

# UFAL

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

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO HÍBRIDO PDMS/VIDRO  
PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE GLIFOSATO**

**José Guimarães Ferreira de Lima Júnior**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
Campus A. C. Simões  
Tabuleiro dos Martins  
57072-970 - Maceió - AL

**JOSÉ GUIMARÃES FERREIRA DE LIMA JÚNIOR**

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO HÍBRIDO  
PDMS/VIDRO PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE GLIFOSATO**

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

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos

Maceió-AL  
2018

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

L732 Lima Júnior, José Guimarães Ferreira de.

Desenvolvimento de dispositivo microfluídico PDMS/vidro para a detecção eletroquímica de glifosato / José Guimarães Ferreira de Lima Júnior. - 2019. 105 f. : il.

Orientador: Diógenes Meneses dos Santos.  
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 99-105.

1. Microsistemas de análise total (Química analítica). 2. Glifosato (Herbicida). 3. Cobre - Eletrodos. 4. Amperometria. I. Título.

CDU: 543



# PPGQB

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/Fax: (82) 3214-1144  
email: ppgqb.ufal@gmail.com


## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **JOSÉ GUIMARÃES FERREIRA DE LIMA JÚNIOR**, intitulada: “**Desenvolvimento de Dispositivo Microfluídico Híbrido PDMS/Vidro para a Detecção Eletroquímica de Glifosato**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 16 de fevereiro de 2019, às 9h, no auditório do severinão do IQB/UFAL.

## COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos  
(PPGQB/UFAL) – Orientador

  
Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Bruno Gabriel Lucca  
(IQ/UFMS)

*Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu país*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família por todo apoio e incentivo em tudo o que faço.

Agradeço, em especial, a minha mãe e meu pai, aos quais sou eternamente grato por todos os ensinamentos e por me moldarem como ser humano.

Agradeço aos meus irmãos Pedro e Lara pelo companheirismo.

Agradeço aos amigos do laboratório, Sara, Ângladis, Leyllanne, Elvis, João Victor, Ivis, Allysson, João César, Emanuella, Samaysa e Renata por todos os momentos vividos e por todas as conversas científicas.

Agradeço a todos os meus professores, sem exceção. Todos, de uma forma ou de outra contribuíram para o que eu sou hoje.

Agradeço aos meus companheiros de pós-graduação e UFAL, Wood, Elysson, Jorge, Pato, Fátima, Amanda, Carol e Raphael.

Agradeço também ao meu orientador Prof. Dr. Diógenes Meneses e a Profa. Dra. Fabiane Caxico por todo o direcionamento no projeto, o apoio e auxílio prestado. Sou muito grato pela oportunidade pessoal e profissional de aprender e crescer como nunca pude imaginar.

Aos órgãos de fomentos CAPES, CNPq, FAPEAL e a instituição UFAL, pelo auxílio financeiro e o espaço físico que viabilizaram a realização deste projeto.

*E essa história de ir sem pressa ainda leva a gente além*

*Só não esquece do olhar de criança*

*Não esquece de lembrar da lembrança*

*Não esquece de ser duro e forte*

*Não esquece de olhar pra Marte*

*Não esquece de fazer tua arte*

*Não esquece de esquecer*

*O que tem que se esquecer*

Rubel – Pinguim

## RESUMO

Microssistemas de análise total ( $\mu$ TAS) possibilitam a integração de diversas etapas de uma análise química dentro de um único dispositivo. Esses sistemas apresentam vantagens como baixo consumo de amostra, portabilidade, integração com diferentes técnicas de detecção e análises relativamente rápidas. Neste sentido, este trabalho propõe o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico híbrido PDMS/Vidro para a detecção eletroquímica de glifosato em amostras ambientais. O dispositivo utilizado apresenta canal de separação de 5cm com braços laterais de 0,75cm, com alinhamento do tipo *off-channel* para o eletrodo de trabalho, com injeção da amostra do tipo *pinched* e adição de surfactante para a inversão do fluxo eletrosmótico. Três diferentes eletrodos de trabalho foram avaliados, sendo o eletrodo de cobre o mais eficiente. Utilizando voltametria cíclica, evidenciou-se que a detecção do glifosato pode ser realizada a partir da complexação do analito com íons Cu(II) gerados na superfície do eletrodo. De uma forma geral, o mecanismo eletroquímico associado ao processo envolve uma etapa eletroquímica reversível com a formação dos íons Cu(II) e uma etapa química irreversível que compreende na formação do complexo Cu(II)-glifosato. A detecção voltamétrica do glifosato utilizando tampão borato obteve resposta linear no intervalo de 30 – 100  $\mu$ M, com R= 0,998. No que tange a detecção amperométrica do analito, verificou-se que a amperometria convencional não é satisfatória e a amperometria de pulso apresentou resultados promissores. Além disso, a utilização desta técnica em microssistemas de análise para a determinação de glifosato configura-se como uma alternativa inédita na literatura.

**Palavras-chave:** Microssistemas de análise; glifosato; Eletrodo de cobre; detecção amperométrica.



## ABSTRACT

Micro Total Analysis Systems ( $\mu$ TAS) enable the integration of several steps of a chemical analysis within a single device. These systems have advantages such as low sample consumption, portability, integration with different detection techniques and relatively fast analysis. In this sense, this work proposes the development of a hybrid PDMS / Glass microfluidic device for the electrochemical detection of glyphosate in environmental samples. The device used has a 5cm separation channel with lateral arms of 0.75cm, with off-channel alignment for the working electrode, pinched sample injection and addition of surfactant to allow a reverse electroosmotic flow. Three different working electrodes were evaluated, with the copper electrode being the most efficient. Using cyclic voltammetry, it was shown that the detection of glyphosate can be performed from the complexation of the analyte with Cu (II) ions generated on the surface of the electrode. In general, the electrochemical mechanism associated to the process involves a reversible electrochemical step with the formation of Cu (II) ions and an irreversible chemical step that comprises the formation of the Cu (II) -glyphosate complex. Voltammetric detection of glyphosate using borate buffer obtained linear response in the range of 30 - 100  $\mu$ M, with  $R = 0.998$ . Regarding the amperometric detection of the analyte, it was verified that the conventional amperometry is not satisfactory and the pulse amperometry presented promising results. The use of this technique in Micro Total Analysis Systems is an alternative for glyphosate detection, which can help researches to solve problems and detect important species.

**Keywords:** Micro Total Analysis Systems; glyphosate; copper electrode; amperometric detection

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Correlação entre as tendências na química analítica moderna e os desenvolvimentos tecnológicos. ....  | 16 |
| Figura 2 - Relação do crescimento da área plantada no Brasil e do uso de agrotóxicos no período de 2005 até 2014. ....   | 19 |
| Figura 3 – A) Relação dos princípios ativos mais comercializados no Brasil no ano de 2014, com ênfase para o herbicida glifosato. B) Vendas do herbicida glifosato (em toneladas) entre os anos de 2009 e 2014. .... | 20 |
| Figura 4 – A) Estrutura do ácido aminometilfosfônico; B) Estrutura do glifosato. ....  | 22 |
| Figura 5 - Mecanismo de ação do glifosato na via do shikimato. ....  | 23 |
| Figura 6 - Equilíbrio ácido-base para o glifosato. ....  | 24 |
| Figura 7 - Resumo gráfico do trabalho de Li e colaboradores para a detecção de glifosato utilizando quantum dots de telureto de cádmio (CdTe). ....  | 28 |
| Figura 8 – Resumo gráfico do trabalho de Wang e colaboradores (2016) para a determinação de glifosato através de detecção espectrofotométrica. ....  | 30 |
| Figura 9 – Esquema de separação eletroforética com espécies de cargas e tamanhos diferentes. ....  | 36 |
| Figura 10 – Estrutura do PDMS, demonstrando sua unidade monomérica. ....   | 40 |
| Figura 11 – Avaliação da temperatura de um microchip com adição de líquido refrigerante para a diminuição do efeito Joule. ....  | 44 |
| Figura 12 – Resumo gráfico do trabalho de Peng e colaboradores para detecção via LIF de Cr(III) em amostras de água após derivatização online. ....  | 50 |
| Figura 13 – Resumo gráfico do trabalho de Zhai e colaboradores (2018) no desenvolvimento de sistema microfluídico para determinação da citotoxicidade celular proveniente do uso de Ag-NPs. ....                     | 51 |
| Figura 14 – Esquema do posicionamento de eletrodo de trabalho na configuração end-channel. ....  | 55 |
| Figura 15 – Resumo gráfico do procedimento de preparo do microchip híbrido. ....   | 61 |
| Figura 16 – Esquema do funcionamento do microchip com os respectivos eletrodos utilizados. ....  | 63 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 17 – Distribuição das espécies de glifosato em função do pH. Valores de pKa utilizados para a elaboração do gráfico: $pK_{a1} = 0,8$ ; $pK_{a2} = 2,16$ ; $pK_{a3} = 5,46$ ; $pK_{a4} = 10,14$ .   | 66 |
| Figura 18– Voltamograma cíclico de eletrodo de cobre na ausência (linha preta) e presença (linha vermelha) de 1 mM de glifosato. Condições experimentais: Tampão fosfato (pH 7,5; 0,1M). Velocidade de varredura: 100 mV s <sup>-1</sup> . Concentração de glifosato avaliada: 1mM. Eletrodo de referência: Ag/AgCl. Contra eletrodo: Fio de platina.   | 67 |
| Figura 19 – A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em NaOH (0,1 M, pH 13,0) na presença de glifosato 100 µM com diferentes velocidades de varredura; B) Variação da corrente de pico catódico e anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura evidenciando mecanismo do tipo E <sub>r</sub> C <sub>i</sub> ; C. Condições experimentais: Eletrodo de referência: Fio de prata. Contra eletrodo: Fio de platina. | 69 |
| Figura 20 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5) na presença de glifosato (0 – 5 mM).  | 70 |
| Figura 21 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em NaOH (0,1 M, pH 13,0) na presença de glifosato 1mM.  | 72 |
| Figura 22 - Resposta analítica obtida para a variação linear da corrente de pico catódico (ipc) em função da da concentração de glifosato. <i>Inset</i> : Voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em tampão Borato (0,1 M, pH 9,0) na presença de glifosato 30 – 100 µM. Condições experimentais: Eletrodo de referência: Ag/AgCl. Contra eletrodo: Fio de platina.   | 73 |
| Figura 23 – A) Espectros de absorção no UV-vis para Cu(II), glifosato e o complexo formado Cu((II)-glifosato B) Adições crescentes de glifosato (99 – 394 µM) em sistema contendo 50mM de Cu(II) C) Correlação linear entre glifosato e o sinal analítico obtido através das medições espectroscópicas utilizando UV-vis. Condições experimentais: Tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5.  | 74 |
| Figura 24 – Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de glifosato (1mM) em eletrodos de A) Platina; B) Ouro e C) Cobre.  | 77 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 25– Voltamogramas cíclicos de eletrodo de Cu(II) utilizando NaOH 0,1M como eletrólito suporte mantendo fixo o limite catódico (-0,8V) e alterando limites anódicos A) -0,3 V; B) -0,2V; C) -0,1V; D) +0,1V; E) +0,2V e F) +0,3V.....   | 80 |
| Figura 26 – Eletroferograma para a detecção de glifosato 1 mM utilizando amperometria. Condições experimentais: Potencial aplicado: -0,1V. Tempo de corrida: 400 segundos. $E_{inj} = -500$ V. $E_{sep} = -700$ V. Tempo de injeção: 10 segundos.....   | 82 |
| Figura 27 – Ampliação do reservatório de detecção do microchip representando o posicionamento <i>off-channel</i> .....  | 83 |
| Figura 28 – Amperograma obtido com a utilização da técnica de amperometria de pulso. Condições experimentais - Eletrólito: Tampão Borato 0,1 M, pH 11,0 com adição de CTAB 2mM. Eletrodo de trabalho: Fio de cobre. Eletrodo de referência: Fio de prata. Contra-eletrodo: Fio de platina. Concentração de glifosato utilizada: 1mM. Voltagens de injeção e separação: -500V e -700V, respectivamente. ....   | 85 |
| Figura 29– Voltamogramas hidrodinâmicos para avaliação da diferentes potenciais do eletrodo de trabalho (+0,3; +0,1; 0; -0,1 e -0,2 V) para detecção de glifosato. Condições experimentais: Concentração da solução de glifosato: 1 $\mu$ M. Voltagem de injeção: -700V. Voltagem de separação: -900V. Eletrólito utilizado: Tampão borato 0,1M, pH 9,0, contendo 0,1mM de CTAB. Tempo de injeção: 10s. Tempo de corrida: 600s.....                                   | 87 |
| Figura 30 – Curva para averiguação da relação entre o sinal analítico (intensidade da corrente medida) e o potencial aplicado no eletrodo de trabalho para a detecção de glifosato em microchip eletroforese. Condições experimentais: Concentração da solução de glifosato: 1 $\mu$ M. Voltagem de injeção: -700V. Voltagem de separação: -900V. Eletrólito: Tampão borato 0,1M, pH 9,0, contendo 0,1mM de CTAB. Tempo de injeção: 10s. Tempo de corrida: 600s. .... | 88 |
| Figura 31 - Amperograma para sistema contendo glifosato. Condições experimentais: Concentração da solução de glifosato: 1 $\mu$ M. Voltagem de injeção: -700V. Voltagem de separação: -900V. Eletrólito utilizado: Tampão borato 0,1M, pH 9,0, contendo 0,1mM de CTAB. Tempo de injeção: 10s. Tempo de corrida: 600s. ....  | 89 |
| Figura 32 - Amperogramas obtidos para a averiguação das voltagens de injeção e separação. A) $V_{inj} = -600$ V, $V_{sep} = -800$ V; B) $V_{inj} = -700$ V, $V_{sep} = -900$ V; C) $V_{inj} = -800$ V,  |    |

$V_{sep} = -1000V$ ; D)  $V_{inj} = -1000V$ ,  $V_{sep} = -1200V$ ; E)  $V_{inj} = -1100V$ ,  $V_{sep} = -1300V$ ; F)  $V_{inj} = -1200V$ ,  $V_{sep} = -1400V$ . ..... 92

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Relação de trabalhos presentes na literatura que propõem a determinação de glifosato em matrizes ambientais e alimentícias. .... | 32 |
| Tabela 2 – Propriedades dos polímeros comumente utilizados como substratos em sistemas microfluídicos .....                                 | 41 |
| Tabela 3 – Aditivos comumente utilizados em eletroforese capilar .....  | 42 |
| Tabela 4 Relação dos tipos de posicionamento de eletrodo em microchip eletroforese .....  | 56 |
| Tabela 5 – Relação dos potenciais aplicados durante a amperometria de pulso. ....   | 84 |
| Tabela 6 - Relação das voltagens de injeção e separação utilizadas e os respectivos tempos para detecção e altura do pico.....              | 91 |

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

|           |  |
|-----------|--|
| $\mu$ TAS | Micro Total Analysis Systems                     |
| Ag-NPs    | Nanopartículas de Prata                          |
| AMPA      |  cido aminometilfosfônico                        |
| CFG       | Cromatografia em Fase Gasosa                     |
| CLAE      | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência         |
| CONAMA    | Conselho Nacional do Meio Ambiente               |
| CTAB      | Brometo de Cetiltrimetilam nio                   |
| DARPA     | <i>Defense Advanced Research Projects Agency</i> |
| EC        | Eletroforese Capilar                             |
| EOF       | Fluxo eletroosmótico                             |
| EPA       | <i>Environmental Protection Agency</i>           |
| EPSPS     | 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase         |
| IC        | Cromatografia I nica                             |
| PC        | Policarbonato                                    |
| PDMS      | Polidimetilsiloxano                              |
| PEP       | Fosfoenolpiruvato                                |
| PMMA      | Polimetilacrilato                                |
| PS        | Poliestireno                                     |
| TTAB      | Brometo de trimetiltetradecilam nio              |

## SUMÁRIO

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b><i>Introdução</i></b> .....   | <b>16</b> |
| <b>2</b>   | <b><i>Revisão Bibliográfica</i></b> .....  | <b>19</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Glifosato</b> .....   | <b>19</b> |
| 2.1.1      | Propriedades físico-químicas e mecanismo de atuação.....   | 21        |
| 2.1.2      | Legislação regulamentária e riscos à saúde humana e ao meio ambiente .....   | 24        |
| 2.1.3      | Metodologias de detecção do glifosato e desafios.....  | 26        |
| <b>3</b>   | <b><i>Eletroforese Capilar em microchip</i></b> .....  | <b>34</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Princípios Básicos da Eletroforese Capilar</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Eletroosmose ou fluxo eletroosmótico</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Substratos Microfluídicos e Técnicas de Microfabricação</b> .....   | <b>38</b> |
| 3.3.1      | Substratos poliméricos.....  | 39        |
| <b>3.4</b> | <b>Aditivos utilizados em eletroforese capilar</b> .....   | <b>41</b> |
| 3.4.1      | Influência da temperatura em sistemas microfluídicos: Efeito Joule .....   | 43        |
| <b>3.5</b> | <b>Técnicas de Injeção em Microchip eletroforese</b> .....   | <b>44</b> |
| 3.5.1      | Injeção hidrodinâmica .....  | 45        |
| 3.5.2      | Injeção eletrocínética .....   | 46        |
| <b>3.6</b> | <b>Detecção em microchip eletroforese</b> .....  | <b>48</b> |
| 3.6.1      | Detecção eletroquímica em microchip eletroforese .....   | 52        |
| 3.6.2      | Posicionamento do eletrodo de trabalho em microchip eletroforese.....  | 54        |
| <b>4</b>   | <b><i>Objetivos</i></b> .....  | <b>58</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Objetivo Geral</b> .....  | <b>58</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Objetivos Específicos</b> .....   | <b>58</b> |
| <b>5</b>   | <b><i>Procedimento Experimental</i></b> .....  | <b>59</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Equipamentos utilizados</b> .....   | <b>59</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Reagentes e Soluções</b> .....  | <b>59</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Preparo do microchip híbrido PDMS/Vidro</b> .....   | <b>60</b> |
| <b>5.4</b> | <b>Estudos Voltamétricos e Amperométricos</b> .....  | <b>62</b> |
| <b>5.5</b> | <b>Preenchimento dos microcanais e teste eletroforéticos para avaliar possíveis obstruções do microchip híbrido PDMS/Vidro</b> ..... | <b>63</b> |
| <b>6</b>   | <b><i>Resultados e Discussões</i></b> .....  | <b>65</b> |



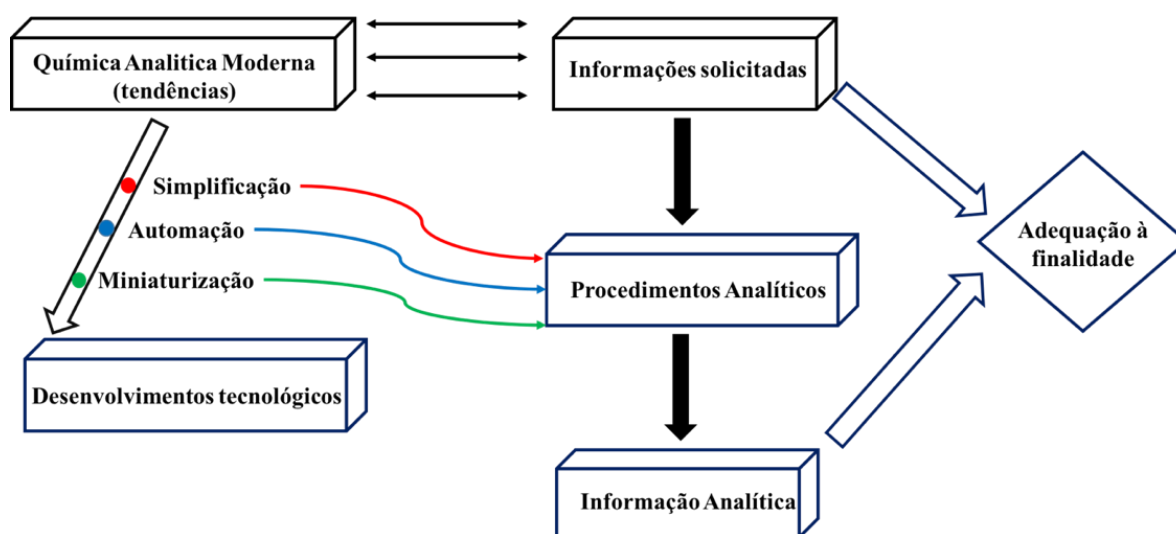
|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>6.1</b> | <b>Avaliação do comportamento eletroquímico do glifosato em eletrodo de cobre com tampão fosfato como eletrólito suporte.....</b>      | <b>65</b> |
| 6.1.1      | Mecanismo eletroquímico .....  | 67        |
| 6.1.2      | Avaliação da concentração de glifosato .....   | 70        |
| 6.1.3      | Comportamento eletroquímico do glifosato em eletrodo de cobre com NaOH 0,1 M como eletrólito suporte.....                              | 71        |
| <b>6.2</b> | <b>Avaliação da concentração de glifosato em tampão borato.....</b>  | <b>72</b> |
| <b>6.3</b> | <b>Verificação do perfil espectroscópico do complexo Cu(II)-glifosato utilizando UV-vis</b>  | <b>73</b> |
| <b>6.4</b> | <b>Avaliações no dispositivo microfluídico.....</b>  | <b>75</b> |
| 6.4.1      | Avaliação de diferentes eletrodos de trabalho – Au, Pt e Cu .....  | 75        |
| 6.4.2      | Avaliação da janela de potencial no eletrodo de trabalho .....   | 78        |
| 6.4.3      | Avaliação eletroforética com detecção amperométrica .....  | 81        |
| <b>6.5</b> | <b>Estudo do potencial de detecção no eletrodo de trabalho para detecção eletroquímica do glifosato em microchip eletroforese.....</b> | <b>86</b> |
| <b>6.6</b> | <b>Estudo das voltagens de injeção e separação .....</b>   | <b>89</b> |
| <b>7</b>   | <b><i>Considerações Finais</i>.....</b>  | <b>94</b> |
| <b>8</b>   | <b><i>Perspectivas</i>.....</b>  | <b>95</b> |
| <b>9</b>   | <b><i>Referências Bibliográficas</i> .....</b>   | <b>96</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A miniaturização em química analítica é uma tendência que vem obtendo grande relevância nos últimos anos, levando ao desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitam operações laboratoriais em microescala. Com o objetivo inicial de aumentar o desempenho analítico, a miniaturização proporcionou uma revolução que gerou o desenvolvimento de novas tecnologias científicas (COLTRO et al., 2007).

A Figura 1 mostra a correlação das tendências da química analítica moderna e suas implicações práticas. A simplificação (facilidade de implementação), automação (sistema automático de controle dos processos) e miniaturização (construção em escala pequena) é essencial para o desenvolvimento tecnológico que possibilita o desenvolvimento de novas áreas dentro da química analítica. As novas tecnologias possibilitam o desenvolvimento de procedimentos analíticos que são utilizados para obter informações requeridas no decorrer de uma pesquisa científica e adequam-se à finalidade proposta.

**Figura 1 – Correlação entre as tendências na química analítica moderna e os desenvolvimentos tecnológicos.**



**Fonte:** Adaptado de Rios, Escarpa e Simonet, 2009.

Neste sentido, os microssistemas de análise total ( $\mu$ TAS – do inglês *Micro total analysis systems*) e a microfluídica como um todo são figuras-chave no desenvolvimento tecnológico dentro da química analítica. A microfluídica pode ser definida como a ciência e tecnologia dos sistemas que processam ou manipulam pequenas quantidades de fluidos (da ordem de  $10^{-9}$  a  $10^{-18}$  litros), usando canais com dimensões de dezenas a centenas de micrômetros (WHITESIDES, 2006). As primeiras aplicações da microfluídica versavam sobre o desenvolvimento de plataformas para a análises químicas devido a características notáveis como uso limitado de amostras e reagentes, separações e detecções com alta resolução e sensibilidade e baixo custo de análise (RIOS; ESCARPA; SIMONET, 2009).

De acordo com Whitesides (2006), o desenvolvimento da microfluídica foi baseado em quatro pilares principais. O primeiro pilar foi o desenvolvimento de análise molecular tais como cromatografia de fase gasosa (GPC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE). Essas técnicas, aliadas à forma capilar, revolucionaram a análise química visto que possibilitaram alta sensibilidade e resolução utilizando pequenos volumes de amostra. O desenvolvimento de plataformas ainda menores baseadas nos avanços dessas técnicas possibilitou outras aplicações em microescala tanto na química quanto na bioquímica. O desenvolvimento de armas químicas e biológicas durante a Guerra Fria e a necessidade de cessar essas ameaças foi o segundo pilar da microfluídica. Durante a década de 1990, a Agência de Projetos de Pesquisa Avançada de Defesa (DARPA, do inglês *Defense Advanced Research Projects Agency*) financiou uma série de projetos para o desenvolvimento de plataformas microfluídicas com o intuito de detectar possíveis ameaças químicas e biológicas. Esse estímulo foi fundamental para o desenvolvimento acadêmico de tecnologias relacionadas à microfluídica

O terceiro pilar da microfluídica foi o desenvolvimento da biologia molecular e da genômica, onde tecnologias como o sequenciamento de DNA exigiram o desenvolvimento de metodologias analíticas com alta sensibilidade, resolução e processamento. Essas características requeridas são compatíveis com as propriedades dos sistemas microfluídicos de análise. O quarto e último pilar foi o progresso da microeletrônica, onde houve o desenvolvimento de sistemas microeletromecânicos. Algumas das contribuições da microeletrônica consistem no uso de plataformas de vidro ou sílica que posteriormente foram trocadas por plataformas de elastômeros

Em teoria, um  $\mu$ TAS ideal possibilitaria a execução de todas as etapas químicas de análise (preparo de amostra, separação do analito e detecção) em um único dispositivo. Desta forma, um  $\mu$ TAS pode ser considerado um dispositivo no qual há uma melhora da performance de análise através da redução do tamanho físico do mesmo. De acordo com Rios e colaboradores (2009), a miniaturização implica em ambientes de trabalho em microescala, onde fenômenos característicos são evidenciados, tais como fluxo laminar e necessidade de manipulação precisa do volume das amostras. Esta última característica propicia a utilização desses microssistemas nos mais diversos campos do conhecimento, como por exemplo na Química Analítica, com o desenvolvimento de metodologias de análise e quantificação de espécies nas mais diversas matrizes, como por exemplo o controverso herbicida glifosato, o agrotóxico mais comercializado no mundo e que apresenta possíveis efeitos nocivos aos seres humanos

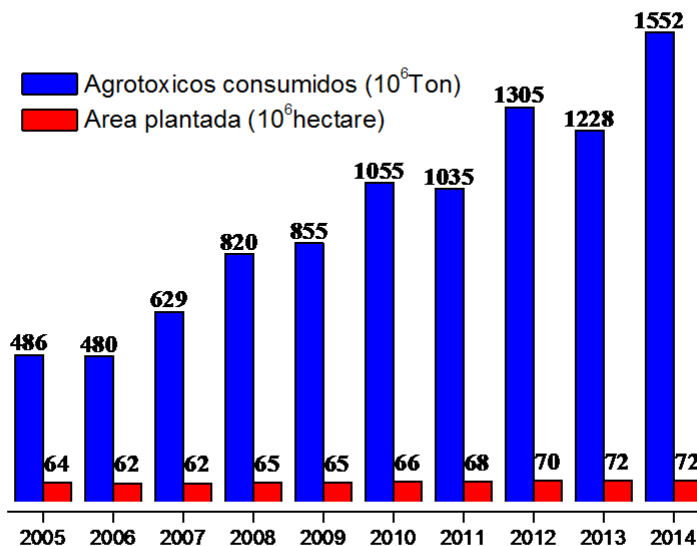
Dentro deste contexto, a utilização de microssistemas de análise para a determinação de moléculas de interesse ambiental como o glifosato oferece meios para o desenvolvimento de metodologias alternativas e inovadoras dentre das possibilidades de análise apresentadas na literatura.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Glifosato

A expansão do agronegócio brasileiro como um dos principais setores da economia tem como pilar essencial a utilização de agrotóxicos que permitem o aumento da produtividade de *commodities* importantes tais como o café, o milho e a soja. De fato, a utilização destes agrotóxicos (pesticidas, herbicidas, fungicidas e outros) vem crescendo ano após ano. O gráfico presente na Figura 2 é um indicativo deste processo econômico e agrícola. Enquanto a área total utilizada em culturas agrícolas no Brasil apresentou um ligeiro aumento no período entre 2005 e 2014, o consumo de agrotóxicos praticamente quadruplicou no mesmo período, evidenciando assim o uso destes agentes para aumentar a produtividade de diversas lavouras (BOMBARDI, 2017).

