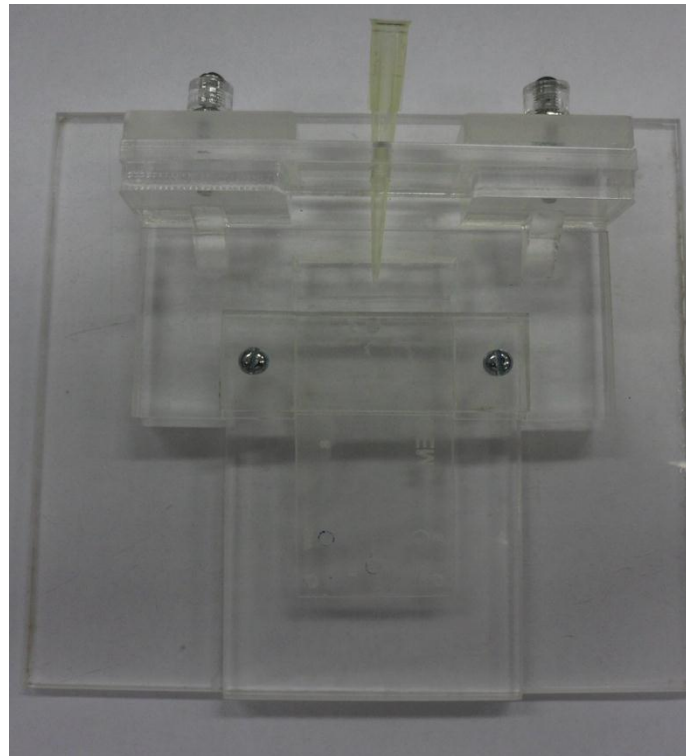
Na segunda etapa foi realizada a gravação e o corte do suporte desenhado no substrato, também, de PMMA de 2 mm de espessura. Foi utilizada a mesma máquina de gravação a Laser.

Na terceira etapa montou-se o suporte colando as partes com clorofórmio, de forma a ter partes fixas e outras móveis. As partes fixas foram coladas deixando um espaço para encaixar o microchip de forma que deixasse espaços nas laterais, no entanto esse espaço foi feito de uma maneira que permitisse aproximar a extremidade do microchip, a qual possuía o final, ou saída, do microcanal

responsável pelo contato com o eletrodo e o reservatório do descarte e consequentemente fazer a detecção. Já as partes móveis foram feitas para: uma delas servir como suporte superior do chip para gerar pressão e, consequentemente, não ter vazamento por baixo, para isso foi colocado dois parafusos para unir a parte móvel com a parte fixa; a outra parte móvel é o suporte do eletrodo de trabalho, que nesse caso foi usado um eletrodo de pasta de carbono, a parte móvel do suporte foi confeccionado para facilitar o alinhamento do eletrodo com o orifício do microchip, onde haveria a saída das espécies em análise para o reservatório do descartes. As dimensões do suporte, já montado, foram de 12,5 x 13,5 cm.

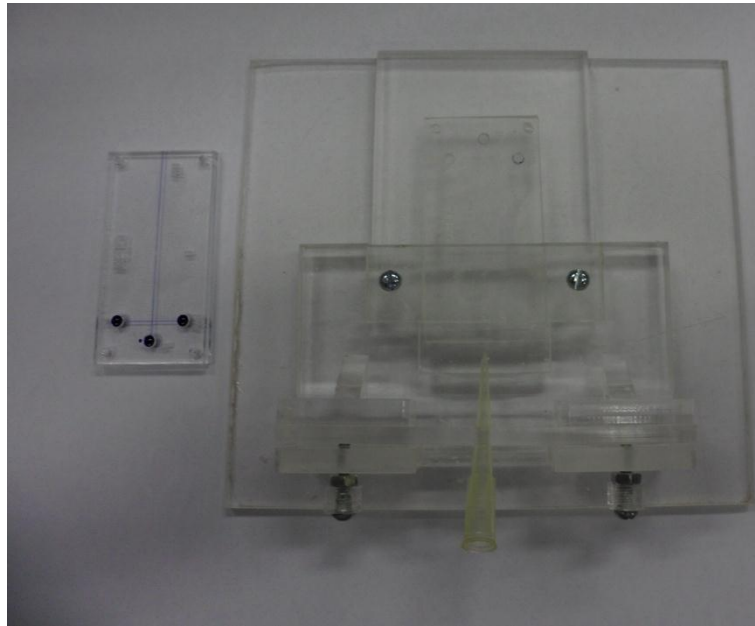
Nas Figuras 5 e 6, estão demonstradas a base dos microchips montada, imagem da parte frontal e da parte de trás, respectivamente.

**Figura 7 - Imagem frontal da base montada dos microchips.**



Fonte: Autor, 2011.

**Figura 8 - Imagem da parte de trás da base montada dos microchips.**



Fonte: Autor, 2011.

#### **4.7 Fabricação do microchip híbrido PDMS/vidro**

A fabricação do disposto microfluídico baseado em PDMS/vidro foi descrita anteriormente pelo grupo da Profa. Susan M. Lunte, dentre outros (MARTIN et al., 2000; FISCHER et al., 2009; LI et al., 2010; GUNASEKARA et al., 2011; GUNASEKARA et al., 2012; ZENG et al., 2011; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2012; WANG; BI, 2013). Brevemente, o fotorresiste negativo SU-8 10 (para os canais eletroforéticos) foi revestido por rotação em um substrato de Si de 100 mm para uma espessura de  $15 \pm 1 \mu\text{m}$  usando um *coater* de rotação modelo 100 Cee. O substrato foi então transferido para uma chapa quente programável para curar suavemente a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 minutos e depois a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 min. Os *designs* dos canais microfluídicos foram criados usando um AutoCad LT 2004 e impresso em um filme de transparência com uma resolução de 50.000 dpi. O substrato foi revestido com filme transparente e expostas a  $344 \text{ mJ/cm}^2$  utilizando uma fonte de UV de fluxo i-line. Após a exposição à radiação UV, o substrato foi curado a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 min e  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 min. O substrato foi, então, desenvolvido em SU-8 revelador, lavado com álcool isopropílico (IPA), e secado sob atmosfera de Nitrogênio. Um último "*hard bake*" foi realizado a  $175 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 h. A espessura do



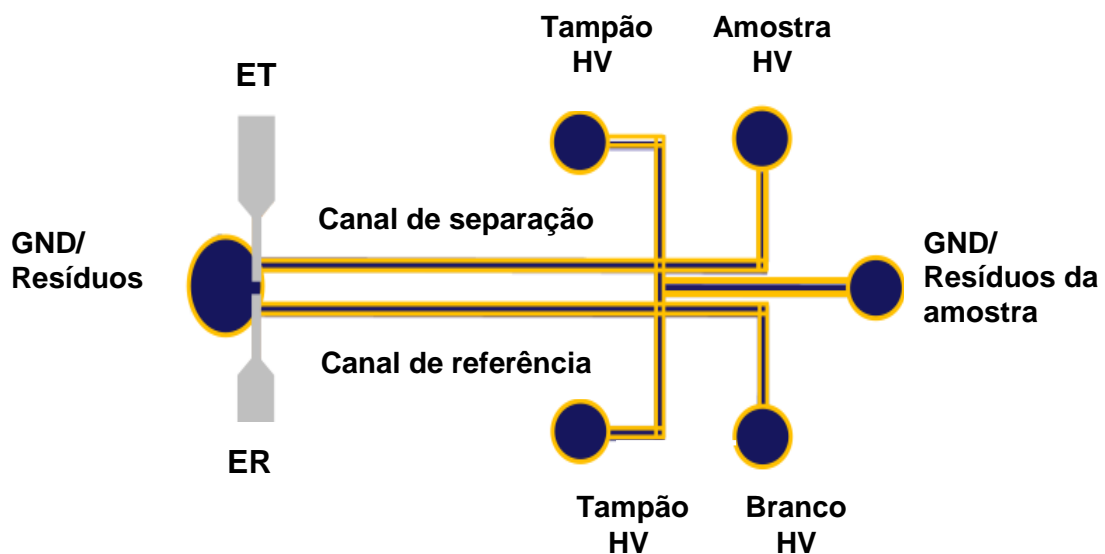
fotorresiste aumentado (levantado), o que corresponde à profundidade dos canais de PDMS, foi medida com um perfilador de superfície. As microestruturas de PDMS foram feitas por moldagem de uma mistura 10:1 de PDMS elastômero e agente de cura, respectivamente, sobre a master (mestre) modelador de Si.

O *design* do microdispositivo que foi moldado apresenta canal duplo, sendo um deles o canal de separação e o outro o canal de referência ou branco, ambos medindo 3,5 cm a partir da intersecção para o final dos canais de separação e referência e os braços laterais mediram 0,75 cm de comprimento. A largura e a profundidade dos microcanais eletroforéticos foram de 40 e 15  $\mu\text{m}$ , respectivamente, exceto o canal de resíduos de amostra que tinha 80  $\mu\text{m}$  de largura e comprimento de 0,9 cm. Os microcanais que representam os braços laterais do microchip possuem dimensões: 0,75 cm de comprimento, 40  $\mu\text{m}$  de largura e 15  $\mu\text{m}$  de profundidade. E para a confecção dos 6 reservatórios foram feitos furos no polímero bastante simétricos utilizando para isso um perfurador de biópsia de 4 mm de diâmetro, exceto para o reservatório de resíduos/GND, que era de 6 mm de diâmetro, e isso se fez necessário para diminuir os efeitos de campo produzido pela alta tensão aplicada nos canais de separação e referência.

Finalizando essa etapa, o substrato de PDMS contendo duplo-canal, canal de separação e canal de referência, foi então selado reversivelmente sobre vidro de borossilicato plano contendo eletrodo de trabalho de Pt medindo 15 ou 50  $\mu\text{m}$  de largura e um eletrodo de referência também de 15 ou 50  $\mu\text{m}$  e de Pt. Em outra secção abaixo foi feita descrição da fabricação desses eletrodos. Os eletrodos de Pt de trabalho e de referência foram cuidadosamente alinhados nos canais de separação e de referência (dentro do canal cerca de 1 a 4  $\mu\text{m}$ ) com o auxílio de um microscópio eletrônico invertido.

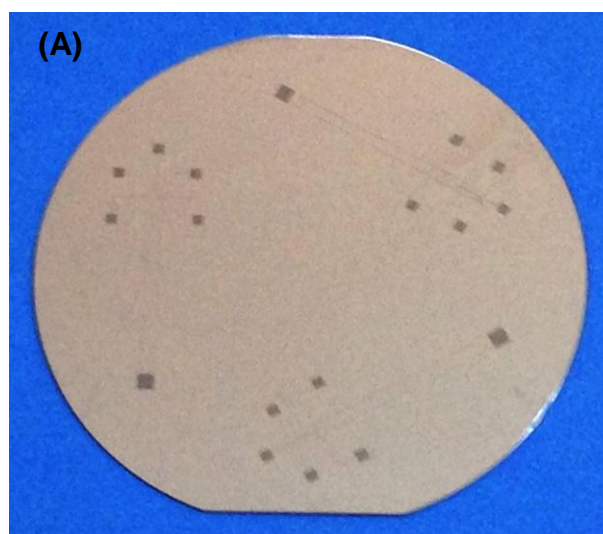
Nas Figura 9 e 10 são apresentas o esquema ilustrativo do sistema microfluídico e imagens fotográficas dos moldes utilizadas para a produção das máscaras com microcanais de PDMS.

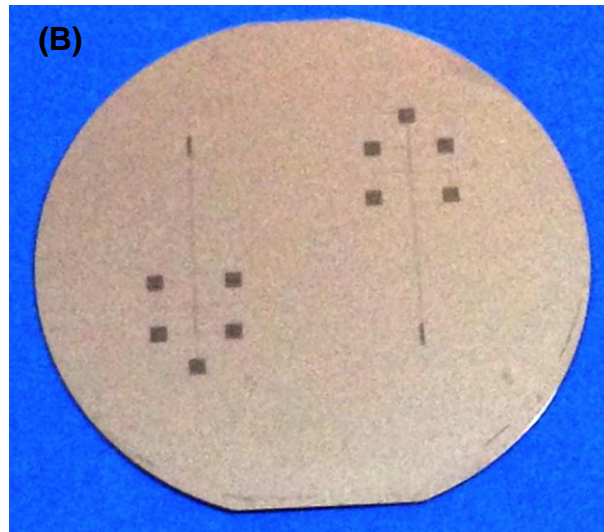
**Figura 9** - Ilustração esquemática do sistema de microcanais no microsistema eletroforético (MSE) de duplo-canal, com uma configuração dentro do canal (*in-channel*) e detector eletroquímico. O canal duplo tem comprimento: 3,5 cm de canal de separação e canal de referência (a partir da intersecção dos canais com a extremidade do canal de separação) e 1,0 cm de braços laterais. Todos os canais têm a mesma secção transversal de dimensões de 40  $\mu\text{m}$  de largura e 15  $\mu\text{m}$  de profundidade, com exceção do canal de resíduos de amostra que é de 80  $\mu\text{m}$ . Todos reservatórios tem um diâmetro de 4 mm, o que é equivalente a um volume de 20  $\mu\text{L}$ , com exceção do reservatório de resíduos/GND, que é cerca de 50  $\mu\text{L}$ .



Fonte: Modificado de CHEN; HAHN, 2007.

**Figura 10** - Imagens fotográficas dos moldes para o microchip de PDMS. A diferença entre as duas imagens é a distância entre os canais de separação e trabalho, em (A) é 160  $\mu\text{m}$  e em (B) 400  $\mu\text{m}$ .





Fonte: Autor, 2012.

#### 4.8 Fabricação dos eletrodos de platina (Pt)

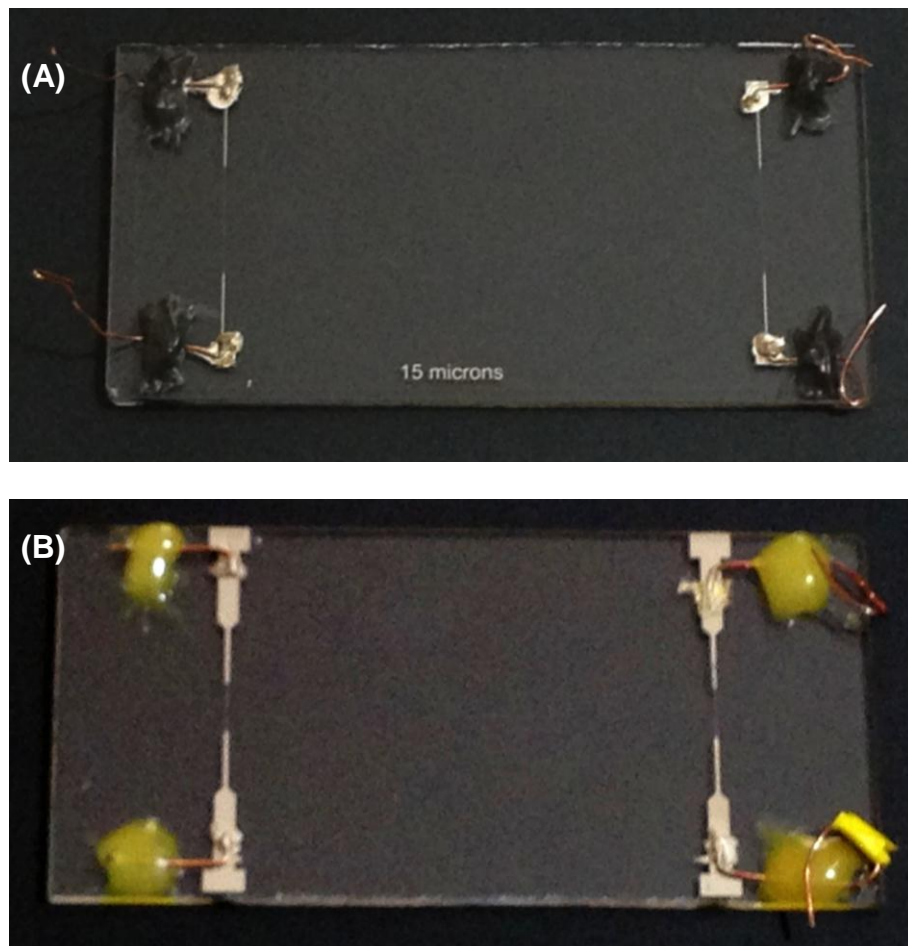
A fabricação dos eletrodos de platina já tem sido descrito por S. M. Lunte e colaboradores (MARTIN et al., 2000; COLTRO et al., 2008; GUNASEKARA et al., 2011; GUNASEKARA et al., 2012; SCOTT, et al., 2013). Os eletrodos usados nos experimentos para detecção eletroquímica consistiram de uma camada de adesão de 200 Å de Ti seguido por uma camada de 2000 Å de Pt depositado em um substrato de vidro. O fotorresiste positivo (AZ 1518) foi dinamicamente aplicado à placa de vidro com revestimento de Pt a 100 rpm durante 5 s. A rotação do coater foi então realizada em rampa até uma velocidade final de 3500 rpm e mantido por 30 s para produzir um fotorresiste de espessura de 2,0 - 2,2 µm. O fotorresiste foi suavemente cozido a 100 ° C durante 2 min e, em seguida, exposto a 86 mJ/cm<sup>2</sup> usando uma fonte de inundação UV in-line e a máscara de uma transparência adequada. Após a exposição, a placa foi desenvolvida durante 30 s em revelador 300 MIF e em seguida enxaguadas completamente com 18,2 MΩ·cm água deionizada e secou-se com gás nitrogênio.

Uma cura rígida final foi realizada a 100 °C durante 10 min. O fotorresiste remanescente no prato serviu para proteger o metal subjacente, ou da base, do procedimento de ataque ácido subsequente. A platina metálica foi removida por

imersão em água régia (3:1:6 H<sub>2</sub>O/HCl/HNO<sub>3</sub>) a 85 °C durante 30 s para remoção completa da platina.

O titânio metálico foi removido por imersão da placa de Ti em produto corrosivo realizada a 95 °C durante 45 s. Após a conclusão do processo de corrosão do metal, o fotorresiste remanescente foi removido por lavagem da placa com acetona, seguido de isopropanol, e secou-se com gás nitrogênio. Os contatos elétricos para os eletrodos de platina foram feitos com fios de cobre colados com tinta condutora de prata líquida (Ted Pella Inc., Redding, CA, EUA) e imobilizadas com cola epóxi.

**Figura 11 - Imagens fotográfica dos eletrodos de platina. (A) eletrodos de 15 µm, e (B) eletrodos de 50 µm.**



Fonte: Autor, 2012.

#### **4.9 Testes eletroforéticos para avaliar prováveis obstruções dos microcanais do microdispositivo de PMMA**

Um ponto interessante desse teste foi como carrear as espécies químicas de uma extremidade à outra, em direção e sentido do detector, do microdispositivo em cruz.

A literatura apresenta duas formas de carreamento: uma utilizando microbombas, porém no geral, a introdução de microbombas para carreamento aumenta significativamente o grau de complexidade dos dispositivos, o que pode requerer um controle exacerbado dos processos de microfabricação, assim como o seu custo.

Uma saída para microssistemas, justamente por não oferecer etapas adicionais com as microbombas, foi utilizar o bombeamento eletrocinético, que é uma das técnicas mais empregadas de manipulação dos fluidos em microcanais. A magnitude do fluxo eletrosmótico é dependente do tipo de material utilizado como substrato e das propriedades da solução que preenche os canais, tais como pH, viscosidade, constante dielétrica e força iônica; e isso se deve ao fato que o fluxo eletrosmótico está relacionado à distribuição não uniforme de íons nas regiões próximas às paredes dos canais, quando estas possuem excesso de carga. Esse tipo de mobilização do fluido favorece a aplicação do microssistema em separações eletroforéticas, como por exemplo, eletroforese de zona e eletrocromatografia, uma vez que a fonte de alta tensão já está disponível na integração da plataforma microfluídica. E o mais interessantes desse tipo de mobilização é que facilmente selecionam-se os canais por onde o fluxo deve passar pela aplicação do potencial nos reservatórios correspondentes a esses canais (COLTRO et al., 2007).

Assim, para observar se havia obstruções nos microcanais foi utilizado um teste eletroforético com os seguintes passos:

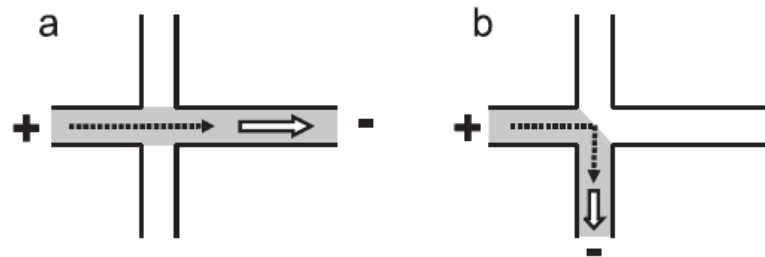
1. Preparou-se uma solução de borato 20 mM, onde essa solução iria servir como eletrólito suporte. A escolha do borato está relacionado ao pH na detecção de acetaminofeno e serotonina as quais exigem um pH

alto, e, no caso do borato o pH foi 9,2. Esse pH foi corrigido com NaOH.

