



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**USO DO PAPEL COMO PLATAFORMA PARA O
DESENVOLVIMENTO DE SENSOR QUÍMICO NA
DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO XANTURÊNICO
PRESENTE NO MOSQUITO *Aedes aegypti*.**

ERIVALDO DE OLIVEIRA COSTA

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

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

ERIVALDO DE OLIVEIRA COSTA

**USO DO PAPEL COMO PLATAFORMA PARA O DESENVOLVIMENTO DE
SENSOR QUÍMICO NA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO XANTURÊNICO
PRESENTE NO MOSQUITO *Aedes aegypti*.**

Maceió – AL

2012

ERIVALDO DE OLIVEIRA COSTA

**USO DO PAPEL COMO PLATAFORMA PARA O DESENVOLVIMENTO DE
SENSOR QUÍMICO NA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO XANTURÊNICO
PRESENTE NO MOSQUITO *Aedes aegypti*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre na área de Química.

Orientador: Prof. Dr. Phabyanno R. Lima

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília O. F. Goulart

**Maceió – AL
2012**

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

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

C837u Costa, Erivaldo de Oliveira.

Uso do papel como plataforma para o desenvolvimento de sensor químico na determinação do ácido xanturênico presente no mosquito *Aedes aegypti* / Erivaldo de Oliveira Costa. – 2012.

80 f. : il., graf., tabs.

Orientador: Phabyanno Rodrigues Lima.

Co-orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.

Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2012.

Bibliografia: f. 80-85.

1. Ácido xanturênico. 2. Complexo de Fe (II). 3. *Aedes aegypti*. 4. Sensor químico – Plataforma de papel. I. Título.

CDU: 543.544.165



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) 3214-1384
email: ppgqb.ufal@gmail.com

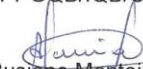
FOLHA DE APROVAÇÃO


Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Erivaldo de Oliveira Costa**, intitulada: **“Uso do Papel como Plataforma para o Desenvolvimento de Sensor Químico na Determinação do Ácido Xanturênico Presente no Mosquito *Aedes aegypti*”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 11 de julho de 2012, às 8h30min., na Sala de Aulas do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima
Orientador/Presidente-PPGQB/UFAL


Prof.ª Dr.ª Marília Oliveira Fonseca Goulart
PPGQB/IQB/UFAL


Prof.ª Dr.ª Ruziene Monteiro de Almeida
PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. José Rui Machado Reys
PPGQB/ESENFAR/UFAL


Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas
IFAL

Dedico esta dissertação a minha família,
em especial a minha querida mãe, Josefa.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser meu guia e sempre iluminar meu caminho.

Agradecimento especial a minha querida mãe, **Josefa de Oliveira Queiroz**, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo oferecidos durante toda a minha vida, especialmente na acadêmica.

Aos meus irmãos, **Cícero, Sebastião, Aparecido e Vitória**, por todo apoio e conselhos oferecidos ao longo desses anos.

A minha namorada **Jhosianna** pelo amor, carinho e dedicação em todas as horas, principalmente nos momentos mais difíceis.

A toda minha família, em especial as minhas cunhadas **Maria e Selma**, minha tia **Carmelita** e seu esposo **Manoel**, que sempre me aconselharam e estiveram por perto.

Aos meus orientadores e amigos, **Prof. Dr. Phabyanno R. Lima** e a **Prof^a. Dra. Marília O. F. Goulart** por acreditarem em mim, pela paciência, dedicação, responsabilidade. Levarei seus ensinamentos por toda minha vida.

Aos meus amigos do laboratório **Paulo, Waldomiro, Adilson, Leonardo, Andréa, Fred, Fabrícia, Franscisco, Monica, Anny, Camila e Cleilton** pelas brincadeiras, discussões e ajuda.

Aos meus amigos **Gilberto, Ângladis, Nereu, Ricardo, Elisson e Estanislau** que sempre me incentivaram, torceram por mim, por estarem ao meu lado no momento que mais precisei, pelas brincadeiras e pela amizade verdadeira.

Aos colegas do laboratório de eletroquímica pela companhia e contribuições.

A **Luciana** e ao **Tiago** pelos esforços e por terem contribuído em alguns experimentos.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia**, pelos ensinamentos e discussões realizadas durante o curso.

Agradecimento especial ao Prof. **Dr. Lauro Tatsuo Kubota**, por ter cedido o papel cromatográfico e pela recepção, orientação e ensinamentos oferecidos em seu laboratório na Unicamp/SP.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. **Antônio Euzébio S. Goulart**, por ter cedido os mosquitos.

Ao CNPq, FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro, possibilitando assim a realização desse trabalho.

A todos muito obrigado!

“Na vida, o mais importante é aprender com os erros e evoluir”.

(Ayrton Senna)

RESUMO

A dengue é uma doença viral originária do sudeste da Ásia presente em países como o Brasil, pois, o clima tropical favorece para a proliferação dessa doença. O mosquito *Aedes aegypti* transmissor da dengue apresenta a 4,8-Dihidroxiquinolina-2-ácido carboxílico (ácido xanturênico) em abundância no seu intestino e atua como um importante antioxidante. Portanto, o desenvolvimento de dispositivo capaz de identificar e quantificar a concentração desse analito é muito importante. Neste trabalho investigou-se a utilização dos papéis qualitativo, quantitativo e cromatográfico como plataforma para o desenvolvimento de um dispositivo cuja finalidade é a detecção do ácido xanturênico (AX). Para a determinação em papel foi utilizado íons Fe^{2+} proveniente do sulfato de ferro (II) e amônio ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) já que este íon está presente na hemoglobina e seu complexo com o AX apresenta coloração verde, favorecendo assim, a utilização do sistema em papel. A determinação do complexo formado foi investigada por espectrofotometria no ultravioleta e visível e por meio da análise termogravimétrica. Esse complexo foi testado com a finalidade de obter dados experimentais que visem à quantificação do antioxidante em estudo. A quantificação do AX foi feita utilizando os papéis como dispositivo microfluídico em que o complexo foi formado. Os resultados obtidos indicaram que o papel qualitativo apresentou melhor resposta com limite de detecção de $\text{LD} = 1,79 \times 10^{-4} \text{ M}$ e quantificação $\text{LQ} = 5,98 \times 10^{-4} \text{ M}$ quando variou a concentração do antioxidante. O estudo também foi realizado em um período máximo de 71 dias, sendo verificada sua estabilidade, indicando que para algumas cores não houve perda de resposta do sensor de papel. A quantificação do ácido xanturênico presente no mosquito *Aedes aegypti* pôde ser estudada por meio da espectrofotometria no Uv-vis devido a sua simplicidade e sensibilidade. Contudo, nas condições estudadas os resultados obtidos indicaram que a concentração da substância em estudo foi 0,47 nmol por intestino. Fica claro, portanto, que a construção do dispositivo em plataforma de papel com detecção química surge de forma inovadora para a detecção desse antioxidante presente no mosquito.

Palavras – chave: Ácido Xanturênico Complexo de Fe (II). *Aedes aegypti*. Sensor Químico-Plataforma de papel.

ABSTRACT

Dengue is a viral disease originate in Southeast Asia present in countries like Brazil, because the tropical climate favors the proliferation of this disease. The *Aedes aegypti* mosquito that transmits dengue has 4,8-Dihydroxyquinoline-2-carboxylic acid (xanthurenic acid) in abundance in your intestines and acts as an important antioxidant. Therefore, the developing device capable of identifying and quantifying the concentration of analyte is very important. This study investigated the use of qualitative, quantitative and chromatographic papers as a platform for the development of a device whose purpose is the detection of xanthurenic acid (XA). For the determination in the paper was used Fe^{2+} from the iron (II) sulfate and ammonium ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) because this ion is present in hemoglobin and its complex with AX has green color, favoring thus, the use of the paper. The determination of the complex formed was investigated by UV-Vis spectroscopy and by thermogravimetric analysis. This complex was tested in order to obtain experimental data aimed at quantifying the antioxidant study. Quantification was performed using the AX roles as microfluidic device in which the complex was formed. The results indicated that the qualitative role had better response with a detection limit $\text{LD} = 1.79 \times 10^{-4} \text{ M}$ and quantification $\text{LQ} = 5.98 \times 10^{-4} \text{ M}$ when varying the concentration of antioxidant. The study was also performed on a maximum of 71 days, and checked its stability, indicating that for some colors no loss of response for paper sensor. Quantification xanthurenic acid present in the mosquito *Aedes aegypti* could be studied through UV-vis spectroscopy because of its simplicity and sensitivity. However, under the conditions studied the results indicated that the concentration of test substance was 0.47 nmol per intestine. Clearly, therefore, that the construction of the device platform chemical detection paper comes in an innovative way to detect this antioxidant present in the mosquito.

Key - words: Xanthurenic acid. Complex Fe(II). *Aedes aegypti*. Platform paper-Chemical Sensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo evolutivo do mosquito da dengue.	20
Figura 2 - Óbitos por dengue nos anos de 2010, 2011 e 2012.	21
Figura 3 - Rota biossintética do ácido xanturênico, com suas respectivas enzimas:TD (Triptofano dioxigenase), QF (Quinurenina Formidase),QAT (Quinurenina aminotransferase),Q3H (Quinurenina3-hidroxilase) e TA (Transferaminase).	22
Figura 4 - Grupamentos com características ácido-base do AX.	23
Figura 5 - Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico.	25
Figura 6 - Principais requisitos para o desenvolvimento de sensor.	26
Figura 7 - Número de publicações de artigos científicos em revista com política editorial seletiva, usando como palavras-chave (“sensor” and “sensors”) e (“chemical sensor”) entre os anos de 2001 a 2012.	27
Figura 8 - Desenvolvimento de um dispositivo protótipo que quantifica simultaneamente dois analitos em amostra de urina.	30
Figura 9 - Exemplo de um reator microfluídico, com dois interruptores (S1, S2), duas regiões (A1, A2) para amostras e um sítio reacional (B).	31
Figura 10 - Exemplo de dispositivo de papel para a determinação simultânea de três analitos (ácido úrico, Glicose e Lactato) com detecção eletroquímica: ER (eletrodo de referência), CE (contra eletrodo), ET (eletrodo de trabalho).	32
Figura 11 - Projeto de um sistema microfluídico simultâneo para análise semi-quantitativa de glicose, lactato e ácido úrico. Regiões de 1 a 4: glicose usando Y + indicador AB, 5 a 7: lactato usando Y + indicador OD, e de 8 a 9: ácido úrico utilizando indicador AB.	33
Figura 12 - Design do dispositivo utilizado na determinação de AX.	40
Figura 13 - Modelo esquemático do dispositivo.	41
Figura 14 - Histogramas das diferentes cores para a mesma região do dispositivo.	42
Figura 15 - Coloração dos dispositivos de papel: sem modificação (A), modificado com Fe ²⁺ (B) ($4,0 \times 10^{-4}$ M), modificado com AX (C) ($1,0 \times 10^{-2}$ M) e formação do complexo (D).	44
Figura 16 - Estudo da estabilidade do sais FeSO ₄ .7H ₂ O (A) ($4,3 \times 10^{-3}$ M),	48

Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O (B) ($4,3 \times 10^{-3}$ M) e (C) Ácido Xanturênico ($4,8 \times 10^{-5}$ M).

- Figura 17 - Estudo estequiométrico do complexo AX:Fe²⁺. Branco AX. 49
- Figura 18 - Estrutura do quelato do ácido xanturênico com ferro. 50
- Figura 19 - Análise termogravimétrica dos complexos AX:Fe²⁺ e AX:Fe³⁺ e do ácido xanturênico. 51
- Figura 20 - Estudo da variação da concentração de Fe²⁺, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para o papel quantitativo, AX ($3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e Fe²⁺ ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 53
- Figura 21 - Estudo da variação da concentração de Fe²⁺, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para o papel qualitativo, AX ($3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e Fe²⁺ ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 54
- Figura 22 - Estudo da variação da concentração de Fe²⁺, por meio das cores CMYK, MAGENTA e PRETO, para o papel cromatográfico, AX ($3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e Fe²⁺ ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 55
- Figura 23 - Estudo da variação da concentração de Fe²⁺, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para os papéis quantitativo, qualitativo e cromatográfico, AX ($3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e Fe²⁺ ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 56
- Figura 24 - Estudo da variação da concentração de AX, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para o papel quantitativo, Fe²⁺ ($3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 58
- Figura 25 - Estudo da variação da concentração de AX, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para o papel qualitativo, Fe²⁺ ($3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 59
- Figura 26 - Estudo da variação da concentração de AX, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para o papel cromatográfico, Fe²⁺ ($3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 60
- Figura 27 - Estudo da variação da concentração de AX, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para os papéis quantitativo, qualitativo e cromatográfico, Fe²⁺ ($3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 62
- Figura 28 - Estudo da estabilidade do dispositivo após três dias, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, utilizando papel quantitativo, Fe²⁺ ($3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 64
- Figura 29 - Estudo da variação da concentração de AX, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, utilizando papel qualitativo, Fe²⁺ ($3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 66
- Figura 30 - Estudo da variação da concentração de AX, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, utilizando papel cromatográfico, Fe²⁺ ($3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 67

Figura 31 - Estudos espectroscópicos das amostras de sangue e do AX.	70
Figura 32 - Curva analítica para adições de AX ($3,0 \times 10^{-2}$ M) em 340nm; branco tampão fosfato pH 7,5 com EDTA.	71
Figura 33 - Curva analítica para adições de AX ($3,0 \times 10^{-2}$ M) em 340nm; branco tampão fosfato pH 7,5 com EDTA.	72
Figura 34 - Análise de amostra de sangue proveniente do intestino do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . Branco: Solução EDTA e tampão fosfato pH 7,5.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos de dengue nos estados brasileiro em 2011 e 2012.	20
Tabela 2 - Variação da concentração de Fe^{2+} na formação do complexo. Papéis utilizados: quantitativo, qualitativo e cromatográfico.	45
Tabela 3 - Variação da concentração de AX na formação do complexo. Papéis utilizados: quantitativo, qualitativo e cromatográfico.	46
Tabela 4 - Estágios de perda de massa dos complexos e do AX.	51
Tabela 5 - Comparação dos três dispositivos vs. Concentração de Fe^{2+} .	57
Tabela 6 - Comparação dos três dispositivos vs. Concentração de AX.	63
Tabela 7 - Estudo da comparação dos sensores no início, 3 e 71 dias após a formação do complexo.	68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AX - Ácido Xanturênico

μ PADs - Microfluidic paper-based analytical devices

μ L - Microlitro

pH - potencial Hidrogeniônico

mL - Mililitro

M - Concentração em mol L⁻¹

TGA - Análise termogravimétrica

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

r - Coeficiente de correlação linear

λ - Comprimento de onda

nm - Nanômetro

mm - Milímetro

cm - Centímetro

RPM - Rotação por minuto

mg - Miligrama

TD - Triptofano Dioxigenase

QF - Quinurenina Formidase

QAT - Quinurenina Aminotransferase

Q3H - Quinurenina 3-Hidroxilase

TA - Transferaminase

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

km² - Quilômetro Quadrado

AAP - 4-Aminoantipirina

DHBS - Ácido 3,5-dicloro-2-hidroxi-benzenossulfônico

OD - Dicloridrato de *o*-dianisidina

Y- Amarelo ácido 34

B - Preto ácido 1

Uv-Vis - Espectrofotometria no Ultravioleta e Visível

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra Acético

CMYK - Abreviação para as cores ciano, magenta, amarelo e preto

MAGENTA - Mistura das luzes azul e vermelho

CIANO - Mistura das luzes azul e verde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Considerações Iniciais.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Dengue: Aspectos Gerais.....	19
2.2	Escolha do Analito.....	21
2.2.1	Ácido Xanturênico.....	21
2.3	Sensores Químicos.....	24
2.3.1	Aplicação dos Sensores.....	26
2.4	Características do Papel.....	28
2.5	Utilização do Papel como Plataforma para Dispositivo Analítico.....	29
2.5.1	Seleção do Método de Detecção.....	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Gerais.....	34
3.2	Específicos.....	34
4	METODOLOGIA.....	35
4.1	Procedimentos Gerais.....	35
4.4.1	Substâncias e Soluções.....	35
4.2	Preparo de Soluções.....	35
4.2.1	Preparo da Solução do Ácido Xanturênico.....	35
4.2.2	Solução de Fe ²⁺	36
4.2.3	Solução de Fe ³⁺	36
4.3	Análises com Sangue.....	36
4.3.1	Preparo de Solução Tampão.....	36
4.3.2	Dissecção do Intestino do Mosquito.....	36
4.3.3	Análise com Sangue de Pombo.....	37
4.4	Técnicas Utilizadas para a determinação do complexo e para o estudo da estabilidade.....	37
4.4.1	Espectrofotometria no UV-vis.....	37
4.4.1.1	Estudo da Estabilidade dos sais de ferro e do AX.....	38

4.4.1.2	Estudos Estequiométricos.....	38
4.4.2	Análise Termogravimétrica.....	39
4.5	Desenvolvimento do Dispositivo.....	40
4.5.1	Utilização dos Papéis.....	40
4.5.2	Área do Dispositivo Microfluídico.....	40
4.5.3	Captura da Imagem.....	41
4.5.4	Determinação do Volume do Dispositivo Microfluídico.....	41
4.5.5	Método de Análise.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
5.1	Espectrofotometria no UV-Vis.....	47
5.1.1	Estudo da estabilidade.....	47
5.2	Determinação da Estequiometria do Complexo.....	49
5.2.1	Espectrofotometria no UV-Vis.....	49
5.3	Análise Termogravimétrica.....	50
5.4	Determinação da Curva Analítica.....	52
5.4.1	Utilização do papel quantitativo vs. Concentração de Fe ²⁺	52
5.4.2	Utilização do papel qualitativo vs. Concentração de Fe ²⁺	53
5.4.3	Utilização do papel cromatográfico vs. Concentração de Fe ²⁺	55
5.5	Comparação dos três dispositivos vs. Concentração de Fe²⁺....	56
5.5.1	Utilização do papel quantitativo vs. Concentração de AX.....	58
5.5.2	Utilização do papel qualitativo vs. Concentração de AX.....	59
5.5.3	Utilização do papel cromatográfico vs. Concentração de AX.....	60
5.6	Comparação dos três dispositivos vs. Concentração de AX.....	61
5.7	Estudo da Estabilidade dos Sensores.....	64
5.7.1	Comparação entre os dias de análise.....	64
5.7.2	Papel Quantitativo.....	64
5.7.3	Papel Qualitativo.....	65
5.7.4	Papel Cromatográfico.....	67
5.7.5	Estudo da Comparação dos Sensores em Diferentes Dias.....	68
5.8	Estudo Espectroscópico das amostras de sangue.....	70
5.9	Teste de Recuperação.....	71
5.10	Análise da amostra de sangue do mosquito <i>Aedes aegypti</i>.....	72
6	CONCLUSÕES	74

7	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

Em todas as grandes cidades do mundo, o crescimento econômico e populacional favorece o acúmulo de grandes quantidades de resíduos sólidos, constantemente produzido por diversos setores e atividades da sociedade, trazendo problemas a saúde da população. Esses resíduos juntamente com a falta de saneamento básico contribuem para o desenvolvimento de criadouros e ao surgimento da dengue, febre amarela, malária, leptospirose, diarreia, cólera, etc (SAMPAIO, 2009).

A dengue é uma doença viral originário do sudeste da Ásia, que ocorre principalmente em climas tropicais e subtropicais do mundo. O vírus da dengue é transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*, que infecta cerca de 50 a 100 milhões de pessoas anualmente (COFFEY, 2009).

Diante disto, o diagnóstico é importante para confirmação de casos, para diferenciar a dengue de outras doenças como a leptospirose, rubéola e outras infecções por flavivírus, e para avaliação clínica de pacientes com doença grave (GUZMAN, 2004).

O mosquito *Aedes aegypti* apresenta ácido xanturênico (AX) em abundância no seu intestino e atua como um importante antioxidante. Muitos relatos sugerem que o ácido xanturênico pode desempenhar um papel importante no estágio patogênico de várias doenças, incluindo câncer de bexiga, diabetes, artrite reumatóide, doenças de pele, e catarata em animais e humanos (SHEN, 2008). Informações sobre a quantidade do AX presente no mosquito é importante na tentativa de identificar novos alvos para prevenir ou interferir com a gametogênese, de forma a interromper o desenvolvimento do parasita. Deste forma, a aplicação de sensores químicos é uma alternativa para a determinação deste analito no mosquito.

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), sensores químicos são dispositivos que transformam informações químicas, por meio da variação da concentração de uma substância presente na amostra,

transformando o resultado em um sinal químico mensurável (IUPAC, 2007). Estes têm sua finalidade voltada para análise direta em amostras complexas. Também podem eliminar a necessidade do pré-tratamento da amostra nas diferentes matrizes, sejam elas de origem ambiental, biológica, ou farmacológica.

Os princípios de funcionamento de sensores incluem na maioria das vezes uma tecnologia de fabricação complicada, aparelhagem de medição sofisticada, materiais sensíveis e custos de produção elevado, a sua comercialização torna-se problemática. Por isso, há necessidade de buscar novos materiais que possam ser utilizados como dispositivos para a fabricação de novos sensores e novas técnicas afim de contornar esses problemas [POGHOSSIAN, 2003].

A utilização de métodos de análise portáteis, simples, precisos e baratos são necessários para realizar o monitoramento ambiental de tal forma que as amostras possam ser analisadas no campo, para investigar e obter o conhecimento dos processos naturais, bem como, analisar espécies químicas existentes no ambiente em estudo (MARLE, 2005).

Dentre os dispositivos recentemente introduzidos em laboratórios de análise os mais baratos são os de papel. Eles são fáceis de usar, requer pequenos volumes de reagentes e amostra, fornece uma análise rápida, são descartáveis e podem ser feitos de materiais de substrato renováveis (DUNGCHAI, 2009).