**Figura 2 - Relação do crescimento da área plantada no Brasil e do uso de agrotóxicos no período de 2005 até 2014.**

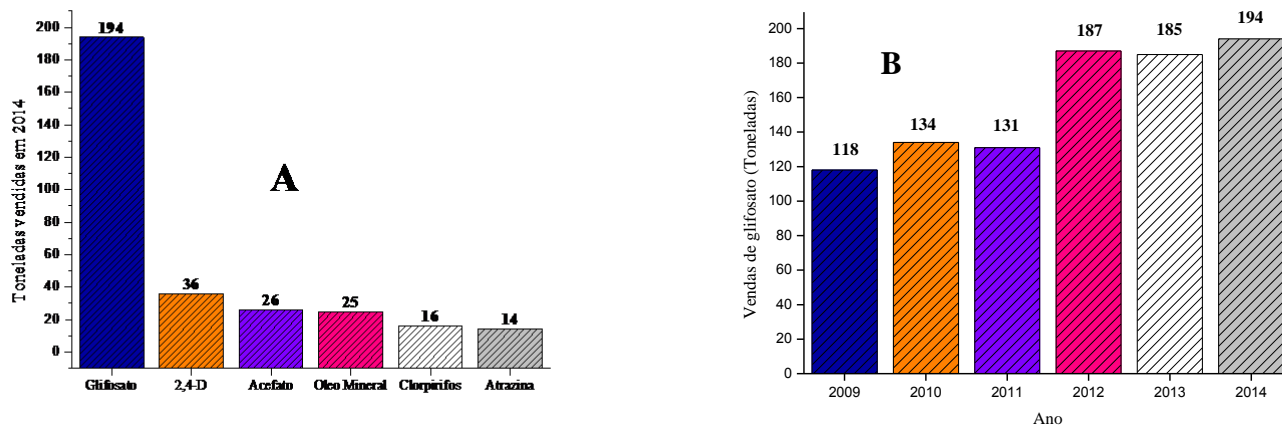


Fonte: Adaptado de Bombardi, 2017.

Ao passo que a economia brasileira desenvolve-se com base no aumento da produtividade agrícola e estratégias utilizando agrotóxicos são largamente empregadas tendo como base o afrouxamento de legislações ambientais que possam limitar o uso destes agentes, a investigação e monitoramento dos agrotóxicos torna-se de extrema importância para a garantia de políticas que possam assegurar tanto a saúde humana quanto a limitação de impactos ambientais decorrentes dessa prática.

Dentre os mais diversos agrotóxicos utilizados no país, o glifosato destaca-se por ser o herbicida mais comercializado no país (Figura 3A), sendo responsável por cerca de 45% do total do volume de vendas de agrotóxicos no país, além de ser o principal agrotóxico utilizado na mais importante *commodity* agrícola, a soja. Além disso, a comercialização do glifosato no mercado brasileiro vem crescendo de forma vertiginosa com o passar dos anos (Figura 3B). Estes dados demonstram a relevância do herbicida dentro do cenário do agronegócio brasileiro, ao mesmo tempo em que alertam para o uso exacerbado do agrotóxico.

**Figura 3 – A) Relação dos princípios ativos mais comercializados no Brasil no ano de 2014, com ênfase para o herbicida glifosato. B) Vendas do herbicida glifosato (em toneladas) entre os anos de 2009 e 2014.**



**Fonte:** Adaptado de Bombardi, 2017.

Do ponto de vista técnico, o glifosato (N-(fosfonametil)glicina) configura-se como um herbicida não-seletivo, sistêmico, pós-emergente (herbicidas pós-emergentes são

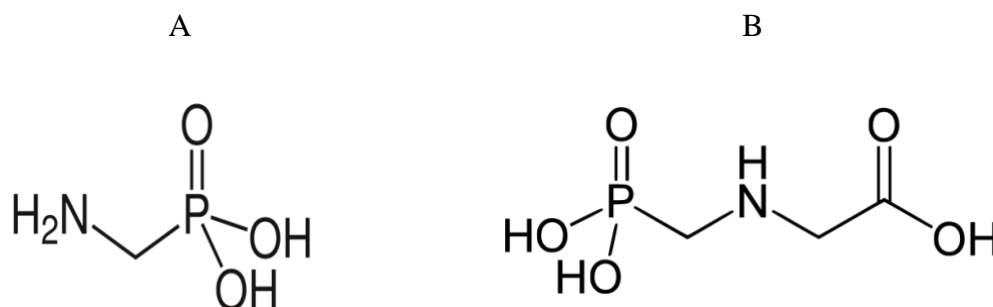
aqueles que podem ser utilizados após a emergência das plantas daninhas porém antes que as mesmas interfiram no desenvolvimento da cultura), sendo o princípio ativo de diversos herbicidas tais como Glyphomax®, Rodeo®, Pondmaster®, Expedite® e Roundup®, sendo o último o herbicida mais comercializado no mundo. Sendo um análogo aminofosfônico do aminoácido natural glicina, o glifosato foi sintetizado inicialmente em 1950 pelo químico suíço Henri Martin, o qual trabalhava para uma pequena indústria farmacêutica. Nenhuma aplicação farmacêutica ou estudo biológico relacionado ao glifosato foi reportada até os anos 1960, quando o químico da Monsanto John Franz efetuou estudos utilizando o composto como um herbicida e descobriu a potencialidade do mesmo para o controle do crescimento de plantas daninhas (DILL et al., 2010; MENSAH; PALMER; MULLER, 2014).

Um produto da degradação do glifosato é o ácido aminometilfosfônico, também conhecido como AMPA. A ocorrência do AMPA junto ao glifosato é comum em amostras de água e solo, visto que microorganismos estão envolvidos na degradação do glifosato a AMPA (GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017).

### **2.1.1 Propriedades físico-químicas e mecanismo de atuação**

De acordo com Amarante Jr. e colaboradores (2002), o glifosato é uma molécula com fórmula  $C_3H_8NO_5P$  (massa molar:  $169,1 \text{ g mol}^{-1}$ ) que pode existir também na forma de sal de isopropilamônio quando acrescido do grupo  $(CH_3)_2CHNH_3^+$  (neste caso com uma massa molar total de  $228,2 \text{ g mol}^{-1}$ ). O seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), apresenta massa molar de  $111,04 \text{ g mol}^{-1}$ . Tanto o glifosato quanto os sais de glifosato apresentam-se como sólidos cristalinos bastante solúveis em água ( $12 \text{ g L}^{-1}$  a  $25 \text{ °C}$ , para o glifosato) e baixíssima solubilidade em solventes orgânicos. As estruturas químicas do AMPA e do glifosato são apresentadas nas Figuras 4A e 4B:

**Figura 4 – A) Estrutura do ácido aminometilfosfônico; B) Estrutura do glifosato.**



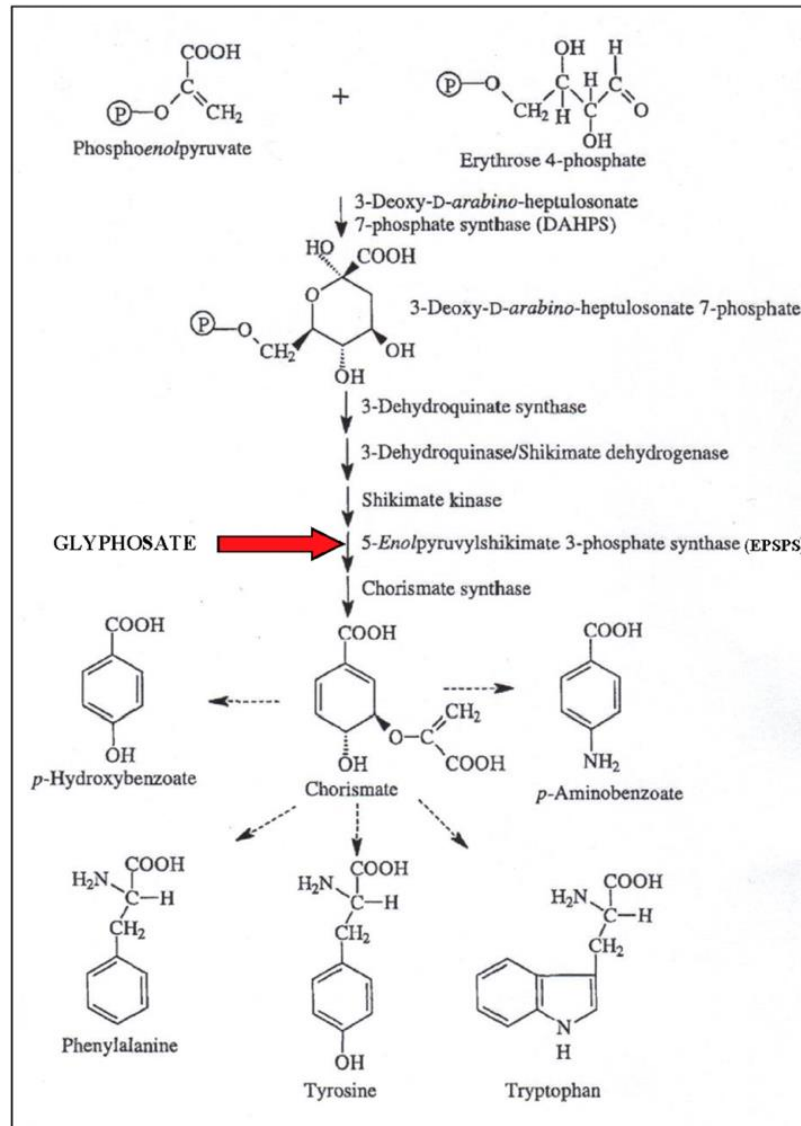
**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

Aplicado via pulverização, o glifosato atua no mecanismo da enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS) presente na via do shikimato, na qual a enzima EPSPS atua na síntese de aminoácidos aromáticos tais como fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 5). Esses aminoácidos são precursores de flavonoides, ácidos benzoicos, alcaloides e lignina, os quais são essenciais para o desenvolvimento das plantas. A inibição da enzima EPSPS leva então à necrose das plantas em dias ou semanas, visto que a via do shikimato corresponde a 30% do peso seco da planta e, desta maneira, qualquer interferência nessa via acarreta na degradação e morte das plantas. (DE ABREU; DA MATTA; MONTAGNER, 2008; MENSAH; PALMER; MULLER, 2014). A Figura 10 mostra a ação do glifosato na via do shikimato e os principais produtos que são inibidos.

O glifosato é bastante adsorvido pelo solo e, portanto, grande parte dos seus resíduos são encontrados imobilizados no mesmo. A meia-vida do glifosato no solo é de 47 dias, sendo este tempo variável em decorrência das condições geoclimáticas que afetam a presença do herbicida. Além disso, micróbios presentes no solo promovem a degradação do glifosato em AMPA (CHAUZAT; FAUCON, 2007; DE ANDRÉA et al., 2003).



Figura 5 - Mecanismo de ação do glifosato na via do shikimato.

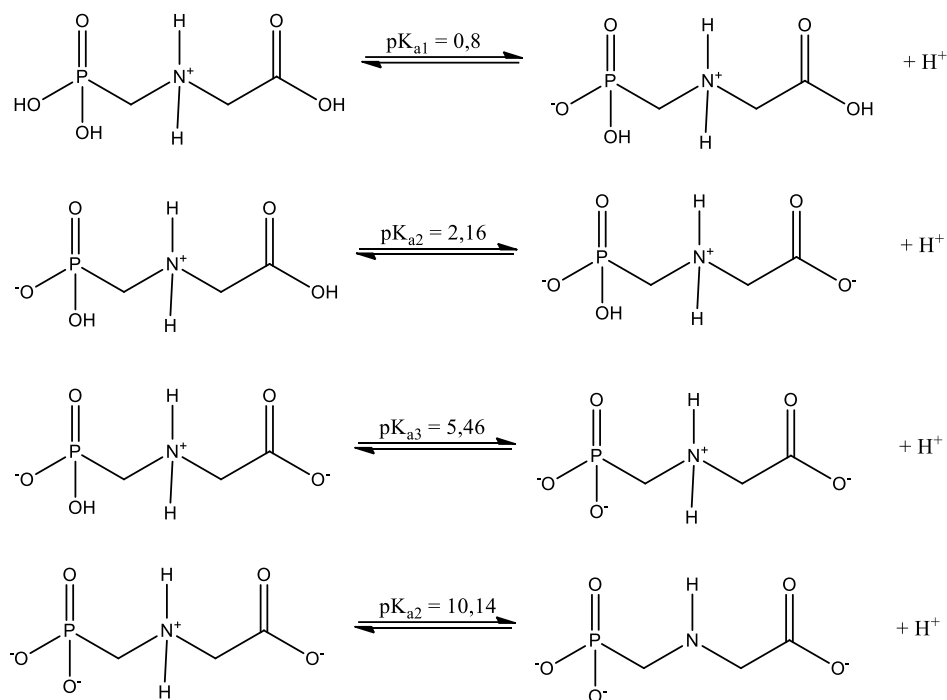


Fonte: Adaptado de Mensah, Palmer e Muller, 2014.

Com relação ao equilíbrio ácido-base da molécula, o glifosato apresenta quatro átomos de hidrogênio ionizáveis, tendo  $pK_1= 0,8$ ;  $pK_2= 2,16$ ;  $pK_3=5,46$  e  $pK_4= 10,14$  (Figura 6). Evidencia-se então que o glifosato se apresenta na sua forma ionizada em

diferentes solos, visto que estes apresentam acidez moderada. O AMPA, por sua vez, apresenta três átomos de hidrogênio ionizáveis, tendo  $pK_1= 0,9$ ;  $pK_2= 5,6$  e  $pK_3= 10,2$  (DELMONICO et al., 2014).

**Figura 6 - Equilíbrio ácido-base para o glifosato.**



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

### 2.1.2 Legislação regulamentária e riscos à saúde humana e ao meio ambiente

Desde a sua introdução no mercado nos anos 1970, a utilização do glifosato em diversas lavouras e culturas cresce vertiginosamente, sendo este o principal herbicida a ser comercializado tanto no Brasil quanto no mundo. O glifosato é empregado no controle de ervas daninhas de culturas diversas tais como soja, cana, milho, algodão e fumo. Além disso, o glifosato pode ser utilizado no controle de ervas aquáticas (JUNIOR et al., 2002). De acordo com Bombardi (2017), o glifosato é o herbicida (princípio ativo) de maior comercialização no Brasil, tendo cerca de 45% do volume total de agrotóxicos comercializados no país (mais de 194 mil toneladas de glifosato comercializados no ano de 2014).

No que tange a legislação brasileira acerca do glifosato, dois órgãos regulam os limites máximos permitidos para o mesmo. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), na resolução 357 de 17 de março de 2005 regulamenta os valores máximos de glifosato presente em águas doces.

Para águas doces da classe 1 (que podem ser destinadas para o consumo humano após tratamento simplificado) o limite estabelecido é de  $65 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para águas doces da classe 3, categoria em que se encaixam a maior parte dos rios que cortam as cidades brasileiras, o limite estabelecido é de  $280 \mu\text{g L}^{-1}$ . A título de comparação, a agência de proteção ambiental (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) dos Estados Unidos da América estabelece um limite de  $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$  para águas de consumo humano. Ou seja, a legislação brasileira permite níveis de glifosato cerca de 90 vezes maiores do que a legislação norte-americana. No que tange ao Limite Máximo de Resíduo (LMR) presente em alimentos, a legislação brasileira considera tolerante valores que vão desde  $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$  para alimentos como a banana até  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  para soja, enquanto que a União Europeia determina um valor máximo de até  $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$  para todos os pesticidas, independentemente da sua estrutura ou atividade biológica (CATRINCK et al., 2014; CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005; YUAN et al., 2017).

A exposição crônica ao glifosato está associada com diversos distúrbios e doenças, incluindo diabetes, esclerose múltipla, depressão, obesidade, mal de Alzheimer, doenças cardíacas, má formação congênita, doenças no sistema renal, entre outras (SAMSEL; SENEFF, 2013). Estudos realizados com peixes demonstram que o glifosato alterou o funcionamento do metabolismo energético, atividade da enzima acetilcolinesterase (que atua diretamente no sistema nervoso) e também causou mudanças significativas no sistema imunológico. Além disso, do ponto de vista ambiental, o glifosato (e seus metabólitos) podem ser encontrados tanto em lagos, rios e riachos, quanto em águas subterrâneas. Elevadas concentrações do herbicida podem, portanto, levar a alterações nos ecossistemas como um todo (LANGIANO; MARTINEZ, 2008; MELLO; BALVEDI; GOULART, 2018).

Recentemente, o uso do glifosato tem sido contestado em ações judiciais. Em 2018, a Monsanto foi condenada pela justiça do estado da Califórnia, nos Estados Unidos da América a efetuar o pagamento de uma multa milionária (US\$ 78 milhões) devido à

atuação do herbicida glifosato no desenvolvimento do câncer de um jardineiro local. Este julgamento é histórico pois foi o primeiro a vincular o uso do glifosato com doenças desenvolvidas por usuários. No Brasil, uma medida liminar também do ano de 2018 propôs a suspensão da comercialização do glifosato no país foi embargada pela justiça em segunda instância. A medida de suspensão do uso do glifosato no Brasil, levaria, de acordo com o ministro da Agricultura à época, a um “desastre para a agricultura” (G1, 2018).

### **2.1.3 Metodologias de detecção do glifosato e desafios**

De acordo com Valle e colaboradores (2018), a detecção e quantificação do glifosato configuram-se como um processo caro, laborioso e lento, visto que a detecção desta molécula não pode ser realizada em conjunto com outras espécies e exige uma série de condições especiais para a sua realização. Estas dificuldades experimentais levam a um baixo número de laboratórios credenciados para a detecção e quantificação do herbicida. Como resultado, atualmente, não existem programas de monitoramento dos níveis de glifosato no mundo, o que torna difícil a averiguação tanto de áreas possivelmente contaminadas quanto o número de pessoas que estão sendo contaminadas diariamente.

Os desafios na detecção do glifosato são vários e todos decorrem da natureza do herbicida. A detecção por meio de metodologias analíticas simples se torna complicada devido a sua característica iônica, alta polaridade e alta solubilidade em água, dificuldade na evaporação, baixa solubilidade em solventes orgânicos, baixa volatilidade, baixa massa molecular e facilidade na complexação com metais. Além disso, detecções fluorimétricas e/ou fotométricas não são possíveis devido à ausência de grupos fluoróforos ou cromóforos na estrutura do glifosato. Somado a todas essas dificuldades, a similaridade estrutura do glifosato com aminoácidos leva à interferência dessas espécies na detecção do herbicida, sendo essencial o pré-tratamento das amostras (GRANDCOIN; PIEL; BAURÈS, 2017; MELLO; BALVEDI; GOULART, 2018).

A Agência de Proteção Ambiental (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) dos Estados Unidos da América tem como metodologia oficial de análise o método EPA 547.0. Esta metodologia utiliza a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com uma coluna de exclusão catiônica tendo como eluente ácido fosfórico 0,05%.

O glifosato é oxidado a glicina na presença de hipoclorito de cálcio e esta complexa com o-ftaldeído-2-mercaptoetanol formando um fluoróforo, que possibilita a detecção com comprimentos de onda de excitação e emissão em 340 e 455 nm, respectivamente (WINFIELD; BASHE; BAKER, 1990).

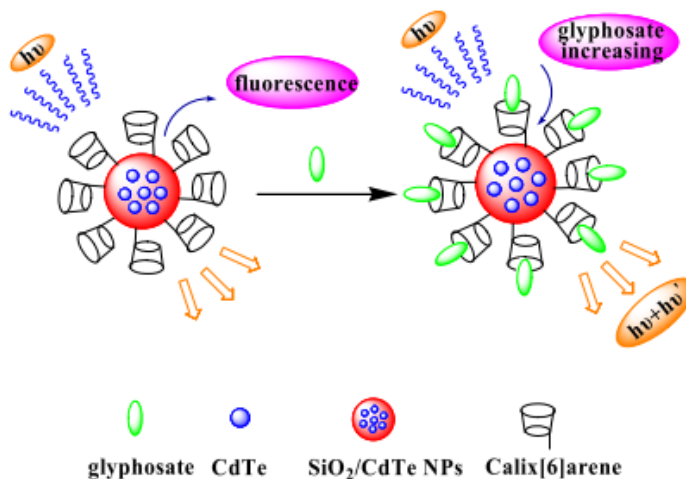
Metodologias baseadas em técnicas cromatográficas são largamente reportadas na literatura para a detecção do glifosato. Estas metodologias, de uma forma geral, baseiam-se na quebra de componentes presentes numa mistura, no qual cada parte pode ser analisada de forma individual.

Catrinck e colaboradores (2014) desenvolveram uma metodologia de análise para glifosato e AMPA utilizando HPLC como técnica de separação e detecção por UV-vis. Como o glifosato não apresenta absorção na região UV-vis, os autores efetuaram um procedimento para a derivatização do analito com o uso do reagente cromogênico FMOC-Cl, o qual permite sensibilidade necessária para a detecção na região do ultravioleta. Para melhorar a sensibilidade do método, os autores otimizaram parâmetros como o efeito da concentração do tampão, tempo de reação e tempo de homogeneização para o procedimento de derivatização. Apesar do aspecto inovador do trabalho, a utilização de agentes derivatizantes configura-se como uma desvantagem necessária para a realização das análises espectrofotométricas do glifosato.

Cromatografia gasosa também pode ser utilizada na determinação de glifosato. Royer e colaboradores (2000) desenvolveram uma metodologia baseada na avaliação de diferentes agentes derivatizantes com o objetivo de atuar no grupamento amínico e/ou carboxílico, tais como 2-cloroetanol, trifluoroetanol, diazometano e isopropilcloroformato. Baseado nos resultados obtidos, a mistura de anidrido trifluoroacético (TFAA) e 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol (HFB) para a determinação de glifosato e AMPA foi escolhida como a mais promissora para a análise de amostras de água utilizando um espectrômetro de massas como sistema de detecção (GC-MS/MS). Quando aplicada, a metodologia apresentou recuperação na faixa de 83–84 %, com limite de quantificação de 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cada analito. Um contraponto presente nesta metodologia está na necessidade de etapas de remoção do excesso de agente derivatizante (efetuadas com o emprego de resinas de troca iônica), o que diminui consideravelmente a frequência analítica do método proposto além de tornar a metodologia de análise mais laboriosa.

Metodologias que utilizam abordagens espectroscópicas também estão presentes na literatura. Nesta forma de detecção, a interação entre a matéria e a radiação eletromagnética é utilizada para a aquisição de dados que utilizam a resposta analítica obtida em função do comprimento de onda ou frequência. A utilização de sondas fluorescentes para a detecção de glifosato é reportada na literatura. Li colaboradores (2011) sintetizaram *quantum dots* de telureto de cádmio (CdTe) e óxido de silício (SiO<sub>2</sub>) funcionalizados com 6-calixareno para a detecção de glifosato (Figura 7).

**Figura 7 - Resumo gráfico do trabalho de Li e colaboradores para a detecção de glifosato utilizando quantum dots de telureto de cádmio (CdTe).**



**Fonte:** Adaptado de Li e colaboradores, 2011.

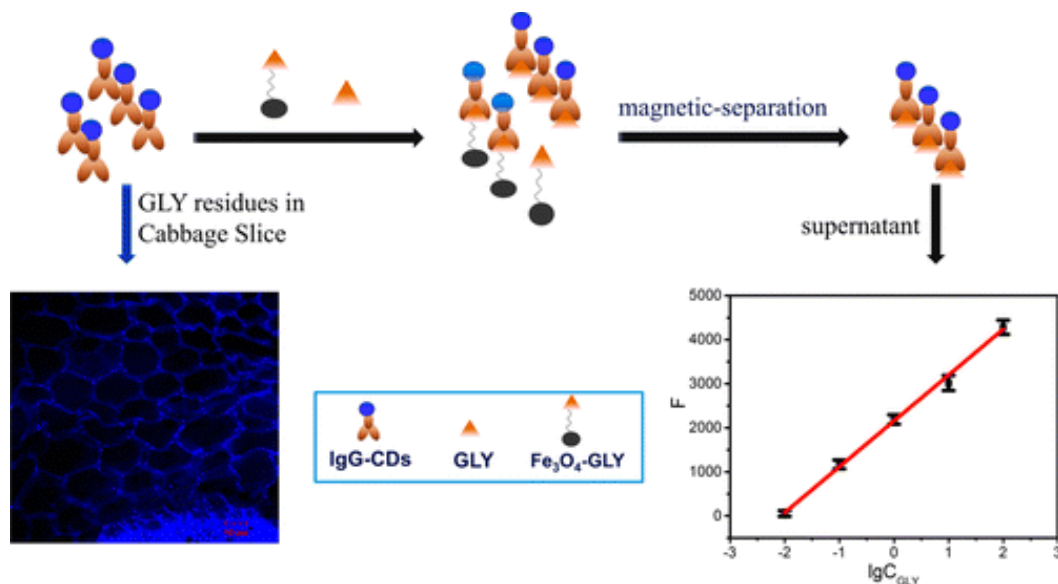
A utilização do 6-calixareno torna-se um ponto positivo essencial para o desenvolvimento da metodologia. Estas estruturas apresentam cavidades relativamente pequenas para que pesticidas aromáticos tais como carbaril e metilcarbe possam adentrar, sendo, portanto, uma barreira física para uma maior seletividade. Por outro lado, o tamanho reduzido possibilita a entrada de moléculas menores como o glifosato. Um ponto negativo, entretanto, refere-se à similaridade da estrutura do glifosato com outras moléculas facilmente encontradas na natureza, como os aminoácidos. A seletividade do glifosato frente a moléculas de estrutura similar não foi avaliada pelos autores. As nanopartículas, quando na presença do herbicida, apresentam um aumento na intensidade de fluorescência emitida, tendo como faixa linear 1–25 nmol L<sup>-1</sup> e limite de detecção de 0,0725 nmol L<sup>-1</sup>. O

ensaio de recuperação efetuado pelos pesquisadores mostrou a potencialidade do método, com recuperações entre 97,4 e 101,7% em amostras de natureza não citadas pelos os autores.