2. Preencher os microcanais com a solução de borato. Para esse passo foi utilizada uma seringa de 20 mL adaptada para aplicar pressão negativa e fazer fluir a solução por todo o microcanal. No início foi preenchido dois dos três reservatórios com a solução e o terceiro reservatório foi utilizado para aplicar a pressão negativa, consequentemente preenchendo os microcanais. No entanto, com essa formatação ficava faltando o maior dos microcanais a ser preenchido, justamente por não ter reservatório. Assim, depois de totalmente preenchido a outra parte do chip, foi aplicado uma pressão negativa no orifício do microcanal que não possuía o reservatório. Finalizando com todo o chip preenchido.
3. Como os microcanais não nos dava certeza de que estavam totalmente cheios de solução tínhamos que fazer um teste para averiguar. E para isso usamos o teste eletroforético, com a ajuda da instrumentação fabricada no próprio laboratório, coordenado pelo professor José Alberto Fracassi da Silva. A instrumentação era basicamente uma fonte de alta tensão de 0 a 4kV a qual era ligada a outra fonte de 12 V, e este era ligado a um transdutor de sinal analógico-digital que era conectado a um microcomputador. O transdutor tinha fundamental importância porque ele determinava a tensão exata para a fonte de alta tensão, e então era aplicada a tensão nos eletrodos. Todo o sistema era controlado pelo software LabVIEW<sup>TM</sup> da National Instruments e que estava interfaceado ao microcomputador. Assim, foi colocado o eletrodo positivo em um dos reservatórios e o negativo no outro, se desse sinal no LabVIEW não estava obstruído. Para a extremidade do microcanal que não tinha o reservatório usinado nele próprio foi feito um reservatório na base do chip com a finalidade de fazer esse estudo e para a detecção amperométrica, uma vez que nos reservatórios usinados no chip não possui espaço suficiente para colocar todos os eletrodos.

A Figura 12 demonstra o fluxo eletroforético após aplicação de alta tensão. Nos esquemas **a** e **b** estão representados o sentido da mobilidade do fluxo eletroforético assumirá sempre o sentido do polo positivo, eletrodo positivo, para o polo negativo, eletrodo negativo.

**Figura 12 - Esquema demonstrando a aplicação da tensão com seus respectivos sentidos de fluxo eletroforético.**



Fonte: Modificado de Coltro et al., 2007

#### 4.10 Procedimento de eletroforese usando o microchip híbrido PDMS/vidro

Separações com micro sistemas eletroforético em foram realizadas em um dispositivo híbrido PDMS/vidro usando um método de injeção *gated* (MARTIN et al., 2000; ZHANG et al., 2007; GUNASEKARA et al., 2011) e a tensão de separação foi aplicada usando uma fonte de alimentação de alta voltagem. O eletrólito de base (BGE – do inglês background electrolyte) consistiu de uma solução tampão de ácido bórico 10 mM com TTAB 2 mM, ajustado para pH 11 com NaOH. Neste caso, o TTAB é apenas utilizado para reverter o fluxo eletrosmótico (EOF) e está presente numa concentração inferior a concentração micelar crítica (HULVEY et al., 2010; GUNASEKARA et al., 2011; SCOTT, 2013). O BGE foi introduzido nos reservatórios e levada através do canal sob pressão negativa até o total preenchimento dos canais do microchip de forma que não fossem observadas bolhas de ar, para isso foi utilizado um microscópio. Após o completo preenchimento dos canais com BGE usando pressão negativa, a solução-padrão ou amostra desejada foi colocada no reservatório de amostra HV, conforme Figura 9.

Quatro fios de platina foram conectados a quatro cabos de alta voltagem (HV – high-voltage) e colocados no reservatório da amostra (sample HV) com HV = -1200 V, no reservatório da referência ou branco (blank HV) com HV = -1200 V e ambos reservatórios do tampão (buffer HV) com HV = -1400 V. Dois fios de platina conectados a cabos neutros (ou cabos de aterramento – HV = 0 V) foram colocados nos reservatórios dos resíduos (GND/waste e GND/sample waste), tal como mostrado na Figura 9.

A injeção das soluções padrão e branco (referência) foi realizada a partir da aplicação de alta-voltagem, já supracitadas, nos reservatórios em um intervalo de 1 s seguindo o sentido e a direção de fluxo das soluções dos reservatórios Sample HV e Blank HV para o reservatório GND/Sample waste. Uma Injeção do tipo *gated* foram realizadas por flutuação da alta-voltagem em ambos os reservatórios Buffer HV de forma sincronizada entre eles e os reservatórios *Sample HV* e *Blank HV*, a qual permitiu que a alta-voltagem em ambos os reservatórios *Sample HV* e *Blank HV* entregasse as soluções da amostra e do branco nas intersecções dos canais de separação e referência do microchip para em seguida serem carreadas pelas soluções tampão seguindo sentido reservatório GND/Waste. Para parar uma injeção, a alta-voltagem em ambos reservatórios *Buffer HV* foi restabelecida.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES – PARTE I

Dispositivos microfluídicos são de interesse considerável devido ao seu elevado grau de integração, portabilidade, o mínimo consumo de reagente, alto desempenho e velocidade. Eles são bastante promissores para análises biomédicas e farmacêuticas, diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental, investigações forenses, dentre outros (MANZ et al., 1992).

Inicialmente a maioria dos dispositivos microfluídicos foram fabricados utilizando vidro ou silício fazendo uso das técnicas fotolitográficas. No entanto, a sua aplicação se torna limitada por causa do alto custo e a limitação na modificação geométrica dos microcanais. Polímeros são menos caros e estão se tornando os materiais mais promissores para a fabricação de dispositivos microfluídicos com tecnologias de replicação em massa, tais como moldagem por injeção e estampagem a quente. Uma ampla variedade de materiais poliméricos têm sido avaliados para a fabricação de microchips em vez de vidro, um deles é o poli(metacrilato de metilo) (PMMA) (DUAN et al., 2010).

Nesta tese foi utilizada a estratégia de ligação assistida por plastificante para o fabrico de um dispositivo microfluídico de PMMA e de uma base para o microchip objetivando facilitar as análises, feita com o mesmo material. Os microchips, os microcanais e a base foram fabricados por laser de CO<sub>2</sub>. Subsequentemente, as placas de canal de PMMA e as coberturas de PMMA em branco foram coladas em conjunto a uma temperatura de 90 °C usando o plastificante. A facilidade, simplicidade, versatilidade e baixo custo da colagem assistida por plastificante, torna esse método extremamente atraente para produção de dispositivos microfluídicos de PMMA. A viabilidade e desempenho do microchip com base (suporte) obtidos foram avaliados através da detecção de serotonina e paracetamol por eletroforese em microchip usando detecção eletroquímica com eletrodo de pasta de carbono.

A seguir estão escritos os estudos de otimizações experimentais realizados na tentativa de tornar o método proposto mais seletivo e sensível.

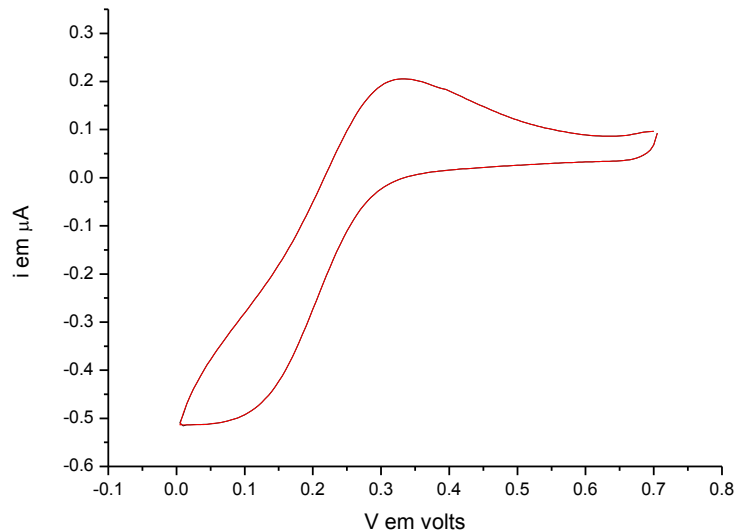
### 5.1 Otimização do eletrodo de pasta de carbono

Conforme descrito anteriormente, o eletrodo de pasta de carbono foi usinado em uma ponteira de pipeta automática de 200 µL com um fio fino de cobre servindo

como contato. Existiu uma dificuldade inicial para colocar a pasta de carbono na ponteira porque o canal da ponteira era muito estreito e dificultava a etapa de compactamento da pasta. Depois de sanado esse problema surgiu outro, como o canal era muito estreito, depois que compactava o óleo mineral escorria para a ponta do eletrodo, conseqüentemente, atrapalhava o processo eletroquímico por dificultar a condutância elétrica. O óleo mineral era adicionado na pasta em quantidade percentual, no caso 30% (m/m), e para corrigir o problema tivemos que diminuir a quantidade de óleo mineral de forma que não escorresse para a ponta do eletrodo e que continuasse compactando. Assim, conseguimos otimizar para uma proporção de 20% (m/m) obtendo um sinal analítico melhor que o resultado da pasta com proporção 30%. Para comprovar a melhora da resolução do sinal analítico devido a proporção da massa do óleo em relação ao carvão ativado foi feita uma voltametria cíclica (VC) para avaliar o comportamento eletroquímico do eletrodo de pasta de carbono utilizando uma solução de ferricianeto 1 mM em cloreto de potássio 0,1 M.

Na Figura 13 está representado o gráfico voltamétrico, VC, do eletrodo de pasta de carbono otimizado, usando ferricianeto de potássio 1 mM. Foi utilizado um fio de platina como eletrodo auxiliar e prata/cloreto de prata saturado,  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{saturado}}$ , como eletrodo de referência. O voltamograma cíclico apresentou as características do processo redox do sistema ferricianeto de potássio, conseqüentemente, tornando-se viável para a utilização do eletrodo nos testes experimentais com os microdispositivos confeccionados.

**Figura 13 - Voltamograma cíclico do eletrodo de pasta de carbono (20% de nujol e 80% de carbono grafite). Parâmetros físico-químicos: tempo de equilíbrio igual a 1 s; 2 scans; potencial inicial de 0,0 V; potencial no 1º vértice igual a 0,0 V; potencial no 2º vértice igual a 0,75 V; potencial step de 0,005 V; solução de ferricianeto de potássio 1 mM em cloreto de potássio 0,1 M; velocidade de varredura de 0,1 V.**



Fonte: Autor, 2011.

## 5.2 Determinação do raio do eletrodo de pasta de carbono

Um fator relevante em trabalhos que utilizam eletrodos de trabalho do tipo “*homemade*” é saber qual a área ativa do eletrodo que estará em contato com as espécies redox para a realização dos processos eletroquímicos. Assim, com esse objetivo foi calculado o raio do eletrodo de pasta de carbono a partir de princípios básicos de eletroquímica. Uma vez comprovada a estabilidade de sinal analítico, o passo posterior seria a determinação da área e, conseqüentemente, o raio do eletrodo a fim de julgar a escala de trabalho.

Para essa determinação seguimos os seguintes passos:

1. Usando uma solução de ferricianeto 1 mM em cloreto de potássio 0,1 M, foi feito o estudo da velocidade de varredura, utilizando as seguintes

velocidades,  $v$ , em V/s: 0,003; 0,01; 0,03; 0,04; 0,05; 0,07; 0,09; 0,10; 0,12 e 0,15.

2. Construiu-se um gráfico da corrente de pico,  $i_p$ , versus a raiz quadrada da velocidade de varredura,  $v^{1/2}$ .
3. Como o coeficiente angular é proporcional à área do eletrodo, a partir do gráfico  $i_p$  vs.  $v^{1/2}$ , foi observada a linearidade da reta e escolhido a velocidade de varredura 0,05 V/s com a respectiva corrente de pico, 0,869  $\mu\text{A}$ , para o cálculo da área do eletrodo de trabalho. Isso foi possível usando a equação de corrente de pico dada por:

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0^* v^{1/2} \quad \text{Equação (7)}$$

onde,  $n$  é adimensional e significa quantidade de elétrons envolvidos no processo redox, que nesse caso como foi utilizado a solução de ferricianeto a quantidade de elétrons foi 1;  $A$  significa área do eletrodo e é dada em  $\text{cm}^2$ , objeto desse estudo;  $D_0$  é o coeficiente de difusão da espécie em  $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ , que nesse caso como foi o ferricianeto e teve um valor de  $7 \times 10^{-6}$ ;  $C_0^*$  é a concentração da espécie em  $\text{mol cm}^{-3}$ , que foi usado a solução de ferricianeto  $10^{-3}$  M;  $v$  é a velocidade de varredura em  $\text{Vs}^{-1}$ , que nesse caso foi escolhida a velocidade de  $0,05 \text{Vs}^{-1}$ , velocidade escolhida para ser aplicada nos testes com o acetaminofeno e serotonina; e,  $i_p$  é a corrente de pico em amperes, que foi dado a partir da velocidade de varredura, 0,869 A (BARD; FAULKNER, 2001).

Aplicando-se a equação (1) foi obtida a área eletroativa de  $2,6 \times 10^{-6} \text{cm}^2$ , e usando a equação  $A = \pi r^2$  encontramos o raio do eletrodo, 9  $\mu\text{m}$ .

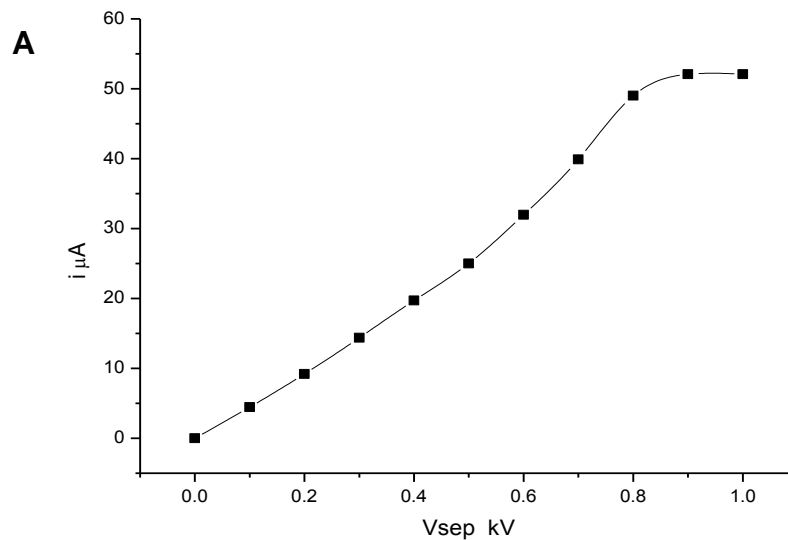
### 5.3 Estudo do potencial de separação eletroforética

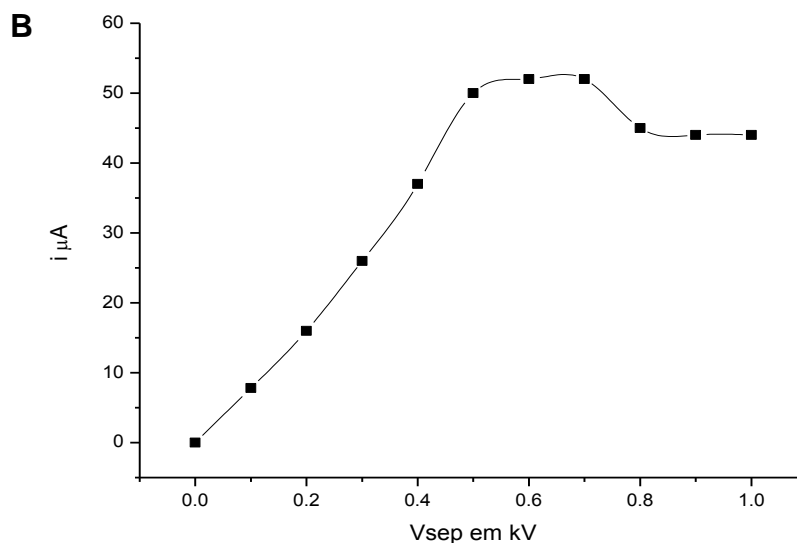
Esse estudo nos mostra a partir de qual potencial, ou o potencial máximo, que pode ser aplicado para que garanta a mobilidade com efetiva separação eletroforética. E isso pode ser dado pelo comportamento da reta, enquanto tiver linearidade, a resistência produzida pela solução no microcanal permanece

favorecendo a mobilidade, se sofrer inclinação tendendo verticalmente pode indicar aumento de temperatura da solução, efeito Joule, interferindo nas propriedades físico-químicas. Se sofrer inclinação tendendo horizontalmente, queda de corrente, implica em obstrução dos microcanais devido à formação de bolhas oriunda de eletrólise.

A Figura 14 retrata exatamente o melhor potencial, a ser usado no método, a inclinação tendendo a vertical e o potencial que se inicia a geração de bolhas. Esse estudo foi feito usando bórax como eletrólito suporte em duas concentrações distintas, 10 mM e 20 mM.

**Figura 14 - Gráficos do potencial de separação vs. corrente elétrica, utilizando bórax (A) 10 mM e (B) 20 mM como eletrólito suporte. Parâmetros físico-químico: tempo de equilíbrio de 5 s; tempo de corrida de 1000 s; intervalos de 0,15 s; potencial no eletrodo de trabalho de 0,9 V; faixa de potencial aplicado de 0,0 a 1,0 kV.**





Fonte: Autor, 2011.

Pode-se observar através dos resultados apresentados pelos gráficos da Figura 14 que há perda de linearidade nos pontos. Isso ocorre devido a formação de bolhas dentro dos canais e próximo ao eletrodo de pasta de carbono. Pode-se observar ainda que esse fenômeno está relacionado à concentração do tampão bórax. O bórax a uma concentração de 20 mM ocorre o aparecimento de bolhas em potenciais de alta voltagem superiores a 0,5 kV provocando a perda de linearidade da curva. Já o bórax a uma concentração de 10 mM apresenta geração de bolhas somente a partir de 0,7 kV. Entretanto a escolha da concentração de 20 mM foi justificado devido a mobilidade eletroforética das espécies em estudo, e pela condutância da solução que está relacionado com a concentração, ou seja, a mobilidade das espécies teve um melhor comportamento em soluções de bórax com concentrações 20 mM do que em 10 mM.

#### **5.4 Determinação amperométrica de acetaminofeno e serotonina para averiguação da viabilidade do microchip de PMMA e do suporte para fixação**

O principal objetivo desse estudo foi verificar se era possível detectar paracetamol e serotonina separadamente com simples injeção da amostra padrão

para observar o comportamento dessa análise usando o microchip fixado no suporte. A priori não foi feita nenhuma otimização para a detecção dessas espécies.

A montagem do sistema foi relativamente simples e reprodutível, começamos envolvendo o microchip com uma fita impermeável, do tipo veda rosca, para evitar vazamentos na base do microchip; e o microchip foi colocado de forma que deixasse espaço suficiente para servir de reservatório que coubesse os eletrodos de trabalho. Neste teste foi utilizado a pasta de carbono como eletrodo de trabalho, e referência prata/cloreto de prata, e um fio de platina como contra eletrodo que foi utilizado apenas. Em seguida foi colocada uma solução de borato 20 mM nos microcanais do chip aplicando pressão dinâmica negativa e averiguado através da aplicação de uma corrente elétrica se os microcanais estão totalmente preenchidos e sem bolhas, em caso afirmativo era possível verificar a corrente elétrica aplicada usando o aparelho; e caso contrário a corrente elétrica nula, pois as bolhas e/ou os defeitos nos microcanais impediriam o contato contínuo da solução necessária para que houvesse a condutância elétrica.

Segundo passo foi analisar a eficiência do sistema desenvolvido determinando amperometricamente padrões de acetaminofeno e serotonina. E para isso foi interfaceado com o sistema o PalmSens (Electrochemical Sensor Interfaces), para realizar a detecção amperométrica.

A sequência dos passos para a análise do acetaminofeno e da serotonina está descrita a seguir:

1. Uma vez montado o sistema microfluídico, os microcanais do chip totalmente preenchidos com o eletrólito suporte, borato 20 mM, e os 04 (quatro) reservatórios, onde o reservatório 4 foi usinado na base do chip com capacidade de 2 mL. No reservatório 1, foi colocado conforme a Figura 13, 20  $\mu$ L de acetaminofeno ou serotonina 1 mM preparado em borato 20 mM, para isso foi retirado o eletrólito suporte desse reservatório e acrescentado em seguida.
2. Todos os eletrodos foram conectados: de trabalho (eletrodo de pasta de carbono), de referência (Ag/AgCl) e auxiliar (fio de platina) ao PalmSens, e colocados estrategicamente no reservatório 4, o qual é o maior

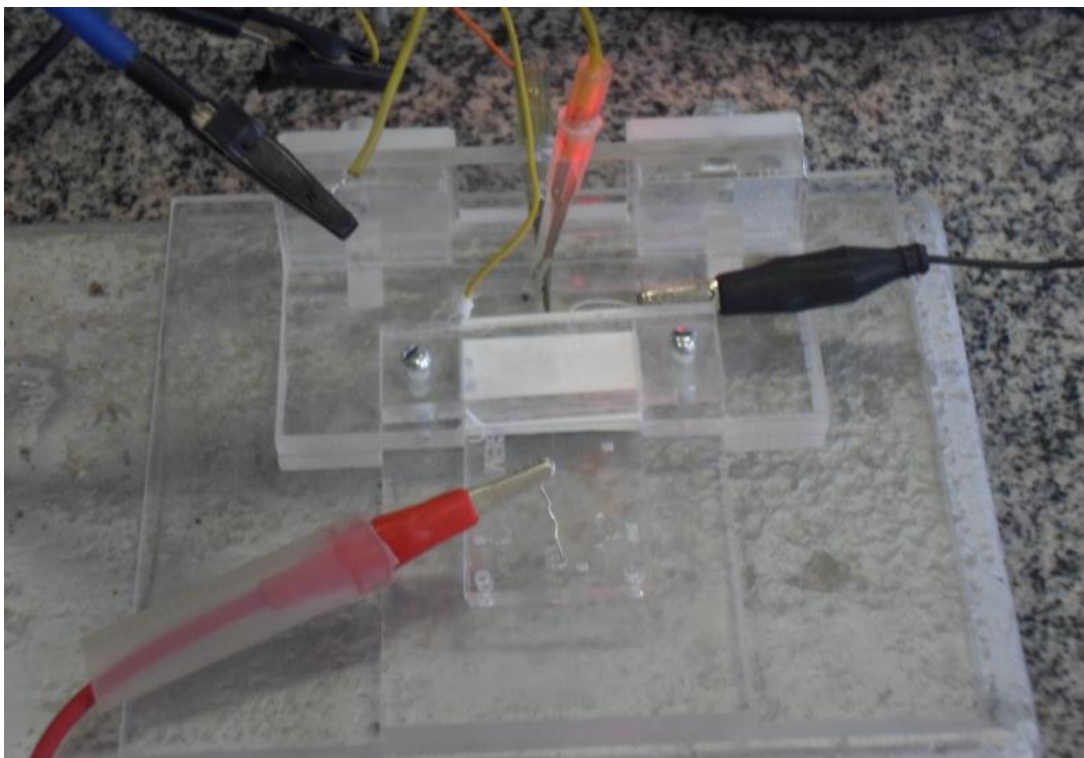
reservatório, capacidade de 2 mL, e por ser o reservatório receptor das espécies analisadas. Foi realizada a medição amperométrica com os seguintes parâmetros: tempo de equilíbrio de 5 s; tempo de corrida de 1000 s; intervalos de 0,15 s; potencial de 0,9 V.