Contudo, é de fundamental importância o controle do mosquito *Aedes aegypti*, bem como o conhecimento do período de sua alimentação, uma vez que ele é o hospedeiro intermediário e contribui para a propagação da doença. Além disso, não há relato na literatura científica de sensores químicos para a detecção e quantificação de AX em plataformas de papel, indicando desta forma sua candidatura no estudo desse analito.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dengue: Aspectos Gerais

A dengue é uma doença viral transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*. O ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti* é composto por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). A transmissão do vírus ocorre no período de acasalamento, pois, é nesse momento que as fêmeas contaminadas precisam de sangue para garantir o desenvolvimento dos ovos, onde estes necessitam de água parada. Essa doença tem origem no sudeste da Ásia, presente em países como o Brasil, pois, o clima tropical favorece para o desenvolvimento do mosquito e conseqüentemente para o aumento do número de infecções.

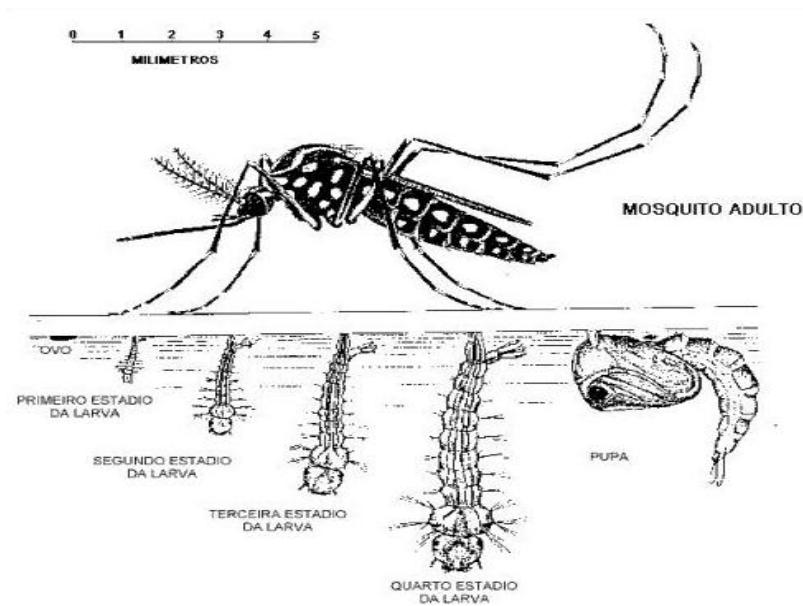
A mudança no ecossistema do mosquito contribui para uma expansão da doença em novas áreas. Atualmente, estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção por esse vírus (GUZMAN, 2004).

Atualmente estima-se que o Brasil tenha 192.376.496 habitantes em uma área de aproximadamente 8,5 milhões de km², com 5.565 municípios, o que significa uma densidade populacional de 22,7 habitantes por km², que contribui para o aumento do número de pessoas infectadas com o vírus (IBGE, 2011). Estudos anteriores relataram que no período entre 2010 e 2012, houve mais de 900 mortes por dengue no Brasil (Figura 2) (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

O diagnóstico da dengue é de grande importância para a pesquisa das características do vírus hospedeiro e do vetor, para determinar as condições epidemiológicas e para a avaliação da vacina (GUZMAN, 2004).

A Tabela 1 mostra os casos de dengue por regiões e por estados do Brasil durante o ano de 2011 e os quatro primeiros meses correspondentes ao ano de 2012. Analisando a tabela percebe-se que no ano de 2012, em apenas 4 meses, nos estados de Roraima, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, houve um aumento nos casos de dengue comparado com os 12 meses de 2011 (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

Figura 1. Ciclo evolutivo do mosquito da dengue.



Fonte: SITE DA DENGUE, 2012.

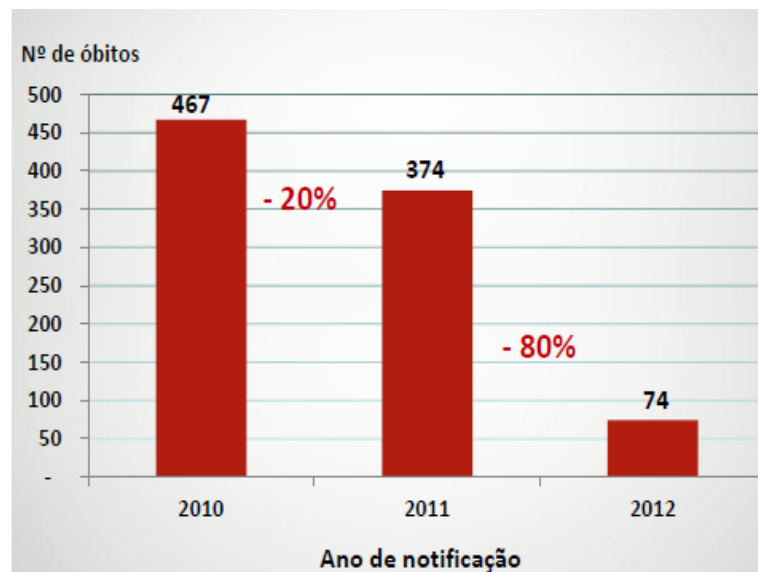
Tabela 1. Casos de dengue nos estados brasileiro em 2011 e 2012.

UF	CASOS		UF	CASOS	
	2011	2012		2011	2012
Norte	97.146	30.145	Nordeste	115.257	103.687
RO	2.407	1.256	MA	5.836	2.977
AC	17.431	2.051	PI	5.461	4.867
AM	56.176	3.009	CE	45.583	17.205
RR	576	822	RN	13.309	10.286
PA	13.726	11.223	PB	8.092	2.526
AP	2.166	195	PE	9.013	27.393
TO	4.664	11.589	AL	4.409	6.465
Sudeste	233.943	119.396	SE	1.130	3.814
MG	25.853	14.006	BA	22.424	28.154
ES	22.176	5.560			
RJ	106.437	80.160	Centro-Oeste	31.787	29.477
SP	79.477	19.670	MS	6.020	4.579
Sul	29.665	3.306	MT	3.538	13.802
PR	29.260	3.079	GO	20.307	10.229
SC	103	84	DF	1.922	867
RS	302	143			

Fonte: PORTAL DA SAÚDE, 2012.

Na Figura 2, pode-se observar a diminuição nos casos de óbitos por dengue no Brasil nos anos de 2010, 2011 e 2012. Essa diminuição pode estar relacionada com os programas de combate a dengue e com o diagnóstico no estágio inicial da doença.

Figura 2. Óbitos por dengue nos anos de 2010, 2011 e 2012.



Fonte: PORTAL DA SAÚDE, 2012

Desta forma, o desenvolvimento de dispositivos capaz de identificar e quantificar a concentração do ácido xanturênico é muito importante, pois ele é produzido no mosquito como forma de defeza durante sua alimentação. Portanto, a determinação do AX pode favorecer para o controle dessa doença.

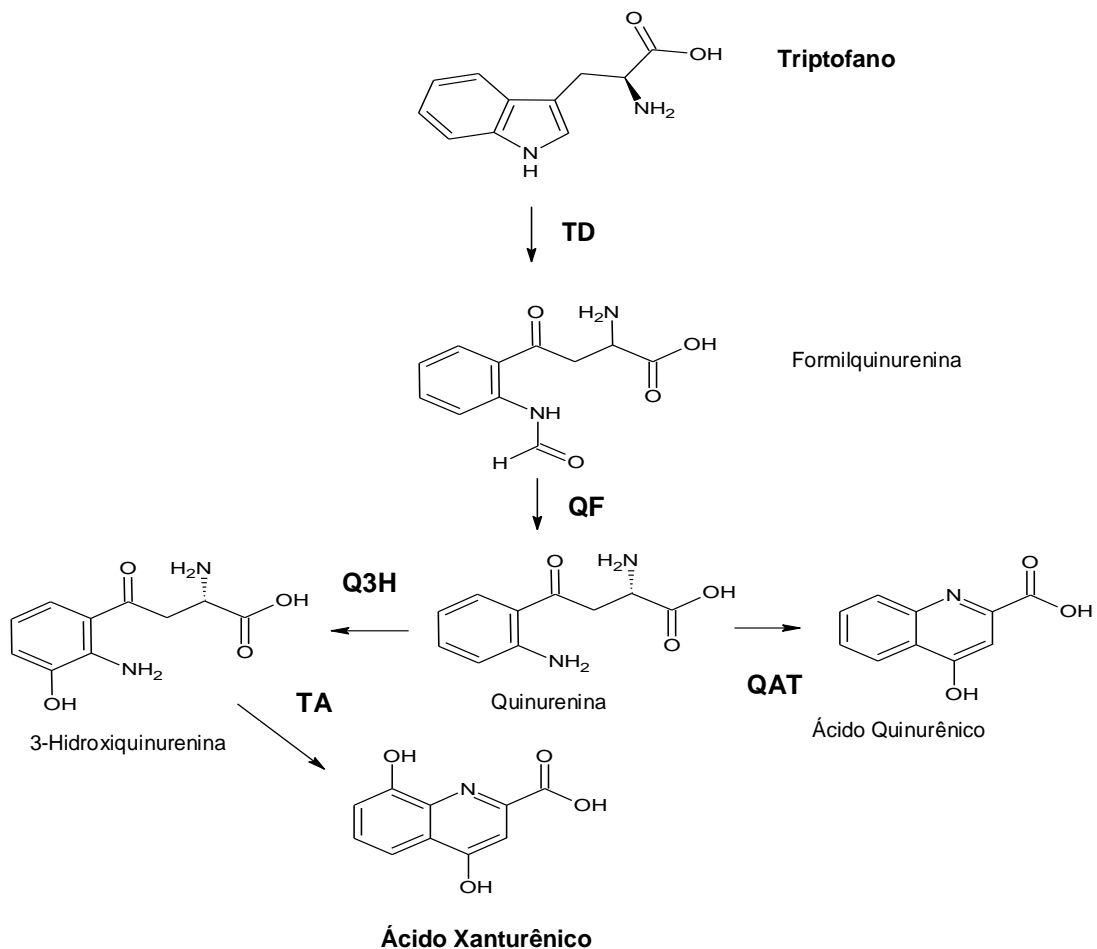
2.2 Escolha do Analito

2.2.1 Ácido Xanturênico

O ácido xanturenico (AX) 4,8-diidroxiquinolina-2-ácido carboxílico é um antioxidante que está presente em alguns seres vivos. Sua formação se dá por meio da via de degradação do triptofano, através de um processo complicado que envolve várias enzimas em sua rota bioquímica. De modo geral, a formação do AX começa

com a oxidação do triptofano formando formilquinurenina, esta é hidrolizada a quinurenina, hidroxilação da quinurenina a 3-hidroxiquinurenina, transaminação da 3-hidroxiquinurenina a um intermediário ceto-ácido na cadeia lateral e ciclização do intermediário, levando a formação do AX (Figura 3) (HAN, 2007; MALINA, 1999, 2003).

Figura 3. Rota biossintética do ácido xanturênico, com suas respectivas enzimas: TD (Triptofano dioxigenase), QF (Quinurenina Formidase), QAT (Quinurenina aminotransferase), Q3H (Quinurenina 3-hidroxilase) e TA (Transferaminase).



Fonte: HAN, 2007

O AX não só está presente em insetos, mas também em tecidos de vertebrados, incluindo células do sangue, e em protozoários. Altas concentrações de triptofano e deficiência de vitamina B₆ estimulam a formação do AX e outros metabólitos na rota da quinurenina, e o aumento do nível de AX é um indicador da deficiência dessa vitamina (ARAI, 2001; MURAKAMI, 2006).

O ácido xanturênico foi detectado na urina, sangue, células do cérebro, e em cristalino dos olhos de mamíferos, e seu acúmulo na célula pode levar a patologia celular ou a morte celular (MALINA,1999; SHEN, 2008).

O ácido xanturênico é um importante antioxidante presente no sangue do mosquito *Aedes aegypti*, e sua determinação e quantificação é importante na tentativa de interromper o desenvolvimento do parasita no mosquito. De acordo com Lima (2007), a concentração do AX no mosquito está relacionado com o tempo de digestão do sangue, indicando que a concentração desse antioxidante é de 15nmols/intestino após 24horas de digestão. (LIMA, 2007).

Murakami e et al. (2006) mostraram que o AX age como um quelante de ferro formando complexo e que possui ações pró-oxidantes. Isto se deve a hidroxila com características fenólicas e ao par de elétrons livre do nitrogênio (MURAKAMI et al., 2006).

A Figura 4 mostra os quatro grupamentos ativos do ponto de vista ácido-base que o AX possui. Um nitrogênio que possui um par de elétrons livres (1), um ácido carboxílico (2), uma hidroxila quinolínica (3) e uma hidroxila ligada ao anel aromático com característica fenólica (4). Tanto o nitrogênio (1), quanto à hidroxila (4) são essenciais para a ligação com ferro. Íons ferrosos em presença de peróxido de hidrogênio geram espécies reativas de oxigênio através da reação de fenton (Reação 1). Desta forma, fica evidente a necessidade da busca de dispositivos capaz de detectar de forma qualitativa e quantitativa, o ácido xanturênico no sangue do mosquito.

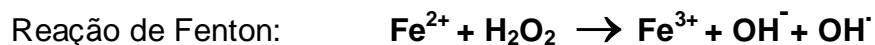
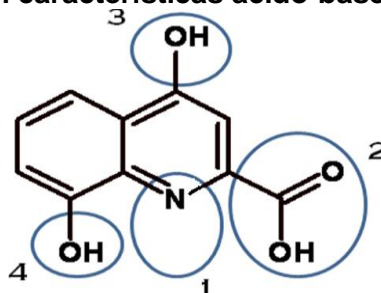


Figura 4. Grupamentos com características ácido-base do AX.



Fonte: SILVA, 2010.

2.3 Sensores Químicos

Sensor químico tem o objetivo de detectar a presença de uma ou várias espécies químicas, frequentemente presentes em amostras complexas. De forma geral, os sensores são ordenados em duas classes:

- I- *Sensores físicos*, para medir distâncias, temperatura, pressão, massa, etc.;
- II- *Sensores químicos*, são usados para detectar substâncias empregando um elemento receptor químico, que engloba os *biosensores*, os quais utilizam um receptor biológico como forma de identificação de substâncias (CAPELETTI, 2010).

Os sensores químicos podem reconhecer um ou mais analitos por meio de uma reação química na interface sensor-amostra, podendo ser aplicados para amostras de origem biológica ou não (CAPELETTI, 2010). Para a produção de sensores, materiais quimicamente seletivos, membranas ou superfícies, que podem "responder" às substâncias desejadas, ou reconhece-las, devem ser estudados (CLECHET, 1991).

O desenvolvimento destes dispositivos tornou-se uma meta na ciência analítica por várias décadas. O aprimoramento de sensores tem se beneficiado com o surgimento nos avanços em áreas como, tecnologia óptica, quimiometria, química de imobilização de enzimas, projeto de ultramicroeletrodo, entre outros (TESS, 1999).

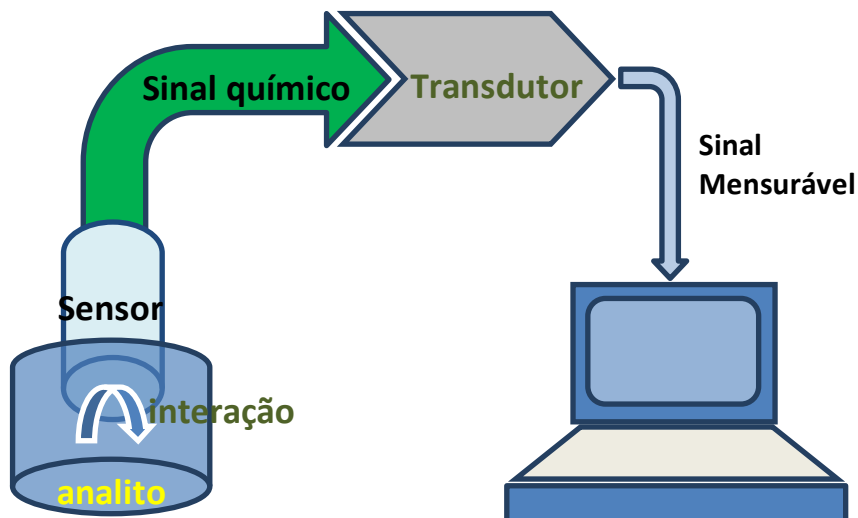
Independente do mecanismo de transdução específica, todos os sensores químicos geram sinais por meio da interação entre sua interface química seletiva e o alvo de reconhecimento (PHILLIPS, 2004). Estes dispositivos são recobertos com uma camada de um elemento de reconhecimento, seja químico ou biológico, onde esta interage com o analito, e a reação química resultante é transformada em sinal. Do ponto de vista geral, um sensor químico é um sistema dinâmico cujo sinal evolui de acordo com a concentração dos analitos em que ele é sensível (MARTINELLI, 2004).

No caso dos sensores eletroquímicos, o transdutor é o equipamento (Potenciostato) munido por um conjunto de eletrodos. Sendo assim, o transdutor eletroquímico é um dispositivo que transforma informações químicas, como a concentração de um componente específico da amostra em relação a sua composição total, em um sinal analiticamente mensurável (WANG et al., 2000; THÉVENOT et al, 2001).

As informações obtidas no instrumento de medida podem estar relacionadas a uma reação química ou mesmo a uma propriedade química do analito. Além do transdutor, os sensores químicos apresentam outras partes básicas: o receptor ou fase sensora - região reconhecedora onde ocorre a reação química seletiva e o condutor, que transporta o sinal para a instrumentação de medida. A fase sensora pode ser um corante ácido/básico, um trocador iônico, uma substância redox, uma substância fluorescente, um anticorpo, entre outros (THÉVENOT et al., 2001), enquanto, o transdutor pode ser classificado como: calorimétrico (calor), eletroquímico (corrente, condutividade, potencial), óptico (absorção, fluorescência, reflectância) ou piezométrico (alteração de massa).

Na Figura 5 é possível observar um modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico, mostrando o caminho desde a interação do analito com a fase sensora até a obtenção da resposta tanto qualitativa quanto quantitativa.

Figura 5. Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico.



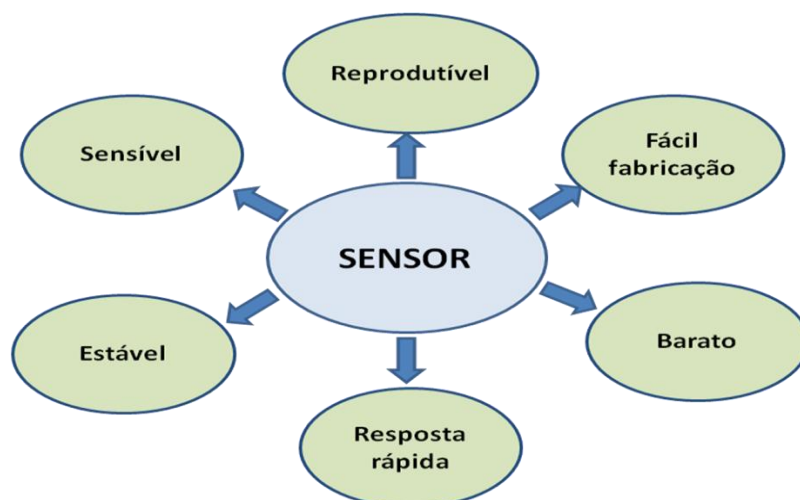
2.3.1 Aplicação dos Sensores

Aplicação de sensores químicos para análise de plasma sanguíneo, sangue e outros flúidos biológicos começaram em 1970 juntamente com o rápido desenvolvimento de diferentes tipos de eletrodos íon-seletivo. Essas atividades resultaram no desenvolvimento de sensores de íons como K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- e outras espécies. Alguns deles têm sido aplicados com sucesso em amostras de sangue. No entanto, desde meados dos anos 1980 o progresso nesta área tornou-se significativamente mais lento devido a uma falta de novos materiais de detecção e novas idéias (LEGIN, 1999).

As crescentes demandas na fiscalização do controle ambiental, no monitoramento e detecção de vários produtos químicos, adicionou um novo impulso à pesquisa de sensores. Esses dispositivos, podem proporcionar contínua ou periódica análise em tempo real, além de fornecer informação sobre os processos industriais que podem ser utilizados para melhorar a eficiência ou controle de qualidade, ou para reduzir o impacto ambiental negativo do processo (FERGUS, 1997; SEITER, 2001).

Caracteristicamente, o sensor deve obedecer alguns requisitos importantes para fins comerciais descrito na Figura 6 (LIU, 1995).

Figura 6. Principais requisitos para o desenvolvimento de sensor.

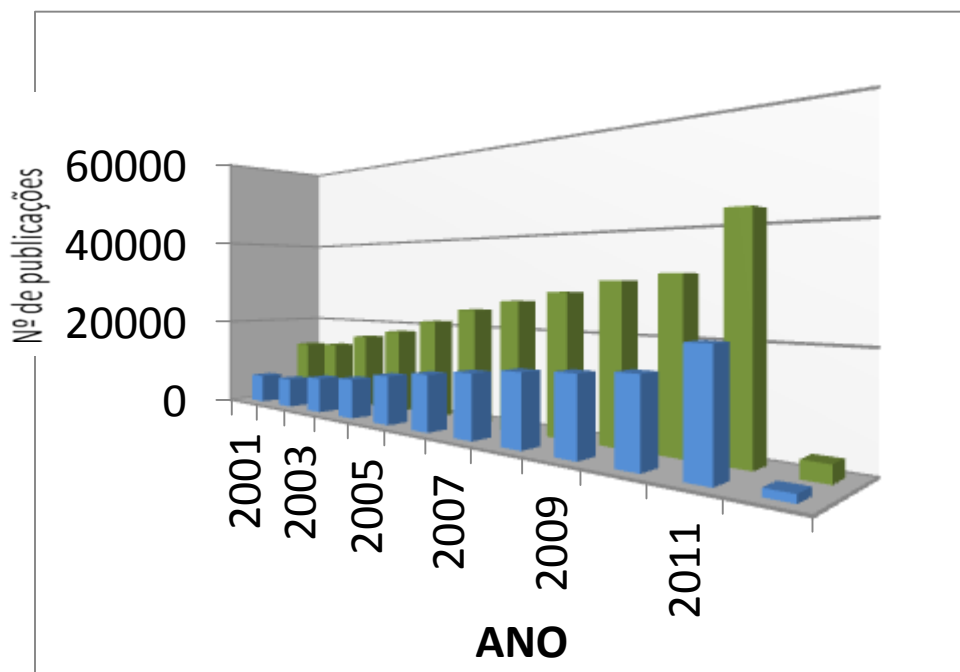


Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Sensores químicos permitem a coleta de dados e a obtenção de informações com mínima manipulação do sistema estudado. Estes dispositivos possuem características particulares que os distinguem de métodos instrumentais de grande porte, os quais, por sua vez, são cada vez mais sensíveis, precisos e seletivos, mas não permitem a obtenção de informações *in situ* e em tempo real (ARAÚJO, 2009).