Também utilizando detecção fluorimétrica, Wang e colaboradores (2016) desenvolveram uma metodologia para a detecção de glifosato baseada numa reação imunológica. Inicialmente, *quantum dots* de carbono (CDs) foram acoplados a um anticorpo específico para glifosato (IgG). A sonda gerada (IgG-CDs) permite a detecção fluorimétrica do herbicida. Para eliminar os efeitos do excesso da sonda na detecção do analito, os autores utilizaram nanopartículas magnéticas baseadas em antígenos e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> as quais possibilitam a remoção do excesso da sonda e aumenta a seletividade do método proposto. Em condições otimizadas, a detecção do glifosato pode ser realizada com comprimento de onda máximo em 450nm, com uma faixa linear entre 0,01 e 80 µg mL<sup>-1</sup>. A metodologia proposta também mostrou boa seletividade, visto que diversos pesticidas (incluindo glifosina e PMIDA) e íons metálicos foram avaliados como possíveis interferentes. A validação do método foi realizada através do ensaio de recuperação com a detecção do herbicida em amostras de água de rio, chá e solo, com recuperações entre 87,4% e 103,7%. A Figura 8 mostra um resumo gráfico do trabalho realizado pelos autores.

Abordagens espectrofotométricas também são relatadas na literatura. Çetin e colaboradores (2017) desenvolveram uma metodologia para separação e pré-concentração do glifosato através de microextração líquido-líquido com detecção espectrofotométrica baseada na conversão do glifosato em ácido ditiocarbônico na presença de dissulfeto de carbono (CS<sub>2</sub>). Após esta etapa, o produto formado complexa com íons Cu(II) e a absorção do mesmo é monitorada em 435nm. Os autores reportam uma faixa linear de 0,5 – 10 mg L<sup>-1</sup>, e a utilização da metodologia proposta para determinação de glifosato em legumes.

**Figura 8 – Resumo gráfico do trabalho de Wang e colaboradores (2016) para a determinação de glifosato através de detecção espectrofotométrica.**



Fonte: Adaptado de Wang e colaboradores (2016).

A ausência de grupos passíveis de redução e/ou oxidação na molécula do glifosato pode parecer um entrave para a sua detecção utilizando técnicas eletroquímicas. Entretanto, trabalhos presentes na literatura lançam mão de artifícios para contornar este problema. Coutinho e colaboradores (2007) efetuaram a determinação direta de glifosato utilizando cromatografia de interação hidrofílica como técnica de separação e detecção coulométrica com microeletrodos de cobre. O trabalho é baseado no aumento da corrente anódica do microeletrodo na presença de agentes complexantes como o glifosato, levando à formação de complexos de Cu(II) solúveis. Um fator extremamente positivo para a metodologia desenvolvida é a utilização de amostras (sucos de frutas) sem a necessidade de procedimentos de extração, limpeza ou preconcentração. Nestas condições, os autores reportaram um limite de detecção de 0,01 mg L<sup>-1</sup>, com uma faixa linear de 0,01 – 34 mg L<sup>-1</sup>.

Sato e colaboradores (2001) desenvolveram uma metodologia para a detecção e separação dos herbicidas glifosato, glufosinato e bialafos utilizando cromatografia de troca aniônica como técnica de separação e amperometria de pulso como técnica de detecção e utilização de eletrodos de ouro. Estes herbicidas apresentaram correntes catalíticas baseadas na oxidação das aminas presentes na estrutura das suas moléculas. De acordo com os autores, a resposta eletroquímica observada na amperometria de pulso assemelha-se com o



perfil de aminoácidos, os quais apresentam adsorção/dessorção catalítica na superfície do eletrodo de ouro. Esta similaridade é decorrente da semelhança estrutural desses herbicidas e os aminoácidos em geral. Após a otimização, os limites de detecção para glufosinato, bialafos e glifosatos foram calculados em 20, 65 e 50 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A metodologia foi aplicada na determinação dos herbicidas em amostras de soro e urina.

Bataller e colaboradores (2012) desenvolveram uma metodologia para a detecção de glifosato baseado numa língua eletrônica voltamétrica. Esta metodologia baseia-se na voltametria de pulso e consiste no uso de três diferentes eletrodos de trabalho (Pt, Co e Cu) encapsulados num cilindro polimérico. Na presença de glifosato, a corrente de corrosão dos eletrodos de Cu e Co aumentaram significativamente, provavelmente devido a formação de complexos de Cu<sup>2+</sup> e Co<sup>2+</sup>. A metodologia é relativamente simples, apresenta baixo custo e rapidez nas análises. Os autores também avaliaram possíveis interferentes ao método (como ácidos húmicos e Ca<sup>2+</sup>).

A tabela 1 abaixo elenca algumas abordagens presentes na literatura para a detecção do glifosato, dando ênfase para abordagens cromatográficas, espectroscópicas e eletroquímicas:

**Tabela 1** – Relação de trabalhos presentes na literatura que propõem a determinação de glifosato em matrizes ambientais e alimentícias.

| Detecção            | Amostra                    | Analito (s)                     | Faixa linear                       | Características   | Referência              |
|---------------------|----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---|-------------------------|
| HPLC (UV-vis)       | Não reportado <sup>1</sup> | Glifosato e AMPA                | Não reportado <sup>1</sup>         | Utilização do agente derivatizante FMOC-Cl              | (CATRINCK et al., 2014) |
| GC-MS               | Nozes e groselha-preta     | Glifosato e AMPA                | 0,0025 – 0,200 µg mL <sup>-1</sup> | Utilização da mistura derivatizante TFAA/HFB            | (ROYER et al., 2000)    |
| IC <sub>2</sub>     | Água                       | Glifosato, Bentazone e Picloram | 10 – 500 µg L <sup>-1</sup>        | Codetecção de 12 ânions                                 | (LUO; CHEN; ZHAO, 2015) |
| Fluorescência       | Amostra fortificada        | Glifosato                       | 1 – 25 nmol L <sup>-1</sup>        | Quantum dots de telureto de cádmio (CdTe)               | (LI et al., 2012)       |
| Fluorescência       | Águas, chá e solo          | Glifosato                       | 0,01 – 80 µg mL <sup>-1</sup>      | Uso de anticorpos (IgG) e quantum dots de carbono (CDs) | (WANG et al., 2016)     |
| Espectrofotométrica | Legumes                    | Glifosato                       | 0,5 – 10 mg L <sup>-1</sup>        | Utilização de metodologia de extração                   | (ÇETIN et al., 2017)    |

|                |                 |           |                                    |   |                         |
|----------------|-----------------|-----------|------------------------------------|---|-------------------------|
| Voltamétricas  | Amostra padrão  | Glifosato | 0,83 – 9,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | Eletrodo de carbono modificado com nanotubos de carbono | (MORAES et al., 2010)   |
| Coulorimétrica | Sucos de frutas | Glifosato | 0,01 – 34 $\text{mg L}^{-1}$       | Amostras não precisaram de pré tratamento e/ou extração | (COUTINHO et al., 2007) |
| Voltamétrica   | Águas           | Glifosato | Não reportado                      | Sistema simples e de baixo custo                        | (CAMPOS et al., 2012)   |

<sup>1</sup>= Autores apenas reportaram a utilização da sonda para a derivatização do glifosato. <sup>2</sup>= Detecção por condutividade. <sup>3</sup>= Voltametria de Pulso Diferencial

### 3 ELETROFORESE CAPILAR EM MICROCHIP

O desenvolvimento da microfluídica possibilitou a aplicação de suas tecnologias nos mais diversos campos do conhecimento. Assim, sistemas baseados em Eletroforese Capilar (EC) puderam ser miniaturizados e possibilitaram a integração de etapas como injeção, separação e detecção em um único dispositivo substancialmente menor do que outros sistemas similares tais como cromatógrafos, por exemplo (COLTRO et al., 2007).

Vantagens como pequeno volume de amostra, menor consumo de reagentes/solventes, menor voltagem de separação e maior sensibilidade são alguns dos atrativos para a utilização do microchip eletroforese para a detecção e separação de analitos. Apesar dos avanços recentes na área, algumas limitações são corriqueiras tais como necessidade de interfaceamento entre diferentes componentes do sistema, baixa velocidade para o transporte de massa, introdução da amostra e análises sucessivas de um conjunto de amostras (COLTRO et al., 2007; HENRY, 2006)

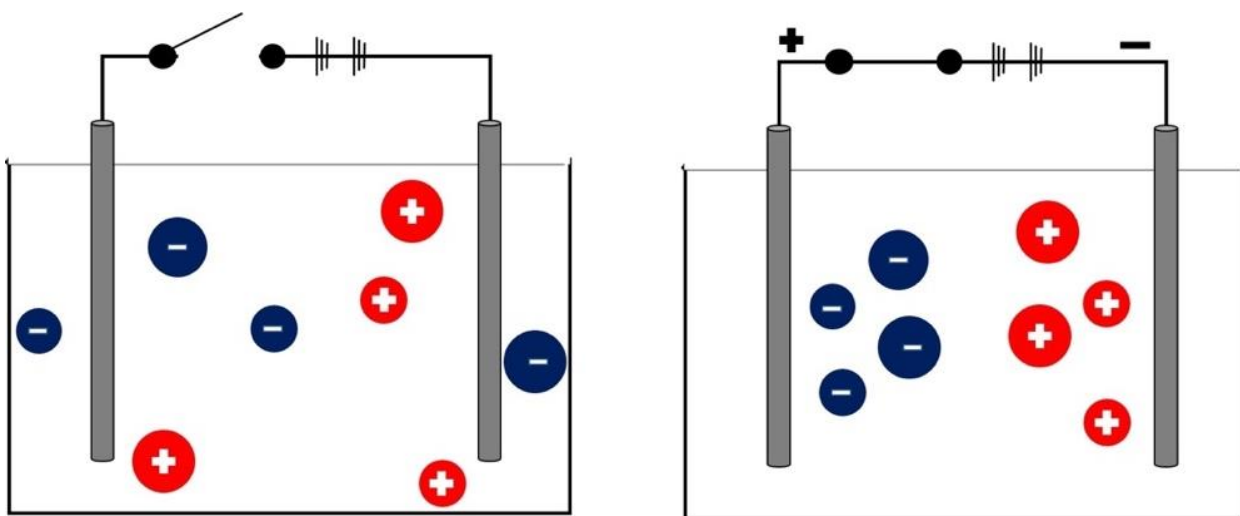
#### 3.1 Princípios Básicos da Eletroforese Capilar

A Eletroforese Capilar é uma forma de separação de compostos iônicos ou ionizáveis presentes num capilar onde um campo elétrico é utilizado para tal propósito. Desenvolvida na década de 1930 pelo pesquisador sueco Arne Tiselius (1902–1971), a eletroforese foi utilizada inicialmente na separação parcial de proteínas constituintes do soro sanguíneo. Devido ao trabalho inovador, Tiselius foi agraciado com o prêmio Nobel de Química no ano de 1948. Diversos avanços dentro da eletroforese foram obtidos com o passar dos anos até o estabelecimento da eletroforese capilar por diversos grupos de pesquisa baseados nos Estados Unidos durante o começo da década de 1980 (HENRY, 2006; TAVARES, 1996). Dentre as diversas vantagens que a Eletroforese Capilar apresenta, destacam-se o manuseio de volumes extremamente reduzidos (na escala de nanolitros,  $10^{-9}$  L), possibilidade de completa automação da análise, detecção e injeção em fluxo e ampla compatibilidade com sistemas de detecção usuais para cromatografia líquida (HARSTAD et al., 2016).

O comportamento das moléculas sob a influência do campo elétrico é essencial para a compreensão de como este fenômeno ocorre. De forma geral, as moléculas podem ser carregadas tanto positivamente quanto negativamente. Quando as cargas positivas igualam numericamente as cargas negativas dentro de uma molécula, estas cargas anulam-se gerando uma molécula eletricamente neutra. Quando presentes em solução, moléculas carregadas tendem a procurar regiões que apresentam cargas elétricas contrárias. Quando não há a presença de um campo elétrico sendo aplicado na solução, o movimento das moléculas é randômico. Entretanto, quando há a presença de um campo elétrico as moléculas tendem a se mover de forma mais organizada e, desta forma, os cátions (espécies positivamente carregadas) movem-se em direção ao cátodo (eletrodo negativamente carregado) e os ânions (espécies negativamente carregadas) movem-se em direção ao ânodo (eletrodo positivamente carregado). Estes fatores levam à geração de um fenômeno denominado fluxo eletroosmótico e é a partir deste fenômeno decorrente da aplicação de um campo elétrico que a separação de espécies por meio da EC se faz possível (TAVARES, 1997; WHATLEY, 2001).

Como denotado na Figura 9, a razão massa/carga ( $m/z$ ) também tem notável relevância dentro da eletroforese capilar. Quatro tipos de partículas carregadas são demonstrados: Partículas grandes e pequenas positivamente carregadas e partículas grandes e pequenas negativamente carregadas. Levando em consideração que todas as partículas têm apenas uma única carga, nota-se que o valor absoluto da força exercida por cada partícula será a mesma. Entretanto, a aceleração criada por essa força pode ser determinada pela relação Força = massa  $\times$  aceleração. Desta forma, partículas menores têm maior aceleração e tendem a migrar mais rapidamente para o polo de carga oposta. Essa característica é fundamental para a eletroforese capilar pois permite não somente a separação de espécies com cargas diferentes mas também tamanhos diferentes (WHATLEY, 2001).

**Figura 9** – Esquema de separação eletroforética com espécies de cargas e tamanhos diferentes.



**Fonte:** Adaptado de Whatley, 2001.

### 3.2 Eletrosmose ou fluxo eletrosmótico

O fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*) é um fenômeno que ocorre como decorrência do diâmetro pequeno do capilar e que pode ocorrer em qualquer sistema eletroforético (TAVARES, 1997). Em sistemas que utilizam capilar de sílica fundida, o fluxo eletrosmótico decorre da ionização dos grupos silanóis na parede do capilar, que apresentam carga negativa devido à passagem de uma solução alcalina no meio. A presença de contra íons no meio leva a formação de uma dupla camada elétrica. Esta dupla camada é composta, então, de uma camada fixa e outra móvel, que cria uma diferença de potencial denominada potencial zeta. Este potencial é gerado dentro de todo o capilar e produz um fluxo uniforme sem a geração de pressão. Essa característica é extremamente importante do ponto de vista experimental, pois contribui para o não alargamento dos picos, visto que moléculas iguais tenderão a se mover com velocidades muito próximas (QUEIROZ; JARDIM, 1993). Outra característica que não contribui para o alargamento do pico é o perfil do fluxo dentro do capilar. Este fluxo apresenta um perfil plano dentro da superfície do capilar visto que o mesmo tem origem nas paredes do tubo, o

que difere do fluxo gerado por pressão presente na cromatografia líquida (SKOOG et al., 2017).

Quando um campo elétrico é aplicado, forças elétricas atuam na camada difusa e os íons arrastam moléculas de água formando um fluxo que é direcionado para o cátodo, enquanto que a parede do capilar permanece negativa. EOF pode também ser obtida com outras superfícies (positivas, neutras ou negativas) e neste caso a direção do fluxo eletroosmótico dependerá da carga presente na superfície do capilar. O fluxo sempre ocorre em direção ao eletrodo que apresenta a mesma carga da parede do capilar. Ou seja, num sistema onde a parede do capilar está carregada de forma negativa, o fluxo eletroosmótico tende a ser direcionado do ânodo para o cátodo. Desta forma, espécies com carga positivas são facilmente detectadas quando o fluxo eletroosmótico normal é utilizado. Entretanto, quando a espécie de interesse a ser detectada tem carga líquida negativa, o fluxo eletroosmótico deverá ser modificado de forma tal que a detecção seja facilitada.

A velocidade do fluxo eletroosmótico dentro de um capilar ou canal pode ser mensurada utilizando a equação de Smoluchowski:

$$v_{eof} = -\left(\frac{\epsilon\zeta}{4\pi\eta}\right)E \quad \text{Equação (1)}$$

Onde  $\epsilon$  é a constante dielétrica do eletrólito,  $\zeta$  é o potencial zeta (em Volts),  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $E$  é o potencial aplicado (Volts cm<sup>-1</sup>). Além disso, a velocidade do fluxo é geralmente maior do que as velocidades de migração eletroforética dos íons individuais, isto é, apesar de que os analitos tenham uma migração associada à sua carga dentro do capilar, o fluxo eletroosmótico tende a arrastar todas as espécies, sejam elas positivas, neutras ou negativas (SKOOG et al., 2017).

Outro parâmetro que pode ser previsto do ponto de vista teórico é a velocidade de migração dos analitos, baseado na mobilidade eletroforética. De acordo com Dziubakiewicz e Buszewski (2013), a separação eletroforética deriva da diferença na velocidade de migração de partículas carregadas sob influência de um campo elétrico. Levando em consideração um capilar preenchido com tampão, duas forças principais atuam sobre os íons. A força eletroestática resulta do produto entre a carga do íon ( $q$ ) e o campo elétrico gerado ( $E$ ). A segunda força atua na direção oposta e é denominada força de fricção, a qual

resulta do produto entre a viscosidade da solução ( $\eta$ ), o raio iônico da espécie ( $r$ ) e a velocidade eletroforética ( $v_{ep}$ ). Durante o procedimento de separação eletroforética, entretanto, ambas as forças estão em equilíbrio, portanto:

$$qE = -6\pi\eta r v_{ep} \quad (\text{Equação 2})$$

Sabendo-se que a mobilidade eletroforética ( $\mu_{ep}$ ) é proporcional à carga da partícula e inversamente proporcional ao raio e viscosidade do meio, tem-se:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad (\text{Equação 3})$$

Desta forma, a velocidade eletroforética para os íons pode ser obtida a partir da equação 4, onde evidencia-se que a velocidade eletroforética, sob ação de um campo elétrico e meio constante, depende tão somente da carga e do raio da espécie a ser avaliada.

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (\text{Equação 4})$$

### 3.3 Substratos Microfluídicos e Técnicas de Microfabricação

O processo de fabricação de um dispositivo microfluídico inicia-se com a escolha do material de partida, o qual definirá qual técnica será utilizada e também a viabilidade de produção do microssistema. De forma geral, os materiais de partida podem ser substratos rígidos (silício e vidro), poliméricos (elastômeros e termoplásticos) e papel, cada um com a sua particularidade no que tange a microfabricação (GALINDO-ROSALES, 2017). As técnicas de microfabricação em microfluídica são determinantes para estabelecer parâmetros como tamanho dos canais, *layout*, limitações e aplicação dos microssistemas. Dentre as técnicas convencionais de microfabricação destacam-se os processos fotolitográficos, onde estruturas micrométricas (10–100  $\mu\text{m}$ ) são transferidas para um substrato sólido a partir do uso de radiação UV ou raios-X. Esse procedimento também foi desenvolvido inicialmente pela indústria da microeletrônica e adaptado para a microfluídica utilizando substratos como silício e vidro.

Os métodos de fabricação para substratos rígidos (silício e vidro, por exemplo) foram inicialmente adaptados de tecnologias baseadas em microssistemas eletromecânicos (MEMS), os quais inicialmente utilizaram técnicas previamente utilizadas na indústria de



circuitos integrados. Nessa categoria processos como fotolitografia, deposição de vapor químico, pulverização catódica (*sputtering*) são utilizados. Grande parte dessas metodologias são consideradas de alto consumo energético e/ou de longa duração e faz com que a reprodutibilidade e viabilidade de microsistemas baseados em vidro seja deficitária (COLTRO et al., 2007). Essas desvantagens fazem com que as metodologias de fabricação em substratos rígidos não sejam convenientes, por exemplo, no que tange o desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em sistemas microfluídicos, onde diversos parâmetros são avaliados e a construção de um único dispositivo baseados em silício ou vidro impossibilita a averiguação destes parâmetros.

Para contornar este problema, metodologias de microfabricação baseadas na fotolitografia suave (do inglês *soft lithography*) são bastante utilizadas em sistemas microfluídicos devido a características como baixo custo de replicação, facilidade e conveniência na fabricação. De uma forma geral, essa abordagem envolve a cura de um material polimérico (elastômeros) na superfície de um molde que contém o dispositivo microfluídico (comumente feito de materiais como o silício). Os elastômeros apresentam fácil remoção da superfície do molde e assim, a replicação dos mesmos é obtida com certa simplicidade operacional, permitindo uma relação custo-benefício satisfatória (XIA; WHITESIDES, 1998).

### 3.3.1 Substratos poliméricos

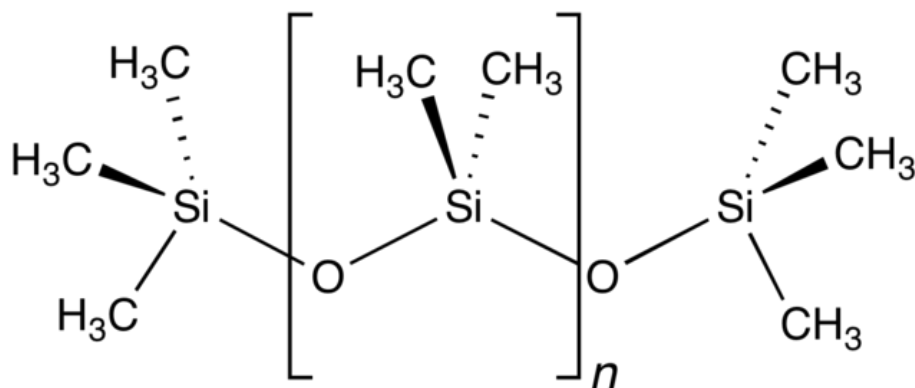
Substratos poliméricos emergiram como alternativa aos convencionais substratos baseados em vidro e silício. A utilização de substratos poliméricos deve-se, primordialmente, à simplicidade de uso e baixo-custo destes materiais. Além disso, a ampla disponibilidade de diferentes materiais plásticos, que possuem propriedades e características singulares, permite aplicações distintas para cada material (BECKER; LOCASCIO, 2002; TSAO, 2016).

De acordo com Tsao (2016), a escolha do polímero a ser utilizado na microfabricação tem como primeiro passo a identificação da aplicação e as condições experimentais necessárias. O próximo passo é a escolha do polímero tomando como critério a aplicação. De forma geral, existem duas classes principais nos quais os substratos

poliméricos podem se encaixar. A primeira categoria é composta pelos polímeros termoplásticos que apresentam como principais características a rigidez, boa estabilidade mecânica, e resistência a solventes, ácidos e bases. Estas características fazem com que dispositivos construídos com esses polímeros sejam utilizados em diversas aplicações bioanalíticas. Entre os principais termoplásticos estão o PC (policarbonato), PS (poliestireno) e PMMA (polimetil-metacrilato) A segunda categoria é composta pelo elastômero polidimetilsiloxano, popularmente chamado de PDMS.

O PDMS (Figura 10) é um polisiloxano, uma importante classe de polímeros que apresenta na unidade monomérica um átomo de silício ligado ao oxigênio e dois grupos orgânicos  $-R$  ligados ao silício. Com fórmula empírica  $(C_2H_6OSi)_n$ , onde  $n$  denota a quantidade de unidades monoméricas presentes no polímero. A depender da quantidade dessas unidades monoméricas, o PDMS pode se apresentar como um líquido viscoso (baixo número de  $n$ ) ou um semi-sólido (alto número de  $n$ ) (O'BRIEN, 2003).

**Figura 10** – Estrutura do PDMS, demonstrando sua unidade monomérica.



**Fonte:** Adaptado de O'Brien, 2003.

De grande elasticidade e passível de deformação com a aplicação de força ou pressão de ar, o PDMS apresenta grande biocompatibilidade com diversas biomoléculas e células, propriedades ópticas excelentes, estabilidade térmica (até 186 °C). Entre as principais desvantagens que o PDMS apresenta, estão a possibilidade de deformação dos canais, baixa resistência a solventes e variações de pH (meios extremamente ácidos ou

básicos). Por apresentar grupos ionizáveis, o PDMS pode ser utilizado para induzir um fluxo eletrosmótico de forma análoga ao que acontece nos capilares de sílica (XIA; WHITESIDES, 1998).

A Tabela 2 compara as propriedades de diferentes polímeros no que tange as principais características físicas dos mesmos. Evidencia-se que a depender da aplicação desejada, um tipo específico de polímero pode ser empregado.

**Tabela 2** – Propriedades dos polímeros comumente utilizados como substratos em sistemas microfluídicos

| Polímero                   | PDMS       | Termoplásticos |        |        |
|----------------------------|------------|----------------|--------|--------|
|                            |            | PC             | PMMA   | PS     |
| Propriedade mecânica       | Elastômero | Rígido         | Rígido | Rígido |
| Resistência à solventes    | Ruim       | Boa            | Boa    | Boa    |
| Resistência à ácidos/bases | Ruim       | Boa            | Boa    | Boa    |
| Transmissividade ótica     | Boa        | Ruim           | Boa    | Ruim   |
| Biocompatibilidade         | Boa        | Boa            | Boa    | Boa    |

**Fonte:** Adaptado de Tsao, 2016.

### 3.4 Aditivos utilizados em eletroforese capilar

De acordo com Tavares (1997), aditivos podem ser utilizados em eletroforese capilar para facilitar processos de detecção e/ou separação. O emprego desses aditivos é indicado em situações onde se faz necessário a solubilização de solutos ou compostos presentes na matriz da amostra, redução da interação de solutos com a parede do capilar (minimização da adsorção), alteração da mobilidade do soluto e modificação do fluxo eletrosmótico. A Tabela 2 apresenta alguns dos aditivos empregados em eletroforese capilar e suas respectivas funções.