3. Para proporcionar um fluxo eletroforético, foi colocado os eletrodos, de alta tensão da eletroforese, positivo no reservatório 1 e o negativo no reservatório 2 e aplicou-se um potencial de 0,5 kV, assim, conforme a figura, o acetaminofeno ou a serotonina foi carregada para o canal 2 por 5 s. Foi usado esse tempo para que parte do analito de interesse ficasse na intersecção da cruz formada pelos microcanais. O estudo da otimização do tempo de eletromigração não foi realizado.
4. Após o passo 2, imediatamente foi trocada as posições dos eletrodos de alta tensão, onde a ordem do posicionamento dos polos é importante, uma vez que a mobilidade do fluxo eletroforético ocorre do polo positivo para o polo negativo. Logo, foi colocado o eletrodo positivo no reservatório 3 e o negativo no reservatório 4 e aplicou-se a mesma tensão do passo 3.
5. Os passos 3 e 4 foram repetidos em triplicata para observar a repetitividade de sinal.

Na Figura 15 está ilustrado a imagem fotográfica do sistema proposto utilizado nas aplicações.



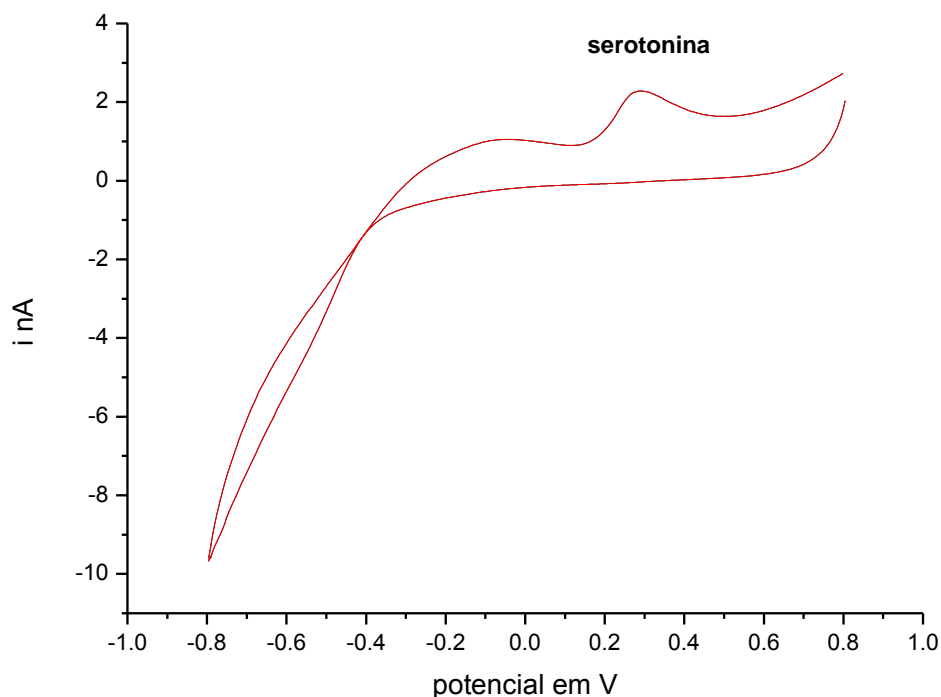
**Figura 15 - Imagem fotográfica do sistema de PMMA proposto.**



Fonte: Autor, 2011.

A voltametria cíclica tem encontrado considerável aplicação como uma ferramenta para diagnosticar e fornecer informações sobre os mecanismos de reações redox realizadas sob várias condições. Essa técnica voltamétrica é exemplo de um processo no qual as varreduras lineares diretas e inversas são aplicadas; e, onde, os produtos formados na varredura direta podem ser detectados na varredura inversa, se não tiverem sido removidas do eletrodo de trabalho ou não alterados por uma reação química subsequente. Assim, Inicialmente foi realizado uma voltametria cíclica objetivando determinar o potencial de oxidação da serotonina, uma vez que não estava bem definido na literatura. Através da Figura 16 foi possível verificar que o potencial de oxidação da serotonina foi de 0,3 V e que a reação não é reversível para a faixa de potencial aplicado.

**Figura 16 - Voltamograma cíclico da serotonina 1 mM. Parâmetros físico-químico: tempo de equilíbrio igual a 1 s; 2 scans; potencial start de -0,8 V; potencial no 1º vértice igual a -0,8 V; potencial no 2º vértice igual a 0,90 V; potencial step de 0,90 V; velocidade de varredura de 0,1 V.**



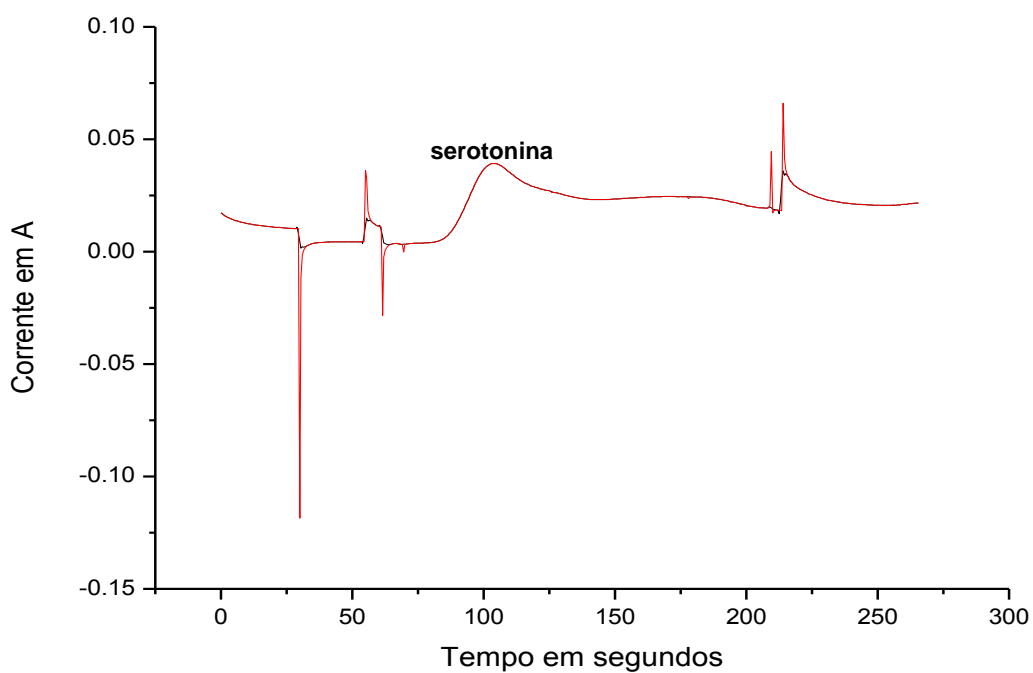
Fonte: Autor, 2011.

As Figuras 17 e 18 confirmaram a detecção amperométrica dos dois compostos, a serotonina que é um neurotransmissor e em meio básico possui mobilidade catiônica seguindo seu respectivo fluxo eletrosmótico, e o acetaminofeno, que em meio básico não possui mobilidade catiônica e nem aniônica, conseqüentemente, assume o fluxo hidrodinâmico da solução. A detecção amperométrica, mostrada nos gráficos, ratifica a possibilidade do uso do eletrodo de pasta de carbono, feito a partir de 80% de pó de carbono mais 20 % (m/m) de óleo mineral, para a determinação das espécies.

A calda e a falta de simetria apresentadas nos picos, tanto na detecção do paracetamol quanto da serotonina, estão relacionadas com a distância do eletrodo na saída do canal de detecção, fator o qual permite a difusão das espécies caracterizando o alargamento e a falta da simetria dos picos. Uma solução para esse problema seria posicionar o eletrodo dentro do microcanal e usar um desacoplador ou um potenciostato eletricamente isolado. O método proposto não

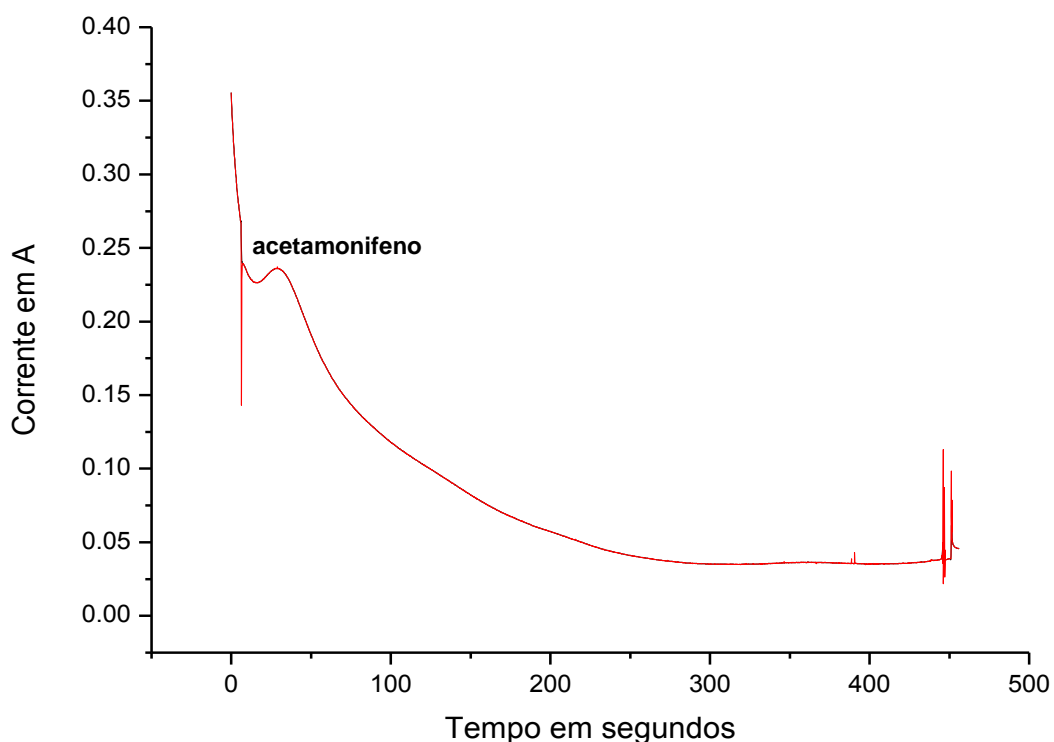
possibilita posicionar o eletrodo dentro do canal, e para tornar isso possível deveria ser mudada a configuração do microchip e do eletrodo, o que poderia ser um teste futuro.

**Figura 17 - Amperograma da serotonina 1 mM em bórax 20mM como eletrólito suporte. Parâmetros físico-químico: tempo de equilíbrio de 5 s; tempo de corrida de 1000 s; intervalos de 0,15 s; potencial no eletrodo de trabalho de 0,9 V; alta-voltagem de 0,5 kV.**



Fonte: Autor, 2011.

**Figura 18 - Amperograma do acetaminofeno 1 mM em bórax 20mM como eletrólito suporte. Parâmetros físico-químico: tempo de equilíbrio de 5 s; tempo de corrida de 1000 s; intervalos de 0,15 s; potencial no eletrodo de trabalho de 0,9 V; alta-voltagem de 0,5 kV.**



Fonte: Autor, 2011.

Os amperogramas apresentados nas Figuras 17 e 18 tiveram como objetivo comprovar a aplicabilidade do microchip microfluídico associado a uma base, ambos de PMMA, o que foi positivo. No entanto, ficou comprovado também que outros parâmetros precisam ser otimizados, como por exemplo, a mobilidade das espécies em estudo com a finalidade de obtenção de gráficos mais simétricos, a distância do eletrodo de trabalho em relação a saída do microcanal, o tipo e o pH do eletrólito suporte, analisar as duas espécies simultaneamente para averiguar a eficiência da separação eletroforética, dentre outras.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES – PARTE II

O microssistemas eletroforético (MSE) é uma ferramenta poderosa para a total separação em microssistemas de análises. A detecção eletroquímica (DEQ) pode ser facilmente combinada com MSE e é, portanto, um método de detecção ideal. No entanto, os limites de detecção são relativamente altos devido a sensibilidade e ao ruído da fonte de alimentação de alta tensão utilizada para a separação.

Assim, um método de configuração de duplo-canal associados com um potenciostato isolado eletricamente foi utilizado na segunda parte deste trabalho para avaliar a performance de separação e minimização da influência do potencial de separação sobre o ruído, e, subseqüentemente, melhorar a sensibilidade, o desempenho de separação e os limites de detecções.

O sistema EM-DEQ contém dois canais paralelos separados, cada um contendo um eletrodo de Pt de 15  $\mu\text{m}$  colocados exatamente no mesmo ponto no canal de separação. Um eletrodo foi utilizado como eletrodo de trabalho e o segundo eletrodo como o de referência. Os dois eletrodos foram posicionados na saída dos canais, cerca de 1 a 4  $\mu\text{m}$  dentro do canal, e os sinais amperométricos foram medidos sem qualquer mudança de potencial ou de interferência oriunda da tensão de separação aplicada.

Esse dispositivo foi utilizado para monitorar amostras contendo nitrito, tirosina,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ , glutathiona (GSH), ácido ascórbico (AA) e cisteína (Cys), e nitrito em amostras de perfusato de sangue de ovelhas e ratos. As amostras foram injetadas no canal de separação contendo o eletrodo de trabalho, enquanto o eletrólito carreador (BGE) foi simultaneamente injetado no canal de referência com o eletrodo de referência para avaliar o desempenho do microchip. Os resultados serão apresentados detalhadamente nos pontos que seguem.

### 6.1. Efeitos da condutância e capacitância nos microchip com detecção eletroquímica

A melhor eficiência de pico em separações nos microssistemas eletroforéticos pode ser obtida quando o detector é colocado ao longo do microcanal. Em particular para a detecção eletroquímica, é problemático devido à interferência da intensidade do campo elétrico. Para superar este problema, Chen e Hahn (CHEN; HAHN, 2007) propuseram um designe (projeto) com duplo-canal, onde ambos os eletrodos de trabalho e de referência são posicionados em uma região isopotencial, sendo um canal usado como canal de referência preenchido com BGE. Nesse trabalho, este *design* foi explorado para a separação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio utilizando polaridade negativa e para discutir alguns parâmetros que afetam o desempenho da estratégia de detecção.

Na detecção eletroquímica, é preciso evitar a queda de tensão ( $IR = \text{corrente elétrica} \times \text{resistência elétrica}$ ) na solução de eletrólitos, principalmente quando são usados eletrodos com grande área. Em aplicações de microchip, a queda de IR pode ser pronunciada devido às dimensões dos microcanais e a baixa condutividade de BGE. Uma vantagem sobre o uso de microssistemas com duplo-canal é apresentar um percurso maior entre os eletrodos de trabalho e de referência. Chen e Hahn relataram que o efeito da resistência da solução não é significativo quando usada a configuração de dois canais, no entanto, a configuração deles utilizava um sistema de três eletrodos (CHEN; HAHN, 2011), trabalho, referência e auxiliar. Nesse trabalho foi utilizada uma configuração de dois eletrodos, trabalho e referência, e verificou-se que o posicionamento dos eletrodos dentro dos microcanais promovia instabilidades e baixa reprodutibilidade dos resultados.

E como os eletrodos utilizados possuíam tamanhos micrométricos, deve-se levar em consideração os parâmetros temporais da técnica eletroanalíticas empregada que governa a espessura da camada de difusão, uma vez que para ser considerado um microeletrodo, em definições mais abrangentes, suas dimensões, em uma dada condição experimental, sejam comparáveis ou menor que a camada de difusão. Assim, sob essas condições é obtido um perfil de estado estacionário ou pseudo estacionário. Essas características contribuem para um comportamento eletroquímico diferenciado, com voltamogramas apresentando um perfil sigmoidal

referente ao estado estacionário obtido através, predominantemente, do transporte de massa diferenciado nessas superfícies eletródicas, em que prevalece a difusão radial (PAIXÃO, 2007).

As vantagens proporcionadas com o uso de eletrodos com tamanhos micrométricos tem atraído interesse de pesquisadores na área de eletroanalítica, tais como: a corrente de estado estacionário para processos faradâicos é obtida em um curto espaço de tempo; a razão entre corrente faradáica e corrente capacitiva é aumentada, uma vez que a corrente capacitiva decai proporcionalmente com a área do eletrodo, enquanto que a corrente faradáica é proporcional aos parâmetros dimensionais dos eletrodos; baixa sensibilidade à queda ôhmica, produto entre corrente elétrica e resistência ( $IR$ ), possibilitando estudos eletroquímicos de sistemas redox em solventes com elevada resistência ou na ausência de eletrólito suporte; devido aos baixos valores de corrente medidos com microeletrodos, o produto  $IR$  é desprezível para um amplo intervalo de valores de resistências; o potencial aplicado pode ser variado rapidamente, porque a corrente capacitiva é minimizada; a razão entre sinal e ruído,  $S/R$ , em condições de estado estacionário é melhorada quando comparada com eletrodos de tamanho convencional; aumento do transporte de massa da espécie eletroativa para a superfície do eletrodo e, conseqüentemente, pouca interferência de efeitos hidrodinâmicos sobre o sinal de corrente; o pequeno tamanho dos eletrodos pode propiciar a sua utilização para a exploração de domínios microscópico, como pequenos volumes (PAIXÃO, 2007).

Um problema relevante encontrado na utilização de microssistema eletroforético com detecção eletroquímica (MSE-DEQ) é o efeito da resistência elétrica, que é a capacidade de um material se opor à passagem de corrente elétrica mesmo quando existe uma diferença de potencial aplicada, e capacitância, que é a quantidade de energia elétrica que pode ser acumulada em si por uma determinada tensão, produzida pelo eletrólito suporte (BGE, do inglês background electrolyte) que fica entre os eletrodos de trabalho e de referência quando são colocados nos microcanais, especialmente se os eletrodos tiverem uma configuração com posicionamento dentro dos microcanais (alinhamento ou configuração in-channel), os quais promovem a instabilidade em sistemas que utilizam detectores eletroquímico (KLETT et al., 2001).

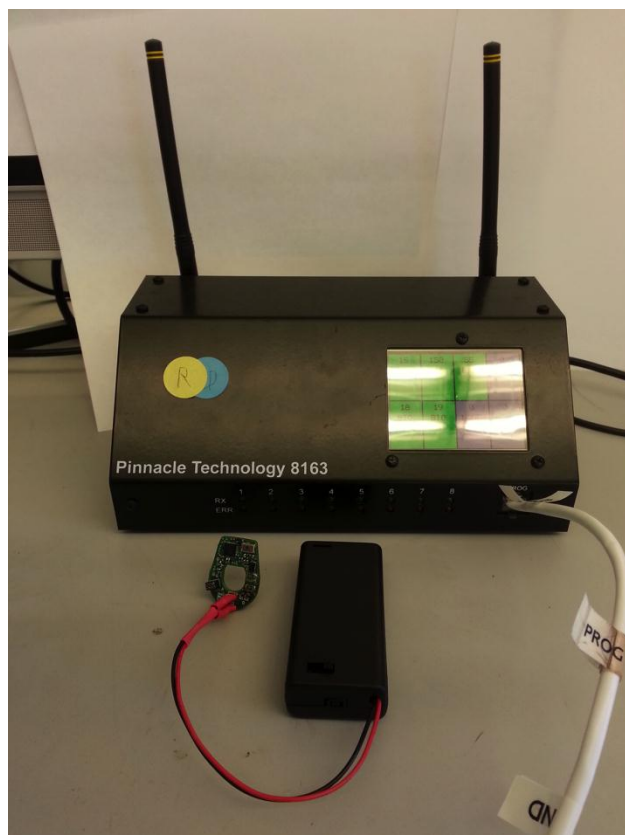
Conforme esperado para detecção amperométrica, uma voltagem constante é aplicada entre os eletrodos de trabalho e de referência, no entanto, a resistência produzida pela BGE entre os eletrodos afeta o ruído de fundo (ou ruído background) (KLETT; NYHOLM, 2003; CHEN; HAHN, 2011). O uso de um potenciostato eletricamente isolado já tem sido utilizado pelo grupo em outros trabalhos publicados, os quais demonstraram excelente robustez, sensibilidade, reprodutibilidade e repetitividade dos resultados utilizando as metodologias propostas nos trabalhos.

A principal vantagem do uso de um potenciostato eletricamente isolado em EM-DEQ é a possibilidade de permitir que o eletrodo de trabalho seja posicionado diretamente no microcanal de separação sem danificar os componentes eletrônicos do potenciostato devido a alta-voltagem aplicada no microcanal de separação, além de tornar desnecessário o uso de um desacoplador (MARTIN, et al., 2000; GUNASEKARA, et al., 2011). Outra vantagem é diminuir a geração excessiva de ruídos, podendo melhorar a relação sinal/ruído e, conseqüentemente, o limite de detecção.

A Figura 19 apresenta uma imagem fotográfica do potenciostato eletricamente isolado usado em todo esse trabalho.



**Figura 19 - Imagem fotográfica do potenciostato eletricamente isolado modificado Modelo 8151BP 2-canal Wireless (Pinnacle Tecnologia, Lawrence, KS, USA).**



Fonte: Autor, 2012.