Dentre os sensores químicos, há várias classificações possíveis, as quais se baseiam, no tamanho, tipo de aplicação ou mecanismo de transdução da resposta. Assim, de acordo com o banco de dados do Science Direct (2012), aproximadamente 408.836 artigos científicos foram publicados contendo a palavra-chave “sensor” and “sensors”, entre os anos 2001 a 2012 (Figura 7) (SCIENCE DIRECT, 2012). Estes trabalhos referem-se a investigações com sensores de diversos tipos e inclui transdução, colorimétrica, potenciométrica, amperométrica, piezométrica, óptica, térmica, condutométrica, entre outras, ressaltando a importância do campo de desenvolvimento de sensores.

Figura 7. Número de publicações de artigos científicos em revista com política editorial seletiva, usando como palavras-chave (■ “sensor” and “sensors”) e (■ “chemical sensor”) entre os anos de 2001 a 2012.



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Por isso, essa dissertação dar-se-á maior ênfase ao desenvolvimento de um sensor feito de papel, e a utilização de um transdutor colorimétrico como meio de detecção.

2.4 Características do Papel

Papéis de filtro possuem uma longa história de aplicações laboratoriais para filtração e também como suporte para separação cromatográfica. Além disso, o papel oferece vantagens únicas em relação aos materiais poliméricos na busca por novas plataformas para a construção de dispositivos (PELTON, 2009). O papel é produzido praticamente em todas as partes do mundo a partir de recursos renováveis e recicláveis, além de ser barato; é facilmente impresso, revestido e impregnado; a celulose é um polissacarídeo de ocorrência natural; é biodegradável ou facilmente queimado; sua estrutura porosa facilita separações cromatográficas e a utilização como dispositivos microfluídicos.

A celulose é o principal constituinte do papel. Suas fibras são tubos ocos de aproximadamente 1,5 mm de comprimento, 20 μm de largura e sua parede possui uma espessura de 2 μm . O transporte de soluções ao longo da fita de papel pode oferecer as seguintes vantagens em uma análise.

- I. No papel, haverá o processo de separação cromatográfica devido a facilidade com que solvente percorre os poros do papel, enquanto que partículas do soluto ficarão retidas.
- II. O papel pode ser modificado para fornecer canais hidrofóbicos que podem dividir a amostra em duas ou mais partes transportando-as para diferentes locais em sua superfície (MARTINEZ et al., 2008).

Essas propriedades fornecem a fundação para a utilização do papel como dispositivos para sistemas microfluídicos (LI, 2010). Recentemente muitos trabalhos estão sendo publicados com o intuito de explorar cada vez mais a versatilidade do papel (MARTINEZ et al., 2008).

2.5 Utilização do Papel como Plataforma para Dispositivo Analítico

As análises de fluidos biológicos e ambiental são necessárias para monitorar a saúde da população, mas essas medidas são difíceis de implementar em regiões remotas, como as encontradas em países menos-industrializados, ou em situações de emergência. Instrumentos convencionais de laboratório fornecem medidas quantitativas de amostras biológicas, mas são inadequados para estas situações, pois, são análises na maioria das vezes caras e exigem pessoal treinado e consideráveis volumes de amostras (MARTINEZ, 2007). Desta forma, métodos de análise portáteis, simples e precisos são necessários para realizar esse tipo de monitoramento de tal forma que as amostras possam ser analisadas no campo.

Acredita-se que dispositivos de papel pode ser uma das plataformas mais barata disponíveis para o desenvolvimento de ensaios, por ser portátil e tecnicamente simples para detectar uma série de espécies importantes (JOHNSON, 2008; MARTINEZ, 2007).

Dispositivos microfluídicos foram usados em uma variedade de áreas, incluindo bioanálises, produtos farmacêuticos, aplicações forenses e clínicas. Eles são normalmente feitos de silício, vidro ou material polimérico, devido à sua compatibilidade química. Exemplos de polímeros utilizados incluem polidimetilsiloxano (PDMS) e polimetilmetacrilato (PMMA) (MARLE, 2005).

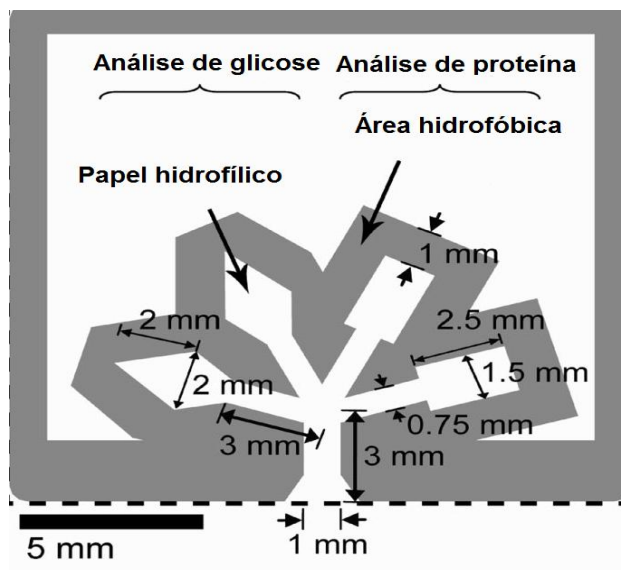
Dentre os dispositivos recentemente introduzidos os mais baratos são os de papel. Eles são fáceis de usar, requer pequenos volumes de reagentes e amostra, fornece uma análise rápida, são descartáveis, podem ser feitos de materiais de substrato renováveis, e são portáteis (DUNGCHAI, 2009).

Testes com tira de papel estão disponíveis comercialmente para gravidez, diabetes, drogas e etc. A maioria destas análises usam a mudança de cor visível para detecção qualitativa do analito. Entretanto, a análise qualitativa não é suficiente quando os níveis do analito são importantes para o diagnóstico ou tratamento. Muito esforço tem sido, portanto, voltados para o desenvolvimento de testes quantitativos com tiras de papel (DUNGCHAI, 2010).

Um grande exemplo a ser ilustrado refere-se ao papel indicador de pH, é barato, não requer nenhum tipo de equipamento ou sistema de amplificação do sinal, apresenta uma grande sensibilidade e possui um longo tempo de vida (PELTON, 2009).

Papéis têm sido usados como substratos cromatográficos desde 1850. Recentemente, Martinez et al. (2008) usaram papel como plataforma para criar barreiras por meio de técnicas de fotolitografia, afim de delimitar a área por onde a amostra de urina foi dispersa, nesse estudo foi possível determinar glicose e proteína (Figura 8) (MARTINEZ et al., 2008).

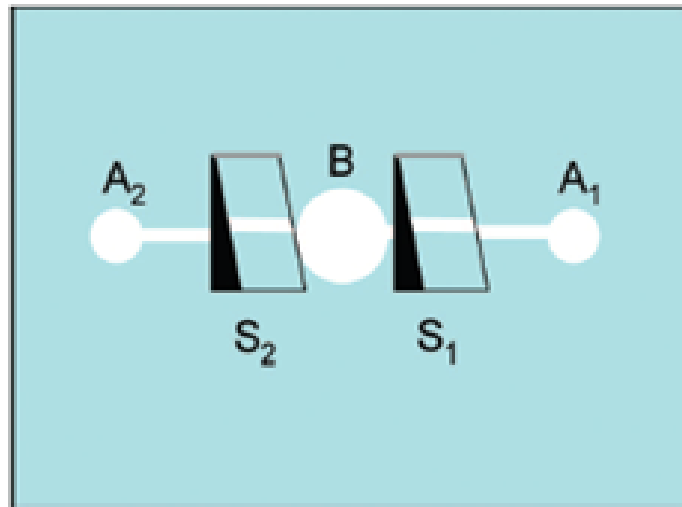
Figura 8. Desenvolvimento de um dispositivo protótipo que quantifica simultaneamente dois analitos em amostra de urina.



Fonte: MARTINEZ et al., 2008.

Seguindo o mesmo princípio de finalidade, Li et al. (2008) mostraram o desenvolvimento de alguns dispositivos, onde dois reagentes (A_1 e A_2) percorrem o caminho até a região reacional (B) (Figura 9). Estes tipos de dispositivo, quando usado com as ferramentas de comunicação modernas, podem fornecer poderosos sistema de análise em tempo real (LI, 2008).

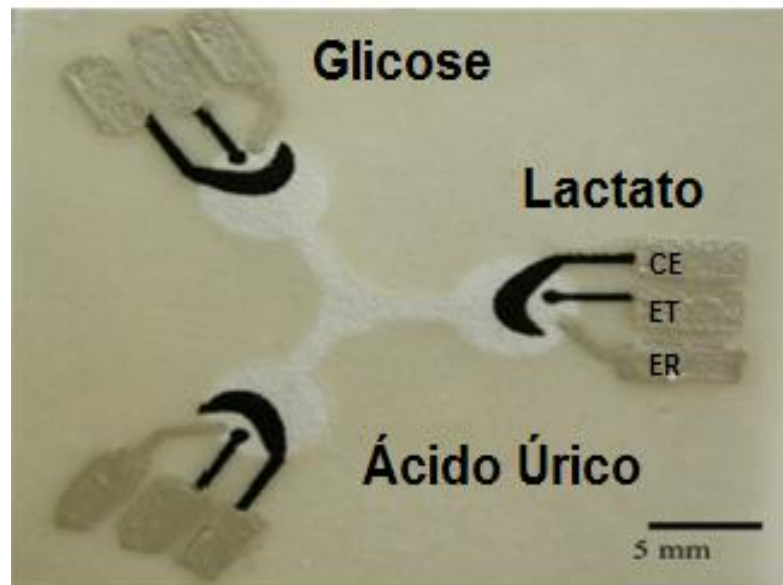
Figura 9. Exemplo de um reator microfluídico, com dois interruptores (S1, S2), duas regiões (A1, A2) para amostras e um sítio reacional (B).



Fonte: LI, 2008.

Buscando um novo método de detecção, Dungchai et al. (2009), publicaram recentemente a construção do primeiro dispositivo microfluídico em papel com detecção eletroquímica (Figura 10). Tal dispositivo apresenta uma região central no qual a amostra é direcionada por capilaridade para três compartimentos onde enzimas (uricase, lactato e glicose oxidase) foram imobilizadas separadamente em cada um dos compartimentos. Para que o processo de detecção fosse efetuado, os autores integraram com sucesso no dispositivo os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar (DUNGCHAI et al., 2009).

Figura 10. Exemplo de dispositivo de papel para a determinação simultânea de três analitos (ácido úrico, Glicose e Lactato) com detecção eletroquímica: ER (eletrodo de referência), CE (contra eletrodo), ET (eletrodo de trabalho).



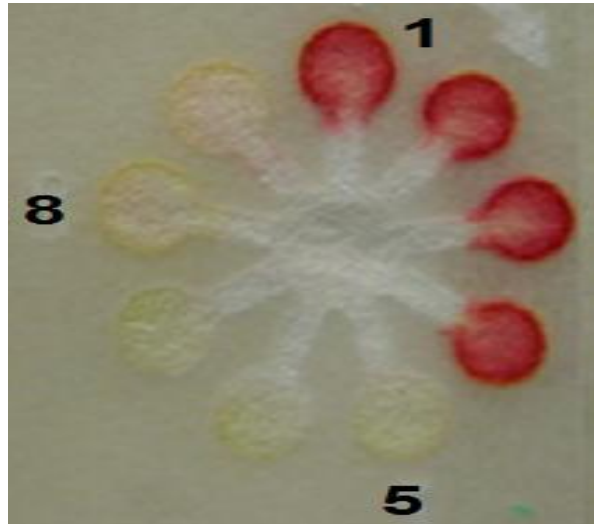
Fonte: DUNGCHAI et al., 2009.

2.5.1 Seleção do Método de Detecção

A maioria dos μ PADs (Microfluidic paper-based analytical devices) apresentados anteriormente foram avaliados para bioensaios colorimétrico. Áreas de detecção são criados por modificação química da superfície do papel por deposição de reagentes, tais como, indicadores ácido-base, enzimas, nanopartículas de ouro, etc. Quando a solução da amostra atinge a zona de detecção, ocorre uma reação química com mudança de coloração entre o composto alvo e os reagentes imobilizados.

Na Figura 11 é possível observar diferentes colorações na zona de detecção por meio da utilização de indicadores apropriado para cada analito. Os indicadores usados foram uma mistura de 4-aminoantipirina (AAP) e ácido 3,5-dicloro-2-hidroxi-benzenossulfônico (DHBS) em razão molar de 1:2 abreviado para AB, dicloridrato de o-dianisidina (OD), iodeto de potássio (KI), amarelo ácido 34 (Y) e preto ácido 1 (B) (DUNGCHAI, 2010).

Figura 11. Projeto de um sistema microfluídico para análise semi-quantitativa de glicose, lactato e ácido úrico. Regiões de 1 a 4: glicose usando Y + indicador AB, 5 a 7: lactato usando Y + indicador OD, e de 8 a 9: ácido úrico utilizando indicador AB.



Fonte: DUNGCHAI, 2010.

A intensidade da cor pode ser medida utilizando aparelhos digitais (por exemplo, câmeras fotográficas, telefones com câmera ou scanners) para a análise quantitativa, e a especificidade das reações garante boa seletividade e detecção. Esse tipo de instrumentação pode ser considerado uma nova tendência neste campo de análise (KARLOS, 2010; ELLERBEE, 2009)

Fica claro, portanto, que a construção de um dispositivo em plataforma de papel com detecção química surge de forma inovadora e irá possibilitar uma união de propriedades intrínsecas ao potencial do papel com as propriedades específicas do antioxidante que será alvo desse estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

Investigar a utilização do papel como plataforma para o desenvolvimento e caracterização de um sensor químico na determinação do ácido xanturênico presente no mosquito *Aedes aegypti*.

3.2 Específicos

- Realizar estudo de estabilidade dos sais, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e do Ácido Xanturênico.
- Caracterizar os complexos formados, por meio das técnicas de Uv-Vis e TGA.
- Estudar as respostas dos papéis qualitativo, quantitativo e cromatográfico na fabricação do dispositivo.
- Realizar estudo da variação da concentração do AX e ferro (II) na formação do complexo utilizando sensor de papel.
- Desenvolver métodos de quantificação do AX com a utilização de papel.
- Realizar teste de recuperação por meio da técnica de Uv-vis.
- Realizar análise em Espectrofotometria no Uv-vis para a determinação e quantificação do ácido xanturênico presente no sangue do mosquito *Aedes aegypti*.

4 METODOLOGIA

4.1 Procedimentos Gerais

4.1.1 Substâncias e Soluções

Todas as substâncias utilizadas no presente trabalho foram de grau analítico e adquiridos da Sigma-Aldrich.

- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloreto férrico $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sulfato de ferro (II) e amônio $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), ácido etilenodiaminotetracético ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), tris (hidroximetil)aminometano ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$), 4,8-diidroxiquinolina-2-ácido carboxílico (ácido xanturênico, ~96%) ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N O}_4$).

As soluções tampão utilizadas nas análises, foram preparados com água purificada em um sistema Milli-Q Millipore, com seus valores de pH determinados em pH-metro, modelo Quimis Q400A.

4.2 Preparo de Soluções

4.2.1 Preparo da Solução do Ácido Xanturênico

Para o estudo da complexação do ácido xanturênico, uma solução estoque de $3,0 \times 10^{-2}$ M do ácido foi preparado adicionando 6,1 mg de AX em 440 μL de NaOH (0,1 M) e 560 μL de H_2O deionizada, obtendo-se um pH 7,5 (BHATTCHARYYA, 2001).

Para a realização das análises em diferentes dias foram utilizadas novas soluções do ácido xanturênico, a fim de evitar perda de concentração do analito por degradação.

4.2.2 Solução de Fe²⁺

Para o preparo das soluções de Fe²⁺ pesou-se 16,7 mg de FeSO₄.7H₂O e 23,5 mg de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂6H₂O, estes sais foram solubilizados em 2,0 mL de HCl 0,1 M. A concentração destes sais foram 3,0 x 10⁻² M.

4.2.3 Solução de Fe³⁺

No preparo desta solução utilizou-se 16,2 mg de FeCl₃.6H₂O em 2,0 mL de HCl 0,1 M (c = 3,0 x 10⁻² M).

A solução de Fe³⁺ só foi utilizada para as análises de TGA. No entanto, a solução de Fe²⁺ foi utilizada em todos os procedimentos de determinação do AX. Em cada experimento foi utilizada uma nova solução dos sais, a fim de evitar perda de concentração por degradação.

4.3 Análises com Sangue

4.3.1 Preparo de Solução Tampão

Para as análises no Uv-vis e em papel foi utilizado solução tampão pH 7,5. Para o preparo de 100 mL de tampão fosfato, adicionou 40,5 mL de Na₂HPO₄ 0,2 M e 9,5 mL de NaH₂PO₄ 0,2 M, e completou-se a solução com 50,0 mL de H₂O para obter uma solução tampão pH 7,5. Para o preparo de 100 mL de tampão Tris-Cl, adicionou 50,7 mL de Tris 0,1 M e 40,3 mL de HCl 0,1 M, para obter uma solução tampão pH 7,5. (PERRIN, 1974). As soluções foram preparadas com água purificada em um sistema Milli-Q Millipore.

4.3.2 Dissecção do Intestino do Mosquito

Os mosquitos *Aedes aegypti* foram cedidos pelo grupo de pesquisa do professor Antonio Euzébio G. de Sant'Ana do Instituto de Química e Biotecnologia-IQB-UFAL.

Os 16 mosquitos utilizados nessa análise foram alimentados com sangue de pombo e depois de 24 horas de digestão foram imobilizados por resfriamento em geladeira, após essa etapa transferiu-se para um vidro de relógio, e em seguida foram manuseados com pinças. As dissecções foram feitas com auxílio de um par de pinças da seguinte forma:

Sobre o vidro de relógio foi colocado uma gota de etanol e em seguida colocou-se os mosquitos adormecidos. O intestino foi obtido segurando o tórax com uma das pinças e o terceiro segmento abdominal com a outra e puxando-as delicadamente em direções opostas. Ao romper a junção entre o tórax e o abdome as duas partes foram separadas. A solução de sangue proveniente dos intestinos foi feita com dezesseis cavidades abdominal, adicionando 200 μL de EDTA (10,0 mM) e tamponado com 600 μL de tampão fosfato pH 7,5. Após essa etapa, a solução proveniente da cavidade intestinal foi centrifugada em uma centrífuga modelo Unicen MR, HEROLAB, a 10000 RPM por 10 minutos. Em seguida, foi retirada a parte sobrenadante armazenado-a em congelador para as análises posteriores (LIMA, 2007).

4.3.3 Análise com Sangue de Pombo

Para esta análise retirou-se aproximadamente 1,0 mL de sangue de pombo e depois foi adicionado 250 μL de EDTA (10,0 mM), em seguida tamponou-se a solução com 800 μL de tampão fosfato pH 7,5. Posteriormente, essa solução foi levada para ser centrifugada a 10000 RPM por 10 minutos, depois, armazenou a parte sobrenadante no congelador para estudos posteriores.

4.4 Técnicas Utilizadas para determinação do complexo e para o estudo da estabilidade

4.4.1 Espectrofotometria no UV-vis

A espectrofotometria de UV-Vis é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função da simplicidade e custo relativamente baixo. Esta técnica é

fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso nas regiões do UV-Vis e IV do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se a Equação 1:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc$$

sendo A a absorvância, I_0 a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo b é a distância percorrida pelo feixe através da amostra e c é a concentração, em mol L⁻¹, da espécie absorvente (ROCHA *et al.*, 2004).

4.4.1.1 Estudo da Estabilidade dos sais de ferro e do AX

Com o objetivo de verificar se os sais e o ácido xanturênico utilizados na formação do complexo sofrem degradação ao longo do tempo sob luz natural, foi utilizado à espectrofotometria no Uv-vis (espectrofotômetro Shimadzu MultiSpec 1501). Preparou-se uma solução de $3,0 \times 10^{-2}$ M dos sais e do AX seguindo os procedimentos anteriores, e feitas leituras em um período total de 5 h. Para o estudo do AX, foi utilizado 5,0 mL de tampão Tris-Cl (pH 7,5) e 8,0 μ L de AX obtendo-se uma concentração de $4,8 \times 10^{-5}$ M. As soluções foram deixadas expostas à luz ambiente durante toda a análise.

4.4.1.2 Estudos Estequiométricos

O estudo da relação estequiométrica do complexo, foi feito por meio do método da razão molar metal/ligante. Essa análise foi realizada com AX e Fe²⁺ ($3,0 \times 10^{-2}$ M).