**Tabela 3** – Aditivos comumente utilizados em eletroforese capilar

| <b>Aditivo</b>         | <b>Função</b>  |
|------------------------|--|
| Aminas                 | Bloqueiam sítios ativos na superfície do capilar e reduzem adsorção e assimetria de pico |
| Anfólitos              | Reduzem a interação soluto-capilar e melhoram a resolução e simetria de pico             |
| Polímeros de celulose  | Agentes modificadores do fluxo eletroosmótico  |
| Solventes orgânicos    | Aumentam a solubilidade de solutos orgânicos. Reduzem a interação soluto-capilar.        |
| Tensoativos catiônicos | Revertem o fluxo eletroosmótico  |

**Fonte:** Adaptado de Tavares, 1997.

Tensoativos são bastante utilizados em Química Analítica devido à possibilidade de modificar o meio reacional e melhorar tanto a sensibilidade quanto a seletividade analítica. De forma geral, os tensoativos tem estruturas do tipo R–X, onde R é uma cadeia de hidrocarbonetos comumente linear (de 8 a 18 átomos) e X é um grupamento polar ou iônico. Para os tensoativos catiônicos, a estrutura geral obedece a fórmula  $R_nX^+Y^-$ , onde R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X representa um elemento que pode formar uma estrutura catiônica e Y é o seu contra íon (MANIASSO, 2001).

A utilização de surfactantes (tensoativos catiônicos) em eletroforese capilar para a otimização do fluxo eletroosmótico e também do processo de separação tem sido utilizado devido aos efeitos decorrentes da adição destes ao sistema. Surfactantes podem interagir com a parede do capilar (ou canal) e modificar a magnitude e polaridade do EOF assim como interagir com os analitos e assim facilitar a separação dos mesmos (BECKERS; BOČEK, 2002; DIRESS; LUCY, 2004; GUO; FUNG, 2011; TAVARES, 1996). Diress e Lucy (2004) reportaram que o uso de surfactantes catiônicos como o brometo de trimetil tetradecilamônio (TTAB) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) faz com que a migração de analitos aniônicos aumente, fazendo com que o analito migre em direção à zona de detecção. Para tanto, os surfactantes catiônicos devem ser adicionados ao tampão de corrida.

Guo e Fung (2011) fabricaram um dispositivo microfluídico baseado em PMMA para a separação e detecção (Via UV–Vis) de espécies aniônicas presentes na urina que são biomarcadores de urolitíase, comumente chamada de pedra nos rins. Os marcadores monitorados foram ácido cítrico, ácido oxálico e ácido úrico. Os autores reportam que em meio alcalino, todos os biomarcadores existem na sua forma aniônica e a detecção dessas espécies nesse meio é facilitada devido a uma maior absorção em 210 nm. Desta forma, os autores avaliaram a influência de dois surfactantes, SDS (surfactante aniônico) e CTAB (surfactante catiônico) na eficiência de separação das espécies. Quando o SDS foi utilizado numa concentração de 5 mM, tanto o tempo de migração quanto o ruído de fundo aumentam. Isto ocorre devido ao fato de que o EOF estava migrando na direção contrária ao campo elétrico negativo aplicado no microchip. Por outro lado, quando 0.5 mM de CTAB foi adicionado ao tampão de corrida, tanto a EOF quanto o campo elétrico migraram na mesma direção. Desta forma, a inversão da EOF reduziu tanto o tempo de migração quanto o ruído de fundo, levando a uma maior sensibilidade e separação mais rápida.

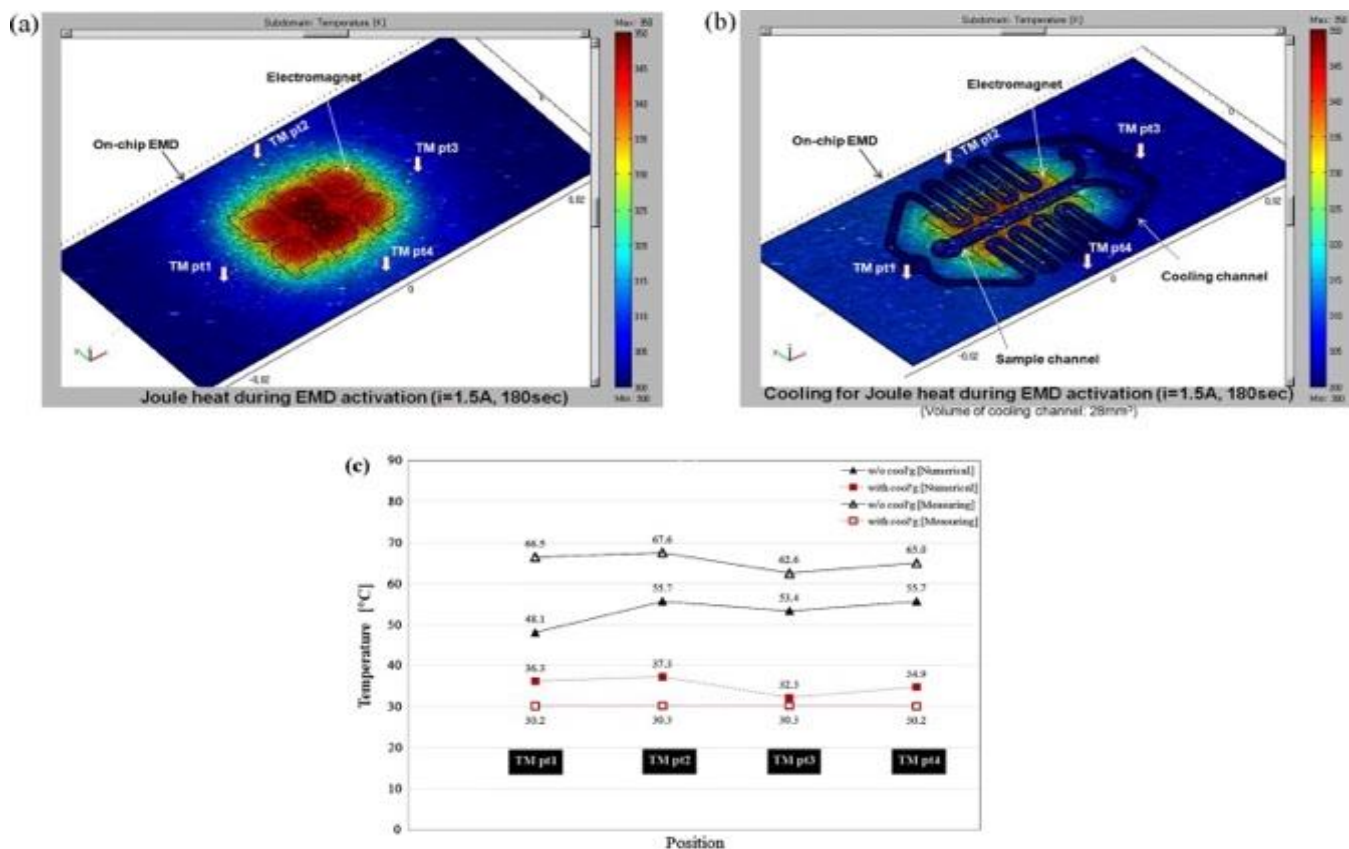
### **3.4.1 Influência da temperatura em sistemas microfluídicos: Efeito Joule**

A condução de corrente elétrica através de uma solução eletrolítica gera calor através das colisões entre os íons e moléculas do tampão. Uma vez que altos campos elétricos são aplicados em eletroforese capilar, o efeito Joule tem grande importância e algumas implicações são decorrentes deste fenômeno. Além do desenvolvimento de gradientes térmicos dentro do capilar, há também o aumento da temperatura dentro do capilar devido à ineficiente dissipação do calor. Neste caso, o calor dissipado não é igual ao calor produzido e desta forma a temperatura dentro do capilar pode aumentar levando à evaporação do tampão, ocasionando bolhas que atrapalham a passagem de corrente dentro do capilar (SONG; KWAK; JUNG, 2009; WEINBERGER, 2000).

Algumas alternativas para contornar o efeito Joule são propostas na literatura. Song e colaboradores (2009) desenvolveram um dispositivo microfluídico voltado para separações biológicas onde o efeito Joule foi compensado pela utilização de um canal de resfriamento preenchido com um líquido refrigerante que possibilitou a dissipação da energia térmica na área ativa do dispositivo e concomitante manutenção da temperatura do

mesmo. Como denotado na Figura 11, a utilização deste canal de resfriamento levou a uma diminuição da temperatura do microchip. Sem a utilização do líquido, verificou-se que a temperatura do dispositivo ficou na faixa de 62–68°C. Com a utilização do líquido, a temperatura da zona ativa permaneceu em 30°C.

**Figura 11** – Avaliação da temperatura de um microchip com adição de líquido refrigerante para a diminuição do efeito Joule.



**Fonte:** Song e colaboradores, 2009.

### 3.5 Técnicas de Injeção em Microchip eletroforese

A injeção da amostra em microchip eletroforese é uma das etapas mais importantes do processo analítico. De forma geral, a quantidade de amostra injetada é de apenas alguns microlitros, o que faz com que a injeção seja um dos parâmetros fundamentais para a análise. A injeção apresenta certa peculiaridade visto que, na maioria dos casos, o

reservatório de detecção (que contém eletrodos de trabalho, referência e auxiliar/contra) deve estar aterrado (*ground*), o que não é um parâmetro necessário quando a detecção óptica é utilizada nesses microssistemas, visto que a voltagem pode ser aplicada no reservatório de detecção sem alterar a resposta do detector (GARCÍA; CHUMBIMUNI-TORRES; CARRILHO, 2013; WHATLEY, 2001)

Fatores como a qualidade de separação dos analitos e repetitividade analítica são decorrentes da introdução da amostra. Desta forma, duas abordagens principais utilizadas desde o início da eletroforese capilar são presentes na literatura: Injeção hidrodinâmica e injeção eletrocinética.

### 3.5.1 Injeção hidrodinâmica

A injeção hidrodinâmica tem como princípio o volume de amostra injetado a partir de uma pressão aplicada na extremidade do capilar imersa na solução da amostra, conforme a equação 2:

$$V = \frac{\Delta p \pi r^4 t_{inj}}{8 \eta L} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde  $V$  é o volume injetado,  $\Delta p$  é a diferença de pressão aplicada,  $r$  é o raio interno do capilar,  $t_{inj}$  é o tempo de injeção,  $\eta$  é a viscosidade da solução injetada e  $L$  é o comprimento total do capilar. O número de partículas injetadas pode ser calculado substituindo  $V$  por  $Q_i/C_i$ , conforme a equação 6:

$$Q_i = \frac{\Delta p \pi r^4 C_i t_{inj}}{8 \eta L} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde  $Q_i$  é a quantidade de partículas (em mols) da amostra injetada e  $C_i$  é a sua concentração. Como consequência dessa equação, nota-se que a quantidade da amostra injetada é diretamente proporcional à concentração da amostra. Além disso, uma pequena fração de amostra injetada é representativa frente a composição original da amostra (GARCÍA; CHUMBIMUNI-TORRES; CARRILHO, 2013).

As principais vantagens na injeção hidrodinâmica estão relacionadas com o volume de amostra praticamente constante, o que depende da injeção ou não de espécies com viscosidade diferente e/ou mudanças bruscas na temperatura. As principais desvantagens estão relacionadas com as já citadas diferenças de viscosidade e também as dificuldades de

controle de parâmetros como a acurácia no tempo de injeção, repetitividade de todos os procedimentos e a altura de elevação do capilar (quando utilizada a injeção por gravidade), principalmente em sistemas do tipo *homemade* (COLTRO et al., 2007; WHATLEY, 2001).

Três modos de injeção hidrodinâmica são reportados na literatura: Injeção por gravidade, injeção por pressão e injeção à vácuo. Todas essas metodologias diferem apenas na forma em que a diferença de pressão é alcançada. A injeção por gravidade utiliza uma abordagem simples pois não necessita de válvulas de injeção ou dispositivos para pressão. O capilar de separação preenchido com o eletrólito de suporte funciona como uma coluna do líquido. Quando uma extremidade do capilar é elevada a uma altura específica,  $\Delta_h$ , o fluxo hidrodinâmico é alcançado. A taxa de fluxo volumétrico,  $F$ , pode ser calculado a partir da equação de Hagen–Poiseuille:

$$F = \frac{\Delta h \rho g \pi r^4}{8 \eta L} \quad \text{Equação (7)}$$

Onde  $\Delta_h$  é a diferença de altura,  $\rho$  é a densidade do líquido e  $g$  é a aceleração da gravidade. O volume injetado é, portanto, o produto da taxa de fluxo volumétrico e o tempo pelo o qual o capilar está suspenso. Sabendo a diferença de altura, duração de injeção e os parâmetros da solução e do capilar, pode-se realizar o cálculo para saber exatamente o volume injetado. Na injeção por pressão, a diferença de pressão é obtida por meio de bombas de ar com alta precisão. Esta abordagem tem maior aplicação devido às injeções terem maior reprodutibilidade. O terceiro modo de injeção hidrodinâmica, a injeção por vácuo, utiliza obviamente um sistema de vácuo para obter a injeção da amostra não apresenta relevantes aplicações presentes na literatura (GARCÍA; CHUMBIMUNITORRES; CARRILHO, 2013; WHATLEY, 2001).

### 3.5.2 Injeção eletrocinética

A injeção eletrocinética é a outra forma de introdução da amostra possível na eletroforese capilar. Da mesma forma que a injeção por gravidade presente na injeção hidrodinâmica, este tipo de injeção não necessita de aparelhagem complexa. Nesta forma de injeção, um eletrodo é colocado na extremidade do capilar onde a amostra está presente e uma alta voltagem é aplicada através do capilar por um curto período. Este tipo de injeção baseia-se no fluxo proveniente do EOF para o bombeamento da amostra. A quantidade da



amostra injetada depende, entre outros fatores, da mobilidade eletroforética,  $\mu_i$ , e da condutividade da amostra. Neste modo, a quantidade de amostra injetada pode ser obtida a partir da fórmula presente na equação (8):

$$Q_i = \frac{[\mu_i(k_e/k_s) + \mu_{EOF}] \pi r^2 c_i t_{inj} V_{inj}}{L} \quad \text{Equação (8)}$$

Onde  $Q_i$  é a quantidade da espécie que é injetada,  $\mu_i$  é a mobilidade eletroforética da espécie,  $\mu_{EOF}$  é a mobilidade do EOF,  $k_e/k_s$  é a razão da condutividade do tampão de corrida e a amostra e  $V_{inj}$  é a voltagem aplicada para a injeção da amostra. Neste caso, a quantidade de amostra injetada está relacionada com a própria mobilidade eletroforética da amostra juntamente com a sua condutividade. As vantagens para este tipo de injeção estão relacionadas com a simplicidade de injeção da amostra e melhor sensibilidade de análise frente à injeção hidrodinâmica. Entretanto, a reprodutibilidade da injeção eletrocinética é um pouco menor do que a injeção hidrodinâmica (GARCÍA; CHUMBIMUNI-TORRES; CARRILHO, 2013).

As desvantagens da injeção eletrocinética, entretanto, estão relacionadas com dois parâmetros principais. O primeiro tem respeito à mobilidade dos íons. Íons que possuem mobilidade eletroforética elevada tendem a estar numa quantidade maior de amostra injetada do que os íons que tem baixa mobilidade. Desta forma, a composição da amostra injetada não corresponde de modo fiel a composição da amostra original. O segundo problema relacionado à injeção eletrocinética refere-se à composição da amostra. Sabendo que a quantidade de amostra injetada depende da condutividade/resistividade da amostra (denotada pelo termo  $k_e/k_s$ ), tem-se que se duas amostras com a mesma concentração de um determinado íon possuem diferentes condutividades, a quantidade deste íon a ser injetada será diferente nas duas amostras. Do ponto de vista prático, três variações da injeção eletrocinética são possíveis: *Unpinched*, *pinched* e *gated*. Essas abordagens podem ser utilizadas em microssistemas em forma de cruz e a escolha de do tipo de injeção depende de fatores como tipo de amostra, precisão requerida para a análise e, mais importante, da fonte de voltagem disponível (FISCHER et al., 2009).

Forma mais simples de injeção eletrocinética, a injeção *unpinched* consiste na aplicação de alta voltagem no reservatório da amostra por cerca de 1–5 segundos, com o

reservatório de detecção funcionando como *ground*. Durante este curto espaço de tempo, a amostra é introduzida no canal de separação devido às forças eletrocinéticas. Logo em seguida, a alta voltagem é aplicada no reservatório do tampão e a separação é iniciada. Apesar de ser a forma mais simples de injeção eletrocinética, a injeção *unpinched* pode causar injeções não reprodutíveis (FISCHER et al., 2009; PENG et al., 2018).

Uma alternativa para a obtenção de injeções com melhor reprodutibilidade está na injeção *pinched*. Essa abordagem utiliza o controle da voltagem em todos os reservatórios e a intersecção. Inicialmente a região de intersecção do microchip é preenchida com a aplicação de potencial negativo no reservatório de descarte da amostra, tendo os reservatórios de amostra, tampão e detecção estando como *ground*. Em seguida, a separação é iniciada pela aplicação de voltagem no reservatório do tampão e uma voltagem menor nos reservatórios de amostra e descarte da amostra (FISCHER et al., 2009; PENG et al., 2018).

O terceiro modo de injeção eletrocinética é do tipo *gated*, onde há o controle da voltagem em cada reservatório. Neste modo de injeção, dois fluxos são mantidos continuamente tendo uma alta tensão sendo aplicada no reservatório do tampão e uma fração dessa alta tensão aplicada ao reservatório de amostra com o descarte do tampão e o descarte de amostra e reservatório de detecção funcionando como *ground*. Este comportamento resulta num fluxo de amostra em direção ao descarte da amostra e um fluxo de separação do reservatório do tampão para o reservatório de detecção (FISCHER et al., 2009; HENRY, 2006).

### 3.6 Detecção em microchip eletroforese

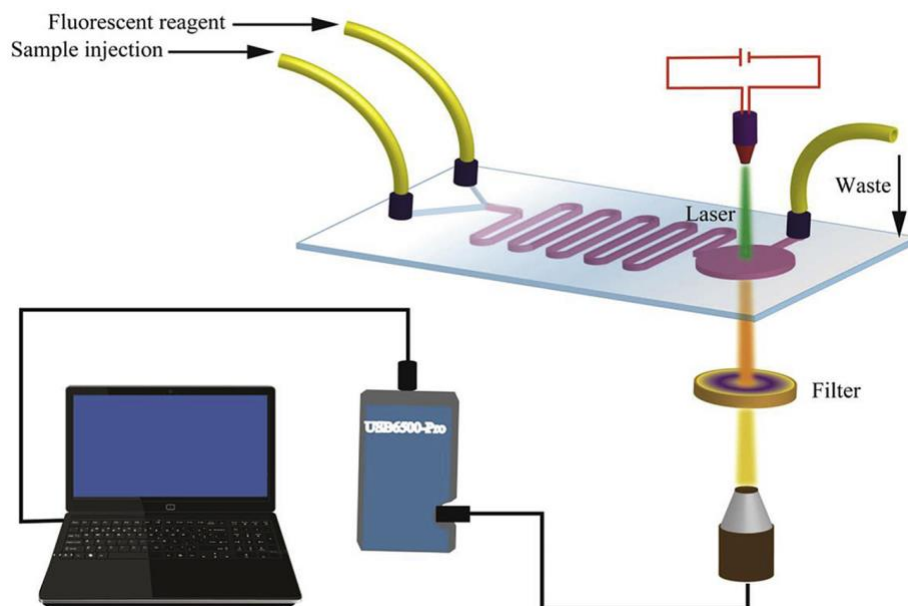
O baixo volume de amostra introduzido no capilar ou canal microfluídico faz com que a detecção de analitos em sistemas que utilizam a eletroforese capilar como técnica de separação seja um dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento de metodologias analíticas. De forma geral, três grupos de detecção são passíveis de utilização: Detecção óptica, onde são utilizadas técnicas como espectroscopia Raman, absorção na região do ultravioleta-visível ou infravermelho, fluorescência e quimiluminescência; Detecção com métodos acoplados, com a utilização de espectrometria de massas, ressonância magnética

nuclear e espectrometria de emissão com plasma indutivamente acoplado (ICP– OES) e; Detecção eletroquímica, onde destacam-se as técnicas de amperometria, voltametria, condutimetria e potenciometria (MARK et al., 2010; OOSTHOEK-DE VRIES et al., 2017; PENG et al., 2017; SILVA, 2003; ZHAI et al., 2018).

Sistemas de detecção baseados em fluorescência utilizam uma fonte externa de energia para excitar as moléculas do analito a um estado de alta energia. Quando essas moléculas retornam ao estado energético normal, elas emitem energia com um comprimento de onda menor que pode ser detectado e utilizado como evidência da passagem do analito. Grande parte dos detectores fluorescente utilizados em eletroforese capilar e sistemas microfluídicos utilizam lasers como fonte de energia, o que comumente é chamado de fluorescência induzida (ou LIF, do inglês *Laser-Induced Fluorescence*). Nesta abordagem, os lasers possuem a vantagem de produzir luz intensa num único comprimento de onda. A natureza monocromática do laser também possibilita a diminuição de interferências na detecção do analito.

Peng e colaboradores (2018) desenvolveram uma metodologia analítica para a determinação de Hg(II) em um dispositivo microfluídico com a utilização de uma molécula derivada da Rodamina B para derivatização *online* e detecção via LIF. Neste trabalho, a resposta analítica foi linearmente proporcional à concentração de Hg(II) e a faixa linear foi obtida no intervalo de 0 – 70  $\mu\text{M}$ , com limite de detecção de 0,031  $\mu\text{M}$ . A metodologia também foi aplicada na determinação de Hg(II) em amostras ambientais de água e a metodologia de *spiking* para o analito obteve recuperação entre 85% e 103%. Também utilizando a detecção via LIF, Peng e colaboradores (2017) desenvolveram uma metodologia baseada na utilização de nanotubos de carbonos de paredes múltiplas como adsorvente para a extração e preconcentração de Cr(III) em amostras de água (Figura 12). Após a preconcentração da amostra, um dispositivo microfluídico com derivatização *online* foi utilizado para a detecção espectroscópica. O sistema otimizado apresentou faixa linear de 0 – 10 nM, com limite de detecção de 0,094 nM e um fator de enriquecimento de 38. As amostras reais utilizadas apresentaram recuperação entre 91,0 e 101,6%.

**Figura 12** – Resumo gráfico do trabalho de Peng e colaboradores para detecção via LIF de Cr(III) em amostras de água após derivatização online.

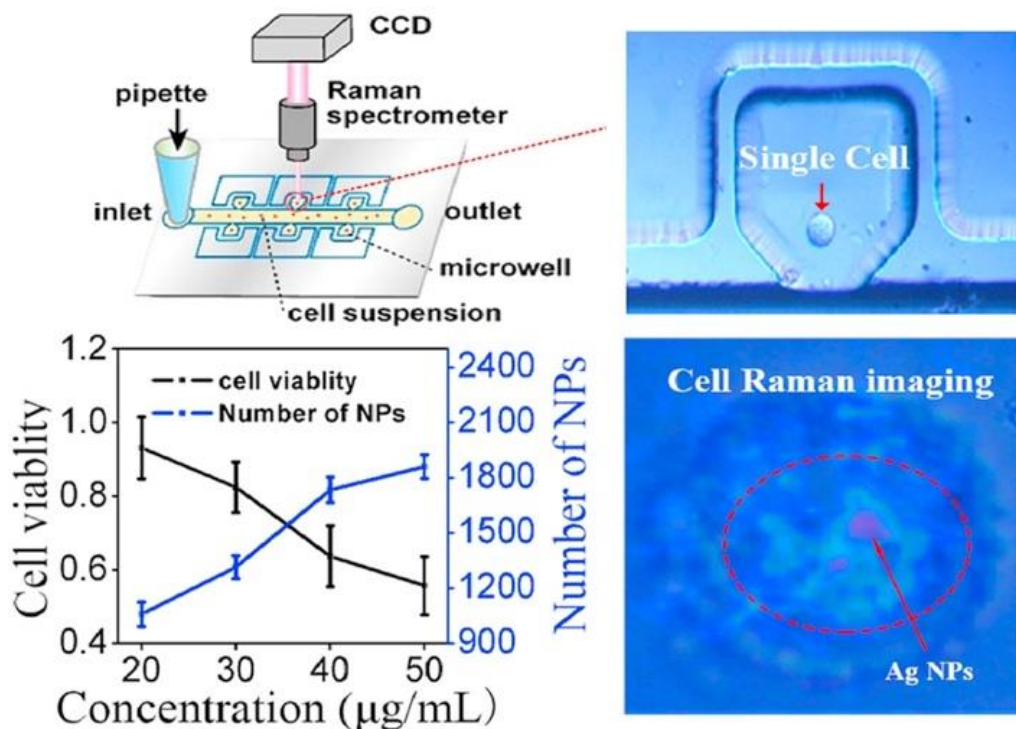


**Fonte:** Peng e colaboradores, 2017.

Técnicas espectrofotométricas em sistemas microfluídicos podem também serem utilizadas em estudos de avaliação de toxicidade em células. Zhai e colaboradores (2018) desenvolveram um dispositivo microfluídico que utiliza Espectroscopia Raman para a avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata (Ag-NPs) em células (Figura 13). Essas nanopartículas apresentam propriedades antibacterianas e são empregadas em diversos produtos farmacêuticos. Apesar de existir uma certa toxicidade associada ao uso das Ag-NPs, estudos para determinar a relação direta entre o número de nanopartículas em células e a toxicidade dessas são escassos. Neste trabalho, um dispositivo microfluídico baseado em vidro e quartzo foi desenvolvido para separar e aprisionar células da linhagem HeLa na presença de Ag-NPs. Estas células foram analisadas via Espectroscopia Raman amplificada por superfície e verificou-se que o aumento da concentração das nanopartículas, e concomitantemente o aumento do número de Ag-NPs presentes no meio diminuiu a viabilidade celular, demonstrando assim a citotoxicidade dessas nanopartículas. A Figura 13 mostra as principais etapas do trabalho, desde o funcionamento do sistema microfluídico

até os resultados de imageamento celular que comprovam a presença das Ag-NPs dentro das células.

**Figura 13** – Resumo gráfico do trabalho de Zhai e colaboradores (2018) no desenvolvimento de sistema microfluídico para determinação da citotoxicidade celular proveniente do uso de Ag-NPs.



**Fonte:** Zhai e colaboradores, 2018.

Ruecha e colaboradores (2011) desenvolveram um dispositivo microfluídico tendo PDMS como substrato principal para determinação de colesterol utilizando ensaios enzimáticos acoplados a detecção amperométrica. Em linhas gerais, o trabalho baseia-se na reação da enzima colesterol oxidase, que fluem dentro do dispositivo devido ao fluxo eletrosmótico, com a geração de peróxido de hidrogênio, o qual pode ser monitorado amperometricamente utilizando um eletrodo de ouro. Comparando as correntes na presença e ausência da enzima, os pesquisadores puderam mensurar a quantidade de colesterol presente. Os autores reportam também que esta metodologia possibilita um baixo limite de detecção (1nM) e rapidez na detecção (<100s). Oosthoek-de Vries e colaboradores (2017) desenvolveram um microchip microfluídico aplicado à espectroscopia de ressonância

magnética nuclear de hidrogênio e carbono ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR) para a identificação de duas moléculas modelo (mentol e crotonato de etila). Os autores reportam que esse dispositivo possibilita a operação em fluxo com baixíssimos volumes utilizados na detecção (aproximadamente 150 e 250 nL), o que garante que não sejam necessárias diluições da amostra, o que levaria à diminuição do sinal da amostra frente ao solvente.