Como foi anteriormente mencionado, quando se emprega uma configuração de posicionamento do eletrodo no final do canal (configuração *end-channel*) existe um problema significativo com o alargamento de banda, o que provoca uma perda de resolução dos picos analíticos, e, portanto, redução da resposta do detector. Por isso, foi escolhido para esse trabalho a configuração com o posicionamento dos eletrodos dentro dos canais (alinhamento *in-channel*), pois é comprovado em outros estudos a superioridade dos resultados em comparação com a configuração fora do canal (alinhamento *end-channel*), tais como o aumento de eficiência de separação dos picos analíticos, ausência de dispersão e/ou difusão, favorecendo assim a formação de picos simétricos (MARTIN et al., 2000; GUNASEKARA et al., 2011).

Na literatura já está estabelecido que existe resistência e capacitância produzida pelo BGE entre os eletrodos de trabalho e de referência quando são colocados em microcanais ou em capilares, e isso afeta a estabilidade dos sistemas

que utilizam a detecção eletroquímica, o que afeta o ruído de fundo. A distância entre os eletrodos de referência e de trabalho influenciam no efeito da resistência e capacitância do BGE. Logo, variando a distância entre eles variará também a relação entre corrente elétrica e a resistência (IR) conforme está estabelecida na Lei de Ohm, que enuncia que a voltagem (V) é diretamente proporcional ao produto da corrente e resistência elétrica, conforme a equação (2) (KLETT et al., 2001; KLETT; NYHOLM, 2003; CHEN; HAHN, 2011):

$$V = IR \quad \text{Equação (8)}$$

Através desta lei fica evidente que a distância entre os eletrodos de trabalho e o de referência devem ser fixos em todos os experimentos para que se possa obter repetitividade e reprodutibilidade dos resultados, o que não é tão simples quando se trata de micro e nano escalas.

Nessa tese foi usado um microssistema eletroforético com duplo-canal em paralelo posicionados a 200  $\mu\text{m}$  de distância um do outro (CHEN; HAHN, 2007; CHEN; HAHN, 2011; CHEN; TENG; HAHN, 2011) e um potenciostato eletricamente isolado como detector para permitir o posicionamento do eletrodo de trabalho dentro do microcanal de separação. Os eletrodos de trabalho e de pseudo-referência foram feitos de platina através da técnica fotolitográfica, os quais mediram 15 e 50  $\mu\text{m}$  de largura, e estes foram posicionados no canal de separação e no canal de referência, respectivamente. A distância entre os eletrodos de trabalho e de referência foi fixada de forma irreversível. Essa fixação dos eletrodos torna os resultados das análises bastante reprodutível, se comparado com os resultados que usam a configuração de canal único com eletrodo de trabalho de Pt (15  $\mu\text{m}$ ) e de Ag/AgCl referência, uma vez que é verdadeiramente difícil reproduzir a distância entre os eletrodos de trabalho e de referência (GUNASEKARA et al., 2011).

O *design* de duplo-canal foi escolhido devido às vantagens apresentadas pelo posicionamento dos eletrodos no método de duplo-canal, o qual não permite que a corrente elétrica entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo passe através do eletrodo de referência, minimizando os efeitos de resistência e, portanto, tornando a variação de corrente insignificante durante a detecção, reduzindo assim o ruído (KLETT et al., 2001; KLETT; NYHOLM, 2003; CHEN; HAHN, 2011).

O microdispositivo EM-DEQ com duplo-canal dessa tese foi configurado com dois eletrodos de platina, referência e trabalho, colocados sempre a mesma distância um em relação ao outro, 15  $\mu\text{m}$ , e posicionados 1 a 4  $\mu\text{m}$  dentro do canal (in-channel), dos 15  $\mu\text{m}$  do comprimento do eletrodo. O potencial aplicado pela fonte de alta-voltagem para realizar a intensidade de campo elétrico de separação foi de 400  $\text{V cm}^{-1}$  em cada canal, de separação e de referência. Esta configuração permitiu uma detecção amperométrica sem interferência e ajudou a produção de flutuações constantes do potencial elétrico nos eletrodos de trabalho e de referência em todos os experimentos.

## 6.2 Injeção da amostra (*gating* eletrocínético) em microchip de duplo-canal

Uma das etapas consideravelmente importante em desenvolvimento de metodologias que envolvem microssistema eletroforético é a forma como a amostra será introduzida no sistema e levada até o detector. A importância da forma de introdução de amostra está concatenado com as características da zona de amostra porque esse fator determina a qualidade da separação analítica das espécies, onde a reprodutibilidade e repetitividade são exigidos. Dentre os métodos utilizados para a introdução da amostra em microdispositivos, os três mais relatados na literatura são “*unpinched*”, “*pinched*” e “*gated*” (COLTRO et al., 2007).

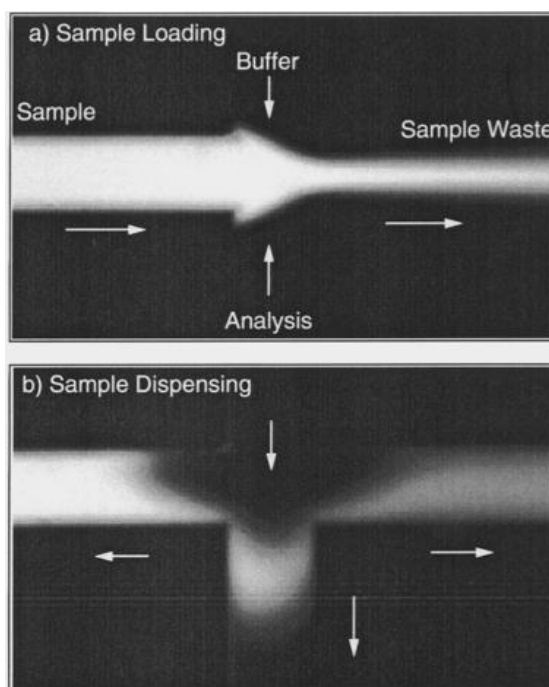
O modo de injeção de amostra mais simples dos três supracitados é o “*unpinched*”, o qual consiste em injetar as amostras utilizando um desenho básico de injetor de forma de cruz ou simples **T**. A literatura reporta que para uma injeção nos microssistemas eletroforéticos, ou eletroforese capilar, é necessário um controle rigoroso do potencial aplicado para a injeção da amostra, que está relacionado ao volume da amostra, para evitar vazamento no canal de separação.

As injeções mais reprodutíveis são realizados por formação dos plugues de injeção com controle de tensão de quatro direções e aplicação de “tensões *pushback*” para evitar vazamentos dos canais secundários. A injeção da amostra é realizada através da aplicação de um potencial no canal de separação, geralmente, em intervalos de 1 a 10 s, onde os eletrodos são colocados nos reservatórios da

amostra e do descarte da amostra. Durante esse tempo, espera-se que o microcanal esteja totalmente preenchido pela amostra para que seja iniciada a etapa de separação a partir de uma diferença de potencial aplicado no canal de separação (MARTIN, 2000; COLTRO et al., 2007).

O método “*pinched*” de introdução de amostra baseia-se na dispensa dos alíquotas (plugues) de amostras definidas em grande parte pelas dimensões físicas da intersecção do canal. A injeção “*pinched*” utiliza forças eletrocinéticas para confinar a amostra na etapa de carregamento e para injetar o plugue da amostra durante a etapa de distribuição. Esse método de injeção *pinched* da amostra é visualizada na Figura 20, onde se percebe como ocorre a introdução da amostra na prática (ALARIE et al., 2001).

**Figura 20 - Imagens de microscopia de fluorescência que descrevem a injeção *pinched*. (a) etapa de carga da amostra, (b) etapa de distribuição de amostra.**



Fonte: ALARIE, J. P. et al, 2001.

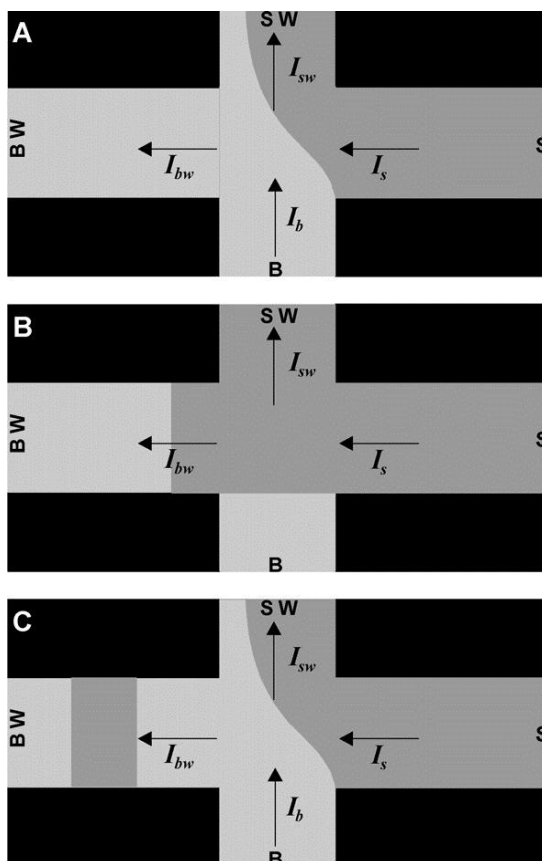
Como pode ser visto na Figura 20, a partir do potencial aplicado a amostra é injetada no sentido da esquerda para a direita até que pára a aplicação do potencial neste sentido e passa a ser aplicado o potencial de cima para baixo e um plugue da amostra é carregada para o detector e, conseqüentemente, tem-se o sinal analítico.

A injeção “*gated*” baseia-se na dispensa de volumes de amostra proporcional à força do campo e da duração temporal, semelhante às injeções eletrocinéticas em capilares. “*Gating*” eletrocinéticas, funcionando como uma micro-válvula que abre e fecha, tem sido amplamente utilizada em dispositivos microfluídicos para a injeção da amostra e interruptor de fluxo (ZHANG et al., 2007).

Investigar o desempenho da injeção é bastante relevante para microfluídica e análise química à base de microfluídica. Como foi escolhido para método de introdução de amostra a injeção tipo *gating*, devido sua excelente reprodutibilidade e repetibilidade de eventos e ser de fácil aplicação e execução, a injeção de *gating* eletrocinético em microcanais foi avaliada usando a técnica de imagens microscópica. Nesta avaliação observou-se o perfil do microfluxo na intersecção dos canais e nos canais de separação e referência, o qual revelou que a difusão da amostra desempenhou um papel significativo ao desativar o “*gated*”, o que poderia causar vazamento (fuga) de analito na injeção de amostra. Devido à difusão, o analito cruza a interface do fluxo do analito e do fluxo de propagação, e em seguida formada uma área de difusão de cauda semelhante em canais de junção.

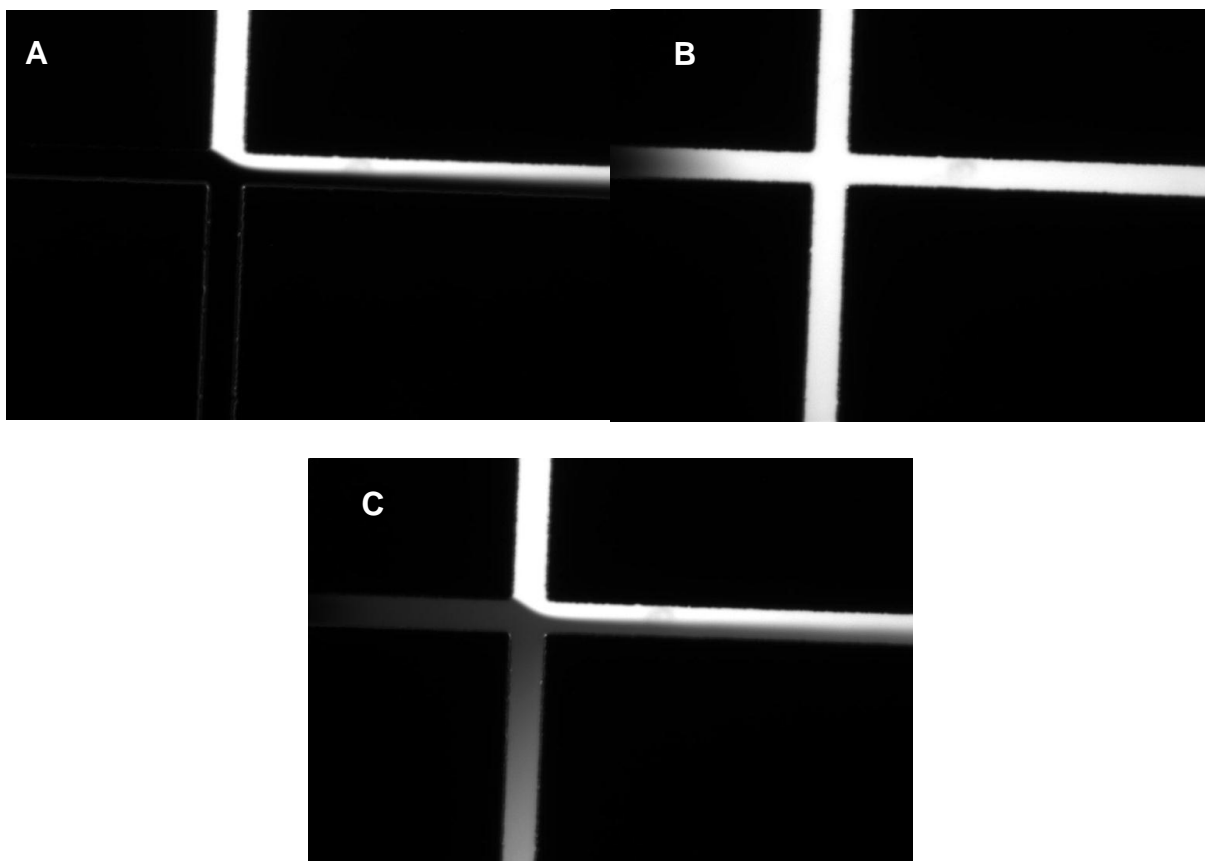
Nas Figuras 21 e 22 estão apresentados um esquema e imagens microscópicas de *gating* eletrocinético. Na aplicação das injeções *gated* ou fluxo interruptor (ou comutador) em separação utilizando microssistema eletroforético, inicialmente um microfluxo dos analitos é realizado do canal S para o canal SW, conforme a Figura 21A. Para evitar o vazamento (ou escapamento) dos analitos para o canal BW, outro microfluxo de canal B é introduzida no canal SW e no canal BW simultaneamente, conforme a Figura 21B. Conforme a Figura 21C, quando o microfluxo do canal B é interrompido, uma alíquota da amostra é então injetado a partir do canal S para o canal BW seguindo um fluxo eletrosmótico ou hidrodinâmico, dependendo das cargas das espécies em análise ou se existe a necessidade do uso de um desacoplador, como em aplicações com configuração que posiciona o eletrodo de trabalho dentro do canal e o potenciostato não é isolado eletricamente. Em seguida, o microfluxo de canal B é reestabelecido. Os analitos são novamente bloqueados (fechado). Um sistema microfluídico pode ser convenientemente alcançado, modulando a intensidade dos campos elétricos em microcanais.

Figura 21 - Diagrama esquemático da válvula *gating* eletrocinética para a injeção de amostra. (A) *Gating*, a amostra foi transportada do canal S para o Canal SW, e foi bloqueada, ou fechada, por um tampão do canal B. (B) Injeção, a válvula foi aberta para a injeção da amostra, quando o fluxo de tampão de canal B foi retida. (C) *Gating*, fluxo de amostra foi fechado novamente para a prevenção da amostra de vazamento, ou de fuga, em Canal BW.



Fonte: (ZHANG, G. et al, 2007).

**Figura 22 -** Imagens microscópicas do *gating* eletrocinético das injeções de amostras feitas nas intersecções do microchip de duplo-canal. Os canais de separação e referência tinham 3,5 cm de comprimento e 40 µm de largura. Para esse teste foi usado fluoresceína em ácido bórico 10 mM contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) 2 mM como BGE. Os potenciais aplicados nos reservatórios da amostra e do BGE foram, respectivamente, 1200 V e 1400 V, e tempo de injeção de 1 s. (A) Imagem antes de ser aplicada a injeção. (B) Imagem do exato momento que está sendo aplicada a injeção. (C) Imagem após ser aplicada a injeção. Os resultados deste teste foram idênticas para os dois canais, de trabalho e de referência.



Fonte: Autor, 2012.

Objetivando observar se havia reprodutibilidade e repetitividade nas injeções foi feito o estudo eletrocinético das injeções *gating* usando a fluoresceína em ácido bórico 10 mM contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) 2 mM como BGE para ser possível fazer as imagens microscópicas. Esse estudo foi de vital importância devido ao tipo de configuração utilizado no método proposto. Como a configuração possuía duplo-canal em paralelo foi extremamente importante saber se havia simetria e perfeita injeção em ambos os canais. Os resultados deste teste apresentaram excelente repetitividade e reprodutibilidade de eventos, tornando-se perfeitamente aplicável para o método analítico desenvolvido. A única exigência para que

ocorresse fidelidade na repetitividade e reprodutibilidade foi a simetria na confecção dos reservatórios para o mesmo microchip e a reprodução dessa manufatura para todos os outros microchips.

### **6.3 Otimização do posicionamento dos eletrodos nos microcanais e do potencial elétrico aplicado no eletrodo de trabalho**

Como relatado por Chen e Hahn (CHEN; HAHN, 2007), a estratégia de canal duplo pode ser favorável para minimizar a interferência da intensidade do campo elétrico de separação. Usando este esquema, os eletrodos podem ser colocados no meio do canal de separação. Neste caso, a eficiência dos picos é elevada e comparável às estratégias de detecção em canal (do inglês *on-channel*), tais como fluorescência induzida por laser. A primeira abordagem dessa etapa do trabalho para a detecção das espécies reativas de nitrogênio (ERN) e das espécies reativas de oxigênio (ERO) foi colocar o eletrodo de trabalho (WE do inglês *working electrode*) e o eletrodo de referência (RE do inglês *reference electrode*) dentro do microcanal com cerca de 200  $\mu\text{m}$  da saída, no entanto observou-se o aparecimento de picos de sistema nos eletroferogramas. Tem-se observado um comportamento semelhante, utilizando microchips de canal único, quando o RE foi posicionado longe do WE. O aparecimento destes picos de sistema pode estar relacionado com a alteração da composição da BGE durante a injeção gated, que pode modificar o potencial WE (mais uma vez, devido à queda de IR) e induzir a uma mudança de corrente. Mas ainda deverão ser feitos mais testes neste sentido.

Visando a otimização do sistema proposto para reduzir ao máximo a interferência produzida pela alta-voltagem aplicada ao canal de separação, o que poderia aumentar o ruído e danificar os eletrodos e/ou o potenciostato, e melhorar a resposta dos picos analíticos foi feito o estudo do posicionamento dos eletrodos nos microcanais em relação à saída, do tamanho dos eletrodos, e do potencial aplicado à WE.

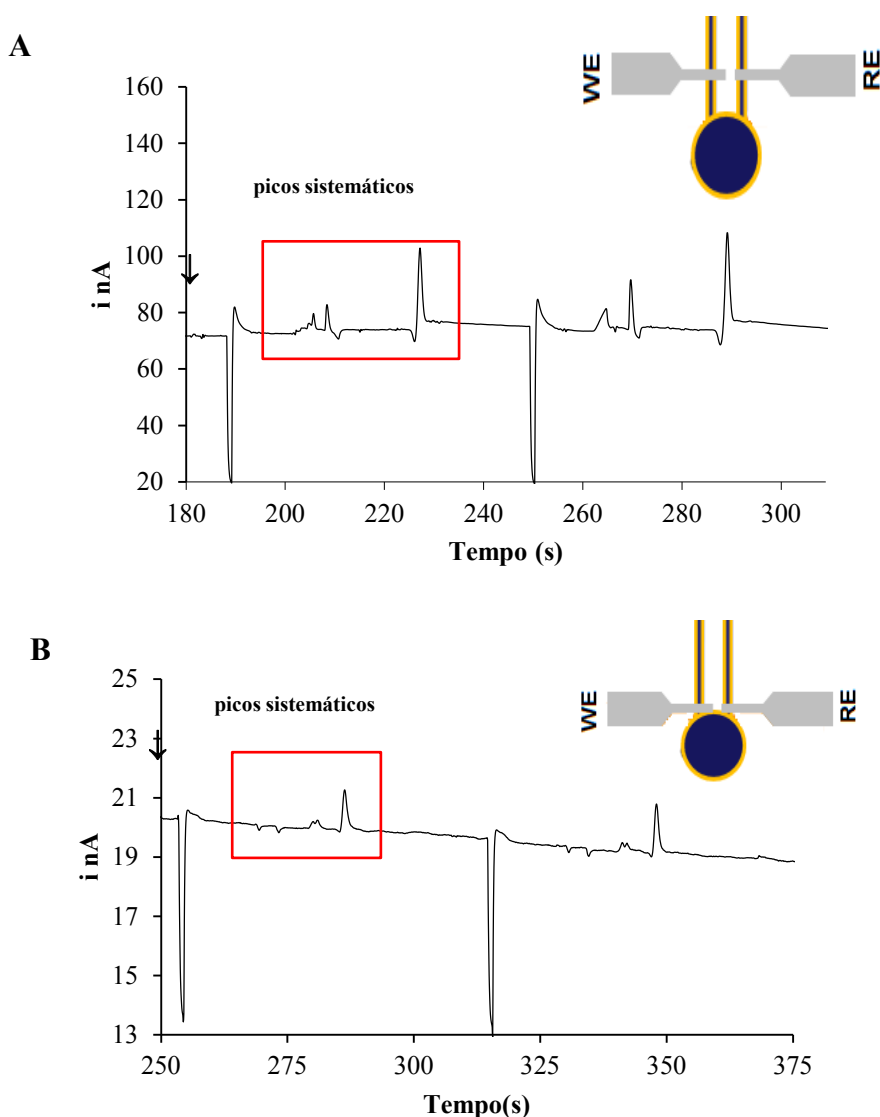
O efeito do posicionamento do eletrodo sobre o aparecimento de picos de sistemas foi investigado e os resultados são apresentados na Figura 23. Nas Figuras 23A, 23B e 23C pode-se notar a presença de picos de sistemas quando ambos WE

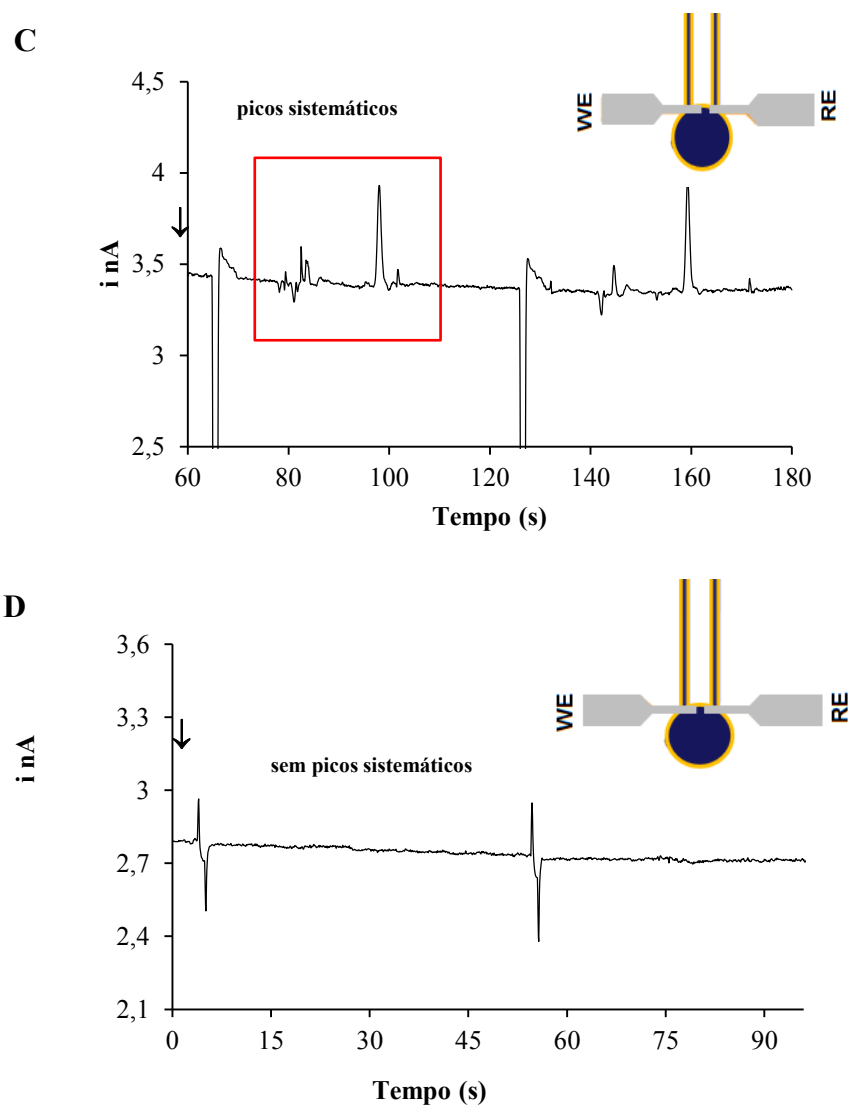


e RE são colocados a 200 e 5  $\mu\text{m}$  da saída do canal e cerca da metade dos eletrodos no interior e fora do canal, respectivamente.