Nessa análise, o número de mols do ácido xanturênico sofreu variações de 0,5 a 5,0 mols, por meio de adições de alíquotas (0,2 μL) em diferentes recipientes contendo 10 μL de Fe^{2+} ($3,0 \times 10^{-2} \text{ M}$) e tampão fosfato pH 7,5. No entanto, o número de mols do metal permaneceu constante, afim de obter o valor da razão molar (SELEEM, 2009). Para a obtenção dos resultados foi utilizado a espectrofotometria no UV-vis.

4.4.2 Análise Termogravimétrica

Análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica na qual a massa de uma substancia é medida em função da temperatura (em uma atmosfera controlada). A amostra pode ser aquecida, a uma velocidade selecionada, ou pode ser mantida a uma temperatura constante (modo isotérmico). Essa técnica identifica mudanças de peso relacionado com volatilização de componentes de amostra, decomposição, reações redox, ou outras mudanças. Ao sofrer degradação, o material perde massa sob a forma de produtos voláteis e o sensor registra essa perda de massa. O resultado da análise, em geral, é expresso sob a forma de um gráfico cuja abscissa contém os registros de temperatura e a ordenada, o percentual de massa perdida ou ganho.

O equipamento usado foi o modelo TGA 2050 da PA Instrument. O aparelho de análise utilizado encontra-se no laboratório de análise Térmica, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A preparação experimental inicia-se na pulverização dos complexos ($\text{AX}:\text{Fe}^{3+}$ e $\text{AX}:\text{Fe}^{2+}$). Utilizou-se aproximadamente 7,0 mg dos complexos e 10 mg do AX. A taxa de aquecimento utilizada foi de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, até uma temperatura de 1000°C . A análise foi realizada em atmosfera de nitrogênio.

4.5 Desenvolvimento do Dispositivo

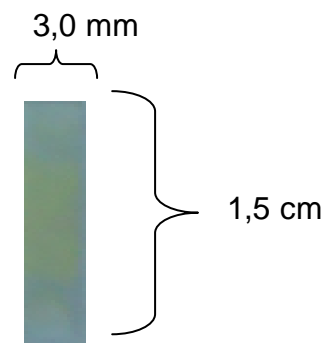
4.5.1 Utilização dos Papéis

Com o intuito de verificar qual papel apresenta melhor resposta para o desenvolvimento do sensor, foram utilizados os papéis: qualitativo da J. Prolab (Maioria dos poros 14 μm e 205 μm de espessura), quantitativo da Sigma-Aldrich (Porosidade 7,5 micras) e cromatográfico da Whatman número 1. Pois, a homogeneidade dos poros favorece ao processo de separação e consequentemente, a determinação do analito.

4.5.2 Área do Dispositivo Microfluídico

A fim de obter uma melhor resposta durante as análises, o dispositivo utilizado foi desenvolvido com 3,0 mm de largura, 1,5 cm de comprimento e com duas regiões de detecção (Figura 12). Estes parâmetros foram utilizados devido à simplicidade de fabricação desse dispositivo. Trabalhos publicados anteriormente por Martinez et al. (2008), Bruzewicz et al. (2008), Abe et al. (2008), Dungchai et al. (2009), Li et al (2010), demonstraram que é possível criar dispositivos com áreas menores e mais zonas de detecção que as utilizadas neste trabalho. Isto se deve em parte, ao uso de computador que favorece a miniaturização da zona de detecção e ao uso de técnicas de fotolitografia que permite a delimitação da área de detecção por meio de uma região hidrofóbica (MARTINEZ, 2008; BRUZEWICZ, 2008; ABE, 2008; DUNGCHAI, 2009; Li, 2010).

Figura 12. Design do dispositivo utilizado na determinação de AX.



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

4.5.3 Captura da Imagem

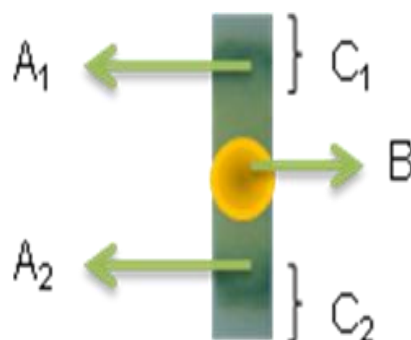
A captura da imagem do dispositivo foi realizada com a utilização de uma câmera Sony (7,2 mega pixels), com zoom óptico de 4x, obtida no modo auto-ajuste sem a utilização de flash.

A câmera foi colocada em um suporte universal a uma distância de aproximadamente 13,0 cm do sensor. Observou-se que para uma distância menor que 13,0 cm, houve uma perda de foco da imagem.

4.5.4 Determinação do Volume do Dispositivo Microfluídico

De posse do tamanho do dispositivo, foram definidos os volumes do analito e do reagente, com o intuito de obter a melhor resposta para o dispositivo desenvolvido. Durante as análises, 0,5 μL da solução de Fe^{2+} foram adicionados nas áreas (A_1 e A_2) e em seguida foi adicionado 5,0 μL do ácido xanturênico na área B. Após a reação do ácido com Fe^{2+} foi delimitado uma zona reacional (C_1 e C_2), onde se obteve as respostas referente a mudança de coloração (Figura 13).

Figura 13. Modelo esquemático do dispositivo.

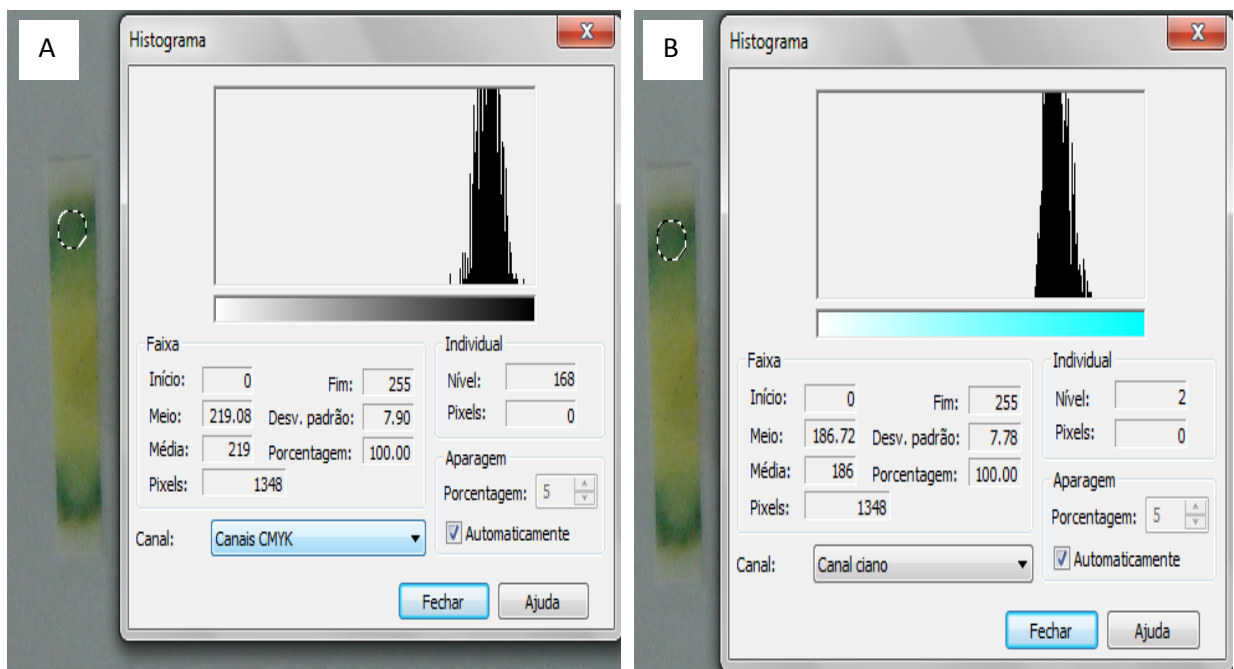


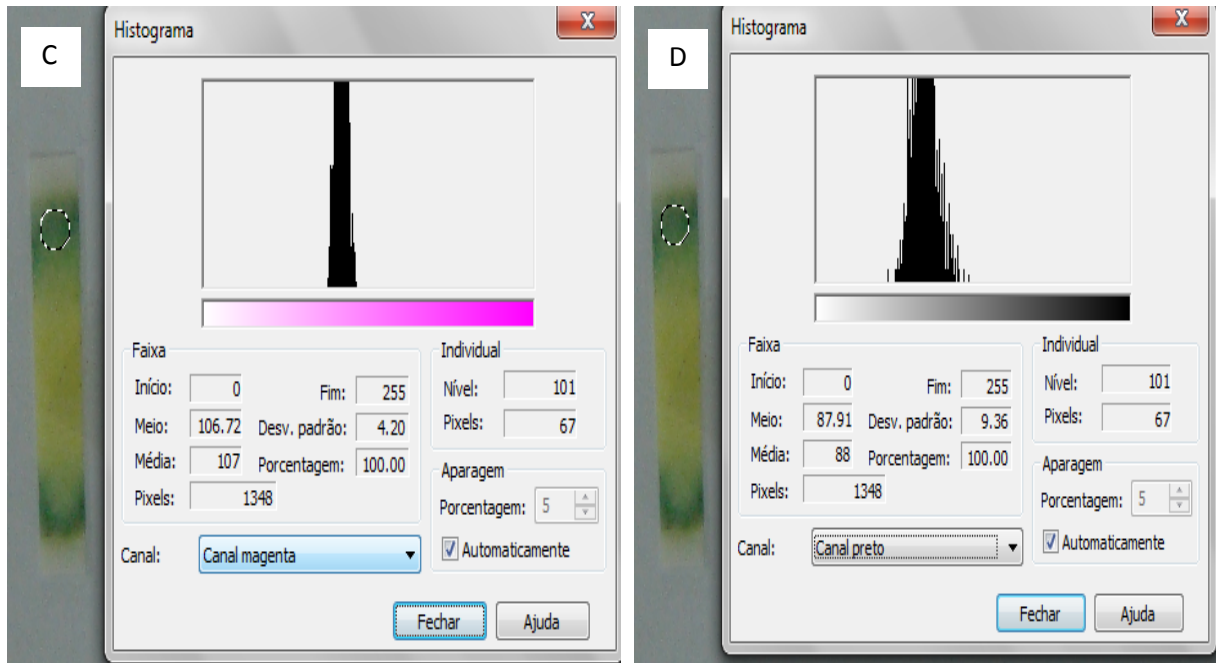
Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

4.5.5 Método de Análise

Os resultados foram obtidos por meio do tratamento das imagens dos dispositivos com a ajuda do programa CorelDRAW X5, obtendo-se as respostas referentes às variações das diferentes colorações na área de detecção. As cores analisadas foram: CMYK (que é a abreviação para as cores ciano, magenta, amarelo e preto), CIANO, MAGENTA e PRETO (Figura 14). Com a utilização do programa foi possível obter para um único ponto valores referentes à variação da coloração, que, por conseguinte, obteve-se como resposta a essa intensidade de cor uma média numérica, que foi a base para o estudo do sensor. Na (figura 15 A, B, C e D), foi possível analisar os diferentes histogramas com os valores da média, desvio padrão, pixels, etc, para as cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO.

Figura 14. Histogramas das diferentes cores para a mesma região do dispositivo.





Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente, foram realizados alguns ensaios preliminares com o intuito de garantir a formação do complexo através da interação entre o AX e Fe^{+2} , e, portanto, fornecer subsídios para tomada de decisão com relação a caracterização tanto do complexo quanto da zona de detecção.

Além disso, como o dispositivo é fundamentado na tecnologia do papel e sua respectiva resposta centra-se no método colorimétrico, ou seja, na intensidade de cor do produto formado, é de fundamental importância verificar as intensidades de coloração dos reagentes de partida sobre a plataforma de papel. A partir da Figura 15, é possível observar a cor do papel na ausência de modificação, modificado com Fe^{+2} , modificado com AX apresentando coloração amarela, bem como um verde escuro sendo o produto da reação entre o Fe^{+2} e AX.

Figura 15. Coloração dos dispositivos de papel.











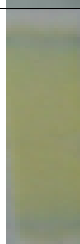
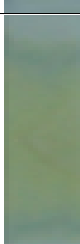





Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Alguns estudos corroboram com essas cores observadas tanto dos reagentes quanto do produto da reação (LIMA, 2007). Segundo o trabalho de Lima (2007), a cor verde intensa pode estar relacionada com a formação de um complexo entre o Fe^{+2} e AX. Por outro lado, o autor não caracterizou o complexo.

Nas Tabelas 2 e 3 é possível observar que a concentração do complexo está diretamente relacionada com a concentração do Fe^{2+} e do AX, pois à medida que diminui a concentração tanto do Fe^{2+} quanto do AX, ocorre uma diminuição na

concentração do complexo formado. Isto pode ser evidenciado pela intensidade de coloração verde na região reacional (zona de detecção). Também é possível visualizar que os papéis influenciam na formação do complexo, sendo a intensidade da coloração do complexo o parâmetro que caracteriza esta afirmativa.



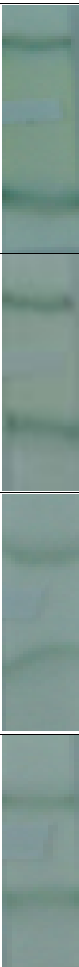


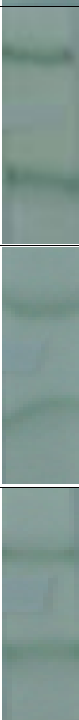


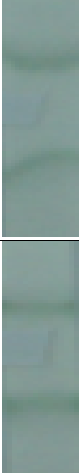



Tabela 2. Variação da concentração de Fe^{2+} na formação do complexo. Papéis utilizados: quantitativo, qualitativo e cromatográfico.



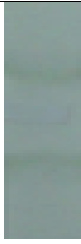


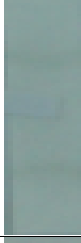

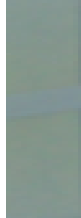
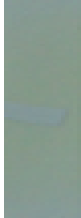
Varição de $[\text{Fe}^{2+}]$	Papel Quantitativo	Papel Qualitativo	Papel Cromatográfico
$1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$			
$5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$			
$2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$			
$1,25 \times 10^{-3} \text{ M}$			
$8,0 \times 10^{-4} \text{ M}$			

$4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$			
Branco (AX $3,0 \times 10^{-2} \text{ M}$)			

Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Tabela 3. Variação da concentração de AX na formação do complexo. Papéis utilizados: quantitativo, qualitativo e cromatográfico.

Varição de [AX]	Papel Quantitativo	Papel Qualitativo	Papel Cromatográfico
$1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$			
$5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$			
$2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$			
$1,25 \times 10^{-3} \text{ M}$			

$8,0 \times 10^{-4} \text{ M}$			
$4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$			
Branco (AX $1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$)			

Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

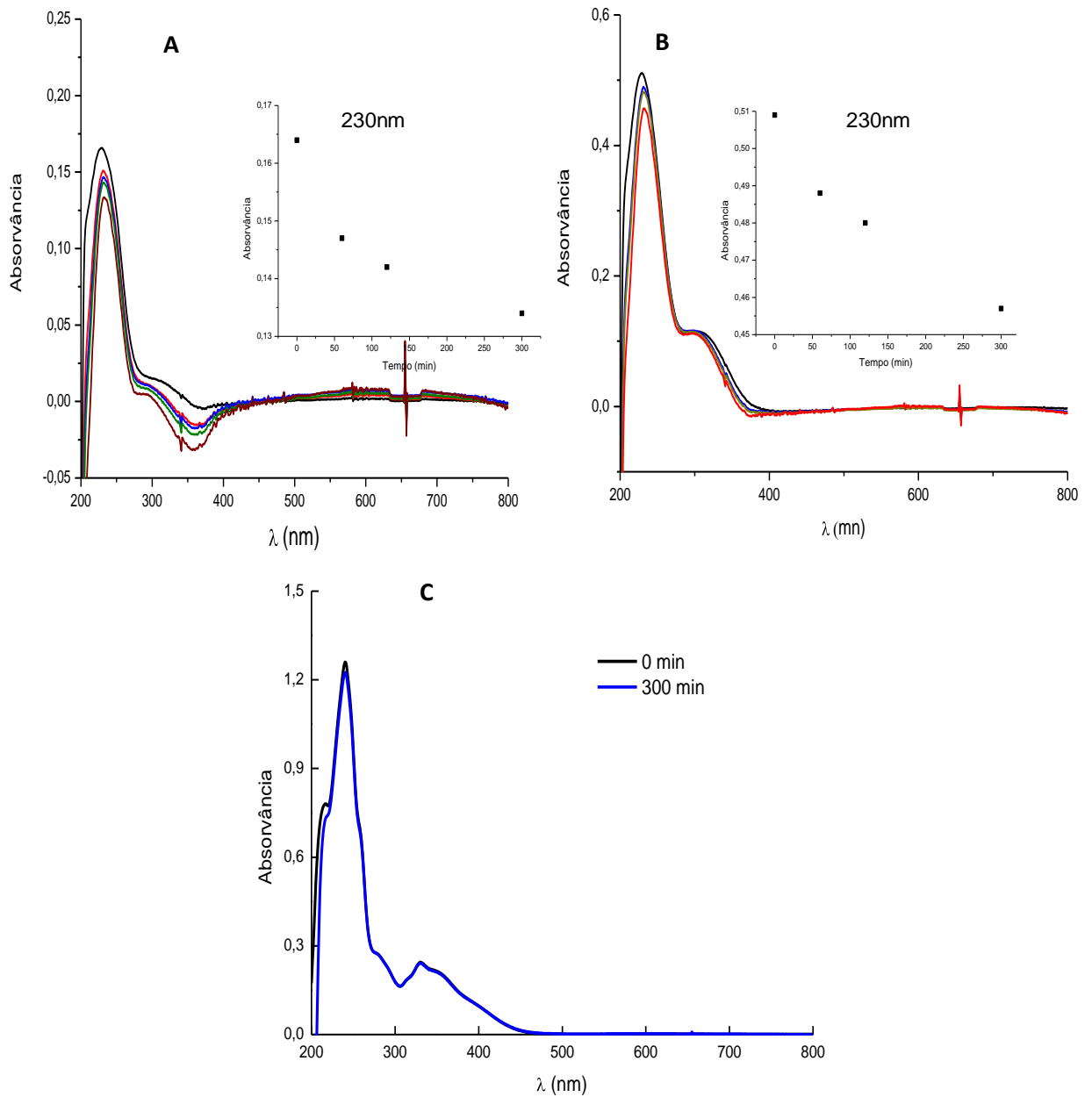
5.1 Espectrofotometria no UV-Vis

5.1.1 Estudo da estabilidade

Com o objetivo de verificar se as substâncias em estudo se decompõem na presença de luz, foi necessário verificar o comportamento das mesmas em um período total de 5 horas sob luz ambiente. Nas Figuras 16A e 16B, observa-se que houve modificação nos espectros dos sais $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Isto pode ser evidenciado por meio da diminuição da absorvância ao longo do tempo de análise.

Diferentemente dos sais de ferro e nas mesmas condições, as absorvâncias inicial e final do ácido xanturênico (Figura 16C) permaneceram as mesmas. Estes resultados comprovaram que a concentração desse composto, em solução, não sofreu modificação no período em que o experimento foi realizado, indicando que não foi necessário proteger o AX contra a luz.

Figura 16. Estudo da estabilidade do sais $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (A) ($4,3 \times 10^{-3} \text{ M}$), $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (B) ($4,3 \times 10^{-3} \text{ M}$) e (C) Ácido Xanturênico ($4,8 \times 10^{-5} \text{ M}$).



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

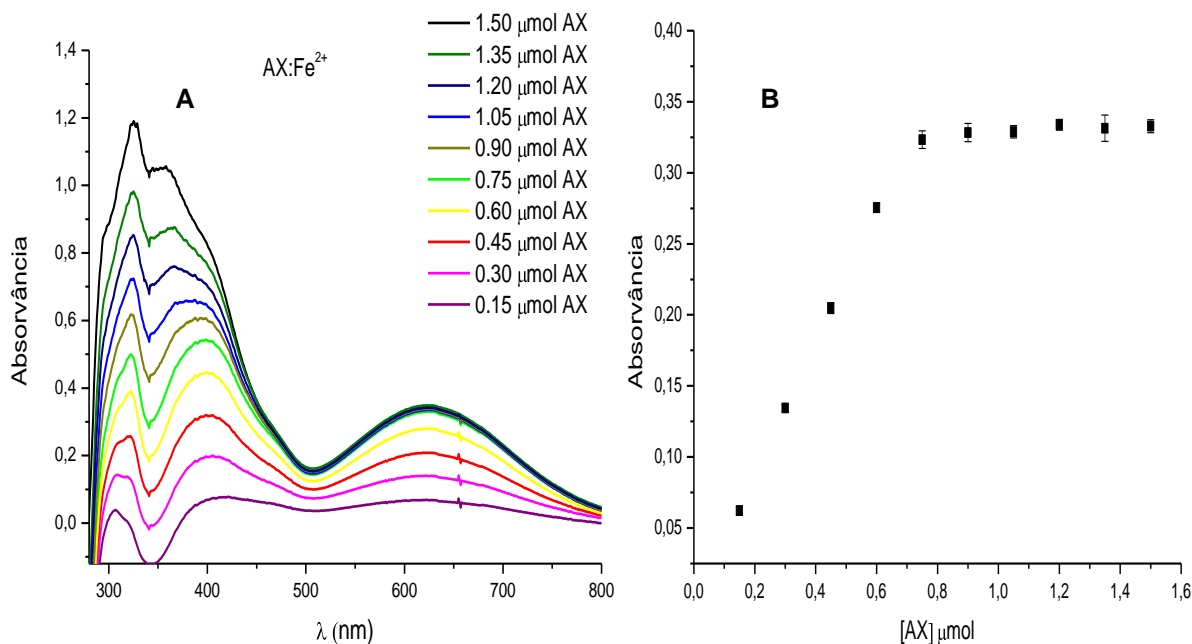
5.2 Determinação da Estequiometria do Complexo

5.2.1 Espectrofotometria no UV-Vis

A realização desse experimento foi feito por meio da espectrofotometria no Uv-Vis, onde foi possível obter informações sobre a estequiometria do complexo. Com o intuito de obter a relação estequiométrica entre AX e Fe^{2+} , a concentração do AX sofreu variações enquanto que a concentração de ferro ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) na cubeta permaneceu constante.