### 3.6.1 Detecção eletroquímica em microchip eletroforese

Além dos diversos trabalhos presentes na literatura que reportam sistemas de detecção baseados em técnicas ópticas, as técnicas eletroquímicas de detecção possuem notável relevância. Em geral, os sistemas de detecção eletroquímicos apresentam alta sensibilidade, facilidade de operação, instrumentação miniaturizada e seletividade elevada. A detecção eletroquímica comumente utiliza um sistema contendo eletrodo de trabalho (onde o potencial varia linearmente com o tempo), eletrodo de referência (que apresenta potencial constante durante o experimento) e um contraeletrodo (geralmente um fio de platina) com a corrente no sistema fluindo do eletrodo de trabalho para o contraeletrodo (SKOOG et al., 2017). A construção e utilização da detecção eletroquímica envolve o posicionamento de eletrodos, os quais podem ser incorporados aos microchips durante a fabricação dos mesmos, levando a uma melhor reprodutibilidade do sistema. Sistemas de detecção eletroquímica em microchip eletroforese podem ser subdivididos em condutométricos, potenciométricos ou amperométricos.

A detecção amperométrica é uma das mais utilizadas em microchip eletroforese devido a uma gama de fatores tais como ampla variedade de analitos passíveis de detecção, baixos limites de detecção e baixo custo quando comparada com outros sistemas de detecção, como LIF. A detecção amperométrica é baseada na oxidação ou redução do analito na superfície do eletrodo de trabalho, onde a variação na corrente elétrica decorrente da passagem de elétrons em direção ao eletrodo (ou no sentido inverso) é proporcional à concentração do analito presente, conforme a equação 9:

$$i = -AnFD \frac{c}{\delta_N} \quad \text{Equação (9)}$$

Onde  $i$  representa a corrente medida durante a amperometria,  $A$  é a área do eletrodo,  $n$  é o número de elétrons envolvidos no processo redox,  $F$  é a constante de Faraday,  $D$  é o coeficiente de difusão,  $\delta v$  é a espessura da camada de difusão e  $c$  representa a concentração do analito (GARCÍA; CHUMBIMUNI-TORRES; CARRILHO, 2013).

Apesar da amperometria possibilitar a detecção tanto da oxidação quanto a redução de um determinado analito, a detecção via oxidação é comumente mais utilizada tendo em vista devido a interferência do oxigênio dissolvido que ocorre quando a detecção via redução é utilizada. Um fator especial a ser mencionado nas detecções amperométricas é que o potencial a ser aplicado para induzir a oxidação ou redução das espécies deverá ser suficientemente positivo ou negativo, respectivamente, para que seja garantida a detecção do analito além de evitar a detecção de possíveis interferentes presentes na amostra (POL et al., 2017; WHATLEY, 2001).

Uma variação da detecção amperométrica convencional é a detecção por amperometria de pulso (ou PAD, do inglês *Pulse Amperometric Detection*), sendo esta técnica utilizada em situações em que a oxidação da superfície do eletrodo de trabalho ocorre após diversas análises. Esta metodologia de análise é utilizada geralmente para a análise de espécies que não apresentam eletroatividade apreciável como carboidratos e aminoácidos (GARCÍA; CHUMBIMUNI-TORRES; CARRILHO, 2013; GARCÍA; HENRY, 2003). A PAD ocorre em mais de uma etapa, ou pulsos:

1. Na primeira etapa ocorre a limpeza da superfície do eletrodo pela aplicação de um potencial positivo para a remoção de qualquer produto que presente na superfície do eletrodo.
2. Uma vez limpa, a superfície é condicionada pela aplicação de um potencial negativo que regenera a superfície metálica do eletrodo.
3. A terceira e última etapa é a aplicação do potencial de trabalho no qual a análise será realizada. Para determinar os potenciais de limpeza e condicionamento, os potenciais de oxidação e redução do eletrodo são determinados via voltametria cíclica. Uma característica importante necessária para a utilização da PAD é a capacidade do eletrodo em oxidar e reduzir

continuamente sem a perda de material. Assim, metais como ouro (Au), platina (Pt), níquel (Ni) e cobre (Cu) são utilizados para este tipo de detecção.

Trabalhos presentes na literatura tendo como base a amperometria de pulso evidenciam a potencialidade desta técnica de detecção. Utilizando a amperometria de pulso como sistema de detecção eletroquímico, Deore e colaboradores (2002) propuseram a determinação de aminoácidos através da oxidação de eletrodo de cobre modificado com polipirrol. De acordo com os autores, a detecção destes aminoácidos é baseada na capacidade de complexação com o Cu(II), o que aumenta a dissolução eletroquímica do eletrodo e gera um aumento da corrente anódica observada. A adição do polipirrol é justificada pela formação de uma barreira de exclusão por tamanho para aumentar a sensibilidade e estabilidade do eletrodo de trabalho além de uma melhora na reprodutibilidade das análises. Parâmetros como potencial de detecção, limpeza e pH foram otimizados para uma melhor resposta do sistema, sendo essenciais para o desenvolvimento da metodologia analítica.

Apesar de todas essas condições que fazem com que a detecção por amperometria de pulso seja extremamente importante na detecção de aminoácidos e açúcares, esse sistema de detecção é comumente utilizado em sistemas de cromatografia líquida, sistemas em fluxo convencionais e eletroforese capilar, sendo escassos os trabalhos presentes na literatura que utilizem essa técnica em microssistemas de análise (GARCÍA; HENRY, 2003). A utilização dessa técnica nesta plataforma de análise, configura assim um desafio dentro do campo dos microssistemas de análise (ISLAM et al., 2018).

Além dos parâmetros supracitados, a detecção eletroquímica requer configurações de análise que devem ser verificadas para uma melhor detecção. Dentre essas configurações de análise o posicionamento do eletrodo é um dos mais importantes, visto que apresenta influência direta na detecção dos analitos.

### **3.6.2 Posicionamento do eletrodo de trabalho em microchip eletroforese**

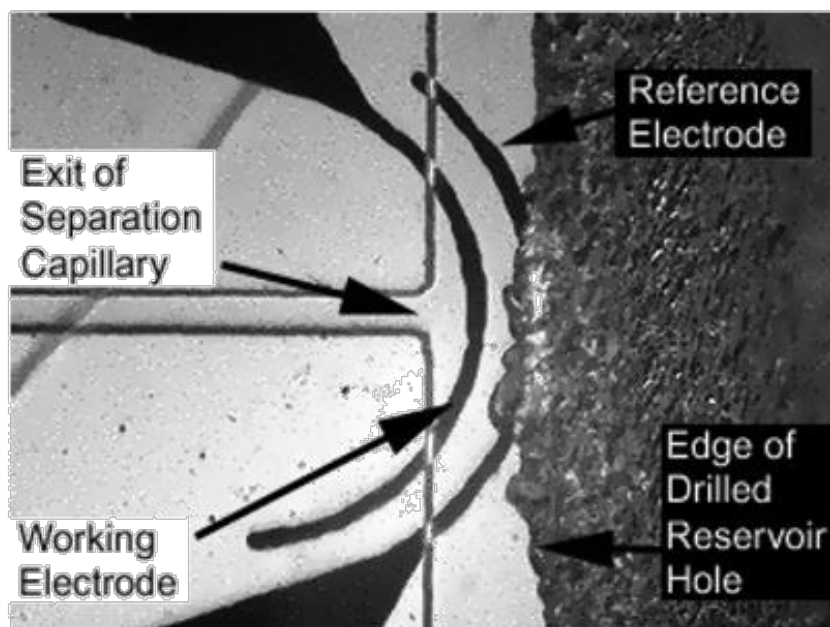
A utilização da amperometria como técnica de detecção em microchip eletroforese faz com que seja necessário o posicionamento do eletrodo de trabalho o mais próximo



possível da saída do canal para evitar o alargamento de banda no sinal amperométrico. Além disso, um dos principais problemas relacionados ao posicionamento do eletrodo está na proximidade da aplicação do sistema de separação do sistema de detecção. Esta proximidade pode levar à perturbação da resposta analítica do sistema de detecção e eventual dano ao potenciostato. Desta forma, o desacoplamento da alta voltagem aplicada e o sistema eletroquímico de detecção se torna um fator importante e necessário para possibilitar a detecção e separação de espécies em microchip eletroforese. Para tanto, três metodologias são empregadas no posicionamento do eletrodo de trabalho: posicionamento *end-channel*, *in-channel* e *off-channel* (FISCHER et al., 2009).

O posicionamento *end-channel* consiste no alinhamento do eletrodo de trabalho no final do canal de separação. O desacoplamento da alta voltagem ocorre devido a pequena distância do eletrodo de trabalho com relação ao canal de separação, suficiente para proteger o potenciostato da alta voltagem aplicada. Como exemplo do posicionamento *end-channel*, Baldwin e colaboradores (2001) desenvolveram um microchip eletroforese construído em vidro com eletrodos diretamente incorporados através de processos fotolitográficos para a detecção de dopamina e catecol como analitos de teste (Figura 14).

**Figura 14** – Esquema do posicionamento de eletrodo de trabalho na configuração *end-channel*.



**Fonte:** Baldwin e colaboradores, 2001.

No sistema proposto, o eletrodo de trabalho (eletrodo de platina) foi posicionado a cerca de 50 micrômetros de distância do canal de separação. Além disso, o posicionamento côncavo do eletrodo limita a difusão da amostra, o que pode gerar alargamento da banda no sinal amperométrico. O alargamento da banda é uma das principais desvantagens com este tipo de posicionamento devido a distância entre o canal de separação e o eletrodo de trabalho, com dispersão de amostra e perda de eficiência. Esta característica faz com que o posicionamento *end-channel* tenha performance inferior à detecção por LIF, onde o analito é detectado dentro ou na saída do canal de separação (RIOS; ESCARPA; SIMONET, 2009).

O posicionamento *in-channel* configura-se como uma alternativa ao posicionamento *end-channel* pois o eletrodo de trabalho é colocado diretamente no canal de separação. Para tanto, deve-se utilizar potenciostatos eletricamente isolados, os quais não precisam utilizar *ground* e desta forma o eletrodo de trabalho não é exposto ao campo elétrico decorrente da aplicação da alta voltagem.

Tanto o posicionamento *in-channel* quanto *end-channel* utilizam configurações onde o alinhamento do eletrodo de trabalho é fixo, levando a uma melhor reprodutibilidade das análises. Entretanto, algumas situações não permitem o uso de eletrodos integrados ao microchip e, portanto, uma abordagem diferente deve ser realizada. No posicionamento *off-channel*, o eletrodo de trabalho é posicionado fora do canal de separação e tendo um desacoplador (geralmente um eletrodo de platina ou paládio) sendo posicionado dentro do canal. Sendo assim, a tabela 4 elenca as principais características e configurações necessárias para cada posicionamento de eletrodo (GARCÍA; CHUMBIMUNI-TORRES; CARRILHO, 2013).

**Tabela 4** - Relação dos tipos de posicionamento de eletrodo em microchip eletroforese

| Posicionamento     | Configuração necessária                        | Características   |
|--------------------|--|---|
| <i>End-Channel</i> | Posicionamento preciso do eletrodo de trabalho | A distância canal-eletrodo pode ser ajustada                            |
| <i>Off-Channel</i> | O uso de um desacoplador é necessário          | Platina e paládio são metais comumente utilizados para o desacoplamento |
| <i>In-Channel</i>  | O uso de um potenciostato isolado é necessário | Alta eficiência de separação com detecção comparável ao LIF             |

**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

A utilização de desacopladores quando o posicionamento do tipo *off-channel* é utilizado tem sido abordada na literatura. De acordo com Rios e colaboradores (2009), um desacoplador tem a função de redirecionar a voltagem de separação para um *ground* e, desta forma, criar uma região com diminuta influência do campo elétrico, onde o analito tende a migrar pela influência do fluxo eletrosmótico gerado antes do desacoplador. Desacopladores são de extrema importância quando o posicionamento *off-channel* é empregado visto que, caso um desacoplador não seja utilizado, a alta voltagem proveniente do sistema de separação da amostra pode ter influência no sistema de detecção, podendo danificar o potenciostato utilizado (GARCÍA; CHUMBIMUNI-TORRES; CARRILHO, 2013; RIOS; ESCARPA; SIMONET, 2009).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo geral o desenvolvimento de metodologia analítica alternativa para a determinação e separação de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em amostras ambientais empregando um microchip eletroforese híbrido PDMS/vidro com canal simples integrado com detecção eletroquímica.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Fabricação das bases de PDMS e de vidro;
- Avaliação do comportamento eletroquímico do glifosato em cela eletroquímica utilizando eletrodo de trabalho de cobre;
- Avaliar a influência de diferentes sistemas tampão na resposta eletroquímica para detecção do glifosato;
- Avaliação do comportamento espectroscópico do complexo formado entre  $\text{Cu}_2^+$  e glifosato;
- Determinar o raio dos eletrodos de trabalho do tipo *homemade* utilizados para detecção em cela e em microchip;
- Determinar o mecanismo eletroquímico associado com o processo de detecção do analito;
- Construção do microchip híbrido PDMS/vidro integrado com detector eletroquímico, avaliando diferentes eletrodos de trabalho (Cu, Au e Pt);
- Otimizar parâmetros como o posicionamento do eletrodo para a detecção do analito;
- Otimização de parâmetros de injeção e separação da amostra;

## 5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 5.1 Equipamentos utilizados

Para as medições das massas dos reagentes utilizou-se balança analítica eletrônica Shimadzu modelo ATY224 com precisão de 0,1 mg. Para as medidas e ajustes de pH, utilizou-se um eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro QUIMIS, (Q400mt, Brasil). Eventualmente, a solubilização completa de alguns reagentes foi efetuada utilizando banho ultrassom da Cristófoli Equipamentos de Biossegurança LTDA (USC070236). Para as análises amperométricas utilizou-se um Potenciostato/galvanostato da Metrohm Autolab® (Modelo PGSTAT 12 AUT73222) interfaceado a um microcomputador controlado pelo software GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.7 eventualmente utilizando potenciostato/galvanostato da Metrohm Autolab® interfaceado a um microcomputador controlado pelo software NOVA® versão 2.1. Utilizou-se fonte de alimentação de alta voltagem com 2 canais (HV Rack, Ultravolt Inc., Ronkonkoma, NY, USA) para injeção eletrocinética. Medidas espectrofotométricas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo (Agilent, modelo HP 8453) equipado com cubetas de quartzo de 10mm de caminho óptico. A análise de dados foi realizada a partir dos gráficos obtidos utilizando o *software* Origin 8.0.

### 5.2 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico de pureza, não sendo necessária qualquer purificação adicional. sendo provenientes da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), Vetec Química (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, BR) Merck (São Paulo, SP, BR) e Dinâmica Química (Indaiatuba, SP, BR).As soluções foram preparadas com água ultrapura (condutividade elétrica  $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) e resistividade específica de  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  obtida a partir do purificador Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA). Diluições subsequentes das soluções foram efetuadas quando necessárias. As

unidades monoméricas do PDMS e o seu agente de cura utilizadas (Sylgard 184™ Silicone Elastomer) foram provenientes da Dow Corning (Elizabethtown, KY, USA).

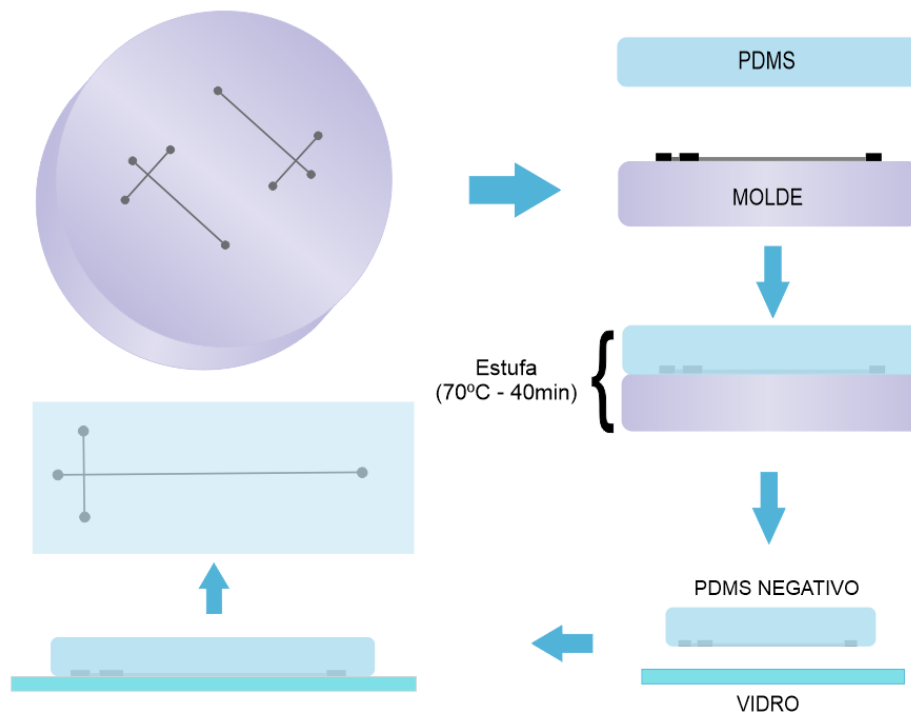
### 5.3 Preparo do microchip híbrido PDMS/Vidro

O preparo do microchip híbrido PDMS/Vidro foi efetuado conforme metodologia citada por Meneses e colaboradores (2015) e desenvolvida por Hulvey e colaboradores (2010). O molde de silício, desenvolvido pelo grupo da professora Susan Lunte (University of Kansas), apresenta canal de separação medindo 5 cm a partir da intersecção até o final do mesmo e braços laterais medindo 0,75 cm de comprimento, com design em T. A largura e a profundidade dos microcanais eletroforéticos foram de 40 e 15  $\mu\text{m}$ , respectivamente. No que tange a replicação do molde por litografia suave, o procedimento descrito abaixo foi utilizado:

1. Inicialmente o molde de silício foi limpo com a utilização de uma solução a partir da mistura, em proporção equivolúmica, de água deionizada, acetona e álcool isopropílico e posterior secagem com  $\text{N}_2$  gasoso tendo bastante cuidado com a força aplicada no processo para evitar a remoção dos canais;
2. Em seguida, o PDMS é preparado pela pesagem e mistura do elastômero e agente de cura na proporção 10:1 (m/m). Estes reagentes são homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro e na sequência o recipiente contendo-os é levado para um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo para a remoção das bolhas presentes no líquido. Após estar visualmente homogêneo e sem a presença de bolhas, o PDMS é depositado no molde e levado à estufa por 3h a 70°C;
3. O microchip de PDMS é retirado da estufa e a sua remoção do molde é feita de forma cuidadosa com o auxílio de uma espátula. O microchip então é envolto em parafilme, onde são anotados o lado superior e inferior do mesmo;

4. Para a confecção dos reservatórios, furos no polímero são realizados utilizando um perfurador de biópsia de 4 mm de diâmetro, exceto para o reservatório de resíduos/GND, onde foi utilizado um perfurador de 6 mm de diâmetro, e isso se fez necessário para diminuir os efeitos de campo produzido pela alta tensão aplicada nos canais de separação e referência.
5. O microchip de PDMS é então selado reversivelmente sobre vidro de borossilicato plano previamente limpo com a mesma mistura utilizada na primeira etapa e secagem com N<sub>2</sub> gasoso. Este vidro contém um eletrodo de Pt medindo 15 ou 50 µm de largura, o qual é utilizado como desacoplador. Um resumo gráfico do procedimento está presente na Figura 15:

**Figura 15** – Resumo gráfico do procedimento de preparo do microchip híbrido.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

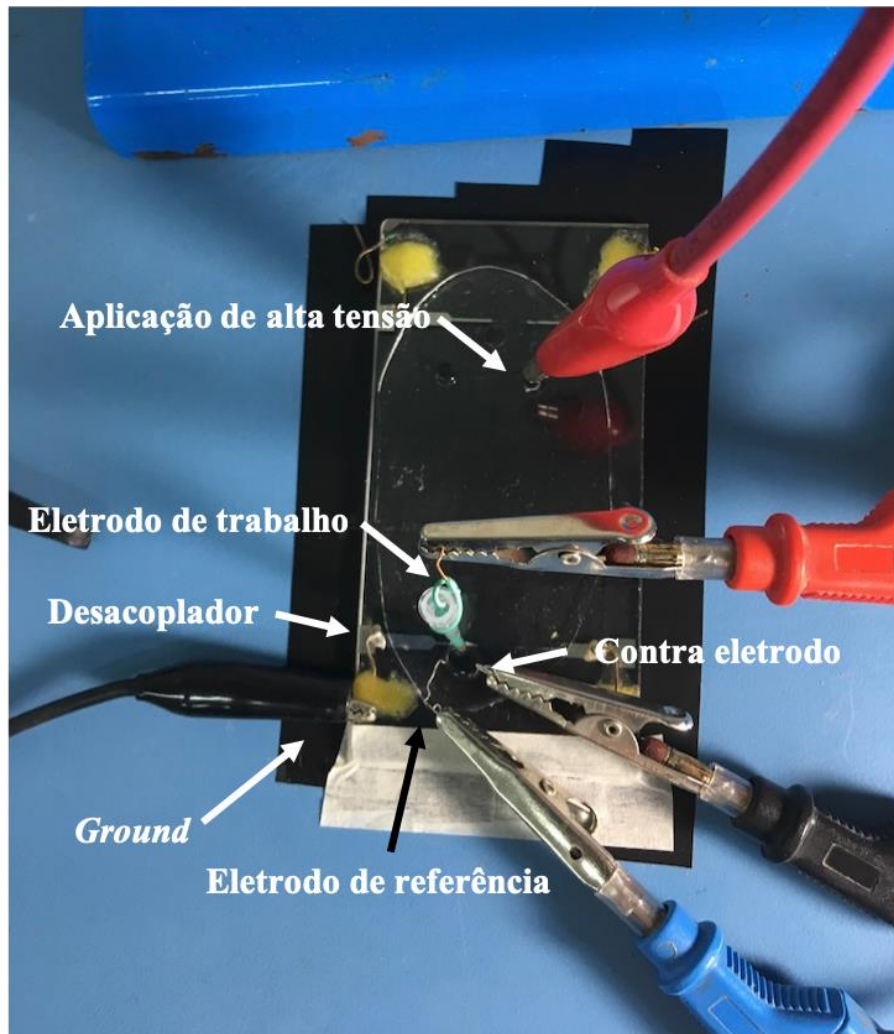
#### 5.4 Estudos Voltamétricos e Amperométricos

Os estudos voltamétricos para a averiguação do comportamento eletroquímico do eletrodo de trabalho e do glifosato foram realizados em duas configurações diferentes. Para os experimentos realizados em cela eletroquímica com volume de 5 mL, utilizou-se um sistema com três eletrodos sendo Ag/AgCl como eletrodo de referência, fio de platina como contra eletrodo e fio de cobre, ouro e platina como eletrodos de trabalho. Tampão fosfato (0,1M, pH 7,5) e NaOH (0,1M, pH 13) foram inicialmente avaliados como eletrólitos suporte.

Os experimentos realizados utilizando o reservatório de detecção do microchip como cela eletroquímica (aproximadamente 50  $\mu$ L de volume) foram realizados tendo fio de prata como eletrodo de referência, fio de platina como contra eletrodo (Conforme a Figura 16). Avaliou-se fio de cobre, ouro e platina como eletrodo de trabalho. A utilização do eletrodo de trabalho posicionado de forma perpendicular ao sistema de análise proporcionou um controle da área do eletrodo imersa dentro do microssistema. Além dos meios avaliados no procedimento anterior, avaliou-se também tampão borato (5 mM, pH 11,00) na presença de CTAB (200  $\mu$ M).



**Figura 16** – Esquema do funcionamento do microchip com os respectivos eletrodos utilizados.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

### 5.5 Preenchimento dos microcanais e teste eletroforéticos para avaliar possíveis obstruções do microchip híbrido PDMS/Vidro

O microchip híbrido PDMS/Vidro teve os microcanais preenchidos com o auxílio de uma bomba de vácuo, exercendo pressão negativa. Inicialmente três dos quatro reservatórios foram preenchidos com solução de água deionizada, sendo a pressão negativa sendo exercida no quarto reservatório por cerca de 5 minutos. Este procedimento foi repetido para todos os outros reservatórios, sempre aplicando pressão negativa em um dos

reservatórios. O mesmo processo foi aplicado utilizando NaOH 0,1M e o eletrólito suporte, respectivamente.

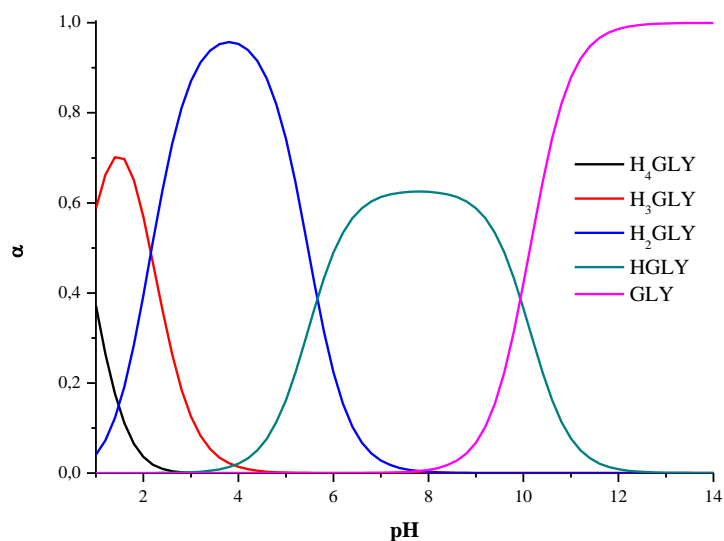
Após o preenchimento dos microcanais, o teste eletroforético foi realizado. Este teste é importante pois possibilita saber se os canais estão preenchidos e se há a passagem de corrente no meio. Para tanto, o seguinte procedimento foi realizado: Após o preenchimento dos microcanais com o eletrólito suporte, alta voltagem negativa foi aplicada (utilizando um eletrodo de platina) em um reservatório, com a presença do *ground* em outro reservatório. O procedimento foi repetido até que fosse possível averiguar a passagem de corrente em todos os reservatórios, o que comprova o preenchimento dos microcanais. Caso não fosse possível obter a passagem de corrente entre os reservatórios, o procedimento de preenchimento dos microcanais é realizado novamente utilizando o eletrólito suporte.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Avaliação do comportamento eletroquímico do glifosato em eletrodo de cobre com tampão fosfato como eletrólito suporte

Inicialmente a utilização do eletrodo de cobre como eletrodo de trabalho para a detecção do glifosato foi avaliada. Trabalhos presentes na literatura lançam mão de estratégias baseadas na complexação de Cu(II) com o glifosato. Esta complexação se faz possível devido ao fato de que, a depender do pH do meio, o glifosato apresenta-se como um ligante passível de complexação com íons metálicos. O gráfico presente na Figura 17 representa a distribuição das espécies de glifosato em função do pH do meio, onde o termo  $\alpha$  (que pode assumir valores entre 0 e 1) demonstra qual espécie de glifosato apresenta-se de forma majoritária. As espécies de carga líquida negativa de glifosato ( $H_2GLY$ ,  $HGLY$  e  $GLY$ ), capazes de complexar de forma efetiva com os íons Cu(II), apresentam-se majoritariamente disponíveis a partir de  $pH=5,6$ , o que demonstra a viabilidade dessas espécies em uma ampla faixa de pH. Adicionalmente, o valor para a constante de estabilidade para o complexo Cu(II)-glifosato é de 11,92, o que garante a formação de um complexo estável entre o íon metálico e o ligante em  $pH 7,5$  (COUTINHO; MAZO, 2005; PEIXOTO et al., 2015).