Os picos de sistema só podem ser eliminados através do posicionamento dos eletrodos no fim do canal. Foi conseguido um excelente nível de ruído de 1 pA colocando os eletrodos de 1 a 4  $\mu\text{m}$  no interior do microcanal, como apresentado na Figura 22D. Além disso, a corrente de linha de base foi diminuída de 150 para 28, para 3,8 e 2,8 nA quando os eletrodos foram colocados em 200, 5, metade no interior e metade fora e 1  $\mu\text{m}$ , respectivamente, no interior do microcanal.

Figura 23 - Eletroferogramas e ilustrações esquemáticas dos alinhamentos dos eletrodos. Parâmetros físico-químico: BGE (pH = 11) , 10 mM ácido bórico contendo 2 mM TTAB; WE = 1,1 V; intensidade de campo elétrico de separação eletroforética  $400 \text{ Vcm}^{-1}$  e injeção ( $\downarrow$ ) de 1 s; configuração *in-channel*. (A) eletroferograma do branco com os eletrodos  $200 \mu\text{m}$  da saída dos microcanais; (B) eletroferograma do branco com os eletrodos  $5 \mu\text{m}$  da saída dos microcanais; (C) eletroferograma do branco com os eletrodos posicionados cerca da metade dentro e metade fora ( $7$  a  $8 \mu\text{m}$ ) dos microcanais; (D) eletroferograma do branco com os eletrodos posicionados somente de  $1$  a  $4 \mu\text{m}$  no interior dos microcanais (corrente de fundo  $2,8 \text{ nA}$ ).

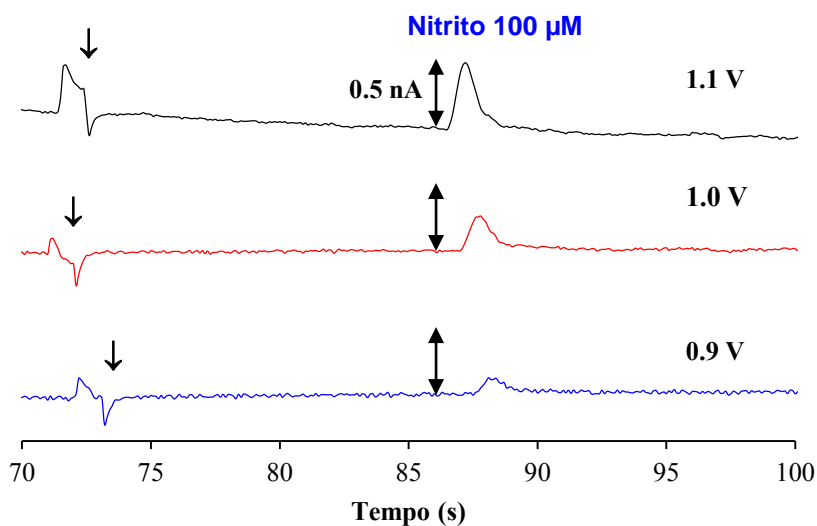




Fonte: Autor, 2012.

Como um dos objetivos deste trabalho é a determinação do nitrito em amostras reais, foi realizado um estudo experimental para avaliar o melhor potencial do eletrodo de trabalho para o monitoramento de nitrito, que apresentou 1,1 V como a melhor resposta para o sinal analítico, e também observou que o sinal analítico diminui consideravelmente quando diminuiu o potencial, conforme apresentado na Figura 24.

**Figura 24: Eletroferogramas de nitrito (100  $\mu\text{M}$ ), comparando os diferentes potenciais do eletrodo de trabalho (1,1, 1,0 e 0,9 V ); BGE (pH = 11) , 10 mM ácido bórico contendo 2 mM TTAB; intensidade de campo elétrico de separação eletroforética 400  $\text{Vcm}^{-1}$  e injeção ( $\downarrow$ ) de 1 s.**



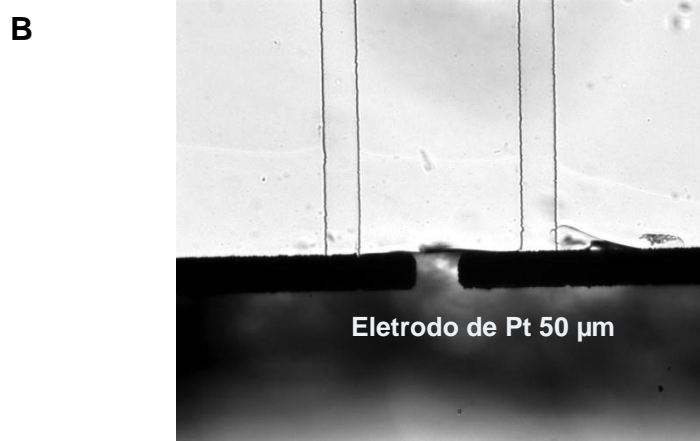
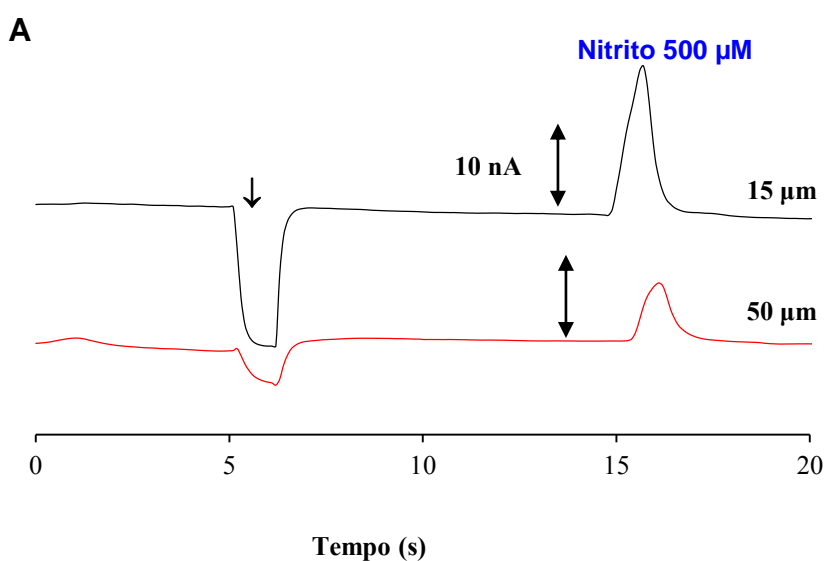
Fonte: Autor, 2012.

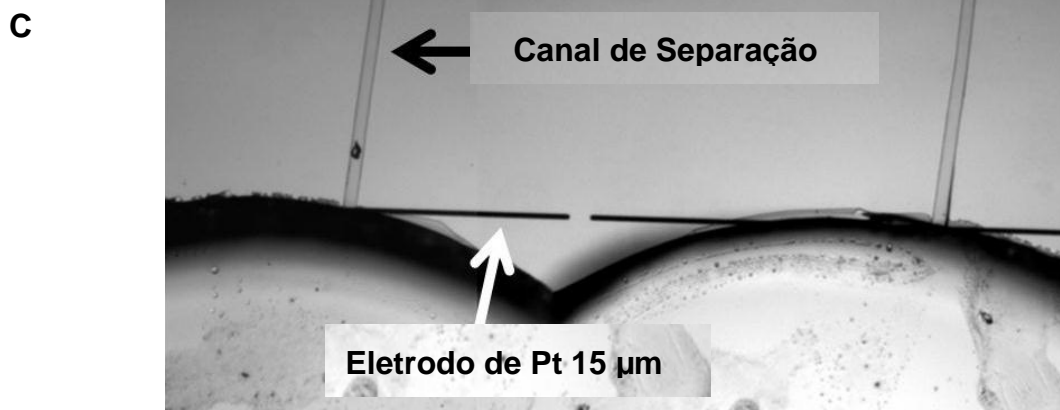
As dimensões do eletrodo é de fundamental importância, não apenas para facilitar o alinhamento nos microcanais, mas para melhorar a resposta do sinal electroanalítico, uma vez que o analito está em fluxo e passa através do eletrodo num curto espaço de tempo. Foram avaliados o efeito do tamanho do eletrodo sobre a resposta do detector electroquímico de canal duplo para a detecção de nitrito. Foram testados eletrodos de microbanda com 15 e 50  $\mu\text{m}$  de largura. Notavelmente, os eletrodos de 15  $\mu\text{m}$  apresentaram maior altura do pico e melhor relação de sinal/ruído para a detecção de nitrito. Assim, eletrodos de 15  $\mu\text{m}$  foram utilizados ao longo do trabalho.

Na Figura 25 estão apresentados os eletroferogramas com picos para nitrito 500  $\mu\text{M}$  para comparação dos diferentes tamanhos de eletrodos, e as imagens microscópicas do alinhamento dos eletrodos de 50 e 15  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Esse alinhamento, logicamente, somente é possível realiza-lo através do auxílio de um microscópio. Como a selagem do microchip é reversível e tendo o microscópio auxiliando o alinhamento dos eletrodos em relação aos microcanais torna essa etapa extremamente fácil e de simples execução. E pelas imagens pode-se observar

que é possível realizar os cortes, ou poços, para os reservatórios e alinhamentos de forma simples e perfeitos.

**Figura 25:** (A) Eletroferogramas de nitrito (  $500 \mu\text{M}$  ) comparando diferentes tamanhos de eletrodos , 15 e 50  $\mu\text{m}$  (  $WE = 1,1 \text{ V}$  ). BGE (  $\text{pH} = 11$  ) , 10 mM ácido bórico contendo 2 mM TTAB; intensidade de campo elétrico de separação eletroforética  $400 \text{ Vcm}^{-1}$  e injeção ( $\downarrow$ ) de 1 s. (B) imagem microscópica do alinhamento dos eletrodos de platina de trabalho e de referência (RWE) de 50  $\mu\text{m}$  de comprimento; e (C) imagem microscópica do alinhamento dos eletrodos de platina de trabalho e de referência (RWE) de 15  $\mu\text{m}$  de comprimento.





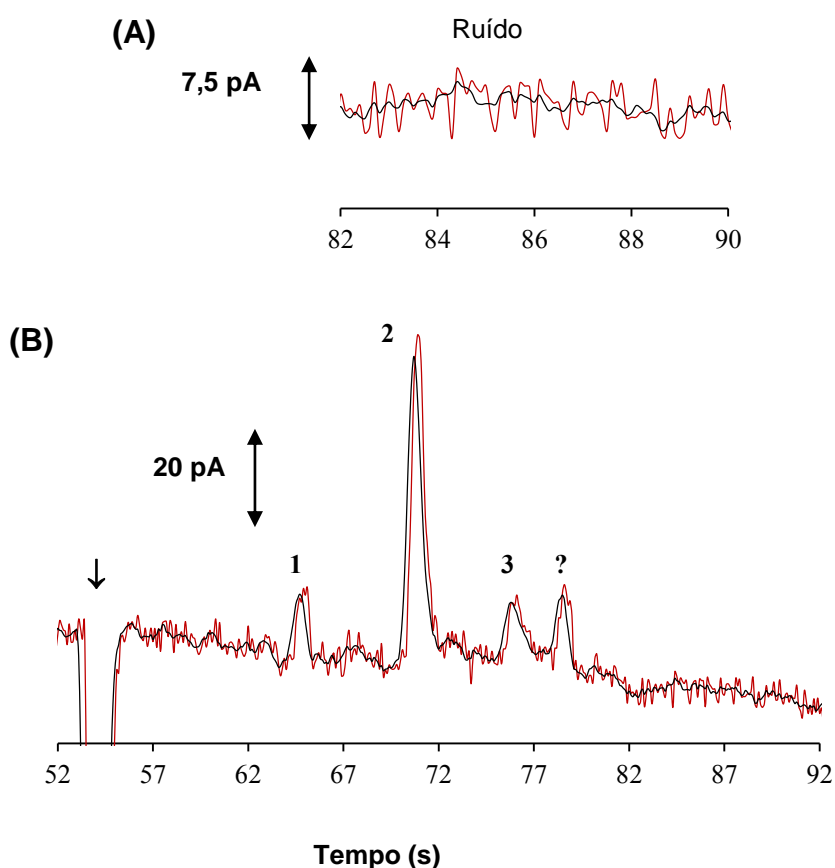
Fonte: Autor, 2012.

#### 6.4 Efeito na relação sinal/ruído (*smoothing effect*)

O método de efeito de suavização (*smoothing effect*) por média foi utilizado para reduzir a alta frequência do ruído associada com detecção amperométrica. Nesse trabalho foram feitas as análises de dados com e sem o *smoothing effect*, e para isso foram utilizados os dados processados dos resultados das análises das amostras padrão de nitrito, tirosina e peróxido de hidrogênio. Através dos resultados ficou evidente que o uso de *smoothing* foi relativamente considerável se comparado com os resultados sem *smoothing*. O método do *smoothing effect* foi realizado a partir do estudo de médias das leituras do processador de dados e ficou evidenciado que, para a quantidade de dados processados, a melhor média para reduzir a alta frequência do ruído associada com a detecção amperométrica na metodologia proposta foi a média na ordem de 5 vezes, ou seja, a média de 5 dados processados consecutivamente.

A Figura 26 apresenta o resultado desse estudo através dos gráficos com e sem a aplicação do *smoothing*. Pode-se ratificar a diferença entre os resultados com (em preto) e sem (em vermelho) o *smoothing effect*, como já era esperado para a sua aplicação, a diminuição da frequência. Conseqüentemente, diminui-se o ruído de forma considerável e suavemente a altura dos picos, com isso adquirindo uma melhor relação sinal/ruído.

Figura 26 - (A) Ampliação do gráfico com foco na linha de base para verificar o ruído no intervalo de 5 s; a linha vermelha representa os resultados sem suavização (smoothing) e a linha preta representa os resultados com suavização (smoothing). (B) Eletroferograma de uma mistura equimolar nitrito (1), tirosina (2) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3), todos com a mesma concentração  $3,125 \mu\text{M}$ .  $E = 1,1 \text{ V}$ . BGE (pH = 11), ácido bórico 10 mM contendo TTAB 2 mM; intensidade de campo elétrico de separação eletroforética  $400 \text{ Vcm}^{-1}$  e injeção ( $\downarrow$ ) de 1 s.



Fonte: Autor, 2012.

Esta aplicação foi consideravelmente favorável, uma vez que um dos problemas associados a este tipo de sistema e metodologia é o valor elevado da alta frequência de ruídos que induz a baixos valores para a relação sinal/ruído, relação esta utilizada para cálculos dos limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ). Assim, se a alta frequência de ruídos é diminuída numa proporção maior que a redução do sinal analítico implicará uma razão sinal/ruído maior e isso produz, consequentemente, um aumento nos valores dos LODs, podendo chegar a valores surpreendentes.

Assim, foi aplicado o efeito de suavização para calcular os limites de detecção para poder fazer um estudo de comparação com os resultados os quais não foram aplicados o efeito de suavização. A Tabela 1 apresenta os resultados calculados com e sem o efeito de suavização.

**Tabela 1 - Comparação de resultados com e sem o efeito de suavização e das configurações de canais único e duplo.**

Configuração	LOD para Nitrito ( $\mu\text{M}$ ) (S/N=3)	LOD para $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{M}$ ) (S/N=3)	LOD para Tirosina ( $\mu\text{M}$ ) (S/N=3)	Ruído
Duplo-canal / eletrodos de trabalho e referência de Pt (15 $\mu\text{m}$ ) (antes Smoothing)	1,87	2,5	0,53	4 pA
Duplo-canal / eletrodos de trabalho e referência de Pt (15 $\mu\text{m}$ ) (após Smoothing)	0,58	0,75	0,14	1 pA
Canal único / eletrodo de trabalho de Pt e de referência de Ag/AgCl (GUNASEKARA et al., 2011)	2,06	23	-	25 pA

Fonte: Autor, 2012.

Como pode ser visto na Tabela 1 houve uma melhora considerável quando se aplica o *smoothing effect*. Pode ser observado uma diminuição na ordem de 3,2 vezes nos limites de detecção calculados.

No entanto, mesmo os resultados com o uso do efeito de suavização serem bastante atraentes é preciso ter cuidado neste tipo de aplicação, uma vez que não existe um estudo detalhado na literatura para este tipo de aplicação, os valores podem variar de sistema para sistema, de método para método. Fica dependente principalmente da eficiência de separação do método. Se o processo envolver uma série de analitos em que eles apresentam uma boa eficiência de separação entre eles, o uso de suavização vai efetivamente melhorar a relação sinal/ruído e conseqüentemente o LOD. Porém, se o método não proporciona um bom desempenho de separação não é sugerido o seu uso, uma vez que produz uma diminuição na altura de picos e, conseqüentemente, dificulta a visualização da separação dos picos nos eletroferogramas devido à uma pequena diminuição na



altura dos picos. Assim, a fim de se obter resultados mais confiáveis para os analitos estudados foi utilizado o efeito de suavização apenas em análises com boa eficiência de separação, ou seja, os eletroferogramas com picos com maior resolução.

Associando a esse estratégia o modelo de configuração de duplo-canal, desde que a interferência proveniente do potencial eletroforético seja evitada e produzir um bom desempenho da separação dos analitos em estudo, proporcionará uma considerável diminuição dos LOD. Isso pode ser comprovado através da excelente resposta da frequência do ruído que baixou de 4 para 0,98 pA (com efeito de suavização) quando comparado com o sistema de canal único que apresentou um ruído de 25 pA (GUNASEKARA et al., 2011). Os resultados comparativos estão apresentados na Tabela 1.