Quando foi adicionado gradativamente 0,15 μmol de AX na cubeta, observou-se formação do complexo com o surgimento da banda em 624 nm. Isto foi evidenciado pelo aumento da absorvância do espectro da amostra (Figura 17A). A partir da adição de aproximadamente 0,7 μmol de AX não houve variação da absorvância, indicando que todo ferro (0,3 μmol) presente na cubeta reagiu com AX adicionado, isto pode ser comprovado pela inflexão da reta (Figura 17B). A obtenção da relação estequiométrica do complexo formado foi feita pela intersecção das duas retas por meio do uso do método da razão molar, indicando desta forma que a razão molar entre Fe^{2+} : AX é 1:2. Esse estudo foi realizado a partir da metodologia da página 38 com auxílio da referência de Seleem (SELEEM, 2009).

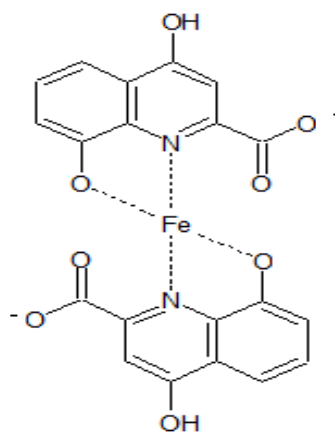
Figura 17. Estudo estequiométrico do complexo AX: Fe^{2+} . Branco AX.



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

A Figura 18 mostra a estrutura do quelato formado a partir do AX com Fe^{2+} , indicando sua estequiometria de 2:1 (MURAKAMI, 2006).

Figura 18. Estrutura do quelato do ácido xanturênico com ferro.



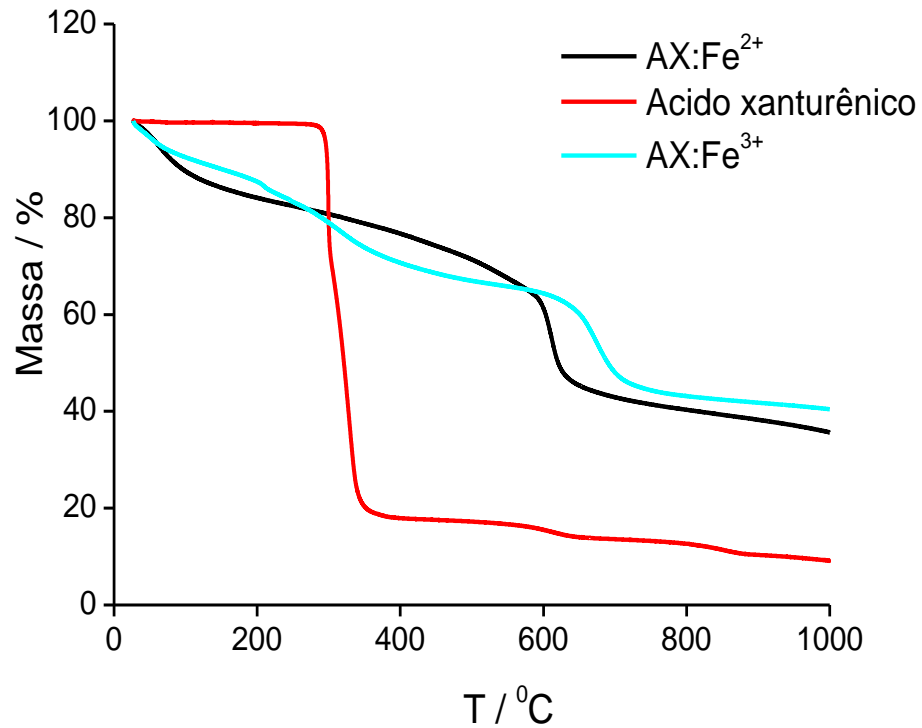
Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5.3 Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas realizadas no presente trabalho serviram para avaliar a estabilidade e o comportamento térmico dos complexos e do AX quando submetidos a uma rampa de aquecimento.

Na Figura 19, pode-se observar que os complexos formados $\text{AX}:\text{Fe}^{2+}$ e $\text{AX}:\text{Fe}^{3+}$, possuem uma estabilidade maior que o AX, devido a forte ligação entre o metal e o ligante, essa estabilidade pôde ser confirmada comparando os estágios de perda de massa. A temperatura onde os complexos têm maior perda de massa foi de aproximadamente 650 °C para o $\text{AX}:\text{Fe}^{2+}$ e de 730 °C para $\text{AX}:\text{Fe}^{3+}$, que podem estar relacionados ao estágio de decomposição do complexo. No entanto, o ácido xanturênico apresentou apenas um estágio de perda de massa com variação de temperatura entre 250 °C a 400 °C, esse estágio é devido a decomposição de sua molécula, e indica também a pureza do AX durante as análises. A Tabela 4 mostra os estágios de perda de massa dos complexos e do AX.

Figura 19. Análise termogravimétrica dos complexos AX:Fe²⁺, AX:Fe³⁺ e do Ácido Xanturênico.



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Tabela 4. Estágios de perda de massa dos complexos e do AX.

	Fe ²⁺ :AX	Fe ³⁺ :AX	AX
Estágios	I	I	I
Início (°C)	30	30	250
Fim (°C)	650	730	400
Perda de massa (mg)	4,5	4,2	9,0
Massa (%)	65	60	90

Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5.4 Determinação da Curva Analítica

Com o intuito de obter resposta capaz de fornecer informações da quantidade do ácido presente no mosquito, foi necessário a realização desse experimento. Nessas análises observou-se que a intensidade da coloração do complexo é influenciado pelas concentrações de ferro e de AX.

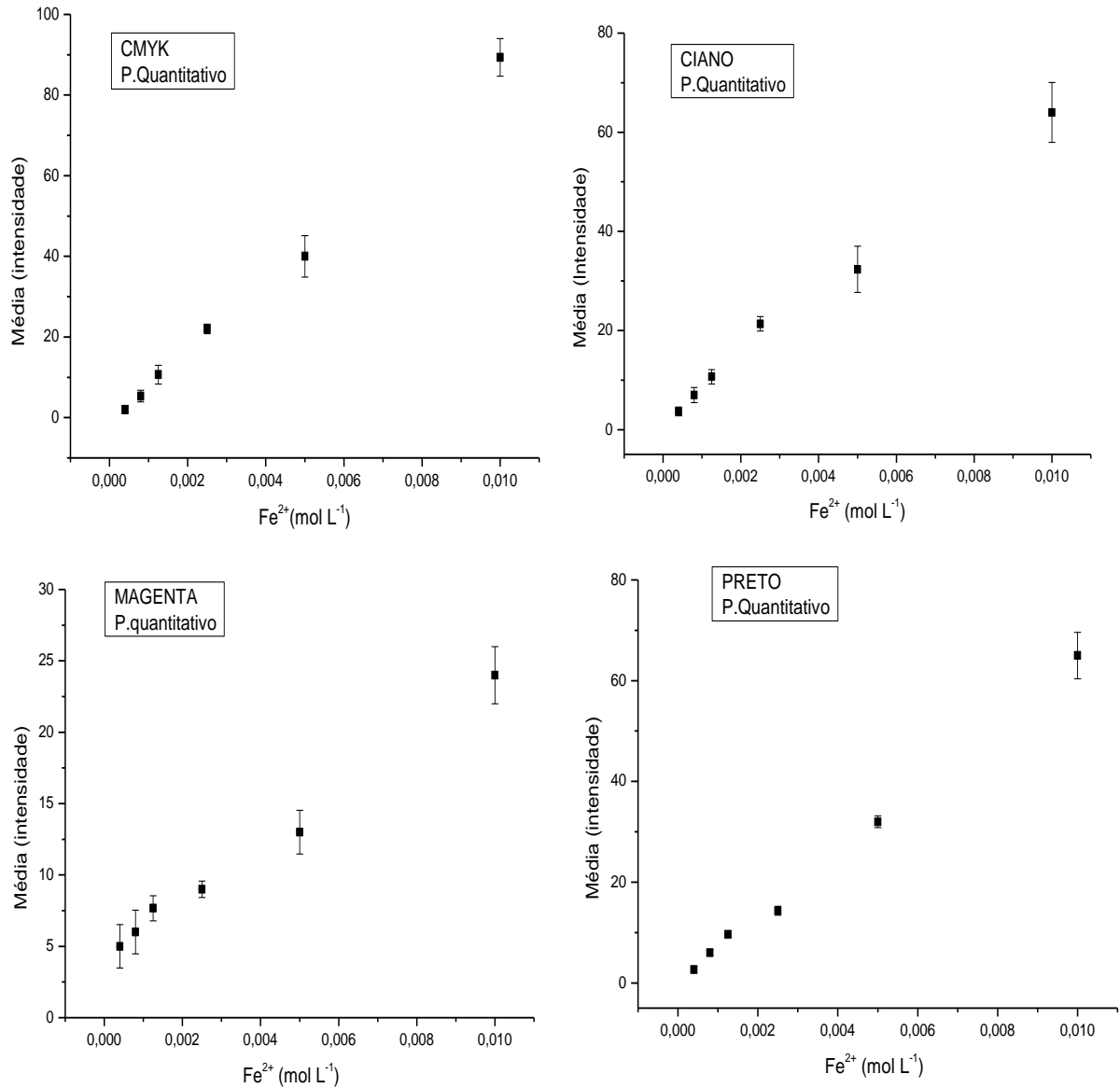
Para estas análises foram utilizados os papéis quantitativo, qualitativo e cromatográfico, pôde-se investigar qual papel possui melhor resposta para o sistema proposto.

5.4.1 Utilização do papel quantitativo vs. Concentração de Fe^{2+}

Na Figura 20, utilizando o papel quantitativo, é possível visualizar um comportamento linear para as quatro cores analisadas à medida que a concentração de ferro no papel aumenta. Também observou-se que a cor MAGENTA apresentou o pior desvio padrão, indicando que esta cor obteve a pior repetibilidade.

Esses resultados mostram que o estudo analítico depende da cor utilizada como forma de detecção, tornando-o uma plataforma capaz de obter dados quantitativos da concentração do ácido xanturênico.

Figura 20. Estudo da variação da concentração de Fe^{2+} , por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para o papel quantitativo, AX ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e Fe^{2+} ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

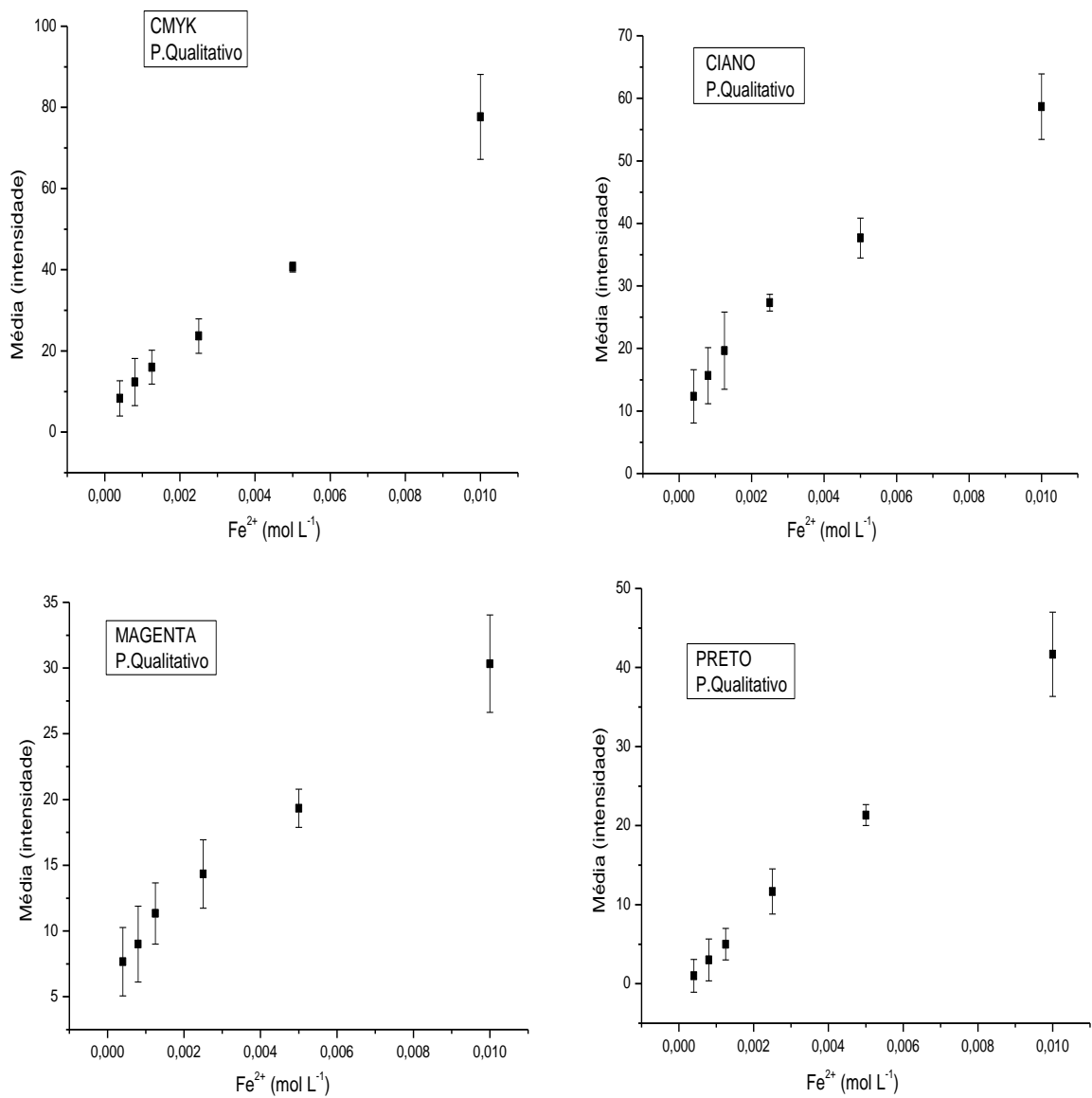
5.4.2 Utilização do papel qualitativo vs. Concentração de Fe^{2+}

A Figura 21 mostra os resultados referentes à utilização do papel qualitativo como plataforma para o dispositivo. O comportamento linear do sistema com a variação de ferro no papel indica que sua utilização é limitada pela cor que

representa melhor o sistema. Dentre as cores analisadas nesse dispositivo a cor MAGENTA apresentou o pior desvio padrão.

As quatro cores utilizadas nesse trabalho apresentam intensidade de resposta diferente, mostrando dessa forma que sua escolha depende apenas da resposta requerida.

Figura 21. Estudo da variação da concentração de Fe^{2+} , por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para o papel qualitativo, AX ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e Fe^{2+} ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

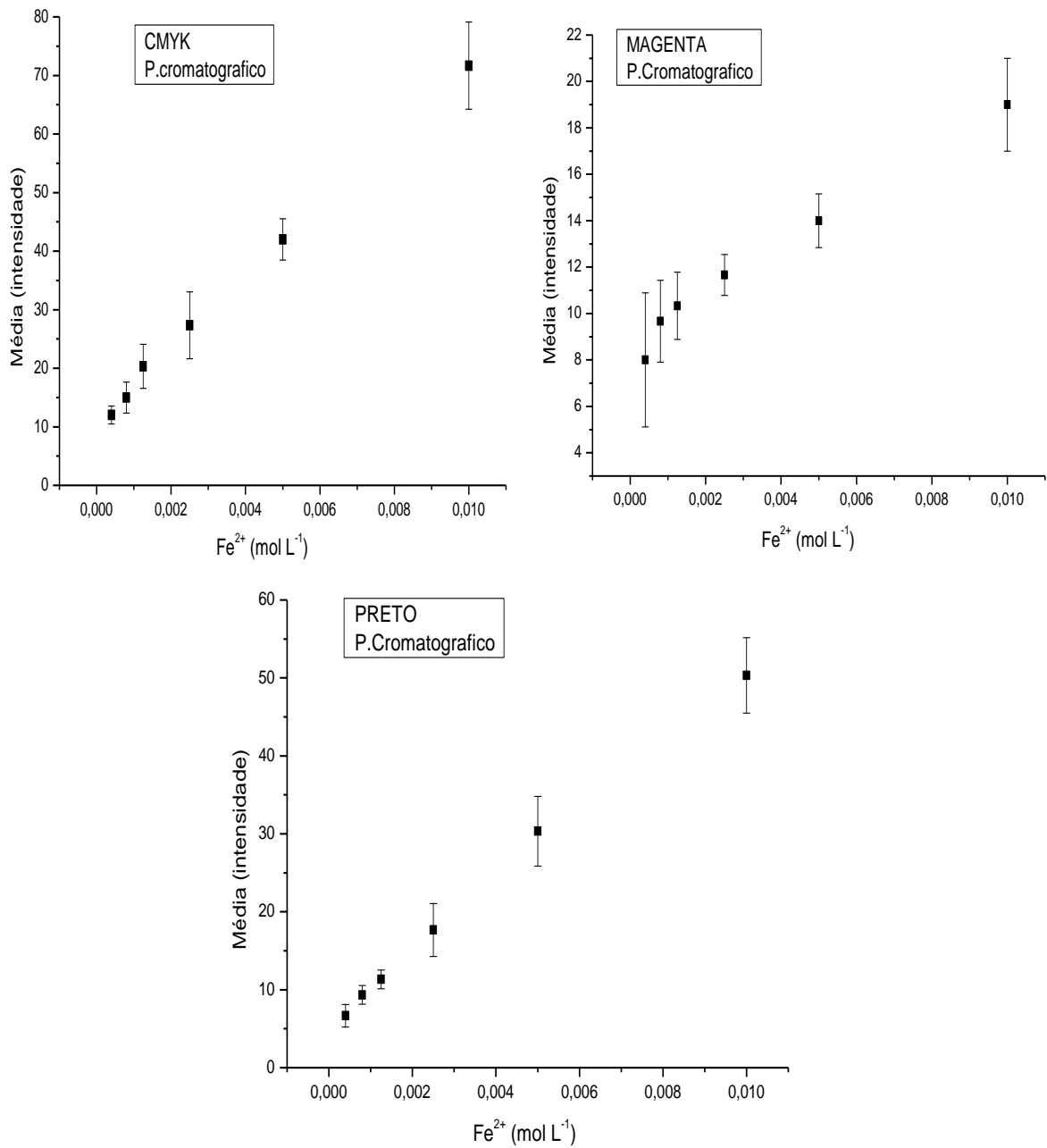


Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5.4.3 Utilização do papel cromatográfico vs. Concentração de Fe^{2+}

A Figura 22 apresenta os resultados referentes a variação da concentração de ferro (II) utilizando papel cromatográfico.

Figura 22. Estudo da variação da concentração de Fe^{2+} , por meio das cores CMYK, MAGENTA e PRETO, para o papel cromatográfico, AX ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e Fe^{2+} ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).



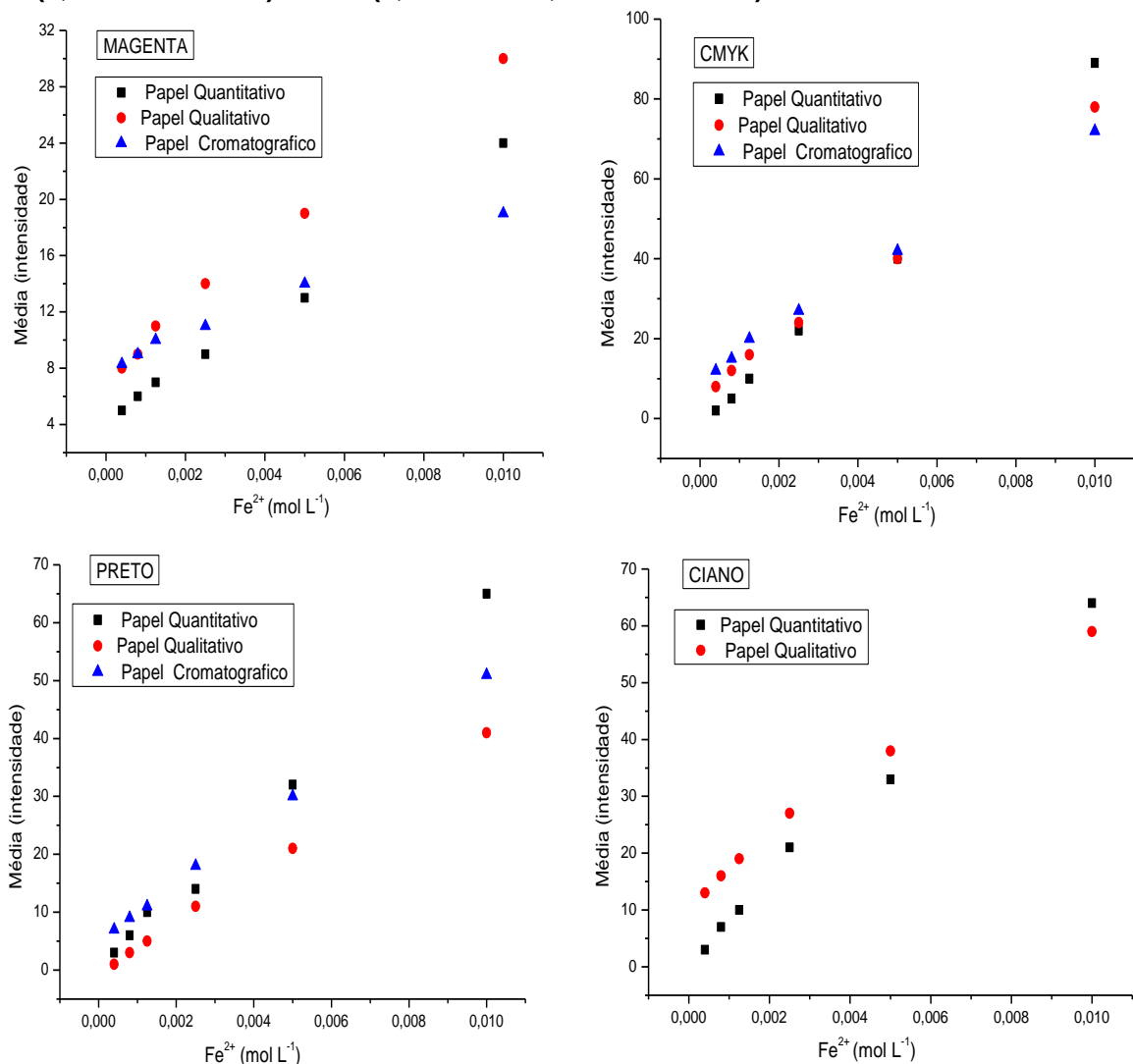
Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

De acordo com a Figura 22, percebe-se um comportamento linear, no entanto, não apresentou uma boa repetibilidade e a cor CIANO não pôde ser detectada nas concentrações utilizadas nessas análises.