**Figura 17** – Distribuição das espécies de glifosato em função do pH. Valores de pKa utilizados para a elaboração do gráfico:  $pK_{a1} = 0,8$ ;  $pK_{a2} = 2,16$ ;  $pK_{a3} = 5,46$ ;  $pK_{a4} = 10,14$ .



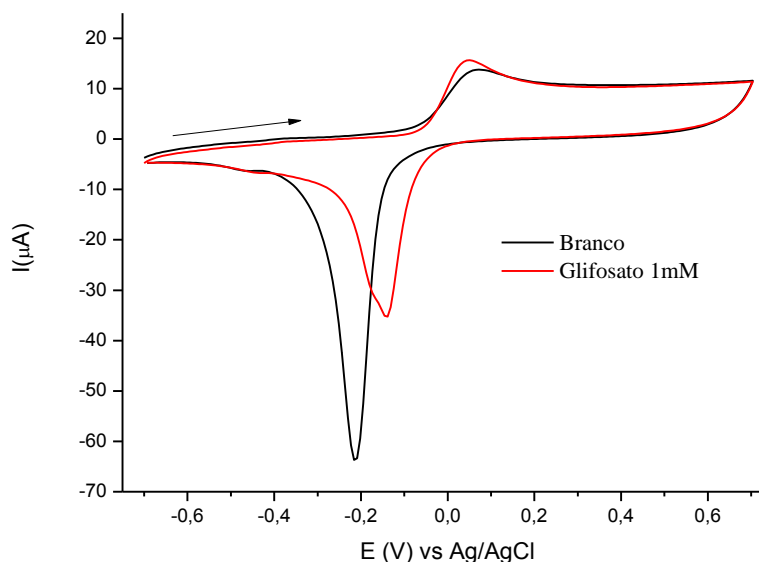
**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

Baseado neste comportamento, voltamogramas cíclicos usando eletrodo de cobre como trabalho em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato (pH 7,5), na ausência e na presença de 1mM de glifosato foram realizados (Figura 18). Na ausência de glifosato (linha preta), foi observado um aumento da corrente na região anódica com um pico em aproximadamente +0,10 V, o que pode ser um indício da formação de óxidos de cobre na superfície do eletrodo (COUTINHO et al., 2007). Por outro lado, a varredura na região catódica apresenta um pico em -0,2 V que pode ser atribuído à redução do óxido de cobre na superfície do eletrodo.

Na presença de glifosato (linha vermelha), observou-se um aumento na corrente anódica, na varredura positiva. Este aumento da corrente pode ser atribuído pela formação do complexo Cu(II)-glifosato e concomitante dissolução da camada de óxidos inicialmente presentes. Na varredura negativa, observa-se um pequeno deslocamento do potencial e uma diminuição da corrente de redução dos óxidos. Estas variações no comportamento catódico estão, provavelmente, associadas com a formação do complexo Cu(II)-glifosato que

impossibilita parcialmente a redução dos óxidos de cobre na superfície do eletrodo pois apresenta grande estabilidade, conforme o valor da constante de estabilidade anteriormente citada. Além disso, verifica-se que no pH utilizado durante o experimento, o glifosato está majoritariamente (cerca de 60%) na sua forma  $\text{HGLY}_2^-$  que apresenta duas cargas negativas líquidas e, desta forma, possibilita-o a atuar como um ligante.

**Figura 18**– Voltamograma cíclico de eletrodo de cobre na ausência (linha preta) e presença (linha vermelha) de 1 mM de glifosato. Condições experimentais: Tampão fosfato (pH 7,5; 0,1M). Velocidade de varredura: 100 mV s<sup>-1</sup>. Concentração de glifosato avaliada: 1mM. Eletrodo de referência: Ag/AgCl. Contra eletrodo: Fio de platina.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2018).

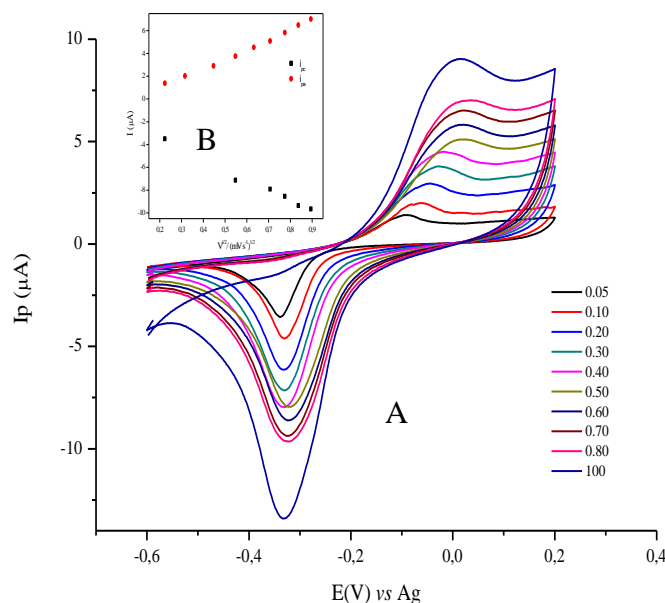
### 6.1.1 Mecanismo eletroquímico

Um importante fator a ser analisado no que tange o comportamento eletroquímico do sistema composto pelo eletrodo de cobre e o glifosato é a determinação do tipo de mecanismo eletroquímico associado. Processos de transferência de elétrons e cinética reacional podem ser monitorados com a utilização de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura (Figura 19A). Apesar desta técnica não ser totalmente conclusiva, as evidências apresentadas são importantes para um direcionamento de como o mecanismo

eletroquímico está associado a esse processo (BARD; FAULKNER, 2001; GOWDA; NANDIBEWOOR, 2014).

Em um mecanismo do tipo  $E_rC_i$ , inicialmente há uma reação eletroquímica reversível em equilíbrio seguida por uma reação química não reversível onde o produto da reação eletroquímica é convertido num produto eletroquimicamente inativo (sendo, portanto, a etapa química irreversível). Quando a constante de equilíbrio relacionada com o processo químico aumenta, a quantidade da espécie eletroquímica consumida para este processo também aumenta e, portanto, há uma menor quantidade da mesma para ser reduzida ou oxidada na varredura de *scan* reversa. Se a velocidade de varredura é aumentada, a etapa eletroquímica começa a competir com a etapa química em termos de quantidade de matéria e mais da espécie eletroquímica é formada no meio, levando a um aumento tanto no pico anódico quanto catódico.

**Figura 19** – A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em NaOH (0,1 M, pH 13,0) na presença de glifosato 100  $\mu\text{M}$  com diferentes velocidades de varredura; B) Variação da corrente de pico catódico e anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura evidenciando mecanismo do tipo E<sub>r</sub>C<sub>i</sub>; C. Condições experimentais: Eletrodo de referência: Fio de prata. Contra eletrodo: Fio de platina.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

Como pode ser observado na Figura 17B, tanto o pico de corrente catódica ( $i_{pc}$ ) quanto o pico de corrente anódica ( $i_{pa}$ ) apresentam variações lineares em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v_{1/2}$ ). Este comportamento sugere que a reação é limitada pelo transporte de massa ou difusão. Além disso, o perfil apresentado nas Figura 17A e Figura 17B sugerem que o mecanismo associado ao processo é do tipo E<sub>r</sub>C<sub>i</sub> (ZARE; SAMIMI; ARDAKANI, 2009).

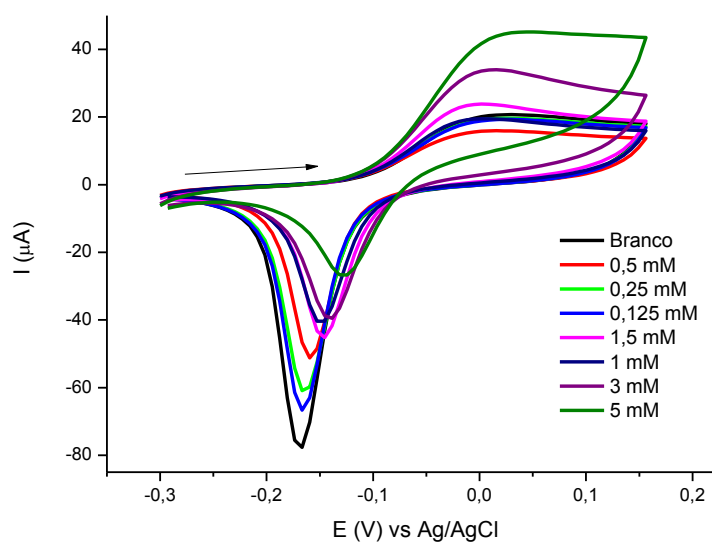
Extrapolando esse tipo de comportamento para o sistema eletroquímico abordado, tem-se que a etapa eletroquímica reversível associada ao processo refere-se à oxidação do cobre presente na superfície do eletrodo em Cu(II) enquanto que a etapa química

irreversível está associada com a formação do complexo entre glifosato e Cu(II), o qual tem alta constante de estabilidade e, portanto, impede que parte do Cu(II) seja novamente reduzido na superfície do eletrodo (COUTINHO, 2008).

### 6.1.2 Avaliação da concentração de glifosato

Tendo em vista o comportamento eletroquímico apresentado pelo sistema, a resposta analítica na presença de diferentes concentrações de glifosato foi averiguada. Para tanto, concentrações crescentes do analito foram adicionadas à cela eletroquímica (0,5 – 5 mM), conforme a Figura 20. Verificou-se que, na presença de glifosato, a variação da corrente de pico catódico tende a aumentar com o aumento da concentração do analito no meio. Este comportamento possivelmente ocorre devido ao fato de que, na presença de glifosato, a quantidade de Cu(II) disponível em solução para ser reduzido novamente a cobre na superfície do eletrodo é diminuída e, portanto há uma diminuição na corrente de redução.

**Figura 20** – Voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5) na presença de glifosato (0 – 5 mM).



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

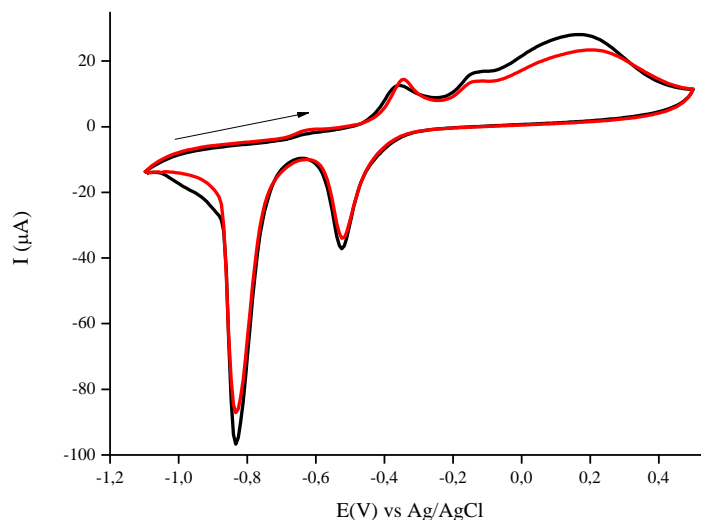


Além deste comportamento constatado, verificou-se um deslocamento do pico catódico para valores mais próximos de zero com o aumento da concentração. Este efeito pode ser associado com os fenômenos de transporte de massa e difusão presentes no sistema eletroquímico. De uma forma geral, a corrente faradáica (referente ao processo de oxidação e redução do sistema) é uma medição direta da reação eletroquímica que ocorre na superfície do eletrodo e, desta maneira, depende da velocidade com que a espécie eletroquímica migra da solução para a superfície do eletrodo, ou seja, depende do transporte de massa. Quando a concentração da espécie no sistema é relativamente baixa, a difusão (movimento randômico de moléculas de uma região de mais alta concentração para uma região de mais baixa concentração) ocorre de forma satisfatória. Entretanto, quando a concentração da espécie no sistema é relativamente alta, há uma perturbação no processo de difusão e, para que o equilíbrio do transporte de massa no sistema seja restabelecido, o sistema eletroquímico aplica mais potencial para a realização do processo e, por este motivo, o potencial do pico é deslocado (ELGRISHI et al., 2018).

### **6.1.3 Comportamento eletroquímico do glifosato em eletrodo de cobre com NaOH 0,1 M como eletrólito suporte**

A avaliação do comportamento eletroquímico do sistema utilizando NaOH 0,1 M como eletrólito suporte também foi averiguada, conforme apresentado na Figura 21. Neste sistema verificou-se, na ausência de glifosato, a presença de dois picos anódicos em -0,4V e -0,1V, referentes à oxidação de  $\text{Cu}^0$  a  $\text{Cu}^+$  e de  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$ , respectivamente, com a concomitante formação de óxidos das espécies geradas no meio. O aumento da corrente anódica presente no voltamograma pode estar relacionado com a oxidação da molécula de glifosato possivelmente no seu grupamento amino. De acordo com Coutinho (2008), a utilização do eletrodo de cobre em meio fortemente alcalino ( $\text{pH} > 13,0$ ) pode promover a oxidação do glifosato.

**Figura 21** – Voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em NaOH (0,1 M, pH 13,0) na presença de glifosato 1mM.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

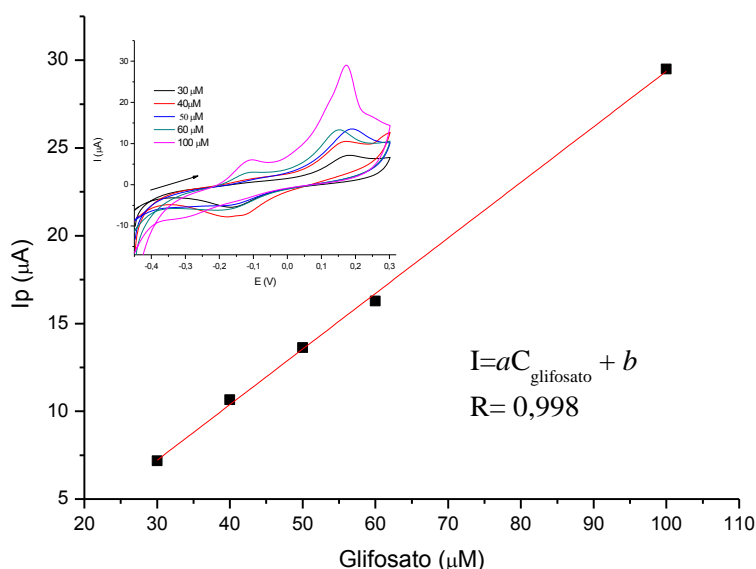
Vale ressaltar que, com base no perfil de distribuição das espécies presente na Figura 17, o glifosato apresenta-se majoritariamente na sua forma mais dissociada,  $\text{GLY}_3^-$ , e este comportamento decorre da atuação dos íons de cobre gerados como mediadores redox entre o analito e o eletrodo. Na presença de glifosato verifica-se comportamento eletroquímico semelhante ao observado para o sistema contendo tampão fosfato como eletrólito suporte.

## 6.2 Avaliação da concentração de glifosato em tampão borato

Além das condições previamente avaliadas, o uso de tampão borato como eletrólito foi averiguado. Nestas condições, observou-se que com o aumento da concentração de glifosato no meio, a corrente de pico catódico também apresentava aumento (*inset* da Figura 23). Nessa condição, a corrente de pico anódico não apresentou correlação com o aumento da concentração do analito. Diante desse cenário, a corrente de pico catódico foi utilizada como parâmetro para a averiguação da concentração da corrente no meio.

Sendo assim, uma correlação linear entre a concentração de glifosato no meio e a resposta analítica foi obtida, tendo uma faixa linear de 30 – 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e  $R=0,998$ , como pode ser observado na Figura 22.

**Figura 20** - Resposta analítica obtida para a variação linear da corrente de pico catódico (ipc) em função da da concentração de glifosato. *Inset:* Voltamogramas cíclicos do eletrodo de cobre em tampão Borato (0,1 M, pH 9,0) na presença de glifosato 30 – 100  $\mu\text{M}$ . Condições experimentais: Eletrodo de referência: Ag/AgCl. Contra eletrodo: Fio de platina.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2019.

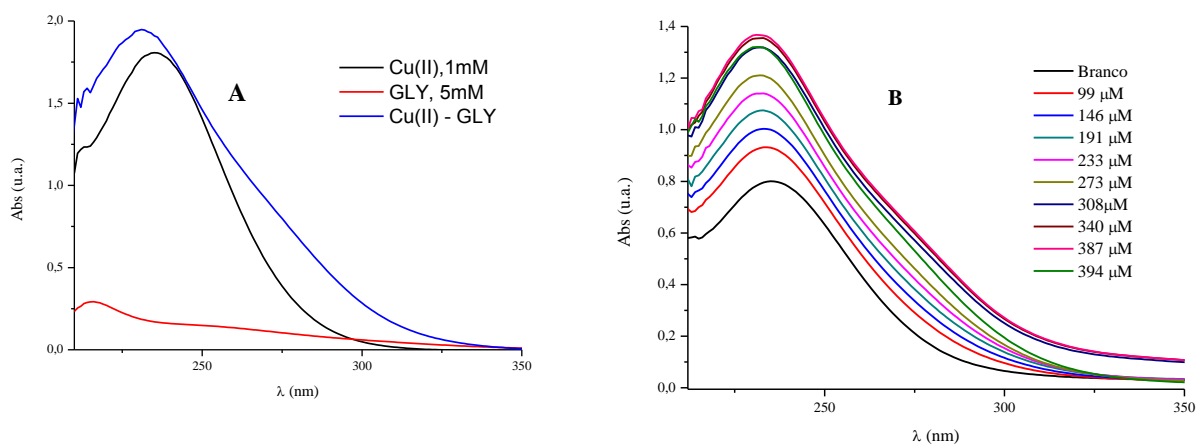
### 6.3 Verificação do perfil espectroscópico do complexo Cu(II)-glifosato utilizando UV-vis

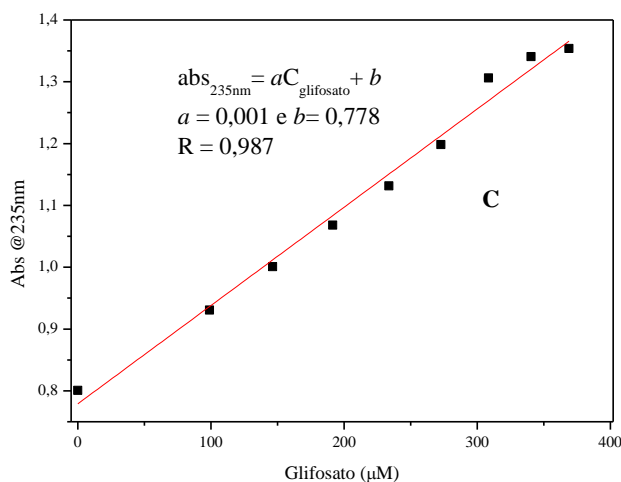
Como forma adicional de verificação da formação do complexo Cu(II)-glifosato, utilizou-se espectroscopia de absorção na região do visível e ultravioleta para tal averiguação. Sendo assim, soluções de Cu(II) (50 mM), glifosato (1  $\mu\text{M}$ ) e o complexo formado foram avaliadas. Inicialmente, verificou-se que, o glifosato apresenta baixa absorção no UV-Vis frente aos íons Cu(II). Quando o complexo Cu(II)-glifosato é formado, há um aumento da absorbância referente à formação do complexo em 250nm (Figura 23A).

Este tipo de transição é característica de uma transferência de carga do ligante para o metal (TCLM), que geralmente ocorre quando o ligante apresenta pares isolados com energias relativamente elevadas ou quando o metal possui orbitais vazios de baixa energia (Figura 19A). No caso específico do complexo de glifosato e Cu(II), o par de elétrons livres presente no grupamento amina provavelmente está envolvido no processo de complexação.

Utilizando tampão fosfato (0,1M, pH 7,5) como meio, a concentração de Cu(II) no meio foi mantida constante (50 mM) e sucessivas adições de glifosato (99 – 394  $\mu$ M) foram medidas. Verificou-se que há uma correlação linear crescente ( $R = 0,987$ ) no sinal de absorvância com o aumento da concentração de glifosato no meio (Figura 23B), o que está em concordância com o trabalho de Glass e colaboradores onde os autores verificaram um aumento da absorvância com o aumento da concentração de glifosato no meio para um sistema formado por glifosato e óxido de cobre (II) (GLASS, 1984; SHRIVER et al., 2008). Adicionalmente, a relação linear entre a concentração de glifosato presente no meio e o sinal de absorção estão presentes na Figura 23C.

**Figura 21** – A) Espectros de absorção no UV-vis para Cu(II), glifosato e o complexo formado Cu(II)-glifosato B) Adições crescentes de glifosato (99 – 394  $\mu$ M) em sistema contendo 50mM de Cu(II) C) Correlação linear entre glifosato e o sinal analítico obtido através das medições espectroscópicas utilizando UV-vis. Condições experimentais: Tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5.





**Fonte:** Elaborado pelo autor , 2018.

#### 6.4 Avaliações no dispositivo microfluídico

A partir dessa etapa, a plataforma de trabalho para os estudos deixa de ser a cela eletroquímica para dar lugar ao dispositivo microfluídico. Para tanto, avaliações específicas para o microdispositivo foram efetuadas.

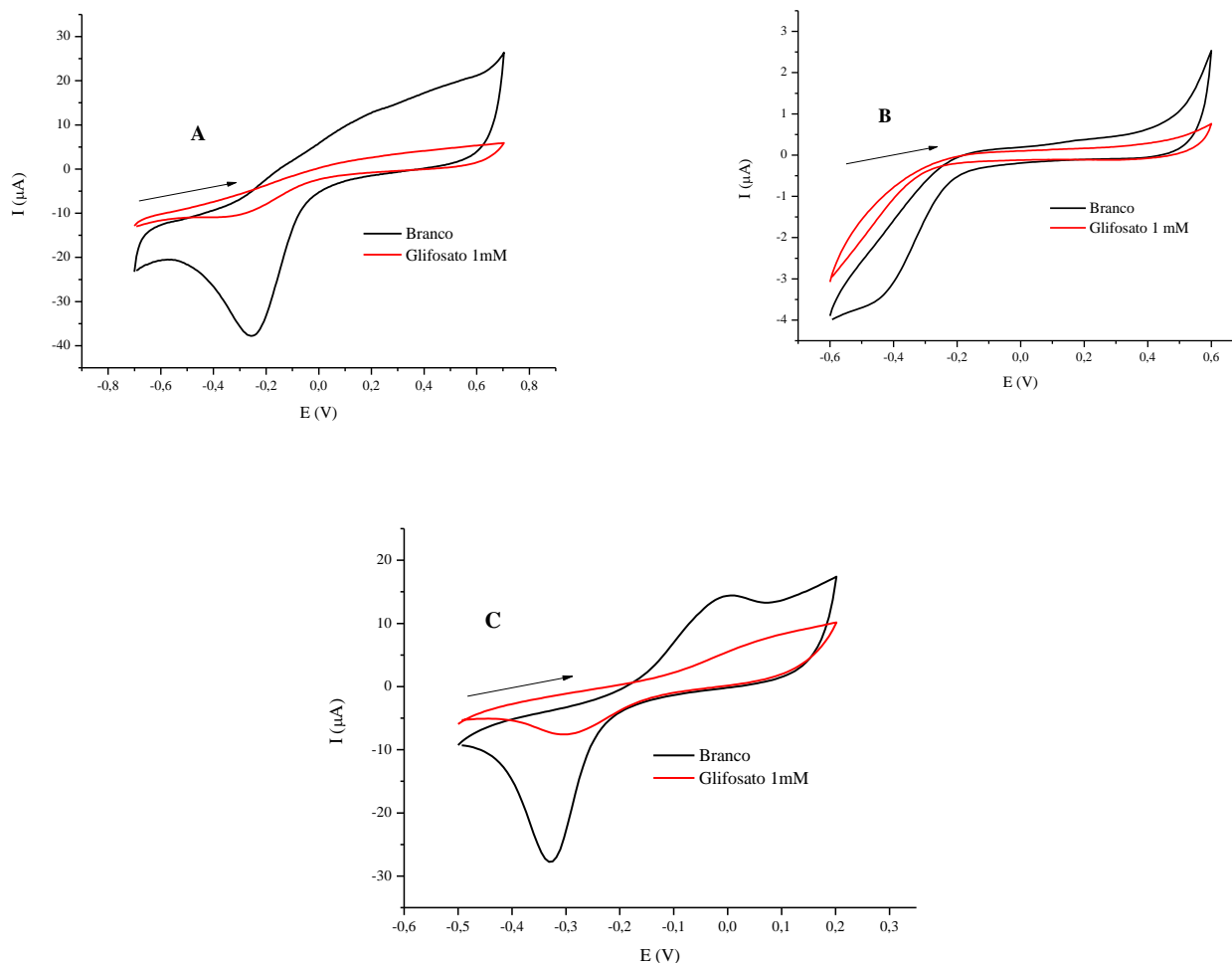
##### 6.4.1 Avaliação de diferentes eletrodos de trabalho – Au, Pt e Cu

A detecção eletroquímica demanda que eletrodos de trabalho possuam características as quais possibilitem uma melhor detecção dos analitos. Entre essas características destacam-se a condutividade, reatividade ou inércia, custo e maleabilidade dos materiais que compõem o eletrodo. Desta forma, a avaliação de diferentes eletrodos de trabalho torna-se de extrema necessidade tendo em vista que os mesmos podem responder de forma diferente com o analito (BIRCH; LANDERS, 2017).

Para avaliar o dispositivo microfluídico híbrido PDMS/Vidro, a atividade eletroquímica do sistema na ausência e presença de glifosato foi averiguada. Voltametrias cíclicas foram realizadas para eletrodos de ouro, platina e cobre, utilizando NaOH 0,1M como eletrólito suporte.