## 6.5 Desempenho de separação e limites de detecção

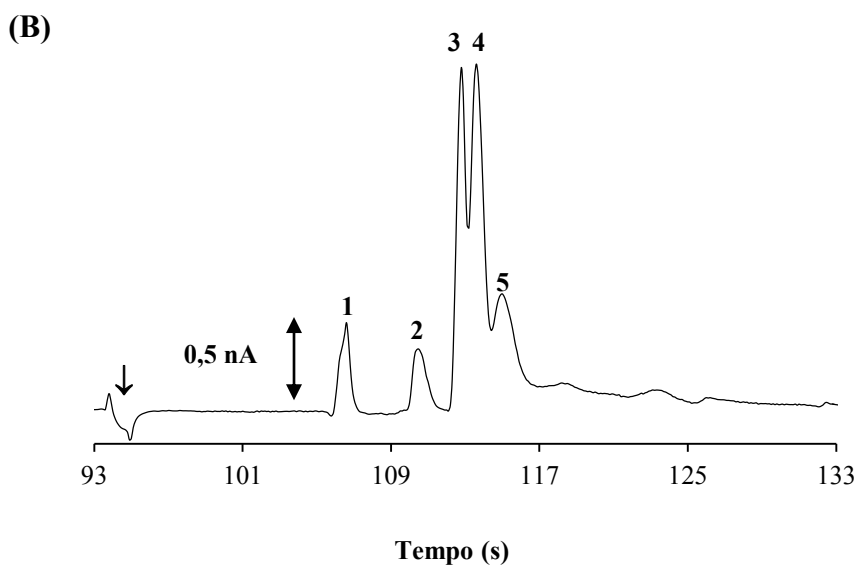
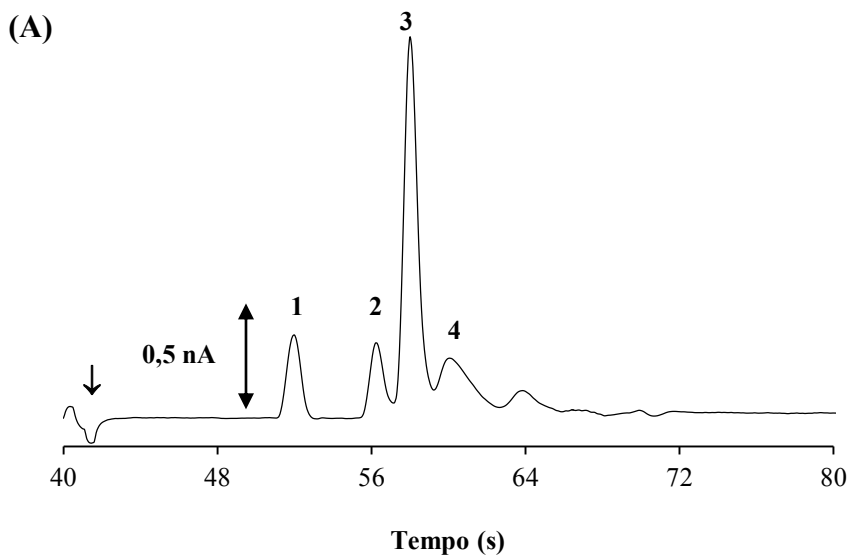
A performance de separação de algumas espécies de interesse no estresse oxidativo e nitrosativo usando a configuração de duplo-canal, com alinhamento dos eletrodos dentro do canal cerca 1  $\mu\text{m}$ , e detecção eletroquímica foi avaliada para a separação de nitrito, glutathiona (GSH), ácido ascórbico (AA),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tirosina e cisteína (Cys), e estão apresentados na Figura 24. Susan *et al* publicou protocolos para a separação e detecção destas espécies com microchip CE usando detecção amperométrica em microchip de configuração de único canal e usando um potenciostato eletricamente isolado (potenciostato wireless) (GUNASEKARA et al., 2011; GUNASEKARA et al., 2012). O uso do potenciostato wireless proporcionou o posicionamento dos eletrodos em uma configuração dentro do canal (configuração in-channel, cerca de 1 a 4  $\mu\text{m}$  dentro do canal), sem a necessidade de um desacoplamento, e sem sofrer com a interferência das elevadas voltagem de separações.

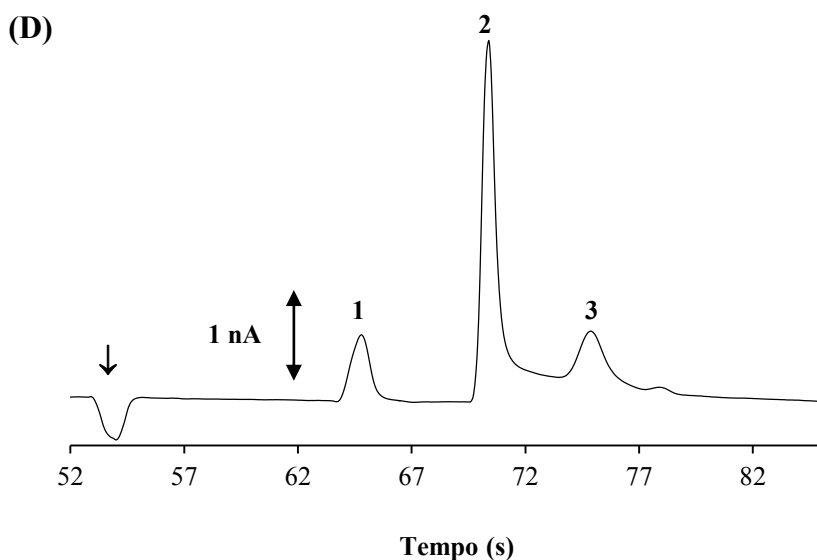
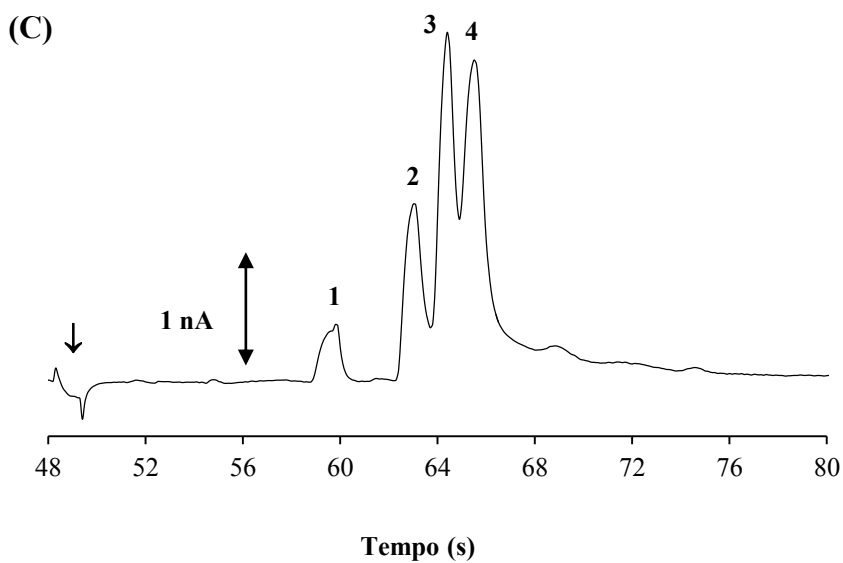
Na Figura 27 pode-se observar que o nitrito (pico 1 na Figura 27A, 27B e 27C) mostrou uma considerável resolução e tempo de migração. O sinal de pico analítico foi bastante simétrico, assim como um valor de LOD bastante expressivo se

comparado com outros métodos. A GSH (pico 2 na Figura 27A e 27B) apresentou uma melhoria significativa relacionada com o tempo de migração e separação em relação ao AA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se comparado com outros trabalhos já publicados, que mostraram a dificuldade em separar a GSH do AA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GUNASEKARA et al., 2011).

Um obstáculo bastante normal relacionado com os analitos em estudo neste trabalho é a separação entre tirosina, AA e GSH. Observando-se a Figura 27B, percebe-se que, com a metodologia proposta, houve uma melhora significativamente da separação da GSH em relação aos outros analitos, e conseguiu-se identificar a tirosina e o AA, porém é preciso melhorar a resolução dos picos e/ou o tempo de migração da tirosina em relação ao AA. Na Figura 27C é apresentada a confirmação da identificação da tirosina e do AA e ratifica a necessidade da melhoria já mencionada. Algo que se pode informar, ainda na Figura 27C, é o tempo de migração da Cys igual ao da GSH, isso implica dizer que, com a metodologia proposta, não se conseguiu separar esses analitos, sendo eles interferentes um do outro nas condições experimentais estudadas. No entanto, observou-se uma excelente eficiência de separação e tempo de migração para Cys na ausência de tirosina. Pode ser visto na Figura 27D que se realizar análise da mistura apenas de nitrito, tirosina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a eficiência de separação é excelente.

Figura 27 - Eletroferogramas de misturas equimolar 100  $\mu\text{M}$  de: (A) nitrito (1), GSH (2), AA (3) e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (4); (B) nitrito (1), GSH (2), tirosina (3), AA (4) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5); (C) nitrito (1), Cys (2), tirosina (3) e AA (4), (D) nitrito (1), tirosina (2) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3).  $E = 1,1 \text{ V}$ ; BGE (pH = 11) ácido bórico 10 mM contendo 2 mM TTAB; intensidade de campo elétrico de separação  $400 \text{ Vcm}^{-1}$  e injeção ( $\downarrow$ ) de 1 s (parâmetros otimizados).





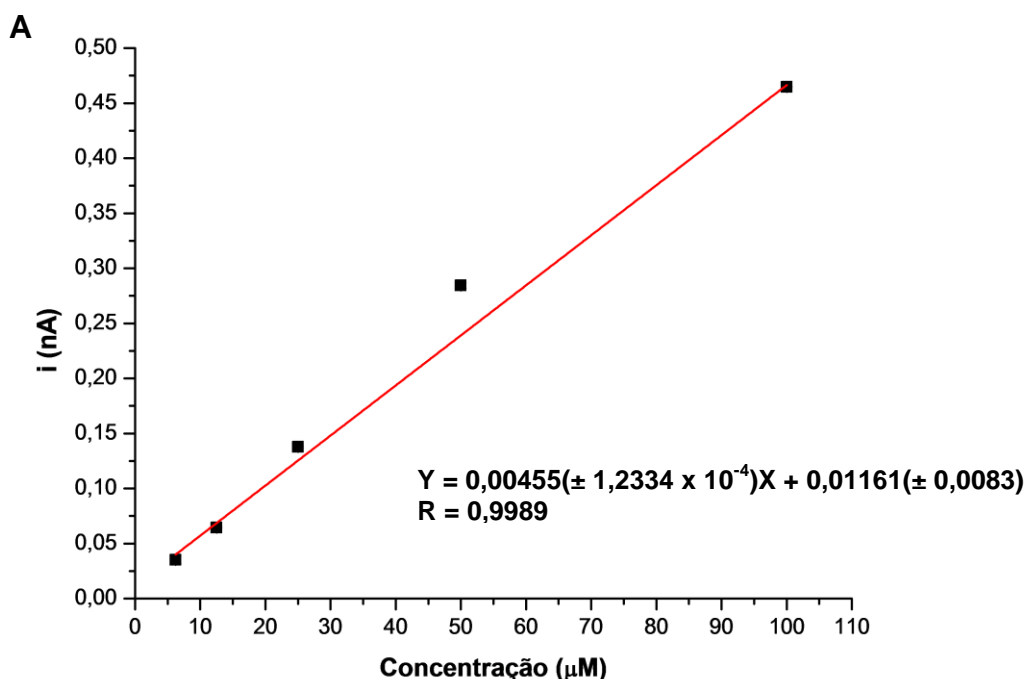
Fonte: Autor, 2013.

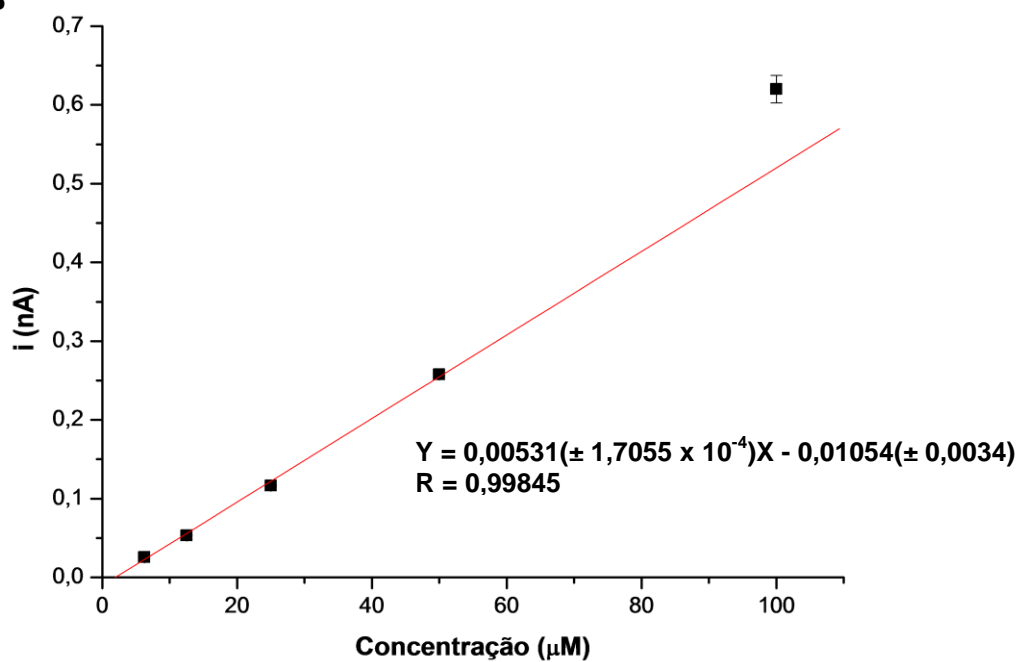
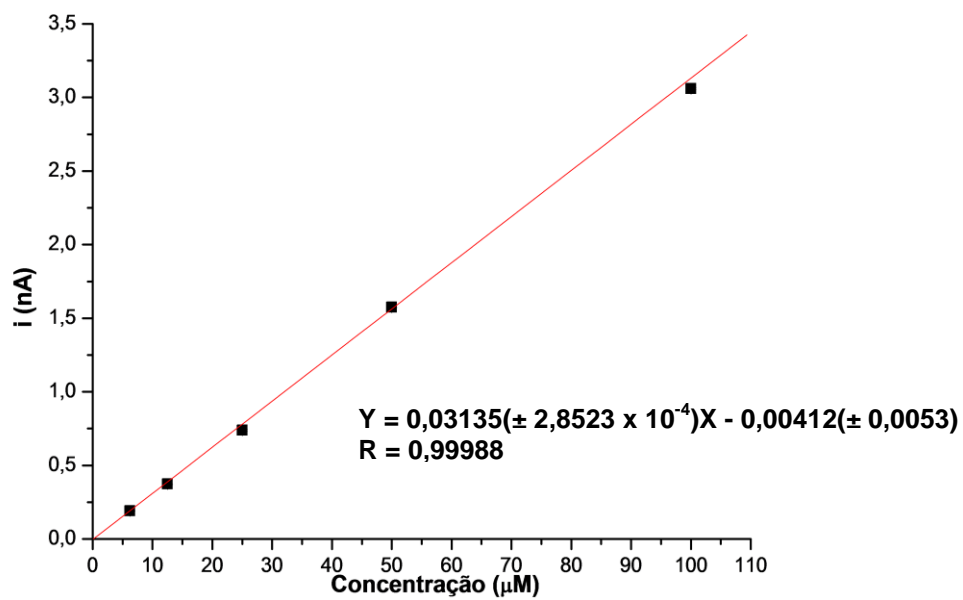
A estratégia da utilização de duplo-canal também reduziu consideravelmente a corrente de fundo (cerca de 0,8 nA) e da linha de base do ruído, o que garantiu a melhoria considerável dos limites de detecção (LOD) para estes analitos. Embora não tenha sido encontrada a separação da linha de base para todos os analitos apresentados, a resolução pode ser melhorada através da injeção de amostras mais diluídas, uma vez que os eletroferogramas apresentadas na Figura 27 foram obtidos por concentração de analitos de 100  $\mu\text{M}$ . Os LODs calculados usando a relação do sinal/ruído igual três ( $S/R = 3$ ) e para 1 s da injeção foram de 0,58, 0,75, 0,14, 0,82,

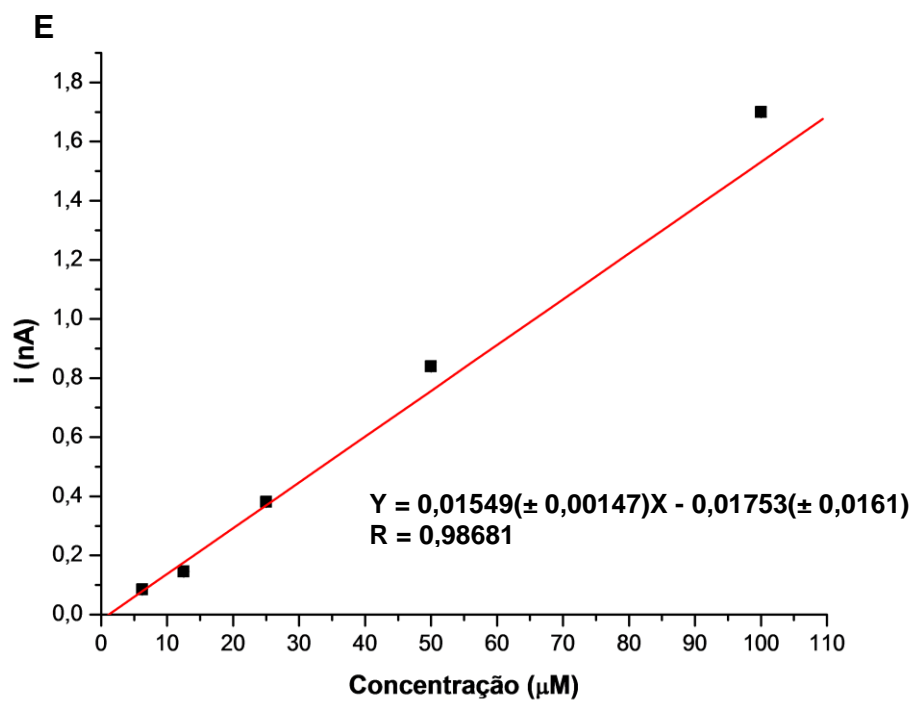
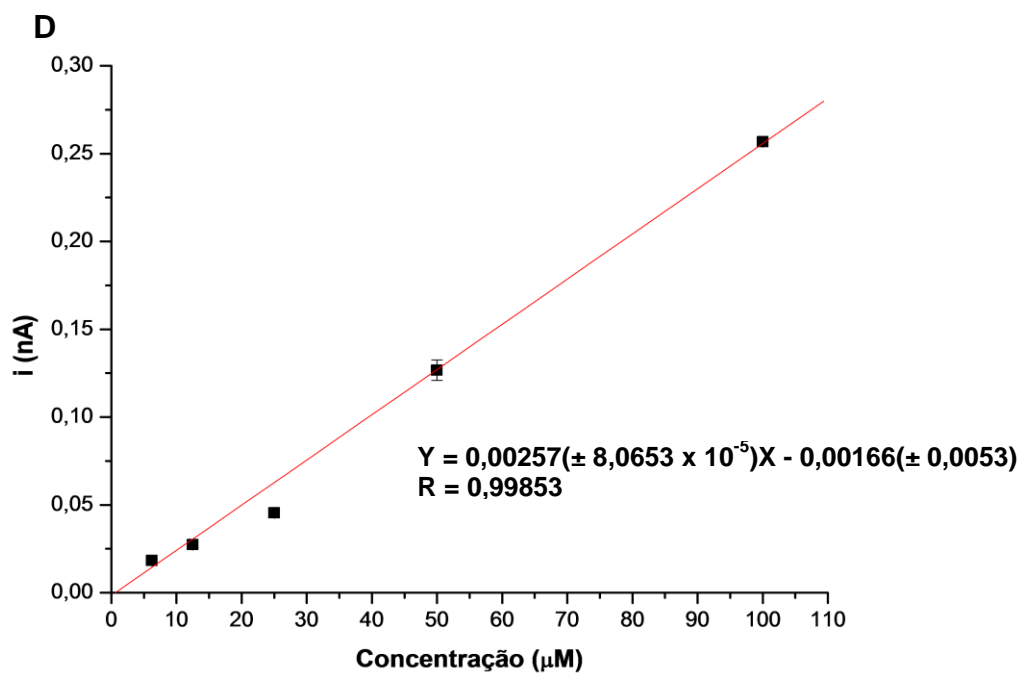
0,21 e 1,63  $\mu\text{M}$  para o nitrito,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tirosina, GSH, AA e peroxinitrito ( $\text{ONNO}^-$ ), respectivamente.

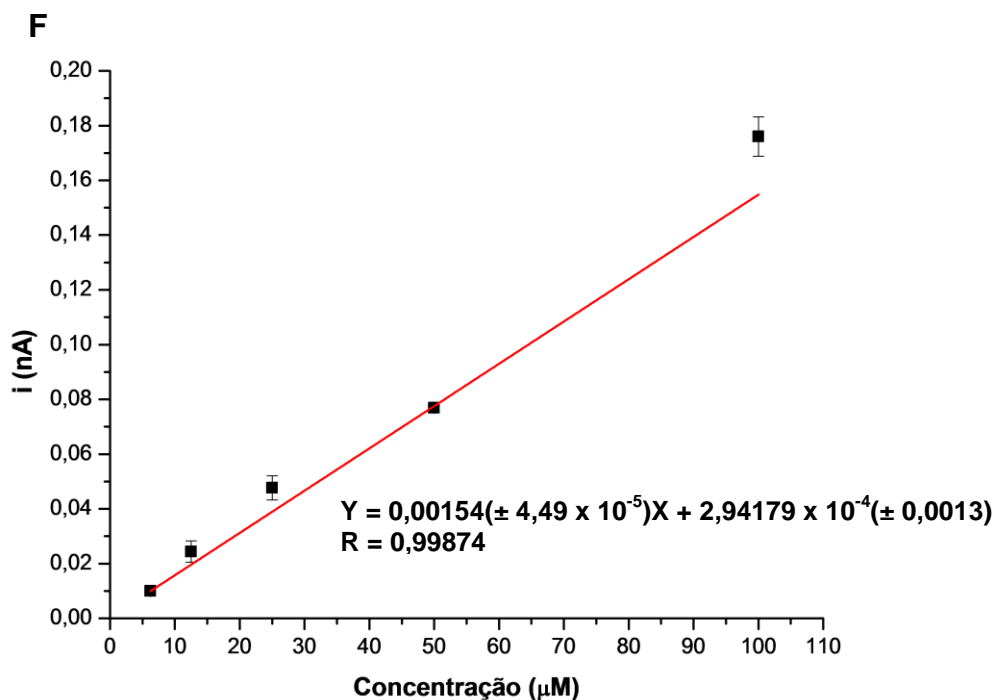
Na Figura 28 estão apresentadas as curvas de referência do nitrito,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tirosina, GSH, AA e  $\text{ONOO}^-$ , com suas respectivas equações de reta e coeficiente de linearidade.