5.5 Comparação dos três dispositivos vs. Concentração de Fe^{2+}

A Figura 23 apresenta a comparação entre os três sensores de papel nas diferentes cores variando a concentração de Fe^{2+} , onde percebe-se dessa forma, a determinação das figuras de mérito a partir do comportamento linear.

Figura 23. Estudo da variação da concentração de Fe^{2+} , por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para os papéis quantitativo, qualitativo e cromatográfico, AX ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e Fe^{2+} ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

A Tabela 5 apresenta os resultados referentes aos limites de detecção, quantificação e o coeficiente de correlação linear, obtidos a partir da Figura 29, utilizando os três tipos de papéis, por meio das diferentes cores. Esses resultados indicam qual dos papéis apresentou melhor resposta para o sistema proposto.

Tabela 5. Comparação dos três dispositivos vs. Concentração de Fe^{2+} .

Varição da $[Fe^{2+}]$	Papel Quantitativo	Papel Qualitativo	Papel Cromatográfico
CMYK			
LD	$2,92 \times 10^{-4}M$	$2,35 \times 10^{-4}M$	$3,29 \times 10^{-4}M$
LQ	$9,73 \times 10^{-4}M$	$7,84 \times 10^{-4}M$	$1,11 \times 10^{-3}M$
r	0,997	0,998	0,993
CIANO			
LD	$3,86 \times 10^{-4}M$	$3,49 \times 10^{-4}M$	-
LQ	$1,28 \times 10^{-3}M$	$1,17 \times 10^{-3}M$	-
r	0,969	0,959	-
MAGENTA			
LD	$7,15 \times 10^{-4}M$	$7,0 \times 10^{-4}M$	$1,59 \times 10^{-3}M$
LQ	$2,38 \times 10^{-3}M$	$2,33 \times 10^{-3}M$	$5,31 \times 10^{-3}M$
r	0,976	0,988	0,983
PRETO			
LD	$2,63 \times 10^{-4}M$	$3,75 \times 10^{-4}M$	$2,84 \times 10^{-4}M$
LQ	$8,77 \times 10^{-4}M$	$1,25 \times 10^{-3}M$	$9,47 \times 10^{-4}M$
r	0,984	0,997	0,994

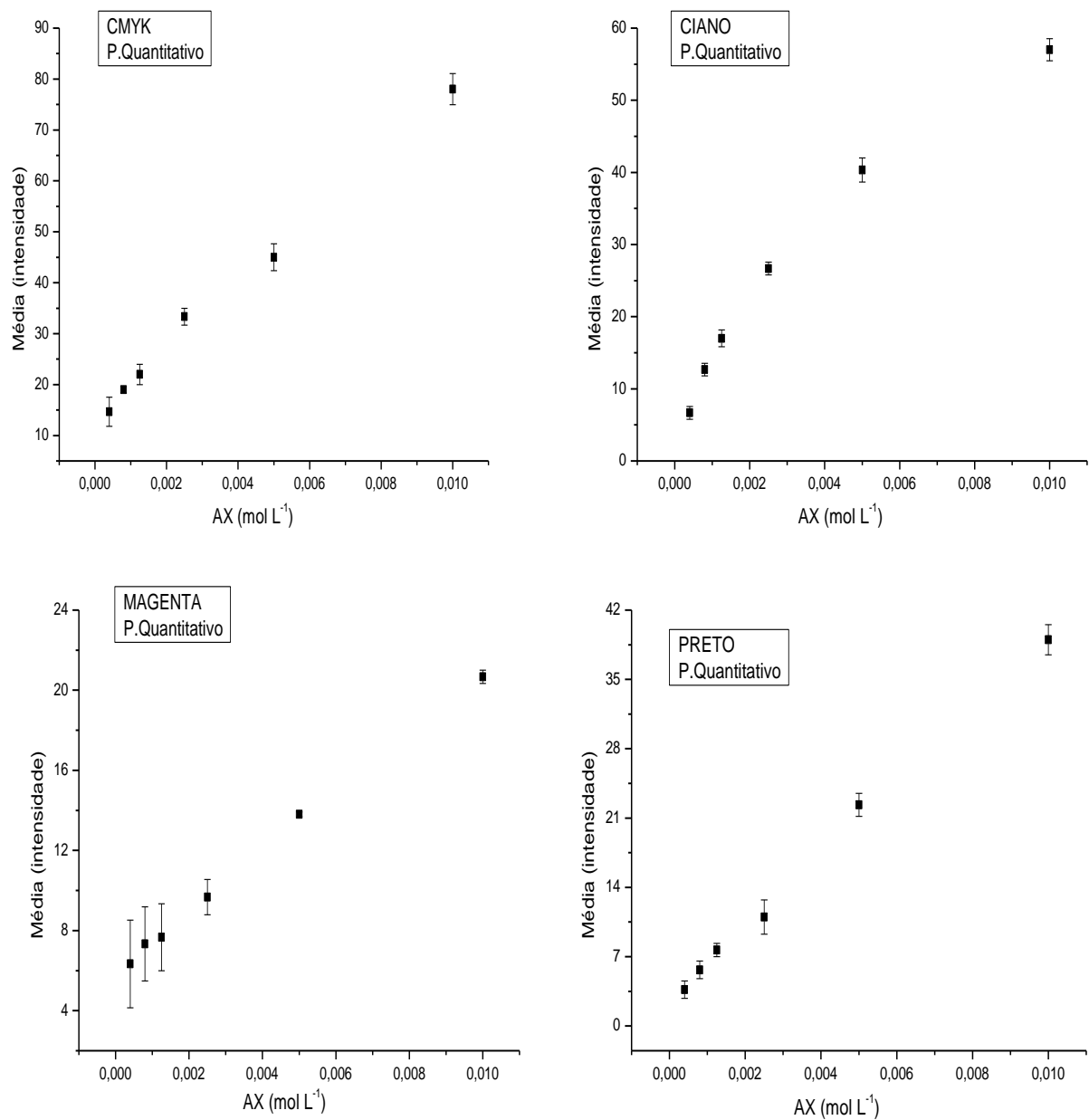
Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Os resultados obtidos a partir da Figura 23 e Tabela 5 indicam que o papel cromatográfico apresentou resultados menos satisfatório para todas as cores empregadas, além de não ter sido possível detectar o complexo por meio da cor CIANO na faixa de concentração estudada. Contudo, ao se utilizar os papéis quantitativo e qualitativo os valores de LD, LQ e r obtidos foram semelhantes, indicando serem mais vantajosos para a elaboração do dispositivo.

5.5.1 Utilização do papel quantitativo vs. Concentração de AX

Os dispositivos foram analisados variando a concentração do ácido xanturênico (Figura 24), com o intuito de verificar se o dispositivo apresentava o mesmo comportamento linear observado na seção 5.4, quando se variou a concentração de Fe^{2+} .

Figura 24. Estudo da variação da concentração de AX, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para o papel quantitativo, Fe^{2+} ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

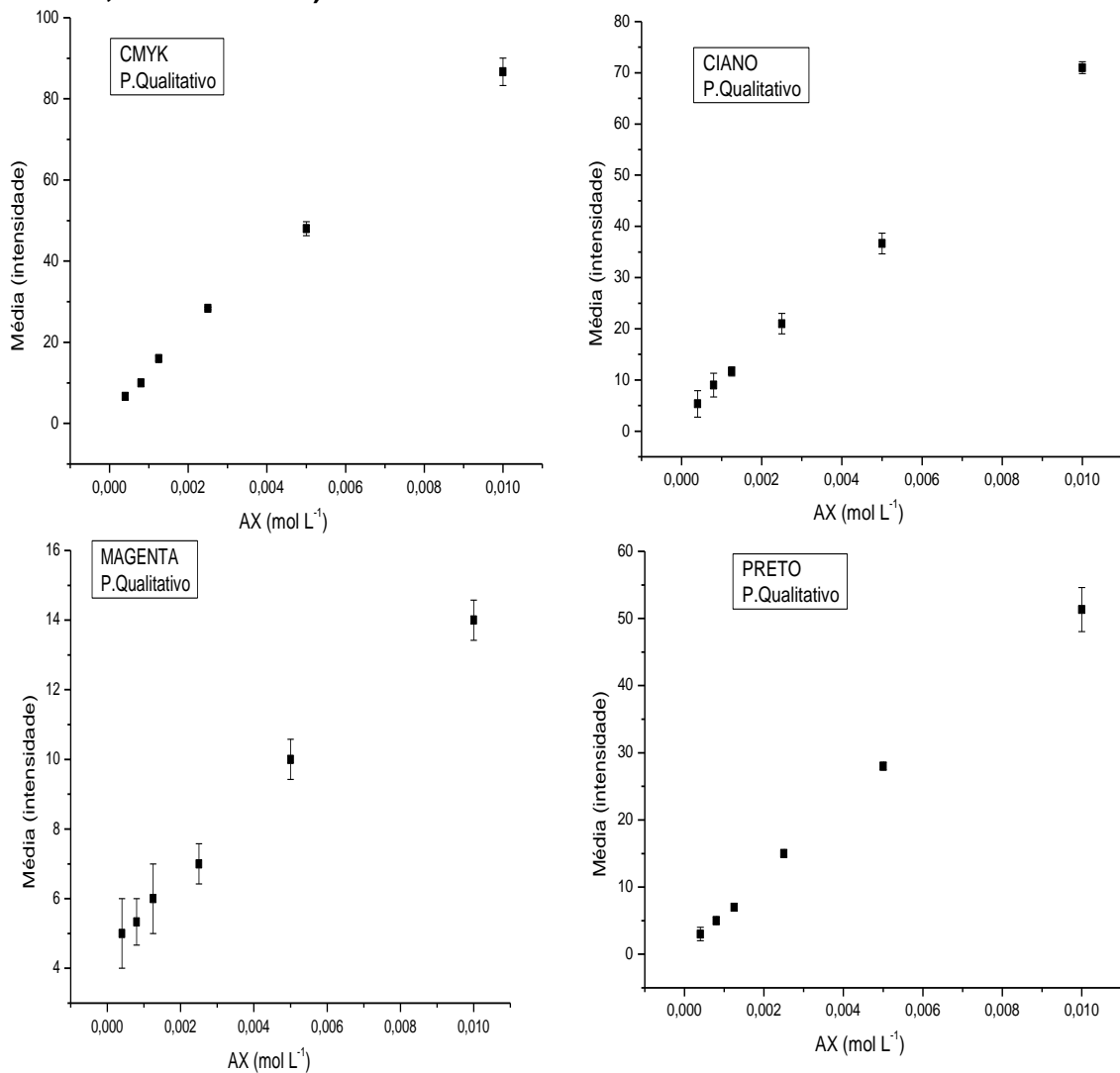


De acordo com a Figura 24 percebe-se que a cor MAGENTA apresenta o pior desvio padrão, o que indica uma baixa repetibilidade comparada às demais cores testadas.

5.5.2 Utilização do papel qualitativo vs. Concentração de AX

Os estudos a seguir mostram a influência da variação da concentração do AX na formação do complexo por meio da utilização do papel qualitativo (Figura 25).

Figura 25. Estudo da variação da concentração de AX, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para o papel qualitativo, Fe^{2+} ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).



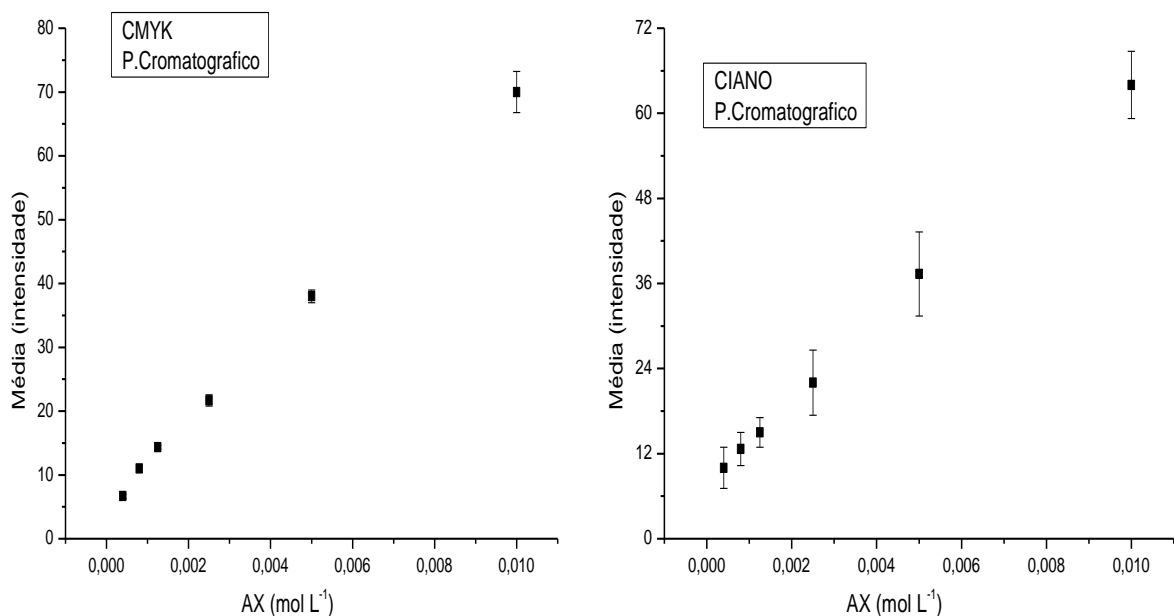
Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

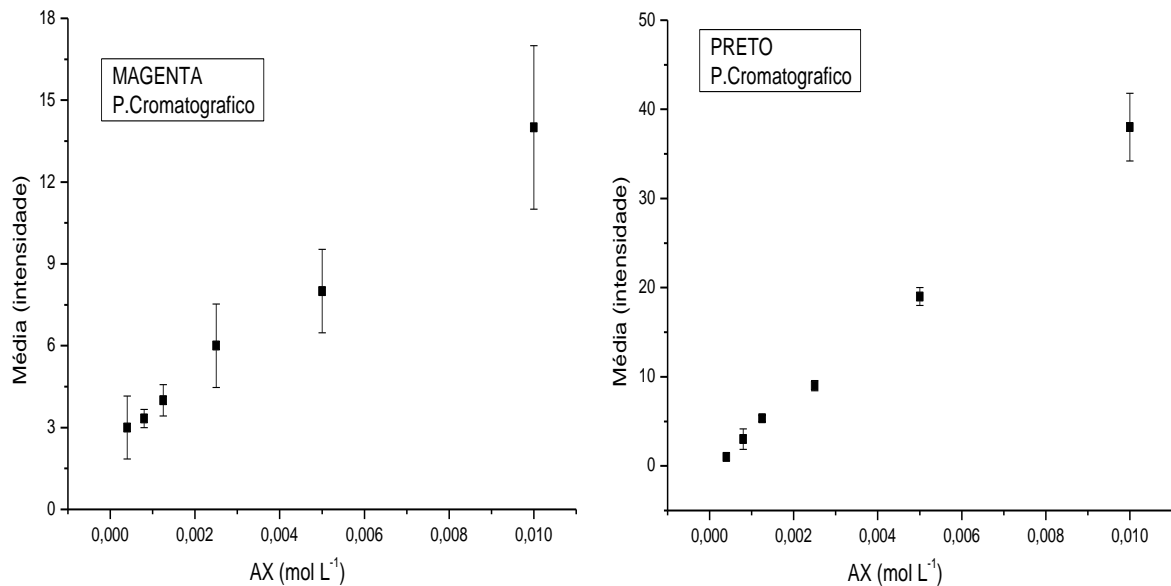
Nessas condições o dispositivo apresentou uma boa repetibilidade e linearidade com a variação do AX. De acordo com a Figura 25 e Tabela 6 (Página 64), observa-se diferentes valores de limite de detecção, limite de quantificação e coeficiente de correlação linear para as cores analisadas, sendo a cor CIANO a que melhor representou o dispositivo, pois apresentou os valores de LD, LQ e r de $2,04 \times 10^{-4} \text{M}$, $4,49 \times 10^{-4} \text{M}$ e 0,999, respectivamente. Entretanto, entre as cores analisadas, os piores valores de LD, LQ e r foram observados para cor MAGENTA, indicando que a mesma não representa uma boa escolha para a determinação do analito.

5.5.3 Utilização do papel cromatográfico vs. Concentração de AX

A Figura 26 mostra os resultados referentes à formação do complexo no papel cromatográfico. De posse desses resultados foi possível observar o comportamento linear para as diferentes cores.

Figura 26. Estudo da variação da concentração de AX, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para o papel cromatográfico, Fe^{2+} ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).





Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

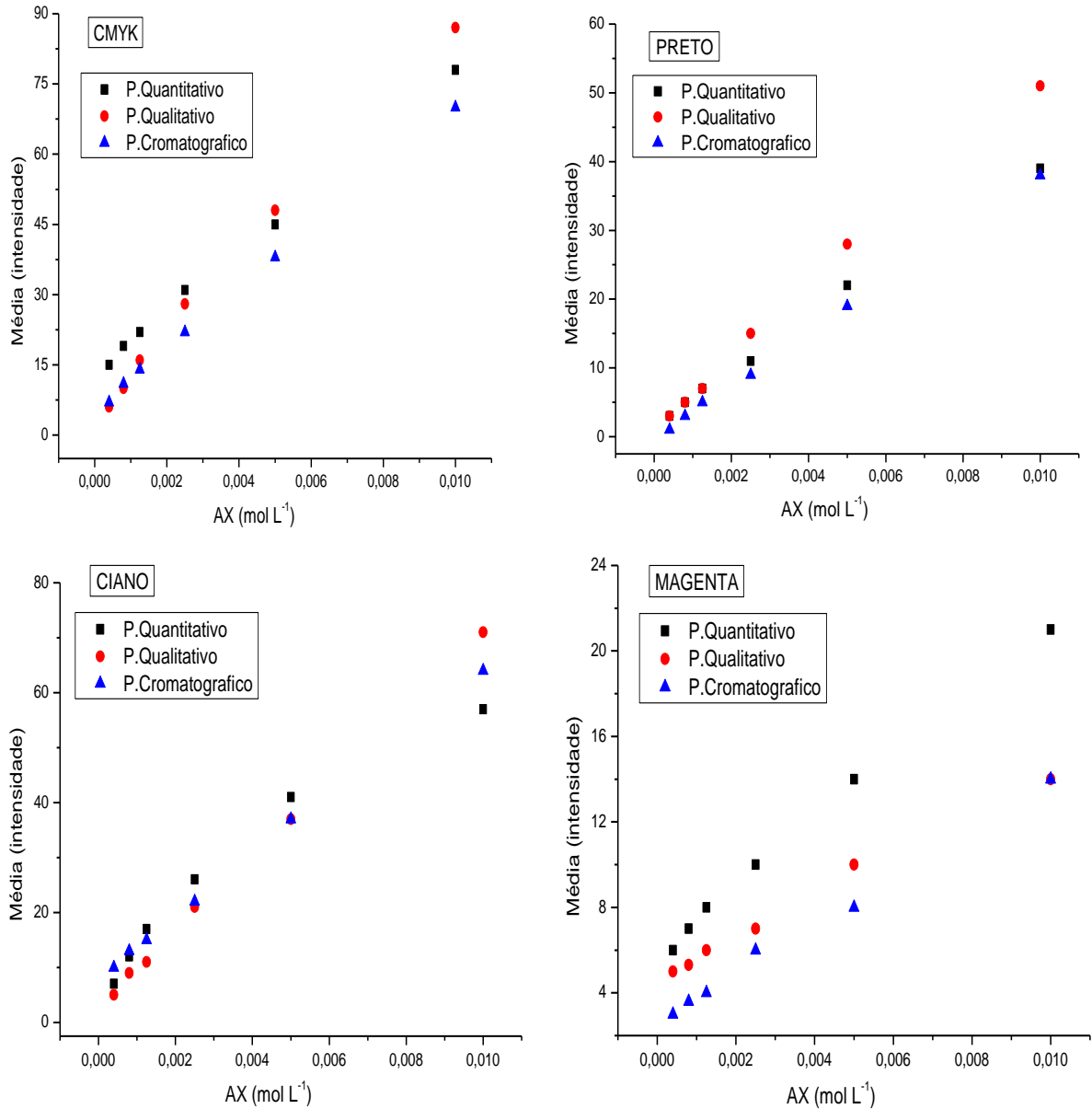
De acordo com a Figura 26, percebe-se que as cores CMYK e PRETO apresentaram os melhores desvio padrão e conseqüentemente uma melhor repetibilidade, diferentemente da cor MAGENTA que apresentou o pior desvio padrão entre as cores analisadas.