Como pode ser verificado na Figura 24A, o eletrodo de platina apresenta pico de redução em aproximadamente + 0,2V. Na presença de glifosato, este pico é suprimido, possivelmente devido à eletrooxidação do glifosato. Esta hipótese pode ser suportada com base no trabalho de Marangoni e colaboradores (1989), onde a eletrooxidação da glicina (aminoácido de estrutura semelhante à estrutura do glifosato) foi investigada utilizando eletrodo de platina como trabalho. De acordo com os autores, a eletrooxidação em meio básico leva à formação de formaldeído como produto principal. Além disso, é reportado de que uma camada de óxido é formada na superfície do eletrodo, o que pode levar a passivação do mesmo. Com base nessas informações reportadas na literatura, evidencia-se que o glifosato pode se comportar de forma semelhante à glicina e a diminuição da corrente catódica do eletrodo na presença do analito refere-se à passivação do mesmo.

**Figura 22** – Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de glifosato (1mM) em eletrodos de A) Platina; B) Ouro e C) Cobre.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

Com base nos resultados obtidos para o eletrodo de ouro (Figura 24B), não foi possível verificar a presença de picos de redução e/ou oxidação na presença e ausência de glifosato, o que é um comportamento que não condiz com dados presentes na literatura, onde o eletrodo de ouro é utilizado para a detecção de carboidratos e aminoácidos de estrutura química semelhante ao glifosato.

Para o eletrodo de cobre (Figura 24C), verificou-se a presença de um pico de oxidação em +0,05V e um pico de redução em -0,34V. Na presença de glifosato, ambos os picos foram suprimidos, o que pode estar relacionado com a formação de óxidos de cobre

na superfície do eletrodo, o que leva a passivação do mesmo na presença do glifosato. Devido a estes comportamentos, utilizou-se o eletrodo de cobre para o prosseguimento dos experimentos.

#### 6.4.2 Avaliação da janela de potencial no eletrodo de trabalho

Janela de potencial é um termo comumente utilizado para indicar a faixa de potencial e é uma das características mais importantes a serem avaliadas em sistemas eletroquímicos. Ela pode ser calculada pela diferença entre um potencial de redução (limite catódico,  $V_{RED}$ ) e um potencial de oxidação (limite anódico,  $V_{OXI}$ ). Quanto maior a janela de potencial do eletrodo de trabalho, maior será a quantidade de espécies passíveis de serem oxidadas e/ou reduzidas com a utilização deste eletrodo.

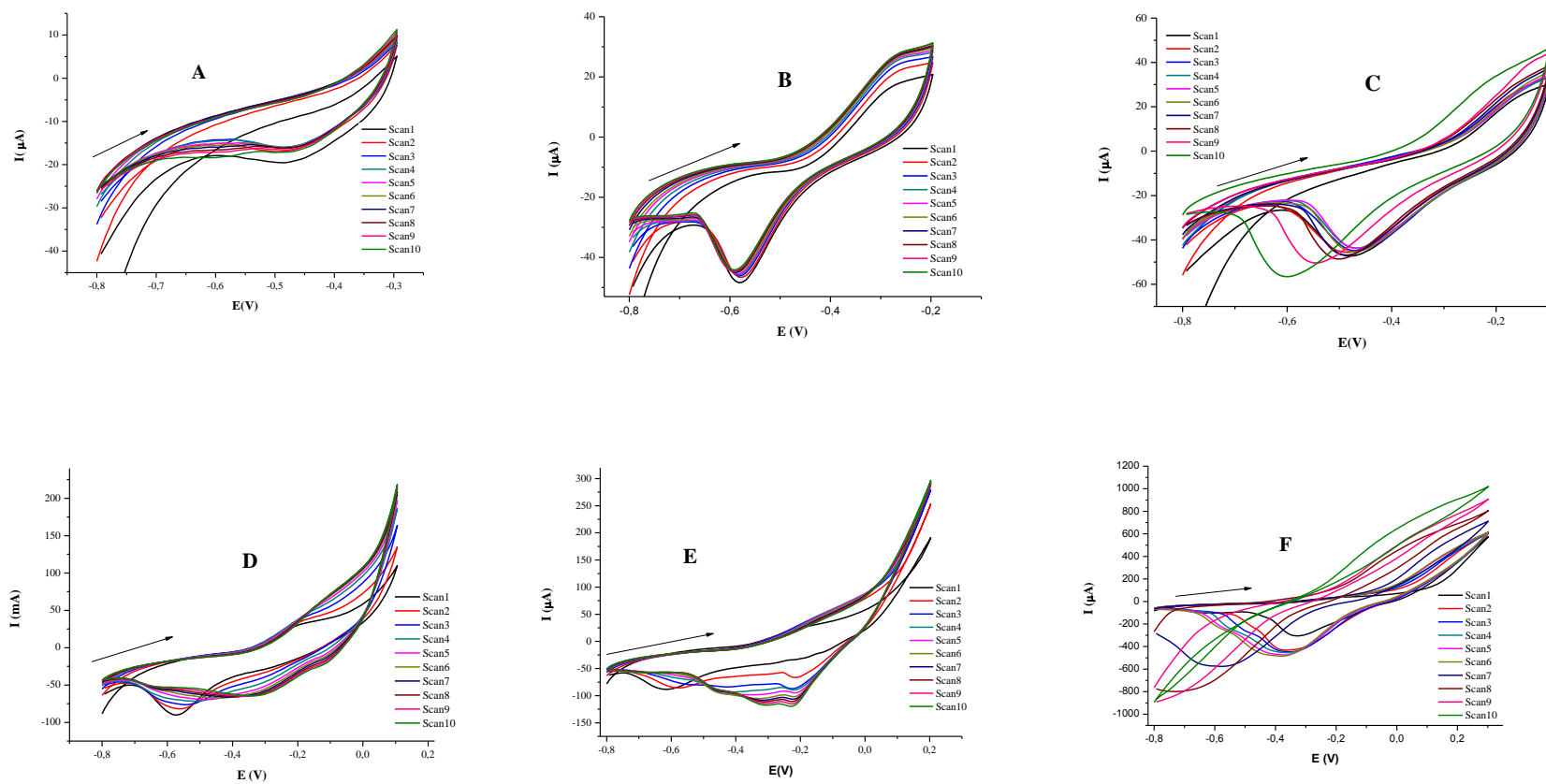
Desta forma, diferentes janelas de potencial foram avaliadas para determinação da janela mais estável, usando como critério de avaliação a repetitividade e precisão de dez *scans* de varredura na faixa estudada. Esta avaliação, desta maneira, visa obter uma faixa de potencial em que tanto o potencial de oxidação quanto o potencial de redução do eletrodo se mantenha estável mesmo quando diversos ciclos são efetuados. Mantendo fixo o limite catódico ( $V_{RED} = -0,8 \text{ V}$ ), seis diferentes limites anódicos foram avaliados ( $-0,3 \text{ V}$ ;  $-0,2 \text{ V}$ ;  $-0,1 \text{ V}$ ;  $+0,1 \text{ V}$ ;  $+0,2 \text{ V}$  e  $+0,3 \text{ V}$ ) para o eletrodo de cobre na ausência de glifosato.

Como pode ser observado na Figura 25A, a faixa de  $-0,8 \text{ V}$  -  $-0,3 \text{ V}$  não apresentou picos de oxidação e/ou redução o que impossibilitaria a utilização da mesma para o monitoramento do eletrodo de cobre. Desta forma, essa janela de potencial não pode ser utilizada. Por outro lado, a Figura 25B mostra a avaliação realizada para a faixa de  $-0,8 \text{ V}$  -  $-0,2 \text{ V}$ . Nesta faixa, evidencia-se um pico de oxidação em  $-0,3 \text{ V}$  e um pico de redução em  $-0,6 \text{ V}$ . O comportamento eletroquímico desse sistema foi estável mesmo após a leitura de 10 *scans* em sequência, evidenciando assim que esta janela de potencial apresenta boa estabilidade. A janela de potencial de  $-0,8 \text{ V}$  -  $-0,1 \text{ V}$  (Figura 25C) apresentou picos de redução e oxidação bem definidos, porém observou-se deslocamento no potencial do pico de redução em diferentes *scans*. Este perfil não permite a aplicação desta janela de potencial visto que a estabilidade do sistema eletroquímico não é assegurada. De forma análoga, a janela de potencial de  $-0,8 \text{ V}$  -  $+0,1 \text{ V}$  (Figura 25D) apresentou deslocamento tanto no potencial quanto na intensidade do pico de redução. As janelas de  $-0,8 \text{ V}$  -  $+0,2 \text{ V}$



(Figura 25E) e  $-0,8\text{V} - +0,3\text{V}$  (Figura 25F) não apresentaram estabilidade tanto na região catódica quanto anódica, além de uma alta corrente associada ao processo.

**Figura 23**– Voltamogramas cíclicos de eletrodo de Cu(II) utilizando NaOH 0,1M como eletrólito suporte mantendo fixo o limite catódico (-0,8V) e alterando limites anódicos A) -0,3 V; B) -0,2V; C) -0,1V; D) +0,1V; E) +0,2V e F) +0,3V.

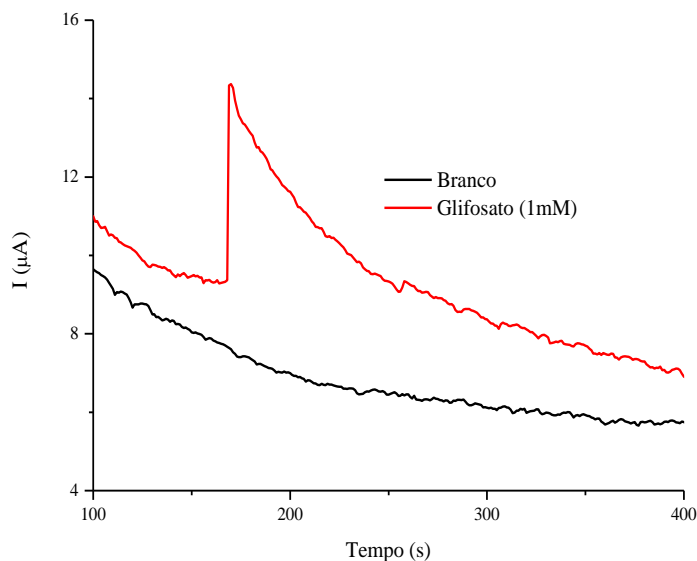


### 6.4.3 Avaliação eletroforética com detecção amperométrica

Tendo em vista que o glifosato se apresenta como uma espécie de carga negativa em quaisquer dos sistemas tampão avaliados alterando apenas a quantidade de cargas negativas que a molécula possui e também a direção do fluxo eletrosmótico que favorece preferencialmente a migração de espécies carregadas positivamente, a utilização de um surfactante catiônico fez-se necessária. Neste sentido, utilizou-se brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) para promover a inversão do fluxo eletrosmótico e, assim, facilitar a detecção do glifosato. Desta forma, utilizou-se nos testes iniciais para a injeção e separação da amostra voltagens de -500V e -700V, respectivamente, com tempo de injeção de 10 segundos.

Inicialmente a técnica de amperometria convencional foi empregada para a detecção do glifosato. Aplicando um potencial de -0,1 V, relativo à oxidação do Cu(II) no meio e sua complexação com o glifosato. Desta maneira, a resposta apresentada na Figura 26 foi obtida.

**Figura 24** – Eletroferograma para a detecção de glifosato 1 mM utilizando amperometria. Condições experimentais: Potencial aplicado: -0,1V. Tempo de corrida: 400 segundos.  $E_{inj} = -500$  V.  $E_{sep} = -700$  V. Tempo de injeção: 10 segundos.



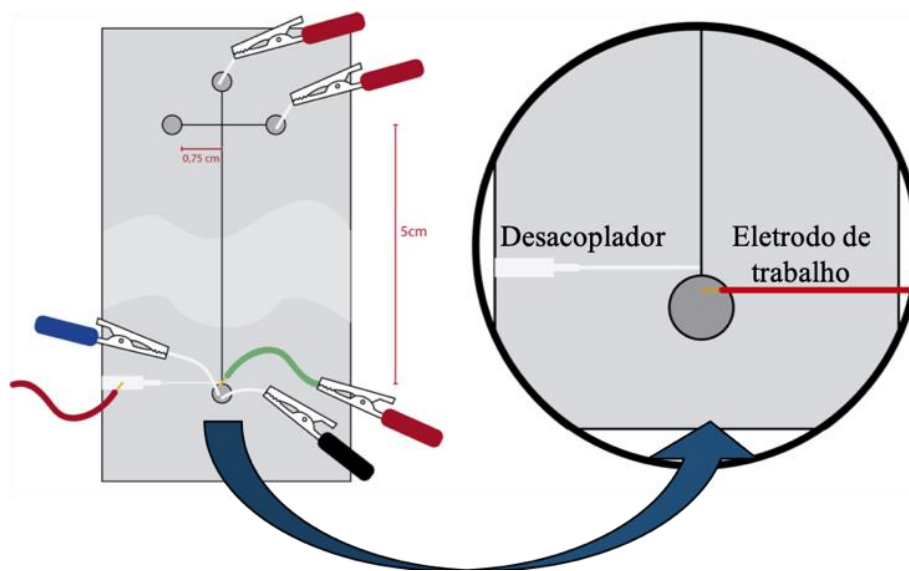
**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

Neste sistema, observa-se uma diminuição branda da corrente até cerca de 150s com um posterior aumento brusco da corrente originando um pico com um grande alargamento de cauda (tempo de eluição com cerca de 100 segundos). Este alargamento pode estar relacionado com dois fenômenos diferentes. O primeiro deles é a quantidade de amostra injetada e a concentração do analito (1mM). O tempo de injeção utilizado no experimento é notoriamente grande e, portanto, pode levar a uma grande quantidade de amostra a ser detectada pelo sistema eletroquímico.

O segundo fenômeno que pode levar a um alargamento de pico é a configuração *off-channel* do sistema de detecção (Figura 27). Este tipo de comportamento foi averiguado por Fischer e colaboradores (2009) que descreveram que o posicionamento de eletrodo na configuração *off-channel*, apesar de ser de fácil implementação em dispositivos microfluídicos, é responsável por dispersões e alargamento de pico devido à distância entre

o final do canal de separação e o eletrodo de trabalho. Ainda de acordo com os autores, este tipo de comportamento poderia ser minimizado com a utilização de um potenciostato eletricamente isolado.

**Figura 25** – Ampliação do reservatório de detecção do microchip representando o posicionamento *off-channel*.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

A utilização da amperometria convencional na detecção eletroquímica de espécies, tais como carboidratos, aminoácidos e o glifosato apresenta uma série de dificuldades experimentais. A mais notória delas está com a aplicação de um único potencial para a detecção do analito. Se há apenas um potencial sendo aplicado constantemente no eletrodo, os produtos de oxidação gerados na superfície do mesmo gradualmente vão dificultando a aquisição do sinal analítico.

Desta maneira, a amperometria de pulso consiste na alternativa à detecção amperométrica convencional. É importante frisar que não existem trabalhos presentes na literatura que utilizam esta técnica de detecção em microssistemas, sendo desta maneira, este trabalho, o primeiro a propor esta nova abordagem. Inicialmente uma avaliação da potencialidade dessa metodologia foi realizada utilizando um conjunto de três potenciais sendo aplicados conforme a Tabela 4. Utilizando tampão Borato (0,1 M, pH 11 e adição de

CTAB 2mM) como eletrólito suporte e voltagens de injeção e separação de -500V e -700V respectivamente (voltagens negativas utilizadas tendo em vista a inversão do sentido do fluxo eletrosmótico pela presença do surfactante CTAB) com um tempo de injeção de 15 segundos, com o tempo de corrida definido em 600 segundos.

Os três potenciais aplicados foram selecionados com base no perfil voltamétrico na presença de glifosato. O potencial de detecção ( $E_{det}$ ) foi selecionado com base no potencial do pico de corrente catódica referente à redução do Cu(II) na superfície do eletrodo. De forma análoga, o potencial de limpeza ( $E_{limp}$ ) que visa a renovação da superfície do eletrodo foi determinado com base no potencial do pico de corrente anódica. O potencial de condicionamento ( $E_{cond}$ ) foi definido como base num potencial intermediário entre  $E_{det}$  e  $E_{limp}$  em que o eletrodo está disponível para uma nova análise.

**Tabela 5** – Relação dos potenciais aplicados durante a amperometria de pulso.

| Tipo de potencial | Potencial aplicado (V) | Tempo (ms) |
|-------------------|------------------------|------------|
| Detecção          | -0,6                   | 500        |
| Limpeza           | -0,1                   | 300        |
| Condicionamento   | -0,4                   | 200        |

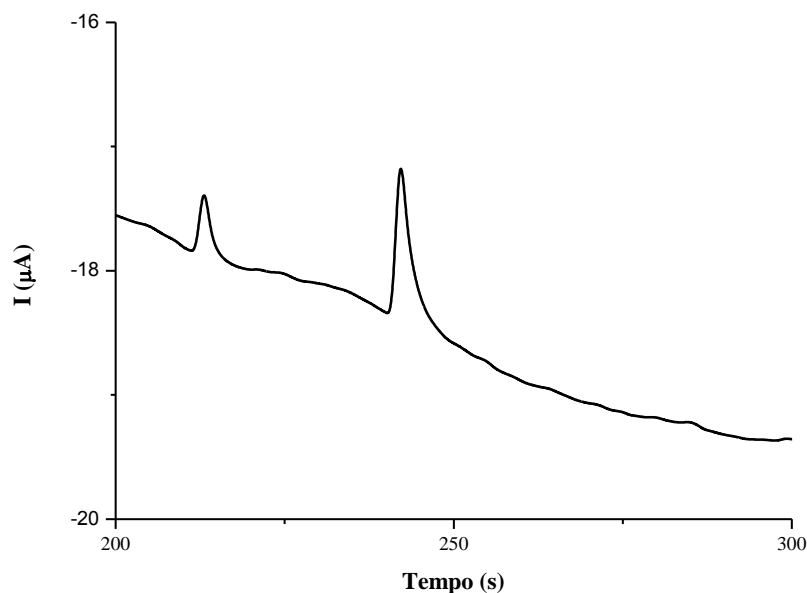
**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

Desta maneira, a Figura 28 mostra o eletroferograma obtido para tal análise. Apesar da possibilidade de utilização desta técnica, a reprodutibilidade do sistema não foi satisfatória. Observou-se que com o passar do tempo o eletrodo de trabalho apresentava uma camada de óxidos presente na superfície levando à sujeira no eletrodo (*electrode fouling*). Para contornar este problema, o eletrodo de trabalho foi mantido em solução de ácido nítrico 1% após as análises para a regeneração da superfície do mesmo.

Evidencia-se a presença de dois picos, o primeiro em aproximadamente 220 segundos e o segundo em cerca de 240 segundos. A presença de dois picos pode estar relacionada com duas hipóteses diferentes. A primeira é a de que os picos são referentes a mesma espécie (glifosato) porém sendo o resultado de duas injeções que não migraram no mesmo tempo até o sistema de detecção eletroquímica. Isto pode estar relacionado com

injeções não eficientes, ou seja, que não apresentaram tempo suficiente para a migração do analito até o sistema de detecção eletroquímico.

**Figura 26** – Amperograma obtido com a utilização da técnica de amperometria de pulso. Condições experimentais - Eletrólito: Tampão Borato 0,1 M, pH 11,0 com adição de CTAB 2mM. Eletrodo de trabalho: Fio de cobre. Eletrodo de referência: Fio de prata. Contra-eletrodo: Fio de platina. Concentração de glifosato utilizada: 1mM. Voltagens de injeção e separação: -500V e -700V, respectivamente.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

A segunda hipótese baseia-se nas características químicas do glifosato. O glifosato apresenta uma hidrólise em média num período de 35 dias (estes valores podem variar a depender de condições como pH e temperatura). Sabendo-se que o glifosato pode ser metabolizado a AMPA, o metabólito formado pode estar presente na solução padrão do herbicida. Assim, o menor pico refere-se ao AMPA (que apresenta três cargas negativas no pH de trabalho e menor massa molecular) enquanto que o segundo pico refere-se ao glifosato (também apresentando três cargas negativas neste pH, porém com uma maior massa molecular). Como espécies com menor relação massa/carga tendem a migrar de

forma mais rápida dentro do canal de separação, o primeiro pico está relacionado ao AMPA enquanto que o segundo está relacionado ao glifosato.

#### 6.5 Estudo do potencial de detecção no eletrodo de trabalho para detecção eletroquímica do glifosato em microchip eletroforese

Sendo a amperometria de pulso a técnica eletroquímica para a detecção do glifosato no sistema proposto, o potencial de ótimo de detecção do analito configura-se como um importante parâmetro a ser averiguado visto que possibilita seletividade para a metodologia proposta (PASAS; MARTIN; LUNTE, 2002). Assim, a voltametria hidrodinâmica configura-se como uma das metodologias mais utilizadas para a determinação do potencial ótimo de trabalho, pois o campo eletromagnético gerado pela aplicação da alta tensão necessária para a separação das espécies é considerado. Nesta classe de voltametria, um fluxo com a solução contendo o analito é gerado em direção ao eletrodo de trabalho. Esta técnica difere da maioria das técnicas voltamétricas onde a solução é intencionalmente colocada em repouso (sem agitação) para permitir que o transporte de massa seja majoritariamente efetuado por difusão.

Desta forma, a averiguação do potencial ótimo para a detecção do glifosato foi realizada tomando diferentes potenciais de detecção, conforme a Figura 29, onde denota-se que cinco diferentes potenciais foram avaliados (+0,3; +0,1; 0; -0,1 e -0,2V). Para este estudo, a intensidade da corrente (em microampères) foi definida como parâmetro analítico de comparação entre as condições avaliadas. Com base nos resultados apresentados, observa-se que quando o potencial de -0,2V é aplicado para a detecção do analito, nenhuma variação apreciável na corrente do sistema é obtida. Neste determinado potencial, verifica-se a redução do Cu(II) para Cu(I) na superfície do eletrodo. Este processo pode dificultar a detecção amperométrica do glifosato visto que neste determinado potencial a oxidação do cobre metálico a  $\text{Cu}^{2+}$  na superfície do eletrodo não é favorecida.

Por outro lado, quando são assumidos valores mais positivos para o potencial a ser aplicado no eletrodo de trabalho, a resposta analítica (variação da corrente) tende a obter valores não negligenciáveis. A facilidade no processo de detecção com o aumento do

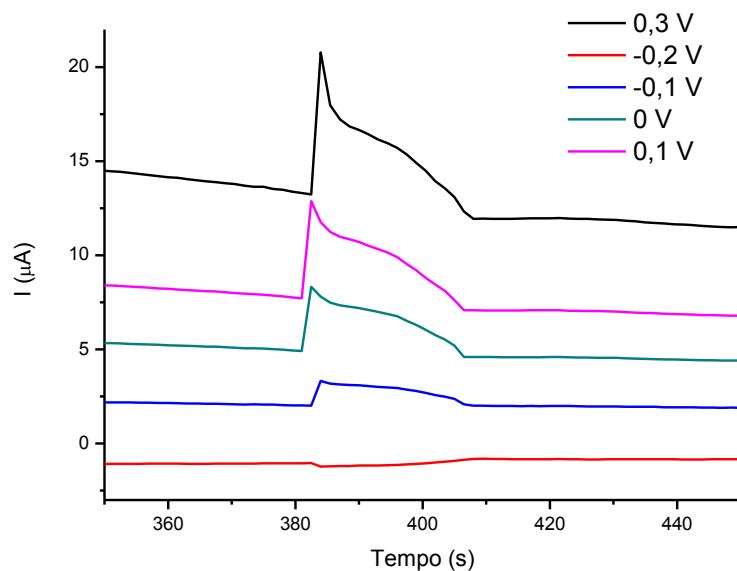


potencial de detecção pode estar relacionada com um aumento na quantidade de íons  $\text{Cu}^{2+}$  que são efetivamente oxidados na superfície do eletrodo.

Desta forma, tem-se que a melhor resposta analítica obtida para o sistema proposto foi obtida quando +0,3V foi utilizado como potencial de detecção. Nesta condição, verifica-se a oxidação do Cu(I) a Cu(II) (que inicia-se, de fato, a partir de +0,2V).

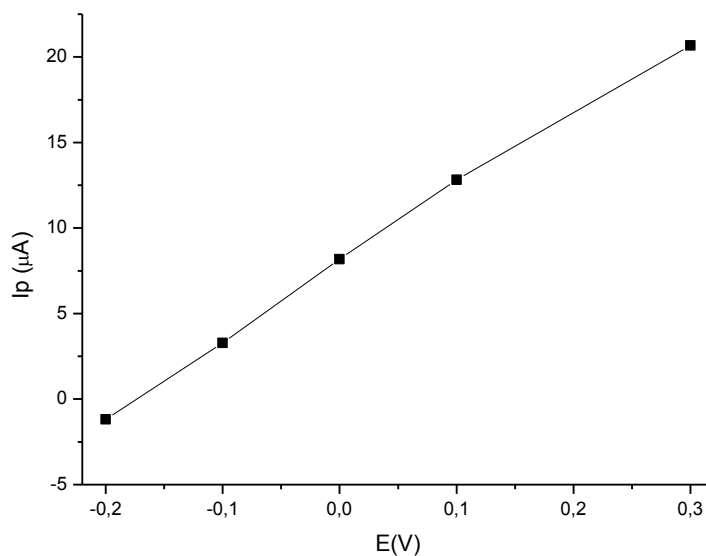
Com base nos resultados apresentados na Figura 29, foi possível a construção de um gráfico relacionando os potenciais aplicados e a corrente medida, conforme a Figura 30. Desta forma, evidencia-se um aumento linear da resposta analítica em função do potencial aplicado para a detecção do analito.

**Figura 27**– Voltamogramas hidrodinâmicos para avaliação da diferentes potenciais do eletrodo de trabalho (+0,3; +0,1; 0; -0,1 e -0,2 V) para detecção de glifosato. Condições experimentais: Concentração da solução de glifosato: 1  $\mu\text{M}$ . Voltagem de injeção: -700V. Voltagem de separação: -900V. Eletrólito utilizado: Tampão borato 0,1M, pH 9,0, contendo 0,1mM de CTAB. Tempo de injeção: 10s. Tempo de corrida: 600s.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2019.

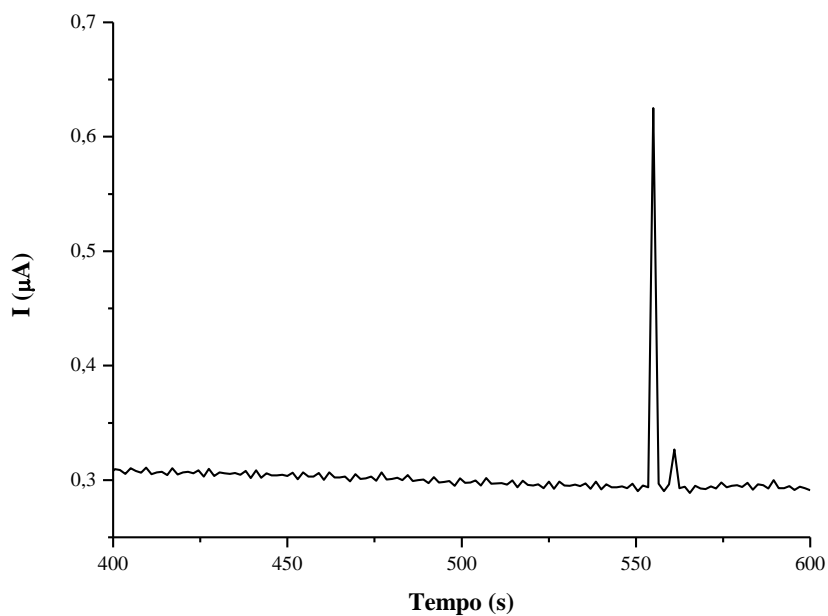
**Figura 28** – Curva para averiguação da relação entre o sinal analítico (intensidade da corrente medida) e o potencial aplicado no eletrodo de trabalho para a detecção de glifosato em microchip eletroforese. Condições experimentais: Concentração da solução de glifosato: 1  $\mu\text{M}$ . Voltagem de injeção: -700V. Voltagem de separação: -900V. Eletrólito: Tampão borato 0,1M, pH 9,0, contendo 0,1mM de CTAB. Tempo de injeção: 10s. Tempo de corrida: 600s.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2019.