**Figura 28 – Curvas de referência para análise de: (A) nitrito; (B)  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (C) tirosina; (D) GSH; (E) ácido ascórbico (AA); e (F)  $\text{ONOO}^-$ . Microchip PDMS/vidro de duplo-canal com 3,5 cm de comprimento dos canais de separação e referência e alinhamento dos eletrodos dentro do canal (1 a 4  $\mu\text{m}$  do eletrodo dentro do canal). Eletrodos de trabalho e referência de Pt (15  $\mu\text{m}$  cada).  $E = 1,1$  V aplicado no eletrodo de trabalho. BGE (pH = 11) - ácido bórico 10 mM contendo 2 mM TTAB. Alta voltagem aplicados nos reservatório da amostra de 1200 V e do BGE de 1400 V - intensidade de campo elétrico de separação de 400  $\text{Vcm}^{-1}$ . Faixa de concentração de 6,25 a 100  $\mu\text{M}$ . Esses parâmetros foram usados para todos as análises.**



**B****C**





As figuras de mérito apresentadas na Figura 28, através do coeficiente de correlação linear (R), faixa de concentração e equação da curva de referência, supracitadas ratifica a excelente resposta analítica através sensibilidade na detecção usando método proposto neste trabalho, assim como excelente robustez, repetitividade e reprodutibilidade de eventos. Somado a estes fatores foi a obtenção de excelente resultados para os limites de detecção (LOD) para as espécies estudadas quando comparadas às outras técnicas e metodologias.

Na Tabela 2 estão apresentados resultados comparativos para o LOD obtidos por diferentes metodologias e técnicas.



**Tabela 2 - Comparação de LODs entre a metodologia e técnica propostas\* e outras metodologias e técnicas.**

Analito	Métodos e Técnicas	LOD	Ref.
	*	0,58 µM	*
	MSE-DEQ	2,60 µM	GUNASEKARA et al., 2011
	MSE-C <sup>4</sup> D	308 µM	VÁZQUEZ et al., 2010
Nitrito	µFIA-DEQ	12 nM	LI et al., 2013
	CZE-UV	0,05 µM	WANG et al., 2012
	GC-MS	3,26 nM	PAGLIANO et al., 2012
	HPLC-UV	1,09 nM	HE et al., 2011
	µFIA-CL	87 nM	HE et al., 2007
	*	0,75 µM	*
	µFIA-DEQ	7 nM	LI et al., 2013
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PM-DEQ	2 nM	LI et al., 2010
	MSE-LIF	1 nM	CHEN et al., 2010
	CL-PD	4 µM	SHU et al., 2007
	DCL	2 µM	YANG et al., 2009
	*	0,14 µM	*
	ENCM-DEQ	0,19 µM	ARVAND et al., 1013
Tirosina	CL-FD	14 nM	SA et al., 2012
	IRS	3 µM	HUANG; YANG, 2005
	IRS	0,4 µM	LEE; YANG, 2006
	*	0,82 µM	*
	MSE-LIF	1,3 nM	CHEN et al., 2010
GSH	AIB-DEQ	0,10 µM	SEZGINTÜRK; DINÇKAYA, 2004
	FD-UV/vis	1 nM	GAO et al., 2012
	FD-UV/vis	178 µM	ZENG et al., 2011

	*	0,21 $\mu\text{M}$	*
AA	ECVM-DEQ	1,00 $\mu\text{M}$	GANESAN et al., 2013
	ENCM-DEQ	2,00 $\mu\text{M}$	WANG; BI, 2013
	ENCM-DEQ	3,00 $\mu\text{M}$	WANG et al., 2012
	ENCM-DEQ	0,14 $\mu\text{M}$	ZHANG et al., 2012
	MCEQA	0,80 $\mu\text{M}$	MOGHADAM et al., 2011
	*	1,63 $\mu\text{M}$	*
	MSE-DEQ	2,4 $\mu\text{M}$	HULVEY et al., 2010
ONOO <sup>-</sup>	EFCM-ECD	0,2 $\mu\text{M}$	PETEU et al., 2010
	ECVM-DEQ	0,1 $\mu\text{M}$	WANG; CHEN, 2010
	FD-UVvis	0,01 $\mu\text{M}$	HUANG, et al., 2007

Significados das siglas: \* = método proposto; MSE = microssistema eletroforético; DEQ = detecção eletroquímica;  $\mu\text{FIA}$  = análise por injeção em microfluxo; C<sup>4</sup>D = condutividade sem contato capacitivamente acoplado a detecção; CZE = eletroforese capilar por zona; UV = detecção ultra violeta; GC = cromatografia gasosa; MS = espectroscopia de massa; HPLC = cromatografia de líquida alta eficiência; CL = cromatografia líquida; PM = micromatrizes de proteína; LIF = fluorescência por laser induzido; PD = fosforescência; DCL = detecção de quimiluminescência; ENCM = eletrodo de nanotubo de carbono modificado; FD = detecção de fluorescência; IRS = espectroscopia de infravermelho; AIB = biossensor inibidor amperométrico; UV/vis = ultravioleta/visível; ECVM = eletrodo de carbono vítreo modificado; MCEQA = método cinético-espectrofotométrica quimiométrica assistida; EFCM = eletrodo de fibra de carbono modificado; ECD = detecção eletrocatalítica.

Fonte: Autor, 2013.

Ao comparar os resultados dos LODs dos analitos estudado (nitrito, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tirosina, GSH, AA e ONOO<sup>-</sup>) pelo método proposto e outros métodos publicados na literatura, pode-se afirmar que o método proposto é viável se os níveis de concentração das espécies em estudo estiverem dentro da faixa de concentração exigida para as análises das amostras reais pertinentes.

## 6.6 Detecção e identificação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )

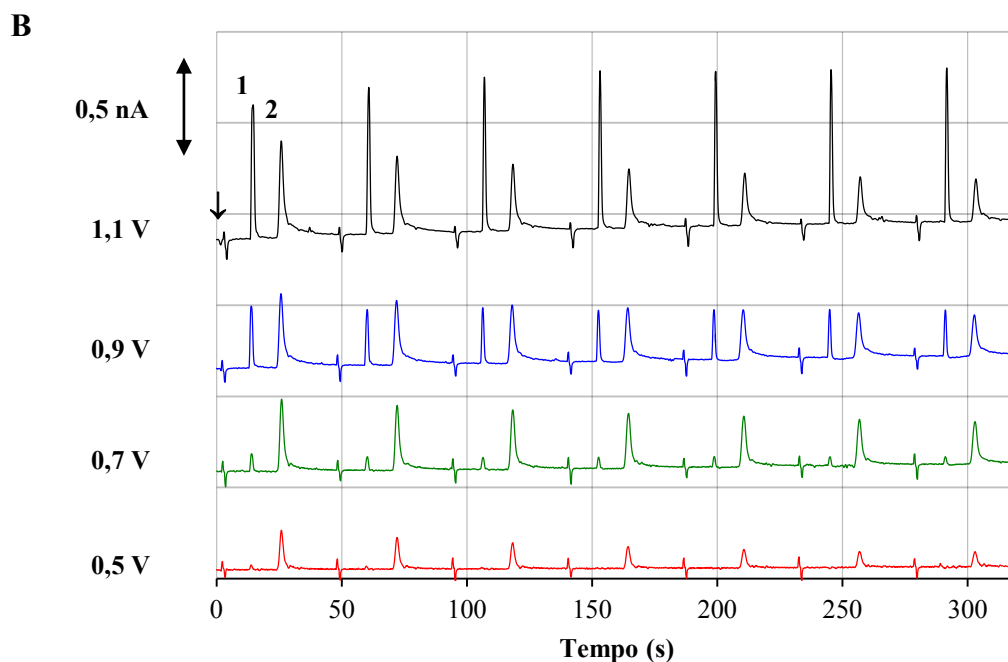
Peroxinitrito é uma espécie eletroativa e reativa envolvida no estresse nitrosativo. Em condições otimizadas corretamente, o peroxinitrito pode ser identificado, separado e detectado por micro sistema eletroforético (MSE) com detecção eletroquímica (DEQ), (GUNASEKARA et al., 2011; VÁZQUEZ et al., 2010; HULVEY et al., 2010).

Buscando os melhores resultados analíticos para  $\text{ONOO}^-$  foi proposta a preparação da solução padrão de peroxinitrito usando apenas a solução tampão (BGE) pH = 11 de ácido bórico 10 mM contendo TTAB 2 mM para a diluição sem acrescentar NaOH, diferindo do preparo da solução encontrado na literatura que acrescentaram NaOH à solução padrão em BGE, que provavelmente pode ter mudado o pH 11 para um valor maior dificultando a estabilidade do  $\text{ONOO}^-$  (GUNASEKARA et al., 2011). Assim, com essa estratégia tornou-se mais fácil o preparo das soluções e pode-se notar uma melhora na resolução e na eficiência de separação, em comparação com os resultados encontrados na literatura. A amostra padrão de peroxinitrito apresentou dois picos, sendo o primeiro nitrito e segundo  $\text{ONOO}^-$ . Isso pode ser observado na Figura 26A.

Objetivando a otimização e confirmação dos resultados foi feito o estudo do comportamento das espécies presentes na amostra padrão,  $\text{ONOO}^-$  e nitrito, quando submetidas a diferentes potenciais do eletrodo de trabalho. Na Figura 29B pode-se ver a partir deste estudo que o pico analítico do nitrito é reduzido, a uma certa proporção, quando o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho também é reduzido. Isso já era esperado conforme os resultados observados na Figura 24, e assim foi confirmado os resultados apresentados, onde o nitrito não apresentou nenhum sinal de pico a um potencial de 0,5 V aplicado ao eletrodo de trabalho. A amostra padrão de  $\text{ONOO}^-$  apresentou uma diminuição no seu pico, no entanto ainda era evidente no potencial de 0,5 V, diferindo assim do comportamento redox apresentado pelo nitrito para o mesmo ensaio. A utilização do método proposto poderá permitir uma quantificação mais precisa do  $\text{ONOO}^-$  em matrizes complexas.

E para determinar o limite de detecção do  $\text{ONOO}^-$  utilizando o método proposto foi construída uma curva de calibração para uma faixa de concentração de



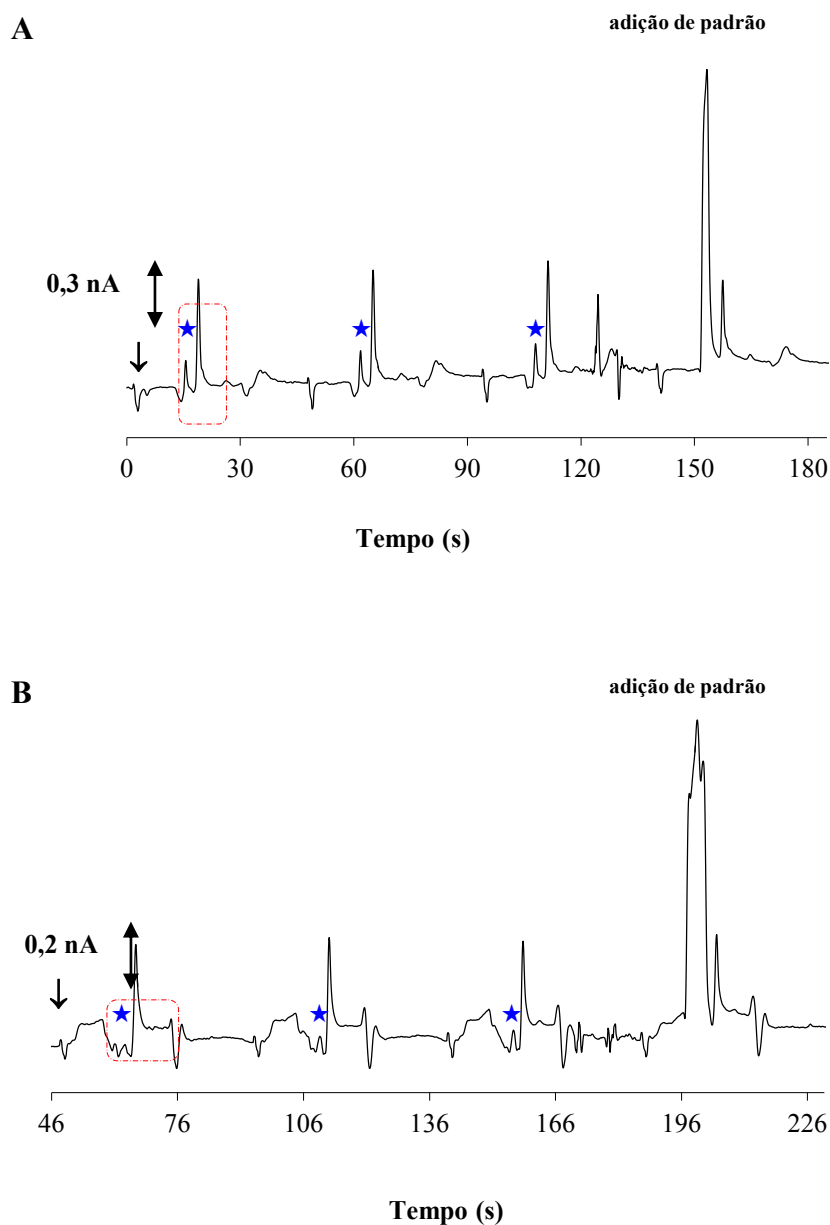


Fonte: Autor, 2013.

### 6.7 Monitoramento de nitrito em amostras perfusadas de sangue de ovelhas e ratos

O microchip de duplo-canal com detecção amperométrica foi aplicado na determinação de nitrito em perfusato de sangue de ovelhas e ratos, com o objetivo de testar a eficiência do sistema proposto. As análises seguiram as seguintes etapas: obteve-se a amostra, perfusada pelo grupo da Profa. Dra. Susan Lunte (SCOTT et al., 2013), a qual tinha 10  $\mu\text{L}$  para cada amostra e foi estocada a uma temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o total descongelamento, foi diluído em uma proporção de 1:1 com BGE, ou seja, 10  $\mu\text{L}$  de solução tampão, e as análises foram feitas imediatamente após preparação. Apesar da complexidade das matrizes das amostras, o método proposto neste trabalho, demonstrou ser uma excelente metodologia para monitoramento das espécies estudadas, sobretudo para nitrito. Os electroferogramas para as análises das amostras são mostrados na Figura 30.

**Figura 30 - Eletroferogramas da determinação de nitrito nas amostras de perfusato de (A) ovelhas (★ nitrito); (B) ratos (★ nitrito); E = 1,1 V; BGE (pH = 11) de ácido bórico 10 mM contendo TTAB 2 mM; intensidade de campo elétrico de separação eletroforética de 400 Vcm<sup>-1</sup> e de injeção (↓) de 1 s; adição de 2 µL padrão de nitrito 10 mM em 20 µL da solução 1:1 de amostra do perfusato da ovelha ou rato e BGE.**



Fonte: Autor, 2013.

Com base nos dados obtidos a partir da curva de referência para o a solução padrão de nitrito, calculados após a otimização completa do método proposto e apresentado na Figura 30, foram os feitos cálculos adequados para quantificar a concentração do nitrito nas amostras analisadas. Os resultados apresentaram uma

concentração de  $34,025 \pm 0,012 \mu\text{M}$  de nitrito nas amostras de perfusato sangue de ovelhas, e como a detecção foi feita a partir da amostra após diluição em uma proporção de 1:1, a concentração real será  $68,05 \mu\text{M}$ , aproximadamente, e usando a mesma estratégia para as amostras de perfusato de sangue de ratos detectou-se uma concentração de  $11,02 \pm 0,012 \mu\text{M}$  de nitrito, sendo que a concentração real foi de aproximadamente  $22,04 \mu\text{M}$ . O pico para o nitrito foi confirmado com o teste de adição de padrão. A adição de padrão foi realizado a partir da adição de  $2 \mu\text{L}$  de nitrito  $10 \text{ mM}$  em  $20 \mu\text{L}$  da solução 1:1 de amostra do perfusato da ovelha ou rato e BGE.

## 7 CONCLUSÕES

A estratégia de selagem assistida plastificante para o fabrico do dispositivo microfluídico de PMMA e da base para fixação do microchip, feita com o mesmo material, onde os microchips, os microcanais e a base foram fabricados por laser de CO<sub>2</sub>, demonstrou significativa facilidade, simplicidade, versatilidade e um baixo custo considerável, conseqüentemente, esse método torna-se extremamente atraente para produção de dispositivos microfluídicos de PMMA. A viabilidade e desempenho do microchip obtido foram avaliados através da detecção de serotonina e paracetamol por eletroforese em microchip usando detecção eletroquímica com eletrodo de pasta de carbono.

A partir dos resultados discutidos ficou comprovado que o sistema precisa ser otimizado, como por exemplo, a mobilidade das espécies em estudo para obter-se gráficos mais simétricos, a distância do eletrodo de trabalho em relação à saída do microcanal, o tipo e o pH do eletrólito suporte, analisar as duas espécies simultaneamente para averiguar a eficiência da separação eletroforética, dentre outras.

A outra estratégia demonstrou ser viável integrar um microsistema eletroforético híbrido PDMS/vidro com duplo-canal paralelo à um potenciostato eletricamente isolado. O potenciostato eletricamente isolado permitiu o posicionamento do eletrodo de trabalho dentro do microcanal de separação, o qual recebeu uma alta voltagem, sem danificar os eletrodos e/ou o potenciostato.

O modelo de configuração de duplo-canal propiciou que a interferência no eletrodo de trabalho proveniente do potencial de separação fosse evitada. Com isso, se comparado com a configuração de canal simples, obteve-se uma expressiva melhora na eficiência e no desempenho da separação dos analitos e uma considerável diminuição no ruído (cerca de 0,94 pA) e, conseqüentemente, na relação sinal/ruído, e na sensibilidade do método proposto comprovada pela diminuição considerável do limite de detecção, se comparado à outros métodos propostos na literatura.



As figuras de mérito, tais como, coeficiente de correlação linear (R), faixa de concentração e equação da reta de referência, ratificaram a excelente resposta analítica através da sensibilidade na detecção usando o método proposto, assim como excelente robustez, repetitividade e reprodutibilidade de eventos.

A eficácia do método proposto foi ratificada através da eficiência de separação e dos excelentes LODs, calculados usando a relação do sinal/ruído igual três ( $S/R = 3$ ) e para 1 s da injeção, encontrados para nitrito ( $0,58 \mu\text{M}$ ), tirosina ( $0,14 \mu\text{M}$ ), peróxido de hidrogênio ( $0,75 \mu\text{M}$ ), glutathiona ( $0,82 \mu\text{M}$ ), ácido ascórbico ( $0,21 \mu\text{M}$ ), cisteína (não obteve-se LOD) e peroxinitrito ( $1,63 \mu\text{M}$ ). Ao comparar os resultados dos LODs dos analitos estudados pelo método proposto e outros métodos já publicados na literatura, pode-se afirmar que o método proposto é, sem dúvidas, viável de aplicação se os níveis de concentração das espécies em estudo estiverem dentro da faixa de concentração exigida para as análises das amostras reais pertinentes.

Em especial, os resultados obtidos para o nitrito possibilitou realizar análises de amostras de perfusato de sangue de ovelhas e ratos, obtendo-se uma excelente resposta para a concentração de nitrito, a qual foi confirmada pela adição de padrão de nitrito. Com isso, ficou evidente a viabilidade do método proposto para a sua aplicação em amostras reais.

## PERSPECTIVAS

1. Usar o sistema desenvolvido para análise de óxido nítrico em células.
2. Aplicar a metodologia desenvolvida para separar e monitorar pesticidas em alimentos.
3. Construir microchips com outras configurações e substratos;
4. Fazer eletrodos de pasta de carbono com e sem modificações para associá-los aos microssistemas e, conseqüentemente, melhorar a sensibilidade e seletividade de espécies;
5. Fabricar eletrodos múltiplos, com possibilidades de acoplar a microssistemas, para análises voltamétricas e amperométricas de NO<sub>x</sub>.
6. Estudar a possibilidade de portabilidade de microssistemas para a realização de análises *in campo*.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. N. Carbon Paste Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1576, 1958.
- ALARIE, F. P.; JACOBSON, S. C.; RAMSEY, J. M. Electrophoretic injection bias in a microchip valving scheme. **Electrophoresis**. v. 22, p. 312-317, 2001.
- ALEIXO, L.M. Voltametria: conceitos e técnicas. **www.chemkeys.com. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química**, São Paulo, 40p. 2003.
- AMBROSI, A.; GUIX, M.; MERKOC, A. Magnetic and electrokinetic manipulations on a microchip device for bead-based immunosensing applications. **Electrophoresis**. v. 32, p. 861-869, 2011.
- ARMSTRONG, D. Methods in Molecular Biology Volume 196. Oxidants and Antioxidants Ultrastructure and Molecular Biology Protocols. **HUMANA PRESS**. 2002.
- ARORA, A. et al. Latest Developments in Micro Total Analysis Systems. **Analytical Chemistry**. v. 82, p. 4830-4847, 2010.
- ARVAND, M.; GHOLIZADEH, T. M. Simultaneous voltammetric determination of tyrosine and paracetamol using a carbon nanotube-graphene nanosheet nanocomposite modified electrode in human blood serum and pharmaceuticals. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**. v.103, p. 84-93, 2013.
- AUROUX, P.-A.; IOSSIFIDIS, D.; REYES, D. R.; MANZ, A., Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications. **Analytical Chemistry**. v. 74, p. 2637-2652, 2002.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. Electrochemical Methods Fundamentals and Applications. **John Wiley & Sons, INC**. New York, USA, 2001.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**. v. 29, No. 1, 113-123, 2006.
- BECKER, H.; GARTNER, C. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. **Electrophoresis**. v. 21, p. 12-26, 2000.
- BECKER, H.; LOCASCIO, L. E. Polymer microfluidic devices. **Talanta**. v. 56, p. 267-287, 2002.
- BERGAMINI, M. F. et al. Determinação de chumbo em álcool combustível por voltametria de redissolução anódica utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com resina de troca iônica Amberlite IR 120. **Eclética**. v. 31, No 2, p. 45-52, 2006.