Com relação aos valores de LD e LQ (Tabela 6, Página 64) percebe-se que a cor CIANO apresentou a melhor resposta, $2,90 \times 10^{-4} \text{M}$ e $9,58 \times 10^{-4} \text{M}$, respectivamente, quando se empregou o papel cromatográfico como dispositivo.

5.6 Comparação dos três dispositivos vs. Concentração de AX

Os estudos a seguir (Figura 27), mostram a comparação entre os três sensores de papel nas diferentes cores variando a concentração de AX, onde percebe-se dessa forma, a determinação das figuras de mérito a partir do comportamento linear.

Figura 27. Estudo da variação da concentração de AX, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, para os papéis quantitativo, qualitativo e cromatográfico, Fe^{2+} ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

A Tabela 6 apresenta os resultados referentes aos limites de detecção, quantificação e o coeficiente de correlação linear, obtidos a partir da Figura 27, utilizando os três tipos de papéis, por meio das diferentes cores. Esses resultados indicam qual dos papéis apresentou melhor resposta para o sistema proposto.

Tabela 6. Comparação dos três dispositivos vs. Concentração de AX.

Varição da [AX]	Papel Quantitativo	Papel Qualitativo	Papel Cromatográfico
CMYK			
LD	2,07x10 ⁻⁴ M	3,22x10 ⁻⁴ M	4,0x10 ⁻⁴ M
LQ	6,75x10 ⁻⁴ M	1,07x10 ⁻³ M	1,27x10 ⁻³ M
r	0,989	0,995	0,999
CIANO			
LD	3,05x10 ⁻⁴ M	2,04x10 ⁻⁴ M	2,90x10 ⁻⁴ M
LQ	1,01x10 ⁻³ M	4,49x10 ⁻⁴ M	9,58x10 ⁻⁴ M
r	0,919	0,999	0,999
MAGENTA			
LD	1,45x10 ⁻³ M	1,71x10 ⁻³ M	1,39x10 ⁻³ M
LQ	5,85x10 ⁻³ M	5,71x10 ⁻³ M	4,64x10 ⁻³ M
r	0,997	0,991	0,986
PRETO			
LD	3,55x10 ⁻⁴ M	2,97x10 ⁻⁴ M	3,46x10 ⁻⁴ M
LQ	1,18x10 ⁻³ M	9,94x10 ⁻⁴ M	1,15x10 ⁻³ M
r	0,995	0,996	0,999

Fonte: Autor desta dissertação, 2012

Os resultados obtidos a partir da Figura 27 e Tabela 6 indicaram que os melhores valores de LD e LQ, quando se empregou o papel quantitativo, foi para a cor CMYK. Já ao se utilizar o papel qualitativo as melhores respostas de LD e LQ foram para as cores CIANO e PRETO. No entanto, para o papel cromatográfico a cor MAGENTA apresentou a melhor resposta de LD e LQ. Dessa forma, a escolha do papel está diretamente relacionada com os valores de LD, LQ e r, que são influenciados pela cor, para a determinação do analito.

5.7 Estudo da Estabilidade dos Sensores

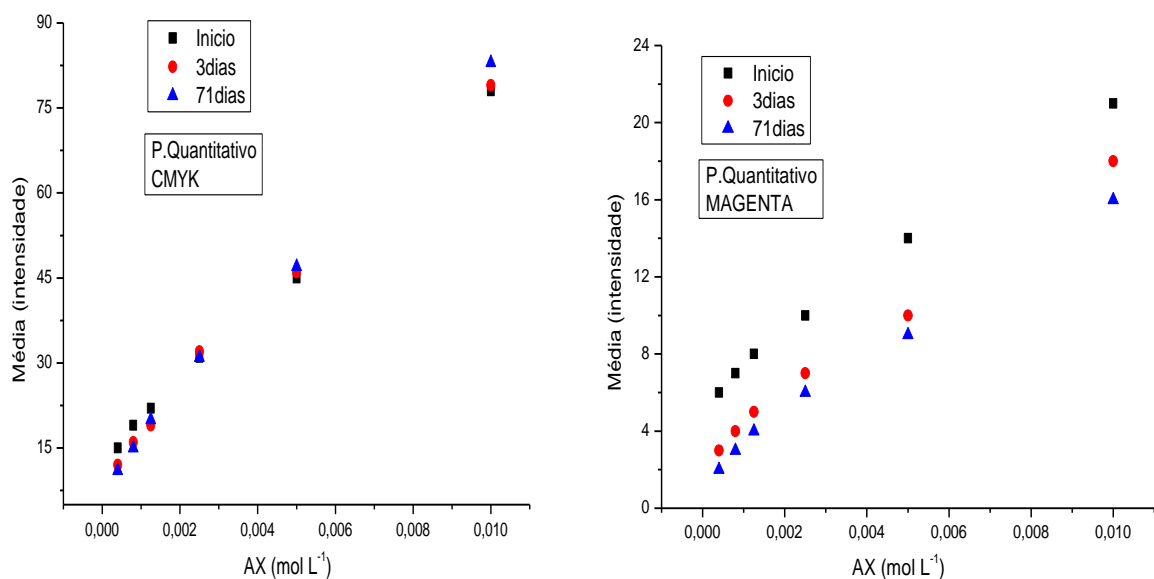
5.7.1 Comparação entre os dias de análise

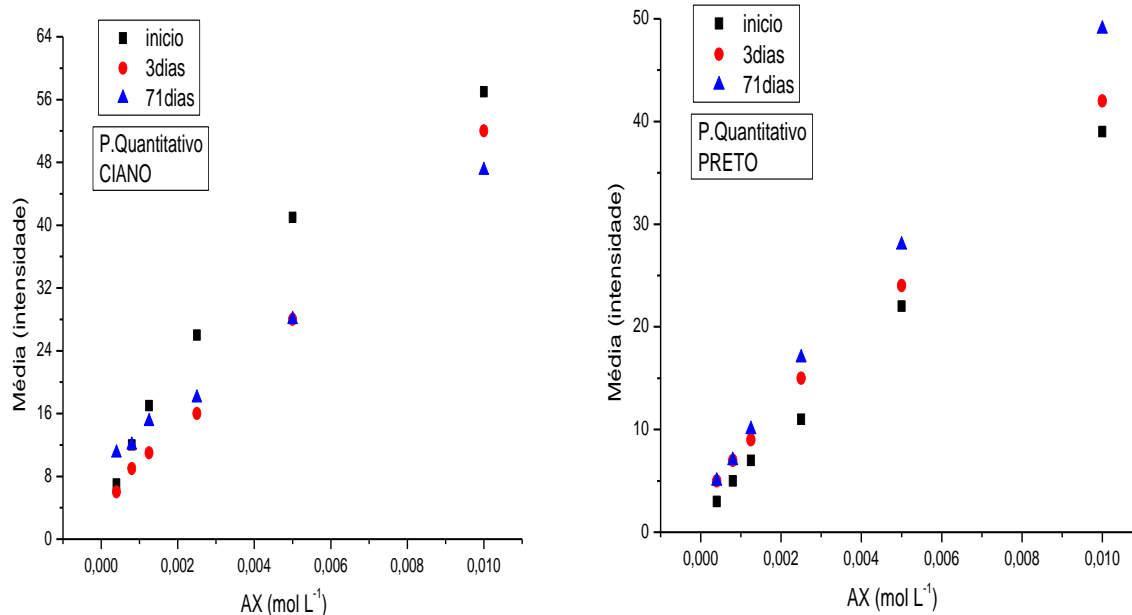
Com o objetivo de avaliar a influência do tempo de análise na determinação do AX em função da variação da coloração do complexo, os dispositivos foram analisados em um período máximo de 71 dias. As análises foram feitas no início, após 3 e 71 dias da formação do complexo, com isso pôde-se verificar a estabilidade dos sensores propostos.

5.7.2 Papel Quantitativo

A Figura 28 mostra a comparação entre os resultados em diferentes dias, variando a concentração de AX. Os resultados obtidos indicam que para as cores CMYK e PRETO houve um aumento na resposta do sistema após um período de 71 dias. Contudo, para as cores CIANO e MAGENTA as melhores respostas foram para as análises feitas no mesmo dia em que o complexo foi formado. Estes resultados mostram claramente que a estabilidade do sistema está relacionada com a cor utilizada como ferramenta de detecção.

Figura 28. Estudo da estabilidade do sensor, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, utilizando papel quantitativo, Fe^{2+} ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), no início, após 3 e 71 dias da formação do complexo.



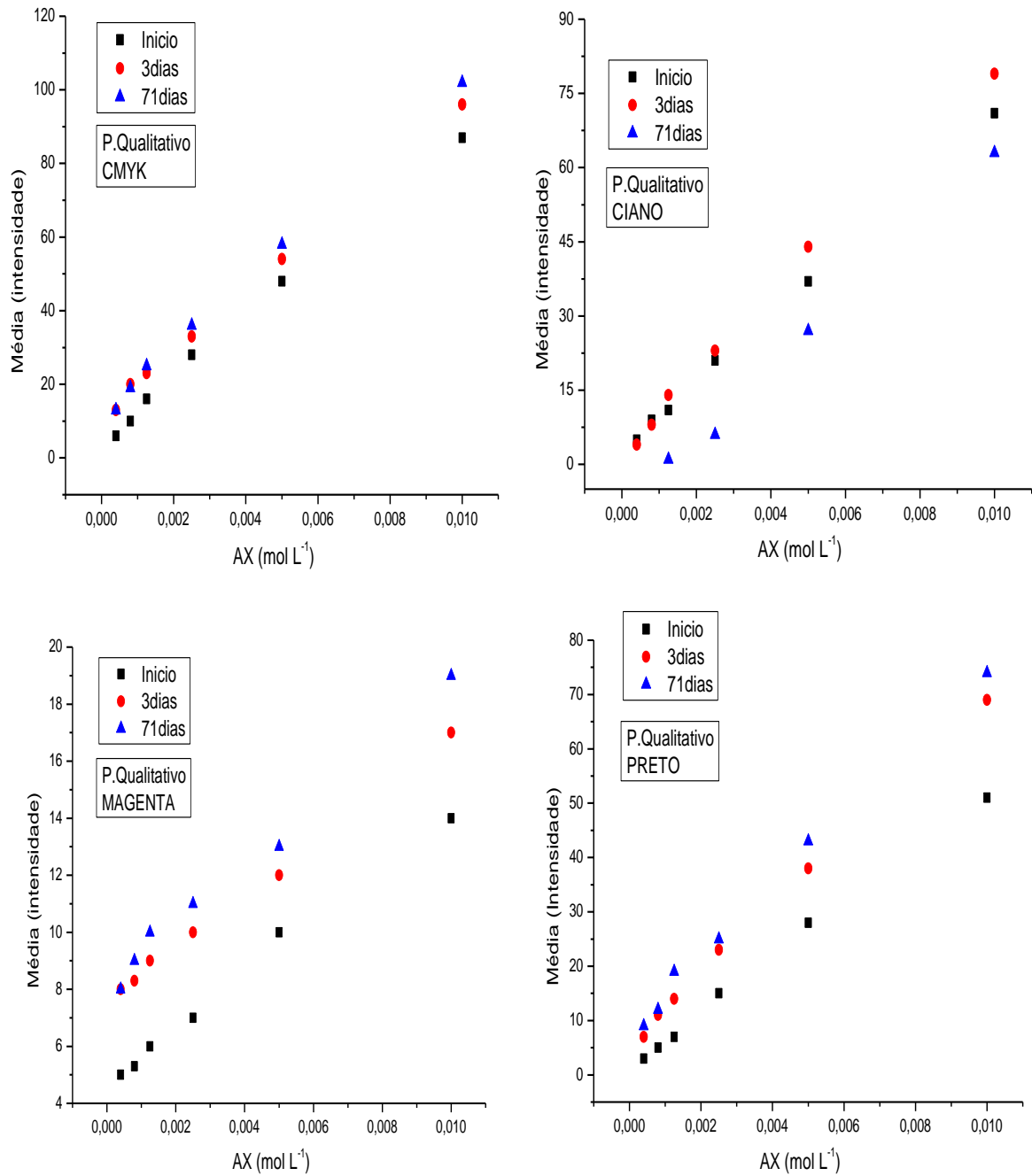


Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5.7.3 Papel qualitativo

A Figura 29 mostra a influência do tempo de análise na determinação dos resultados em diferentes dias, onde foi feita variações da concentração do ácido xanturênico. Os resultados obtidos indicam que para as cores CMYK, MAGENTA e PRETO houve um ganho de resposta do sistema após 71 dias, apresentando uma maior estabilidade nesse período de tempo. Entretanto, para a cor CIANO a melhor resposta foi obtida para a análise feita após três dias em que o complexo foi formado, pois em 71 dias a menor concentração ($4,0 \times 10^{-4}$ M) não pôde ser analisada. Desta forma a utilização dessa cor fica limitada a análises em concentrações menores que $8,0 \times 10^{-4}$ M. Logo, estes resultados mostram claramente que a estabilidade do sistema está relacionada com a cor utilizada como forma para a detecção do analito.

Figura 29. Estudo da estabilidade do sensor, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, utilizando papel qualitativo, Fe^{2+} ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), no início, após 3 e 71 dias da formação do complexo.

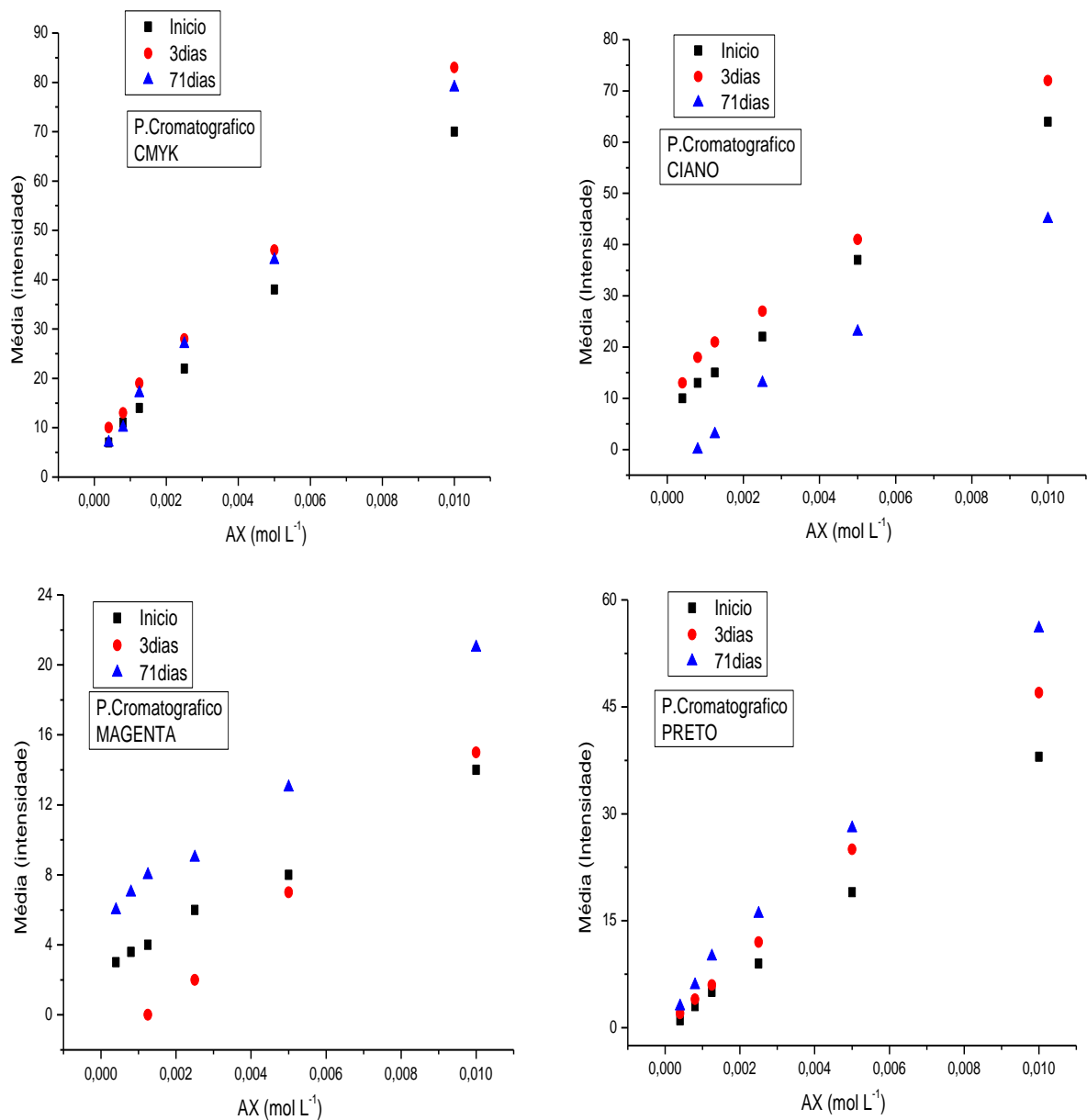


Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5.7.4 Papel Cromatográfico

A Figura 30 mostra a comparação entre os três resultados em diferentes dias, variando a concentração de AX, a fim de verificar a estabilidade do sensor.

Figura 30. Estudo da estabilidade do sensor, por meio das cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO, utilizando papel cromatográfico, Fe^{2+} ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e AX ($1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), no início, após 3 e 71 dias da formação do complexo.



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

De acordo com a Figura 30, pode-se observar que os resultados obtidos a partir das cores CMYK e CIANO, mostraram uma melhor resposta, média da intensidade da cor, após 3 dias de análise. Contudo, para o CIANO, após 71 dias houve perda da resposta do sensor e as concentrações $4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ e $8,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ não pôde ser detectada. Já para as cores MAGENTA e PRETO os melhores resultados foram obtidos após 71 dias do complexo formado. Logo, estes resultados mostram que a intensidade da cor é influenciada pelo período de análise, para a detecção do analito.

5.7.5 Estudo da Comparação dos Sensores em Diferentes Dias

A Tabela 7 mostra os valores de LD, LQ e r dos três dispositivos estudados, em função do tempo de análise, para as cores CMYK, CIANO, MAGENTA e PRETO.

Tabela 7. Estudo da comparação dos sensores no início, 3 e 71 dias após a formação do complexo.

Varição de [AX]	Papel Quantitativo	Papel Qualitativo	Papel Cromatográfico	
CMYK				
LD	Início	$2,07 \times 10^{-4} \text{ M}$	$3,22 \times 10^{-4} \text{ M}$	$4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$
	3 dias	$2,35 \times 10^{-4} \text{ M}$	$3,21 \times 10^{-4} \text{ M}$	$2,15 \times 10^{-4} \text{ M}$
	71 dias	$2,82 \times 10^{-4} \text{ M}$	$1,79 \times 10^{-4} \text{ M}$	$2,08 \times 10^{-4} \text{ M}$
LQ	Início	$6,75 \times 10^{-4} \text{ M}$	$1,07 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,27 \times 10^{-3} \text{ M}$
	3 dias	$7,84 \times 10^{-4} \text{ M}$	$1,07 \times 10^{-3} \text{ M}$	$7,17 \times 10^{-4} \text{ M}$
	71 dias	$9,40 \times 10^{-4} \text{ M}$	$5,98 \times 10^{-4} \text{ M}$	$6,95 \times 10^{-4} \text{ M}$
r	Início	0,989	0,995	0,999
	3 dias	0,999	0,990	0,997
	71 dias	0,998	0,997	0,970
CIANO				
LD	Início	$3,05 \times 10^{-4} \text{ M}$	$2,04 \times 10^{-4} \text{ M}$	$2,90 \times 10^{-4} \text{ M}$
	3 dias	$3,42 \times 10^{-4} \text{ M}$	$3,51 \times 10^{-4} \text{ M}$	$3,56 \times 10^{-4} \text{ M}$
	71 dias	$3,58 \times 10^{-4} \text{ M}$	$3,54 \times 10^{-4} \text{ M}$	$3,39 \times 10^{-4} \text{ M}$
LQ	Início	$1,01 \times 10^{-3} \text{ M}$	$4,49 \times 10^{-4} \text{ M}$	$9,58 \times 10^{-4} \text{ M}$
	3 dias	$7,26 \times 10^{-4} \text{ M}$	$1,17 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,18 \times 10^{-3} \text{ M}$
	71 dias	$1,59 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,18 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,13 \times 10^{-3} \text{ M}$
r	Início	0,919	0,999	0,999
	3 dias	0,999	0,997	0,997
	71 dias	0,983	0,999	0,992

MAGENTA				
LD	Início	1,45x10 ⁻³ M	1,71x10 ⁻³ M	1,39x10 ⁻³ M
	3 dias	1,06x10 ⁻³ M	1,76x10 ⁻³ M	1,20x10 ⁻³ M
	71 dias	9,21x10 ⁻⁴ M	1,25x10 ⁻³ M	8,45x10 ⁻⁴ M
LQ	Início	5,85x10 ⁻³ M	5,71x10 ⁻³ M	4,64x10 ⁻³ M
	3 dias	3,56x10 ⁻³ M	5,89x10 ⁻³ M	4,02x10 ⁻³ M
	71 dias	3,07x10 ⁻³ M	4,16x10 ⁻³ M	2,82x10 ⁻³ M
r	Início	0,997	0,991	0,986
	3 dias	0,994	0,994	0,994
	71 dias	0,989	0,980	0,996
PRETO				
LD	Início	3,55x10 ⁻⁴ M	2,97x10 ⁻⁴ M	3,46x10 ⁻⁴ M
	3 dias	3,34x10 ⁻⁴ M	2,06x10 ⁻⁴ M	2,74x10 ⁻⁴ M
	71 dias	3,41x10 ⁻⁴ M	1,98x10 ⁻⁴ M	2,44x10 ⁻⁴ M
LQ	Início	1,18x10 ⁻³ M	9,94x10 ⁻⁴ M	1,15x10 ⁻³ M
	3 dias	1,11x10 ⁻³ M	6,88x10 ⁻⁴ M	9,14x10 ⁻⁴ M
	71 dias	1,14x10 ⁻³ M	6,62x10 ⁻⁴ M	8,12x10 ⁻⁴ M
r	Início	0,995	0,996	0,999
	3 dias	0,996	0,997	0,998
	71 dias	0,990	0,993	0,997

Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

De acordo com a Tabela 7 percebe-se diferentes valores de LD, LQ e r nos dias de análise para as mesmas cores. Pode-se observar que no início da formação do complexo, o melhor valor de LD e LQ obtido foi de 2,04x10⁻⁴M e 4,49x10⁻⁴M, respectivamente, para o papel qualitativo na cor CIANO e o coeficiente de correlação linear apresentou melhor resultado (0,999) para os papéis qualitativo e cromatográfico nas cores CMYK, CIANO e PRETO. Após 3 dias de formação do complexo o melhor valor de LD e LQ obtido foi de 2,06x10⁻⁴M e 6,88x10⁻⁴M, respectivamente, utilizando o papel qualitativo na cor PRETO, e o melhor valor de r foi observado para CMYK e CIANO para o papel quantitativo. Após 71 dias de formação do complexo o melhor valor de LD e LQ foi de 1,79x10⁻⁴M e 5,98x10⁻⁴M, respectivamente, utilizando papel qualitativo na cor CMYK, contudo, o papel qualitativo na cor CIANO obteve o melhor valor de r.