Com base nessas condições, efetuou-se o teste para a averiguação da resposta do sistema com uma solução mais diluída. Desta forma, uma solução com concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  foi utilizada para averiguar a resposta do sistema. Assim, a Figura 31 apresenta o resultado obtido nessa condição. Adicionalmente, tem-se que o comportamento presente na Figura 28 foi observado novamente, com a detecção do glifosato e um pico de menor intensidade.

**Figura 29** - Amperograma para sistema contendo glifosato. Condições experimentais: Concentração da solução de glifosato: 1  $\mu\text{M}$ . Voltagem de injeção: -700V. Voltagem de separação: -900V. Eletrólito utilizado: Tampão borato 0,1M, pH 9,0, contendo 0,1mM de CTAB. Tempo de injeção: 10s. Tempo de corrida: 600s.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2019.

## 6.6 Estudo das voltagens de injeção e separação

O estudo dos potenciais de injeção e de separação a serem aplicados para a detecção do analito tem grande importância do ponto de vista experimental. Tanto a velocidade eletrosmótica quanto a velocidade eletroforética apresentam proporcionalidade direta ao campo elétrico aplicado. Sendo assim, a separação e/ou detecção de espécies será obtida em tempos menores quando voltagens maiores são aplicadas no dispositivo microfluídico. Entretanto, a aplicação de voltagens muito altas pode resultar em picos sem resolução

devido à influência do efeito Joule (BECKMAN COULTER, 1990). Além disso, a própria natureza da injeção eletrocinética leva a implicações tais como injeções com volumes imprecisos que decorrem de vazamentos durante tanto a etapa de injeção quanto a etapa de separação da amostra.

Desta forma, diferentes voltagens de injeção e separação foram avaliadas, sempre utilizando voltagens negativas e com uma diferença de -200V entre as voltagens de injeção e separação. As condições experimentais utilizadas foram idênticas aos experimentos citados na seção 6.4.

Os dados presentes na Figura 32 evidenciam a influência das voltagens de injeção e separação na detecção do glifosato. Com base na Figura 32A, onde foram aplicadas voltagens de injeção e separação de -600 e -800V, respectivamente, percebe-se variações na corrente até aproximadamente 200 segundos após o início da corrida. Após a estabilização do sinal, um aumento de corrente com a ocorrência de um pico referente ao glifosato é observado em cerca de 385 segundos. Como foi anteriormente citado, a literatura evidencia que com o aumento das voltagens de injeção e separação o analito tenda a ser detectado com tempos relativamente menores. No entanto, o comportamento apresentado nas Figuras XB e XC não corrobora com a literatura. Utilizando voltagens de injeção e separação de -700 e -900V (32B) e -800 e -1000 (32C) a detecção do glifosato só foi obtida após 428 e 473 segundos, respectivamente, apesar do aumento em ambas as voltagens (quando em relação à condição inicial). Este fato pode ser justificado pela não automação do sistema de injeção, no qual tanto o tempo de injeção como regulação da fonte de alta tensão são efetuados de modo manual.

Para os dados presentes nas Figuras 32D (-1000 / -1200) e 32E (-1100 / -1300), os valores relativos ao tempo de detecção do glifosato (146 e 61 segundos, respectivamente) corroboram com a literatura. Embora os tempos para detecção sejam substancialmente menores em ambas as condições avaliadas, a altura do pico também foi menor, demonstrando uma menor sensibilidade apesar de um tempo menor de detecção. Antagonicamente, tem-se que os dados apresentados na Figura 32F não demonstram a presença de nenhum pico referente a detecção do glifosato. Este comportamento pode estar relacionado com a velocidade em que o analito migra dentro do canal, ou seja, com uma maior velocidade de migração, a detecção do mesmo torna-se ineficiente.

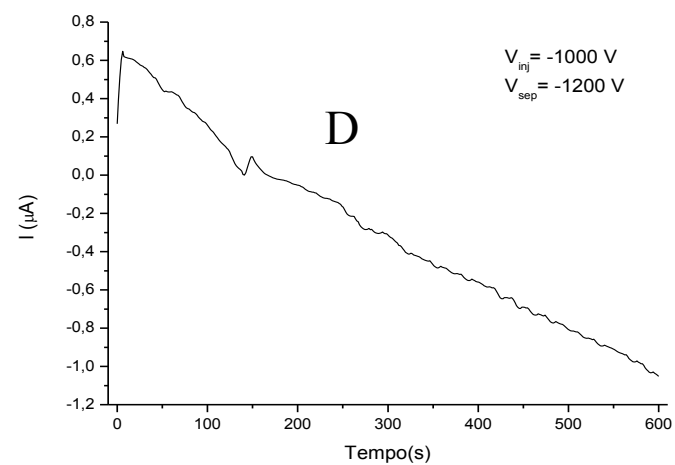
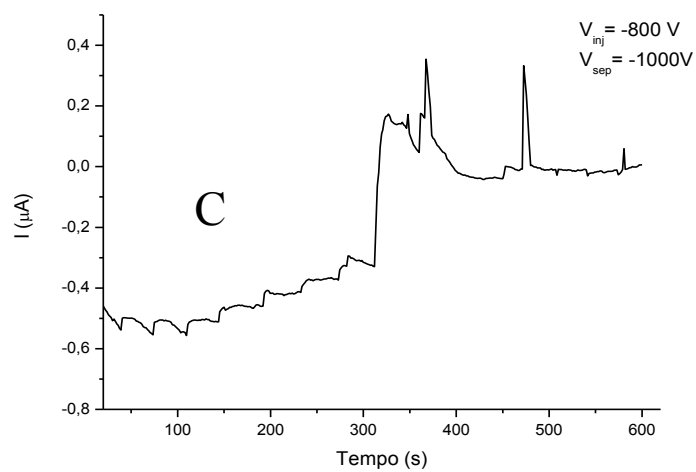
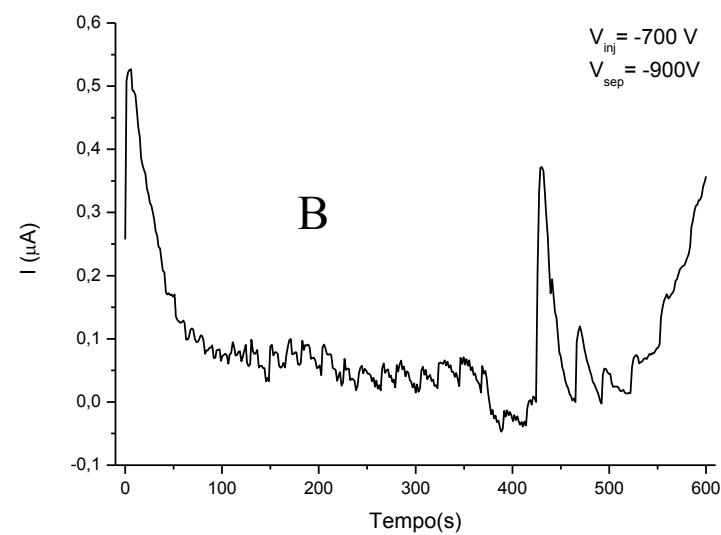
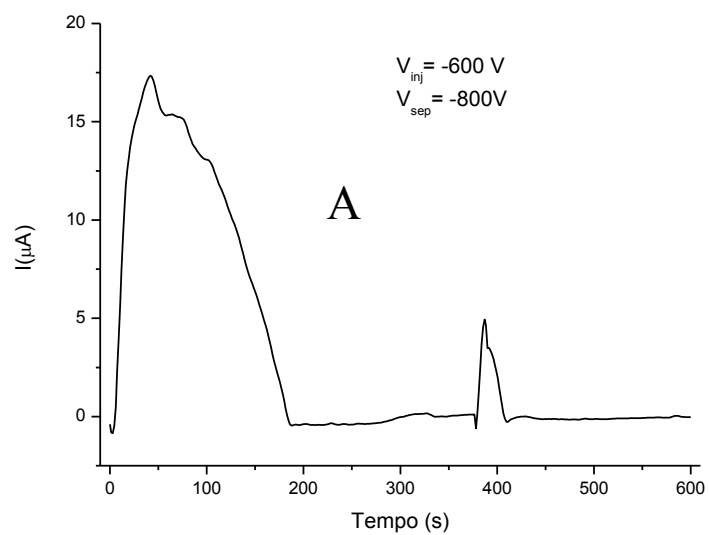
Desta forma, a Tabela 6 elenca de forma resumida os principais parâmetros mensurados para cada condição de injeção e separação:

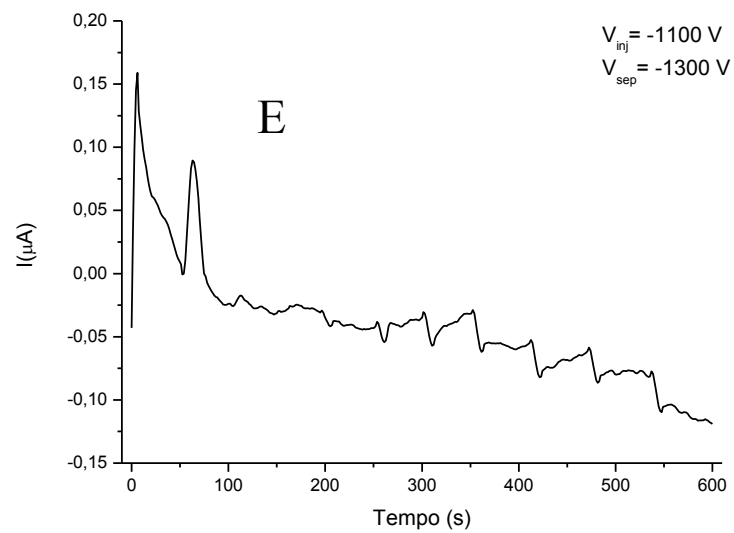
**Tabela 6** - Relação das voltagens de injeção e separação utilizadas e os respectivos tempos para detecção e altura do pico.

| <b>Voltagem de injeção/separação (V)</b> | <b>Tempo para detecção (s)</b> | <b>Altura do pico (<math>\mu\text{A}</math>)</b> |
|--|--------------------------------|--|
| -600/ -800                               | 385                            | 4,80   |
| -700/ -900                               | 428                            | 0,37   |
| -800/ -1000                              | 473                            | 0,33   |
| -1000/ -1200                             | 146                            | 0,10   |
| -1100/ -1300                             | 61                             | 0,08   |
| -1200/ -1400                             | -                              | -  |

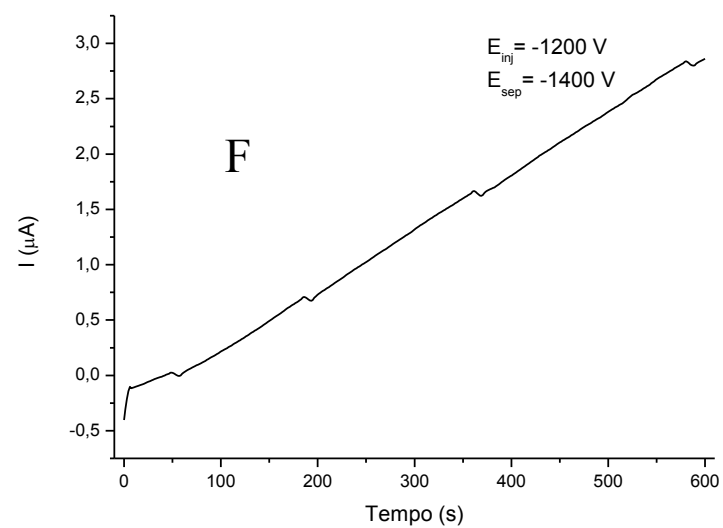
Fonte: Elaborado pelo autor, 2019

**Figura 30** - Amperogramas obtidos para a averiguação das voltagens de injeção e separação. **A)**  $V_{inj} = -600V$ ,  $V_{sep} = -800V$ ; **B)**  $V_{inj} = -700V$ ,  $V_{sep} = -900V$ ; **C)**  $V_{inj} = -800V$ ,  $V_{sep} = -1000V$ ; **D)**  $V_{inj} = -1000V$ ,  $V_{sep} = -1200V$ ; **E)**  $V_{inj} = -1100V$ ,  $V_{sep} = -1300V$ ; **F)**  $V_{inj} = -1200V$ ,  $V_{sep} = -1400V$ .





Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, o desenvolvimento de um microchip eletroforese híbrido PDMS/Vidro para a detecção de glifosato foi realizado. A confecção do dispositivo foi baseada em metodologias previamente estabelecidas. A estratégia de posicionamento *off-channel* do eletrodo de trabalho possibilitou maior facilidade na confecção do dispositivo, entretanto, este tipo de posicionamento levou a dificuldades na detecção do analito.

O eletrodo de cobre apresentou maior potencialidade para detecção do glifosato quando comparado aos eletrodos de ouro e platina, visto que apresenta uma boa interação com o analito. A adição de um surfactante catiônico no tampão configura-se como uma estratégia interessante devido à natureza do fluxo eletroosmótico. O mecanismo eletroquímico associado à interação do eletrodo com o analito é do tipo  $E_rC_i$ , com a formação de um complexo entre os íons Cu(II) provenientes da oxidação do eletrodo e do analito. Os estudos no Uv-vis utilizando o complexo formado revelaram uma banda característica de transferência de carga do ligante para o metal.

Além disso, a adição de glifosato no sistema eletroquímico propicia uma diminuição substancial da corrente de pico catódico, diminuição esta que está relacionada com a menor disponibilidade de íons Cu(II) na superfície do eletrodo passíveis de reduzir. Uma correlação linear entre a corrente medida e a concentração pode ser obtida utilizando-se tampão borato como eletrólito. No que tange a detecção amperométrica utilizando o microchip, a amperometria convencional como técnica de detecção não apresenta eficiência comparável à amperometria de múltiplos pulsos. A aplicação destes pulsos possibilita uma configuração de detecção mais promissora, com boa sensibilidade agregada. Fatores como a voltagem de injeção e separação apresentaram grande relevância para a sensibilidade do sistema e o tempo de migração do analito. Além disso, a utilização da amperometria de pulso, de forma inédita, em um microssistema de análise torna-se uma oportunidade para o desenvolvimento de outros trabalhos na área, possibilitando a detecção de outras espécies.



## 8 PERSPECTIVAS

- Melhorar o posicionamento do eletrodo de trabalho para evitar efeito de difusão no reservatório de detecção;
- Efetuar o interfaceamento da fonte de alta tensão para possibilitar injeções automatizadas das amostras;
- Estabelecer e otimizar parâmetros analíticos tais como pH, curva de calibração, limite de detecção e quantificação, ensaio com amostra real e avaliação de possíveis interferentes;
- Validar e comparar os resultados obtidos com outras metodologias.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDWIN, R. P. et al. Detection for Capillary Electrophoresis in a Microfabricated Device. **Anal. Chem.**, v. 74, n. 10, p. 4491–4498, 2001.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods, fundamentals and applications**. Second ed. New York: [s.n.]. v. 60
- BECKER, H.; LOCASCIO, L. E. Polymer microfluidic devices. **Talanta**, v. 56, n. 2, p. 267–287, 2002.
- BECKERS, J. L.; BOČEK, P. Multiple effect of surfactants used as additives in background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Cetyltrimethylammonium bromide as example of model surfactant. **Electrophoresis**, v. 23, n. 12, p. 1947–1952, 2002.
- BECKMAN COULTER. **Introduction to Capillary Electrophoresis**, 1990.
- BIRCH, C.; LANDERS, J. P. Electrode materials in microfluidic systems for the processing and separation of DNA: A mini review. **Micromachines**, v. 8, n. 3, p. 1–14, 2017.
- BOMBARDI, L. M. **Atlas: Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Européia**. São Paulo: FFLCH–USP, 2017. v. 1
- CAMPOS, I. et al. Glyphosate Detection by Means of a Voltammetric Electronic Tongue and Discrimination of Potential Interferents. **Sensors**, v. 12, p. 17553–17568, 2012.
- CATRINCK, T. C. P. G. et al. A simple and efficient method for derivatization of glyphosate and AMPA using 9-fluorenylmethyl chloroformate and spectrophotometric analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1194–1199, 2014.
- ÇETIN, E. et al. DLLM-Spectrophotometric Determination of Glyphosate Residue in Legumes. **Food Chemistry**, n. March, 2017.
- CHAUZAT, M.; FAUCON, J. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. **Pest Management Science**, v. 1106, n. December 2006, p. 1100–1106, 2007.
- COLTRO, W. K. T. et al. Microsistemas de Análises Químicas. Introdução, Tecnologias de Fabricação, Instrumentação e Aplicações. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1986–2000, 2007.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n 357, 18 de março de 2005. **Diário Oficial**, n. 053, p. 58–63, 2005.
- COUTINHO, C. F. B. et al. Direct determination of glyphosate using hydrophilic interaction

chromatography with coulometric detection at copper microelectrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 592, n. 1, p. 30–35, 2007.

COUTINHO, C. F. B. **Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação do herbicida glifosato**. [s.l.] Universidade de São Paulo – São Carlos, 2008.

DE ABREU, A. B. G.; DA MATTA, M. H. D. R.; MONTAGNER, É. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 5–9, 2008.

DE ANDRÉA, M. M. et al. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 11, p. 1329–1335, 2003.

DELMONICO, E. L. et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid for assessing the quality tap water using SPE and HPLC. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 36, n. 3, p. 513–519, 2014.

DEORE, B. A.; SHIIGI, H.; NAGAOKA, T. Pulsed amperometric detection of underivatized amino acids using polypyrrole modified copper electrode in acidic solution. **Talanta**, v. 58, n. 6, p. 1203–1211, 2002.

DILL, G. M. et al. Glyphosate: Discovery, Development, Applications, and Properties. **Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management**, p. 1–33, 2010.

DIRESS, A. G.; LUCY, C. A. Electroosmotic flow reversal for the determination of inorganic anions by capillary electrophoresis with methanol-water buffers. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, n. 1–2, p. 185–191, 2004.

DZIUBAKIEWICZ, E.; BUSZEWSKI, B. Electromigration Techniques. v. 105, 2013.

ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

FISCHER, D. J. et al. Amperometric detection in microchip electrophoresis devices: Effect of electrode material and alignment on analytical performance. **Electrophoresis**, v. 30, n. 19, p. 3324–3333, 2009.

G1. Proibição de glifosato no Brasil seria “desastre” para agricultura, diz ministro. 16 ago. 2018.

GALINDO-ROSALES, F. J. Complex fluid-flows in microfluidics. **Complex Fluid-Flows in Microfluidics**, p. 1–111, 2017.

- GARCÍA, C. D.; CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; CARRILHO, E. **Electrophoresis Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary**. III ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2013.
- GARCÍA, C. D.; HENRY, C. S. Direct determination of carbohydrates, amino acids, and antibiotics by microchip electrophoresis with pulsed amperometric detection. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 18, p. 4778–4783, 2003.
- GLASS, R. L. Metal Complex Formation by Glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 1249–1253, 1984.
- GOWDA, J. I.; NANDIBEWOOR, S. T. Electrochemical behavior of paclitaxel and its determination at glassy carbon electrode. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 42–49, 2014.
- GRANDCOIN, A.; PIEL, S.; BAURÈS, E. AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. **Water Research**, v. 117, p. 187–197, 2017.
- GUO, W. P.; FUNG, Y. S. Microfluidic chip-capillary electrophoresis with dynamic multi-segment standard addition for rapidly identifying nephrolithiasis markers in urine. **Electrophoresis**, v. 32, n. 23, p. 3437–3445, 2011.
- HARSTAD, R. K. et al. Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 299–319, 2016.
- HENRY, C. S. **Microchip Capillary Electrophoresis**. Totowa: Humana Press, 2006.
- HULVEY, M. K.; FRANKENFELD, C. N.; LUNTE, S. M. Separation and detection of peroxyxynitrite using microchip electrophoresis with amperometric detection. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 1608–1611, 2010.
- ISLAM, M. A. et al. Prospects of pulsed amperometric detection in flow-based analytical systems - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1052, p. 10–26, 2018.
- JUNIOR, O. P. DE A. et al. Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.
- LANGIANO, C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 147, p. 222–231, 2008.
- LI, T. et al. Ultrasensitive detection of glyphosate using CdTe quantum dots in sol-gel-derived

- silica spheres coated with calix[6]arene as fluorescent probes. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 12–18, 2012.
- LUO, X.; CHEN, L.; ZHAO, Y. Simultaneous determination of three chloroacetic acids, three herbicides, and 12 anions in water by ion chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 38, p. 3096 – 3102, 2015.
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 87–93, 2001.
- MARANGONI, D. G.; SMITH, R. S.; ROSCOE, S. G. Surface electrochemistry of the oxidation of glycine at Pt. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 921–926, 1989.
- MARK, D. et al. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications. **NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology**, n. 3, p. 305–376, 2010.
- MELLO, A. L. V. F. C. C.; BALVEDI, R. P. A.; GOULART, L. P. R. L. R. Glyphosate detection: methods, needs and challenges. **Environmental Chemistry Letters**, n. 0123456789, 2018.
- MENESES, D. et al. Evaluation of in-channel amperometric detection using a dual-channel microchip electrophoresis device and a two-electrode potentiostat for reverse polarity separations. **Electrophoresis**, v. 344, n. 6188, p. 1173–1178, 2015.
- MENSAH, P.; PALMER, C.; MULLER, W. Lethal and Sublethal Effects of Pesticides on Aquatic Organisms: The Case of a Freshwater Shrimp Exposure to Roundup®. **Pesticides - Toxic Aspects**, p. 163–185, 2014.
- MORAES, F. C. et al. Direct Electrochemical Determination of Glyphosate at Copper Phthalocyanine/Multiwalled Carbon Nanotube Film Electrodes. **Electroanalysis**, n. 14, p. n/a-n/a, 2010.
- O'BRIEN, K. W. **Synthesis of Functionalized Poly ( dimethylsiloxane)s and the Preparation of Magnetite Nanoparticle Complexes and Dispersions**. [s.l.] Virginia Polytechnic Institute, 2003.
- OOSTHOEK-DE VRIES, A. J. et al. Continuous Flow <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy in Microfluidic Stripline NMR Chips. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 2296–2303, 2017.
- PASAS, S. A.; MARTIN, R. S.; LUNTE, S. M. Recent developments in amperometric detection for microchip. v. 2683, n. January, p. 1–11, 2002.

- PEIXOTO, M. M. et al. Study of the stepwise deprotonation reactions of glyphosate and the corresponding pKa values in aqueous solution. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 119, n. 21, p. 5241–5249, 2015.
- PENG, G. et al. Flow injection microfluidic device with on-line fluorescent derivatization for the determination of Cr(III) and Cr(VI) in water samples after solid phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 955, n. Iii, p. 58–66, 2017.
- PENG, G. et al. Highly sensitive and selective determination of Hg(II) based on microfluidic chip with on-line fluorescent derivatization. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 204, n. Ii, p. 1–6, 2018.
- POL, R. et al. Microfluidic lab-on-a-chip platforms for environmental monitoring. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 95, p. 62–68, 2017.
- QUEIROZ, S. C. DO N. DE; JARDIM, I. C. S. F. Eletroforese Capilar. **Chemkeys - Liberdade para aprender**, p. 1–22, 1993.
- QUÍMICA, I. DE et al. Revisão. v. 28, n. 6, p. 1038–1045, 2005.
- RIOS, A.; ESCARPA, A.; SIMONET, B. **Miniaturization in Analytical Chemistry**. [s.l.: s.n.].
- ROYER, A. et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in water by gas chromatography with tandem mass spectrometry after exchange ion resin purification and derivatization. Application on vegetable matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 16, p. 3826–3832, 2000.
- SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. **Entropy**, p. 1416–1463, 2013.
- SATO, K. et al. Integrated pulsed amperometric detection of glufosinate, bialaphos and glyphosate at gold electrodes in anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 919, n. 2, p. 313–320, 2001.
- SHRIVER, D. F. et al. **Química Inorgânica**. 4ed. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.
- SILVA, J. A. F. Detecção Eletroquímica em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 56–64, 2003.
- SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos da Química Analítica**. 9ª edição ed. São Paulo: Cengage Learning, 2017.

- SONG, S. H.; KWAK, B. S.; JUNG, H. IL. Analysis and utilization of Joule heating in an electromagnet integrated microfluidic device for biological applications. **Current Applied Physics**, v. 9, n. 4 SUPPL., p. e287–e290, 2009.
- TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos.pdf. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173–181, 1996.
- TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493–511, 1997.
- TSAO, C. W. Polymer microfluidics: Simple, low-cost fabrication process bridging academic lab research to commercialized production. **Micromachines**, v. 7, n. 12, 2016.
- WANG, D. et al. A Highly Selective and Sensitive Fluorescence Detection Method of Glyphosate Based on an Immune Reaction Strategy of Carbon Dot Labeled Antibody and Antigen Magnetic Beads. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 6042 – 6050, 2016.
- WEINBERGER, R. **Practical Capillary Electrophoresis**. 2nd editio ed. Orlando: [s.n.].
- WHATLEY, H. Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis. In: **Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis**. [s.l: s.n.]. p. 21–58.
- WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–373, 2006.
- WINFIELD, T. W.; BASHE, W. J.; BAKER, T. V. Determination of glyphosate in drinking water by direct-aqueous-injection HPLC, post-column derivatization, and fluorescence detection. n. July, p. 16, 1990.
- XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Soft lithography. **Annual Review of Material science**, v. 28, n. 12, p. 153–184, 1998.
- YUAN, Y. et al. Fluorescent carbon dots for glyphosate determination based on fluorescence resonance energy transfer and logic gate operation. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 242, p. 545–553, 2017.
- ZARE, H. R.; SAMIMI, R.; ARDAKANI, M. M. A Comparison of the Electrochemical Behavior of Rutin at an Inactivated , Activated , and Multi Wall Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 4, p. 730–739, 2009.
- ZHAI, Z. et al. A microfluidic surface-enhanced Raman spectroscopy approach for assessing

the particle number effect of AgNPs on cytotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162, n. May, p. 529–535, 2018.