BERGAMO, A. B.; SILVA, J. A. F.; JESUS, D. P. Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Food Chemistry**. v. 124, p. 1714-1717, 2011.

BOCKRIS, J. O'M; REDDY, A. K. N.; GAMBOA-ALDECO, M. MODERN ELECTROCHEMISTRY, SECOND EDITION, Fundamentals of Electrodeics. **Kluwer Academic Publishers**. New York, USA, 2002.

BOND, A. M. 200 years of practical electroanalytical chemistry: past, present and future directions illustrated by reference to the on-line, on stream and off-line determination of trace metals in zinc plant electrolyte by voltammetric and potentiometric techniques. **Analytica Chimica Acta**. v. 400, p. 333-379, 1999.

BRAJTER-TOTH, A.; CHAMBERS, J. Q. Electroanalytical Methods for Biological Materials. **Marcel Dekker, Inc.** New York, USA, 2002.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O., Electrochemistry Principles, Methods, and Applications. **John Wiley & Sons, INC.** New York, USA, 2001.

BURDICK, J. A.; KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. Fabrication of Gradient Hydrogels Using a Microfluidics/Photopolymerization Process. **Langmuir**. v. 20, p. 5153-5156, 2004.

CABODI, M. et al. A Microfluidic Biomaterial. **Journal of the American Chemical Society**. v. 127, p. 13788-13789, 2005.

CASTAÑO-ÁLVAREZ, M. et al. Multiple-point electrochemical detection for a dual-channel hybrid PDMS-glass microchip electrophoresis device. **Electrophoresis**. v. 30, p. 3372-3380, 2009.

CHATTERJEEA, E. et al. A microfluidic sensor based on ferromagnetic resonance induced in magnetic bead labels. **Sensors and Actuators B**. v. 156, p. 651-656, 2011.

CHEN, C.; HAHN, J. H. Dual-Channel Method for Interference-Free In-Channel Amperometric Detection in Microchip Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**. v. 79, p. 7182-7186, 2007.

CHEN, C.; HAHN, J. H. Enhanced aminophenols monitoring using in-channel amperometric detection with dual-channel microchip capillary electrophoresis. **Environmental Chemistry Letters**. v. 9, p. 491-497, 2011.

CHEN, C.; TENG, W.; HAHN, J. H. Nanoband electrode for high-performance in-channel amperometric detection in dual-channel microchip capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 32, p. 838-843, 2011.

CHEN, Z. et al. Potent Method for the Simultaneous Determination of Glutathione and Hydrogen Peroxide in Mitochondrial Compartments of Apoptotic Cells with Microchip Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence. **Analytical Chemistry**. v.

82, p. 2006-2012, 2010.

CHRISTIAN, G. D. Analytical Chemistry. **John Wiley & Sons**. 4th ed., New York, USA, 1986.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. **Editora Unicamp**. 4<sup>a</sup> Reimpressão, Campinas, SP-BR, 2011.

COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**. v. 20(5), p. 512-518, 1997.

COLTRO, W. K. T. et al. Microfluidic devices with integrated dual-capacitively coupled contactless conductivity detection to monitor binding events in real time. **Sensors and Actuators B**. v. 192, p. 239-246, 2014.

COLTRO, W. K. T. et al. Microsistemas de Análises Químicas. Introdução, Tecnologia de Fabricação, Instrumentação e Aplicações, **Química Nova**. v. 30, No. 8, p. 1986-2000, 2007.

COLTRO, W. K. T. et al. Electrophoresis microchip fabricated by a direct-printing process with end-channel amperometric detection. **Electrophoresis**. v. 25, p. 3832-3839, 2004.

COSTA, E. T. **Processo de fabricação de mini e microdispositivos fluidicos por ablação a laser de dióxido de carbono**. Dissertação, Universidade de São Paulo, p. 33-39, 2009.

COSTA, J. L. **Eletroforese capilar como ferramenta analítica para toxicologia forense**. Tese, Universidade de São Paulo, p. 5-18, 2008.

CRESPILHO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Química Nova**, v. 27, No. 6, p. 964-969, 2004.

DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A. Micro Total Analysis Systems. Latest Advancements and Trends. **Analytical Chemistry**. v. 78, No. 12, p. 3887-3908, 2006.

DOLNIK, V.; LIU, S. R.; JOVANOVIĆ, S. Capillary electrophoresis on microchip. **Electrophoresis**. v. 21, p. 41-54, 2000.

DUAN, H.; ZHANG, L.; CHEN, G. Plasticizer-assisted bonding of poly(methyl methacrylate) microfluidic chips at low temperature. **Journal of Chromatography A**. v. 1217, p. 160-166, 2010.

FERNANDES, J. C. B.; FERREIRA, L. O. S. Manufacturing of miniature fluidic modules for lab-on-a-chip using a photoresin from flexographic platemaking process. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 17 (4), p. 643-647, 2006.

FIORAVANTE JUNIOR, N. P. **Caracterização e otimização dos processos de fotolitografia aplicados na fabricação de dispositivos micrométricos mos e microssistemas**. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas, p. 5-40,s 2004.

FISCHER, D. J. et al. Amperometric detection in microchip electrophoresis devices: Effect of electrode material and alignment on analytical performance. **Electrophoresis**. v. 30, p. 3324-3333, 2009.

FISCHER, D. J. et al. Pyrolyzed Photoresist Carbon Electrodes for Microchip Electrophoresis with Dual-Electrode Amperometric Detection. **Electrophoresis**. v. 17, p. 1153-1159, 2005.

FONSECA, A. et al. Construction and evaluation of a flow injection micro-analyser based on urethane-acrylate resin. **Analytica Chimica Acta**. v. 603, p. 159-166, 2007.

GABRIEL, E. F. M.; COLTRO, W. K. T.; GARCIA, C. D. Fast and versatile fabrication of PMMA microchip electrophoretic devices by laser engraving. **Electrophoresis**. v. 00, p. 1-8, 2014.

GAO, Y. et al. Highly sensitive and selective detection of biothiols using graphene oxide-based “molecular beacon”-like fluorescent probe. **Analytica Chimica Acta**. v. 731, p. 68-74, 2012.

GANESAN, V. et al. Ion exchange voltammetry at branched polyethylenimine cross-linked with ethylene glycol diglycidyl ether and sensitive determination of ascorbic acid. **Electrochimica Acta**. v. 105, p. 31-39, 2013.

GARCIA, M.; ESCARPA, A. Microchip electrophoresis—copper nanowires for fast and reliable determination of monossacharides in honey samples. **Electrophoresis**. v. 35, p. 425-432, 2014.

GHANIM, M. H.; ABDULLAH, M. Z. Integrating amperometric detection with electrophoresis microchip devices for biochemical assays: Recent developments. **Talanta**. v. 85, p. 28-34, 2011.

GONG, M. et al. Flow manipulation for sweeping with a cationic surfactant in microchip capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. v. 1167, p. 217–224, 2007.

GRIMSHAW, J. **Electrochemical Reactions and Mechanisms in Organic Chemistry**. Elsevier. 2000.

GUIHEN, E. Recent advances in miniaturization—The role of microchip electrophoresis in clinical analysis. **Electrophoresis**. v. 35, p. 138-146, 2014.

GUNASEKARA, D. B.; HULVEY M. K.; LUNTE S. M. In-channel amperometric detection for microchip electrophoresis using a wireless isolated potentiostat. **Electrophoresis**, v. 32, p. 832-837, 2011.

GUNASEKARA, D. B. et al. Microchip electrophoresis with amperometric detection for the study of the generation of nitric oxide by NONOate salts. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.403(8), p. 2377-2384, 2012.

HADDAD, P. R.; DOBLE, P.; MACKA, M. Developments in sample preparation and separation techniques for the determination of inorganic ions by ion chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. v. 856, 145-177, 1999.

HARRISON, D. J. et al. **Science**. v. 261, p. 895-897, 1993.

HARRISON, D. J. et al. Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip. **Analytical Chemistry**. v. 64, p. 1926-1932, 1992.

HE, D. et al. Chemiluminescence microflow injection analysis system on a chip for the determination of nitrite in food **Food Chemistry**. v. 101, p. 667-672, 2007.

HE, L. et al. Effective indirect enrichment and determination of nitrite ion in water and biological samples using ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 3595-3600, 2011.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, D. et al. Reactive oxygen species: A radical role in development? **Free Radical Biology & Medicine**. v. 49, p. 130-143, 2010.

HONG, T. F. et al. Rapid prototyping of PMMA microfluidic chips utilizing a CO<sub>2</sub> laser. **Microfluid Nanofluid**. v. 9, 1125-1133, 2010.

HUANG, G. G.; YANG, J. Development of infrared optical sensor for selective detection of tyrosine in biological fluids. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 21, p. 408-418, 2005.

HUANG, JUN-CHAO et al. A novel fluorescent method for determination of peroxynitrite using folic acid as a probe. **Talanta**. v. 72, p. 128-1287, 2007.

HUANG, X. et al. End-Column Detection for Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Chemistry**. v. 63, p. 189-192, 1991.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; de FÁTIMA, A. Glutaciona e Enzimas Relacionadas: Papel Biológico e Importância em Processos Patológicos. **Química Nova**. v. 31, No. 5, p. 1170-1179, 2008.

HULVEY, M. K.; FRANKENFELD, C. N.; LUNTE, S. M. Separation and Detection of Peroxynitrite Using Microchip Electrophoresis with Amperometric Detection. **Analytical Chemistry**. v. 82, p. 1608-1611, 2010.

KLETT, O.; BJOREFORS, F.; NYHOLM, L. Elimination of High-Voltage Field Effects in End Column Electrochemical Detection in Capillary Electrophoresis by Use of On-Chip Microband Electrodes. **Analytical Chemistry**. v. 73, p. 1909-1915, 2001.

- KLETT, O.; NYHOLM, L. Separation High Voltage Field Driven On-Chip Amperometric Detection in Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**. v. 75, p. 1245-1250, 2003.
- KING, K. R. et al. Biodegradable Microfluidics. **Advanced Materials**. v. 16, p. 2007-2012, 2004.
- KUMAR, C. S. Microfluidic Devices in Nanotechnology Applications. **John Wiley & Sons, Inc.** New Jersey, USA, 2010.
- KUWANA, T.; FRESCH, W. G., Electro oxidation or Reduction of Organic Compounds into Aqueous Solutions Using Carbon Paste Electrode. **Analytical Biochemistry**. p. 36, 241, 1964.
- LACHER, N. A. et al. Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry. **Electrophoresis**. v. 22, p. 2526–2536, 2001.
- LACHER, N. A.; LUNTE, S. M.; MARTIN, R.S. Development of a Microfabricated Palladium Decoupler/Electrochemical Detector for Microchip Capillary Electrophoresis Using a Hybrid Glass/Poly(dimethylsiloxane) Device. **Analytical Chemistry**. v. 76, p. 2482-2491, 2004.
- LANDERS, J. P. Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques. **CRC Press, Taylor & Francis Group**. 3<sup>a</sup> ed.,NW, USA, 2006.
- LEE, CHUNG-JAY; YANG, J.  $\alpha$ -Cyclodextrin-modified infrared chemical sensor for selective determination of tyrosine in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. v. 359, p. 124-131, 2006.
- LEITE, J. L. **Sinterização seletiva a laser de blendas de pa12/pead, pa6/pa12 e pmma/ps com gradientes funcionais aplicáveis em componentes anti-fricção**. Tese, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 25-65, 2007.
- LI, X. et al. Real-Time Electrochemical Monitoring of Cellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Integrated with In Situ Selective Cultivation of Living Cells Based on Dual Functional Protein Microarrays at Au–TiO<sub>2</sub> Surfaces. **Analytical Chemistry**. v. 82, p. 6512-6518, 2010.
- LI, X. et al. A microchip electrophoresis-mass spectrometric platform for fast separation and identification of enantiomers employing the partial filling technique. **Journal of Chromatography A**. v. 1318, p. 251–256, 2013.
- LI, Y. et al. Highly Sensitive Platinum-Black Coated Platinum Electrodes for Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide and Nitrite in Microchannel. **Electroanalysis**. p. 1-8, 2013.
- LIMA, M. S. F. **Fabricação assistida por laser**. Texto técnico, Instituto de Estudos Avançados IEAv, Centro Técnico Aeroespacial CTA. <<http://www.abcm.org.br/pt/wp-content/anais/cobef/2005/PALESTRA02.pdf>>. Acesso em 02/07/2014.



LIVAK-DAHL, E.; SINN, I.; BURNS, M. Microfluidic Chemical Analysis Systems. **Chemical and Biomolecular Engineering**. v. 2, p. 325-353, 2011.

LUNTE, S. M. et al. Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry. **Marcel Dekker**. 2nd ed., New York, USA, 1996.

MANOEL, R. V. G. **Desenvolvimento de métodos para determinação de cátions inorgânicos em leites, nitrito e ni- trato em alface e histamina em peixes utilizan- do eletroforese capilar**. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 25-30, 2011.

MANZ, A. et al. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems. **Journal Chromatography**. v. 593, p. 253-258, 1992.

MANZ, A. et al. Design of an Open-tubular Column Liquid Chromatograph Using Silicon Chip Technology. **Sensors and Actuators B1**. p. 249-255, 1990.

MARK, J. J. P.; SCHOLZ, R.; F. M. MATYSIK, F. M. Electrochemical methods in conjunction with capillary and microchip electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. v. 1267, p. 45-64, 2012.

MARTIN, R. S. et al. Dual-Electrode Electrochemical Detection for Poly(dimethylsiloxane)-Fabricated Capillary Electrophoresis Microchips. **Analytical Chemistry**. v. 72, p. 3196-3202, 2000.

MARTIN, R. S. et al. In-Channel Electrochemical Detection for Microchip Capillary Electrophoresis Using an Electrically Isolated Potentiostat. **Analytical Chemistry**. v. 74, p. 1136-1143, 2002.

MATUSZEWSKI, W.; TRAJANOWICZ, M. Graphite Paste-based Enzymatic Glucose Electrode for Flow Inject ion Analysis. **Analyst**. v. 113, p. 735, 1988.

MITRA, I.; MARCZAK, S. P.; JACOBSON, S. C. Microchip electrophoresis at elevated temperatures and high separation field strengths. **Electrophoresis**. v. 35, p. 374-378, 2014.

MOGHADAM, M. R. et al. Chemometric-assisted kinetic–spectrophotometric method for simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid, and dopamine. **Analytical Biochemistry**. v. 410, p. 289-295, 2011.

MOSES, P. R., WIER, L., MURRAY, R. W. Chemically Modified Tin Oxide Electrode. **Analytical Chemistry**. v. 47, No. 12, 1975.

NAYAK, N. C. et al. CO<sub>2</sub>-laser micromachining of PMMA: the effect of polymer molecular weight. **Journal of Micromechanics and Microengineering**. v. 18, p. 1-7, 2008.

NGUYEN, NAM-TRUNG; WERELEY, S. T. Fundamentals and Applications of Microfluidics. **Artech House**, 2<sup>a</sup> ed., Boston, USA, 2006.

OHLWEILER, O. A., Fundamentos de Análise Instrumental, 1ª Ed., Rio de Janeiro, 1981.

PAGLIANO, E. et al. Negative Chemical Ionization GC/MS Determination of Nitrite and Nitrate in Seawater Using Exact Matching Double Spike Isotope Dilution and Derivatization with Triethyloxonium Tetrafluoroborate. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 2592-2596, 2012.

PAGUIRIGAN, A.; BEEBE, D. J. Gelatin based microfluidic devices for cell culture. **Lab on a Chip**. v. 6, p. 407-413, 2006.

PAIXÃO, T. R. L. C. **Fabricação e utilização de microeletrodos para determinação amperométrica em micro-ambientes**. Tese, Universidade de São Paulo, p. 1-4, 2007.

PAVIA, D. L. et al. Introdução à Espectroscopia. **CENGAGE Learning**. Tradução da 4ª edição norte-americana, São Paulo, SP-BR, 2010.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em Modificação de Eletrodos Amperométricos para Aplicações Eletroanalíticas. **Química Nova**. v. 25, No. 6, p. 1012-1021, 2002.

PETEU, S. et al. Nanostructured poly(3,4-ethylenedioxythiophene)–metalloporphyrin films: Improved catalytic detection of peroxyxynitrite. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 25, p. 1914-1921, 2010.

POZO-AYUSO, D. F. et al. Fabrication and evaluation of single- and dual-channel ( $\pi$ -design) microchip electrophoresis with electrochemical detection. **Journal Chromatography A**. v. 1180, p. 193-202, 2008.

RIBEIRO, S. M. R. et al. The Formation and the Effects of the Reactive Oxygen Species in Biological Media. **Bioscience Journal**. v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema Antioxidante Envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutaciona Associado a Métodos Eletroanalíticos na Avaliação do Estresse Oxidativo. **Química Nova**. v. 24, No. 1, p. 112-119, 2001.

RUANO-LÓPEZ, J. M. et al. A new SU-8 process to integrate buried waveguides and sealed microchannels for a Lab-on-a-Chip. **Sensors and Actuators B**. v. 114, p. 542-551, 2006.

SA, M. et al. Simultaneous determination of tyrosine, tryptophan and 5-hydroxytryptamine in serum of MDD patients by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Clinica Chimica Acta**. v. 413, p. 973-977, 2012.

SILVA, J. A. F. et al. Terminologia para as técnicas de eletromigração em capilares. **Química Nova**. v. 30, No. 3, p. 740-744, 2007.

SILVA, J. A. F.; LAGO, C. L. An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis.

**Analytical Chemistry**. v. 70, p. 4339-4343, 1998.

SCOTT, D. E.; GRIGSBY, R. J.; LUNTE, S. M. Microdialysis Sampling Coupled to Microchip Electrophoresis with Integrated Amperometric Detection on an All-Glass Substrate. **A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry (ChemPhysChem)**, v. 14, p. 2288 – 2294, 2013.

SEZGINTÜRK, M. K.; DINÇKAYA, E. An amperometric inhibitor biosensor for the determination of reduced glutathione (GSH) without any derivatization in some plants. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, p. 835-841, 2004.

SHU, X. et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sensor Based on the Room-Temperature Phosphorescence of Nano TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> Composite **Analytical Chemistry**. v. 79, p. 3695-3702, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., Principles of Instrumental Analysis, 5th ed., **Harcourt, Inc.**, 1998.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**. v. 19, No 2, p. 493-511, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismo de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**. v. 20, No 5, p. 173-181, 1997.

TERRY, S. C.; HERMAN, J. H.; ANGEL, J. B. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. **IEEE Transactions on Electron Devices**. v. 26, p. 1880, 1979.

TRIROJ, N. et al. Microfluidic chip-based nanoelectrode array as miniaturized biochemical sensing platform for prostate-specific antigen detection. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 26, 2927–2933, 2011.

VANDAVEER IV, W. R. et al. Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. **Electrophoresis**. v. 25, p. 3528-3549, 2004.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. **Química Nova**. v. 30, No. 5, p. 1323-1338, 2007.

VÁZQUEZ, M. et al. Dual contactless conductivity and amperometric detection on hybrid PDMS/glass electrophoresis microchips. **Analyst**. v. 135, p. 96–103, 2010.

VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (Cucurbita pepo). **Química Nova**, v. 26, No. 1, 39-43, 2003.

WALLENBORG, S. R.; NYHOLM, L.; C. E. LUNTE, C. E. End-Column Amperometric Detection in Capillary Electrophoresis: Influence of Separation-Related Parameters on the Observed Half-Wave Potential for Dopamine and Catechol. **Analytical**

**Chemistry**. v. 71, p. 544-549, 1999.

WANG, C. et al. Non-covalent iron(III)-porphyrin functionalized multi-walled carbon nanotubes for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and nitrite. **Electrochimica Acta**. v. 62, p. 109-115, 2012.

WALLINGFORD, R. A.; EWING, A. G. Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. **Analytical Chemistry**. v. 59, p. 1762-1766, 1987.

WANG, J. Analytical Electrochemistry. Third Edition. **John Wiley & Sons, Inc.** New Jersey, USA, 2006.

WANG Y., BI, J. Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using poly (tyrosine)/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite film modified electrode. **Journal of Molecular Liquids**. v. 177, p. 26-31, 2013.

WANG, Y.; CHEN, ZHEN-ZHEN. A novel poly(cyanocobalamin) modified glassy carbon electrode as electrochemical sensor for voltammetric determination of peroxyxynitrite. **Talanta**. v. 82, p. 534-539, 2010.

WANG, X. et al. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in human plasma by on-capillary preconcentration with field-amplified sample stacking. **Electrophoresis**. v. 33, p. 402-405, 2012.

WEINBERGER, R. Practical Capillary Electrophoresis. **Academic Press**. Second edition, 2000.

WEST, J. et al. Micro Total Analysis Systems: Latest Achievements. **Analytical Chemistry**. v. 80, p. 4403-4419, 2008.

YANG, X.; GUO, Y.; MEI, Z. Chemiluminescent determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using 4-(1,2,4-triazol-1-yl)phenol as an enhancer based on the immobilization of horseradish peroxidase onto magnetic beads. **Analytical Biochemistry**. v. 393, p. 56-61, 2009.

YEO, L. Y. et al. Microfluidic Devices for Bioapplications. **Small**. v. 7, No. 1, p. 12-48, 2011.

ZEMANN, A. J. et al. Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**. v. 70, p. 563-567, 1998.

ZENG, X. et al. A colorimetric and ratiometric fluorescent probe for quantitative detection of GSH at physiologically relevant levels. **Sensors and Actuators B**. v. 159, p. 142-147, 2011.

ZHAI, H. et al. A glass/PDMS electrophoresis microchip embedded with molecular imprinting SPE monolith for contactless conductivity detection. **Microchemical Journal**. v. 114, p. 223-228, 2014.

ZHANG, G. et al. Characterization of electrokinetic gating valve in microfluidic

channels. **Analytica Chimica Acta**. v. 584, p. 124-135, 2007.

ZHANG, W. et al. A simple strategy based on lanthanum–multiwalled carbon nanotube nanocomposites for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and nitrite. **Sensors and Actuators B**, v. 166–167, p. 601-607, 2012.