5.8 Estudo Espectroscópico das amostras de sangue

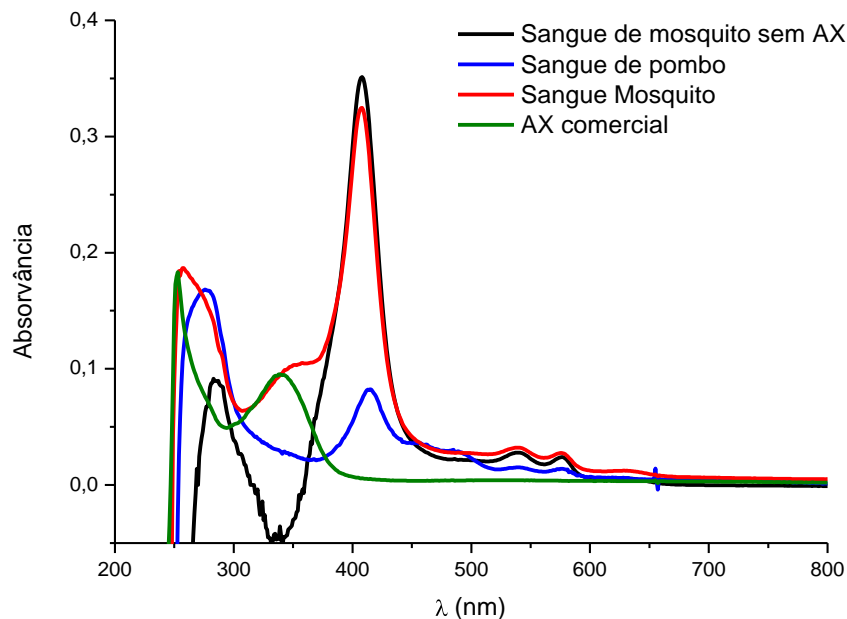
Antes de realizar o estudo com sangue, foi necessário realizar a análise com AX comercial (—).

Com o intuito de verificar a presença de ácido xanturênico nas amostras de sangue (Figura 31), foi realizado o estudo com o sangue proveniente da cavidade intestinal do mosquito (—), podendo ser observada a presença de dois sinais característicos do AX, em 250 e 350 nm, indicando que os sinais presente na amostra de sangue também se encontram no AX.

Utilizando AX como branco (—), notou-se que os sinais referentes ao AX haviam desaparecido, indicando desta forma que o sangue do mosquito *Aedes aegypti* possui o ácido xanturênico. Dessa mesma forma, o sangue do pombo também foi analisado (—), e a ausência das bandas em 250 e 350 nm pôde comprovar que essa amostra não apresenta AX.

A Figura 31 amostra que tanto o sangue proveniente da cavidade intestinal do mosquito quanto o sangue do pombo apresentaram sinais em 275, 410, 538 e 575 nm. De acordo com a literatura, o sinal em 400 nm se deve a banda Soret, e as outras bandas em 275, 538 e 575 são atribuídas aos intermediários da hemoglobina. (GU, 2001; KESZLER, 2006; MOREIRA, 2006; WANG, 2007, 2009).

Figura 31. Estudos espectroscópicos das amostras de sangue e do AX.



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5.9 Teste de recuperação

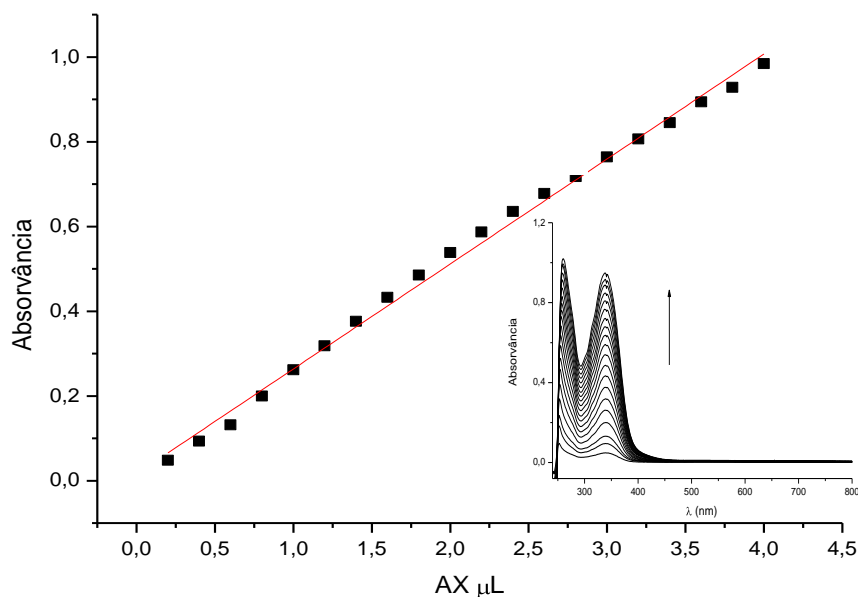
O teste de recuperação foi feito enriquecendo a amostra de sangue com uma quantidade conhecida do padrão de AX.

Com o intuito de verificar se a amostra de sangue possui alguma substância que possa reagir com o AX, foi necessário a realização dessa análise. A Figura 32 mostra a curva referente ao aumento da concentração do AX indicando um comportamento linear.

Na Figura 33, observa-se o aumento da concentração de AX quando foi utilizado sangue do mosquito como branco, evidenciando que não há interferência significativa da matriz na amostra no procedimento realizado. Os resultados revelaram comportamentos similares nas duas análises.

A Figura 32 exibe um comportamento linear, obtidas por meio da adição de AX, com $r = 0,995$.

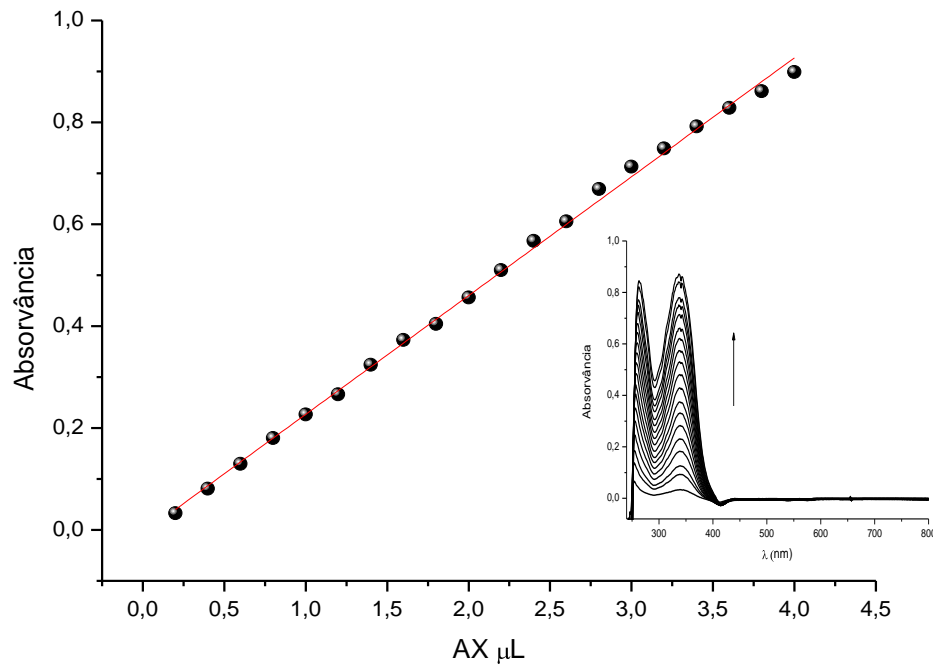
Figura 32. Curva analítica para adições de AX ($3,0 \times 10^{-2}$ M) em 340nm; branco tampão fosfato pH 7,5 com EDTA.



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Na Figura 33, mostra a curva analítica, obtida por meio da adição de AX com um comportamento linear com $r = 0,998$.

Figura 33. Curva analítica para adições de AX ($3,0 \times 10^{-2}$ M) em 340nm; Branco: Sangue de da cavidade intestinal do mosquito.



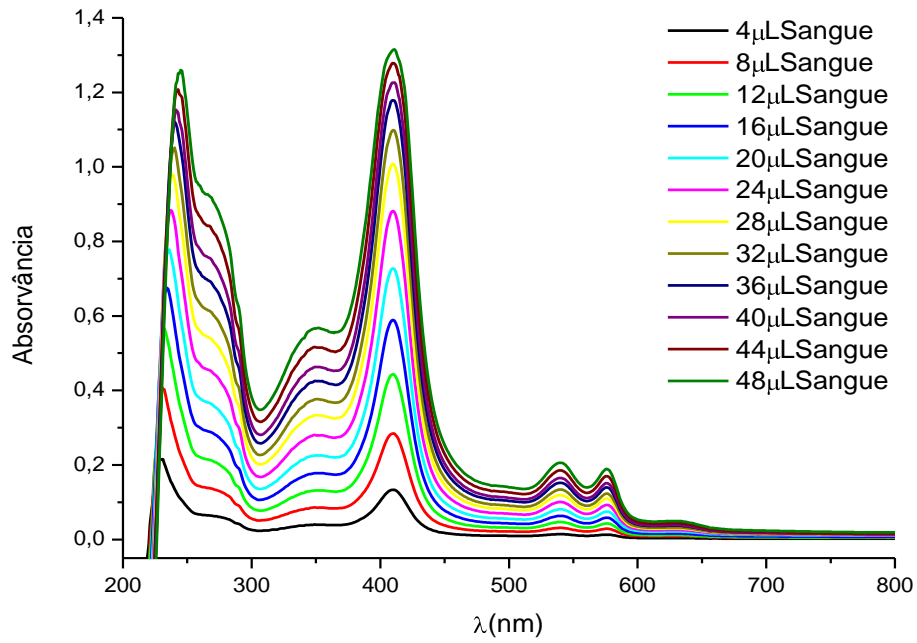
Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5.10 Análise da amostra de sangue do mosquito *Aedes aegypti*

Na Figura 34, observa-se o aumento da absorvância das bandas presente na amostra de sangue proveniente da cavidade intestinal do mosquito *Aedes aegypti* com o aumento da concentração.

A partir dessa análise foi possível obter a concentração do ácido xanturênico presente em cada intestino do mosquito. Os valores encontrados indicaram que a concentração de AX foi 0,47nmol/intestino.

Figura 34. Análise de amostra de sangue proveniente do intestino do mosquito *Aedes aegypti*. Branco: Solução EDTA e tampão fosfato pH 7,5.



Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

6 CONCLUSÕES

Por meio da análise termogravimétrica e da espectrofotometria no UV-Vis, pôde-se observar a formação do complexo. A estequiometria do complexo formado entre AX:Fe²⁺ foi confirmada por meio da espectrofotometria no UV-Vis, obtendo-se uma relação de 2:1 mols de AX e Fe²⁺.

Nas análises pôde-se observar que o tipo de papel utilizado para a fabricação do sensor químico influencia na determinação do AX, com variações na média da intensidade das cores analisadas para os três papéis.

A análise de estabilidade do sensor de papel, por meio da variação da concentração do AX, foi realizada em um período total de 71 dias, onde foi observado que para algumas cores não houve perda de resposta para o sensor proposto nesse período de tempo. Diante dos resultados apresentados o melhor valor de LD foi de $1,79 \times 10^{-4} \text{M}$ para o papel qualitativo utilizando a cor CMYK após 71 dias da formação do complexo, enquanto que o melhor valor de LQ foi de $4,49 \times 10^{-4} \text{M}$ para o papel qualitativo na cor CIANO, após 3 dias da formação do complexo.

A espectrofotometria no UV-Vis também foi uma excelente ferramenta para verificar a concentração do AX presente no sangue proveniente do intestino do mosquito *Aedes aegypti*. Os valores encontrados indicaram que a concentração de AX foi 0,47nmol/intestino.

A análise de interferente para o AX utilizando amostra de sangue do intestino do mosquito indicou a ausência de interferentes. Contudo, a utilização do sensor químico em plataforma de papel para a determinação do AX em amostra de sangue do mosquito não pôde ser analisada.

7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- I- Caracterizar o complexo por IV.
- II- Estudar o comportamento do sensor no intervalo de cinco dias.
- III- Estudar a modificação do papel na determinação do AX presente no sangue do mosquito *Aedes aegypti*.
- IV- Analisar o desenvolvimento de várias zonas de detecção na fabricação do dispositivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D.; Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper. **Anal. Chem.**v. 80, p. 6928 – 6934, 2008.

ARAI, M.; BILLKER, O.; MORRIS, H. R.; PANICO, M.; DELCROIX, M.; DIXON, D.; LEY, S. V.; SINDEN, R. E.; Both mosquito-derived xanthurenic acid and a host blood-derived factor regulate gametogenesis of *Plasmodium* in the midgut of the mosquito. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v.116, p.17 – 24, 2001.

ARAÚJO, C. L.; **Desenvolvimento de sensor amperométrico baseados em eletrodo carbono grafite para a determinação de ácido cítrico em bebidas**. 2009. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

BHATTCHARYYA, M. K.; KUMAR, N.; Effect of xanthurenic acid on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles stephensi*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1129-1133, 2001.

BRUZEWICZ, D. A.; RECHES, M.; and Whitesides George, M. Low-Cost Printing of Poly(dimethylsiloxane) Barriers To Define Microchannels in Paper. **Anal. Chem.**, v. 80, p. 3387-3392, 2008.

CAPELETTI, L. B.; **Efeitos da Rota Sol-Gel no Encapsulamento de Indicadores Colorimétricos e Fluorimétricos e em suas performances com sensores de pH e gás amônia**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CLECHET, P.; Membranes for Chemical Sensors. **Sensors and Actuators B**, v. 4, p. 53 - 63, 1991.

COFFEY, L. L.; MERTENS, E.; BREHIN, A. C.; GARCIA, M. D. F.; AMARA, A.; DESPRE'S, P.; SAKUNTABHAI, A.; Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 143 –156, 2009.

DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S.; Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. **Anal. Chem.**, v. 81, p. 5821– 5826, 2009.

DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S.; Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, p. 227–233, 2010.

ELLERBEE, A. K.; PHILLIPS, S. T.; SIEGEL, A. C.; MIRICA, K. A.; MARTINEZ, A. W.; STRIEHL, P.; JAIN, N.; PRENTISS, M.; WHITESIDES, G. M.; Quantifying Colorimetric Assays in Paper-Based Microfluidic Devices by Measuring the Transmission of Light through Paper. **Anal. Chem.**, v. 81, p. 8447– 8452, 2009.

FERGUS, J. W.; The application of solid fluoride electrolytes in chemical sensors. **Sensors and Actuators B**, v. 42, p. 119 – 130, 1997.

GUZMÁN, M. G.; KOUR, G.; Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 69 – 80, 2004.

HAN, Q.; BEERNTSEN, B. T.; LI, J.; The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 254 – 263, 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Metodologia das Estimativas da População Residente nos Municípios Brasileiros para 1º de julho de 2011.**

Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2011/metodologia_08112011.pdf>.

Acessado em: 21/06/2012.

União Internacional de Química Pura e Aplicada. 1997. **Compendium of Analytical Nomenclature-Definitive Rules 1997, 3rd Edition. Chapter 7, Section 4.**

Disponível em:

<http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/Cha07sec4.pdf>

Acessado em: 21/06/2012.

JOHNSON, R. D.; GAVALAS, V. G.; DAUNERT, S.; BACHAS, L. G.; Microfluidic ion-sensing devices. **Analytica Chimica Acta**. v. 613, p. 20 – 30, 2008.

KARLOS, W.; COLTRO, T.; DE JESUS, D. P.; DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L.; CARRILHO, E.; Review: Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. **Electrophoresis**. v. 31, p. 2487–2498, 2010.

LEGIN, A.; SMIRNOVA, A.; RUDNITSKAYA, A.; LVOVA, L.; SUGLOBOVA, E.; VLASOV, Y.; Chemical sensor array for multicomponent analysis of biological liquids. **Analytica Chimica Acta**. v. 385, p. 131-135, 1999.

LI, X.; TIAN, J.; GARNIER, G.; SHEN, W.; Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 76, p. 564 – 570, 2010.

LI, X.; TIAN, J.; NGUYEN, T.; SHEN, W.; Paper-Based Microfluidic Devices by Plasma Treatment. **Anal. Chem.**, v. 80, p. 9131–9134, 2008.

LIMA, V. L. A.; **Ácido Xanturênico: um antioxidante de baixo peso molecular no intestino médio do mosquito *Aedes aegypti***. 2007. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

LIU, C. C.; Review: Development of chemical sensors using microfabrication and micromachining techniques. **Materials Chemistry and Physics**, v. 42, p. 87 – 90, 1995.

MALINA, H. Z.; FRUEH, B. E.; Abnormal signalling of 14-3-3 proteins in cells with accumulated xanthurenic acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, p. 646 – 650, 2003.

MALINA, H. Z.; Xanthurenic Acid Provokes Formation of Unfolded Proteins in Endoplasmic Reticulum of the Lens Epithelial Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, p. 600 – 605, 1999.

PORTAL DA SAÚDE. **índice de Mortalidade por Dengue**. Disponível em: <http://189.28.128.59/portalsaude/arquivos/ap_balnco_dengue.pdf>
Acessado em: 01/06/2012.

SITE DA DENGUE. **Ciclo Biológico do Mosquito**. Disponível em:
<http://www.dengue.org.br/mosquito_aedes.html>
Acessado em: 01/06/2012.

MARLE, L.; GREENWAY, G. M.; Microfluidic devices for environmental monitoring. **Analytical Chemistry**, v. 24, No. 9, 2005.

MARTINELLI, E.; PENNAZZA, G.; DI NATELE, C.; D'AMICO, A.; Chemical sensors clustering with the dynamic moments approach. **Sensors and Actuators B**, v. 101, p. 346 – 352, 2004.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; BUTTE, M. J.; GEORGE M; Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. **Communications Bioassays**, v. 46, p. 1318 – 1320, 2007.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S. W.; SINDI, H.; GEORGE, M.; Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. **Anal. Chem.**, v. 80, p. 3699 – 3707, 2008.

MURAKAMI, K.; HANEDA, M.; YOSHINO, M.; Prooxidant action of xanthurenic acid and quinoline compounds: role of transition metals in the generation of reactive oxygen species and enhanced formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. **BioMetals**, v. 19, p. 429 – 435, 2006.

PELTON, R.; Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, No 8, p. 925 – 942, 2009.

PHILLIPS, C.; FEDOROV, A. G.; Multicomponent mass transfer in polymer-coated chemical sensors. **Sensors and Actuators B**, v. 99, p. 273 – 280, 2004.

POGHOSSIAN, A.; BERNDSEN, L.; SCHÖNING, M. J.; Chemical sensor as physical sensor: ISFET-based flow-velocity, flow-direction and diffusion-coefficient sensor. **Sensors and Actuators B**, v. 95, p. 384 - 390, 2003.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G.; Estratégias para aumento de Sensibilidade em Espectrofotometria Uv-vis. **Quim. Nova**, v. 27, No 5, p. 807 – 812, 2004.

SAMPAIO, A. M. M.; KLIGERMAN, D. C.; JÚNIOR, S. F.; Dengue, related to rubble and building construction in Brazil. **Waste Management**, v.29, p. 2867– 2873, 2009.

SEITER, J. C.; DEGRANDPRE, M. D.; Redundant chemical sensors for calibration-impossible applications. **Talanta**, v. 54, p. 99 – 106, 2001.

SELEEM, H. S.; EL-INANY, G. A.; MOUSA, M.; HANAFY, F. I.; Spectroscopic studies on 2-[2-(4-methylquinolin-2-yl)hydrazono]-1,2-diphenylethanone molecule and its metal complexes. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 74, p. 869 – 874, 2009.

SHEN, L.; JI, H.F.; Theoretical exploration of the photosensitive properties of xanthurenic acid, a tryptophan metabolite in cataractous human lenses. **Dyes and Pigments**, v. 76, p. 646 – 649, 2008.

SILVA, F. A. S.; LOPES, C. B.; COSTA, E. O.; LIMA, P. R.; KUBOTA, L. T.; GOULART, M. O. F.; Poly-xanthurenic acid as an efficient mediator for the electrocatalytic oxidation of NADH. **Electrochemistry Communications**, v. 12, p. 450 – 454, 2010.

TESS, M.E.; COX, J. A.; Chemical and biochemical sensors based on advances in materials chemistry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 55 – 68, 1999.

THÉVENOT, D.R. *et al.*; Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 121 - 131, 2001.

WANG, K.; YANG, X.; YANG, R.; Optical chemical sensors based on supramolecular chemistry. **Sensors and Actuators B**, v. 66, p. 263 – 265, 2000.