

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO DESCARTÁVEL CONTENDO ARRANJOS DE BIOSSENSORES PARA A DETERMINAÇÃO MULTIPLEXADA DE ESPÉCIES DE INTERESSE BIOLÓGICO EM DIFERENTES MATRIZES

Elson Luiz Fava*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração:
QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

*** Bolsista FAPESP**

SÃO CARLOS

2020

Fava, Elson Luiz

Desenvolvimento de dispositivo microfluídico descartável contendo arranjos de biossensores para a determinação multiplexada de espécies de interesse biológico em diferentes matrizes / Elson Luiz Fava -- 2020. 136f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos
Orientador (a): Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho
Banca Examinadora: Prof. Dr. Nerilso Bocchi, Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Júnior, Prof. Dr. Fernando Campanhã Vicentini, Prof. Dr. Lúcio Agnes
Bibliografia

1. Sensores impressos. 2. Biossensores. 3. Point of care.
I. Fava, Elson Luiz. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Elson Luiz Fava, realizada em 30/10/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Nerilso Bocchi (UFSCar)

Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Junior (UFPR)

Prof. Dr. Fernando Campanhã Vicentini (UFSCar)

Prof. Dr. Lúcio Angnes (USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

Martin Luther King Jr.

DEDICATÓRIA

Só sabemos o quanto somos fortes através de grandes batalhas às quais não nos deixam outra opção que não seja ser forte. Porém não há sentido a luta se não for por algo ou alguém. Mais intenso é quando sentimos que há quem lute por nós. Você lutou por mim desde nos conhecemos e isso fortaleceu o que construímos anos depois. Você luta por mim em todos os momentos e sempre está ao meu lado me fazendo sentir que sou muito maior que imagino. Você é a minha inspiração, é grandiosa, esplêndida, guerreira e é todo o sentido que representa a minha vida! Você é a minha companheira, minha melhor amiga e mãe dos meus filhos! Por isto e muito mais eu dedico esta tese à Mariana Gonçalves Dias, o grande amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito à Deus pela oportunidade de estar aqui nesta terra, para que eu possa buscar ser algo melhor através das provas e expiações atribuídas a mim, para que um dia eu seja digno de poder habitar esferas superiores.

À minha Família, minha esposa Mariana, pessoa pela qual eu terei sempre enorme gratidão por tudo o que ela representa na minha vida. Aos meus filhos Elvis e Miguel, que são a minha força e o motivo pelo qual eu luto e lutarei diariamente. Meu coração transborda de amor por vocês e o papai sempre estará ao lado de vocês para o que precisarem.

Aos meus pais, Jacson e Vânia pelo amor, carinho e o apoio incondicional, que foi fundamental durante esta árdua caminhada, que começou desde a minha educação inicial até os dias de hoje (e os que virão). Eu imagino que não deve ter sido fácil, pois nunca fui um candidato à canonização, mas saibam que dei o meu melhor para poder retribuir a confiança que em mim foi depositada por vocês.

Aos meus irmãos Elton, Elder, Elison e Luana, que cada um, de sua maneira peculiar, deram-me suporte para toda esta caminhada, fortalecendo o conceito de família. Pelas risadas, pelos momentos passados por todos estes anos de convivência (bons e ruins), pelos exemplos, cumplicidade, enfim, por tudo que vocês representam na minha vida.

Aos meus sobrinhos Guilherme, Sarah, Ana Carolina, Luan, João Atílio, Luiza e Eduarda, por serem um dos pilares mais importantes da minha

vida. O amor que sinto por todos vocês transcende todas as barreiras que a distância tem imposto. Vocês fazem a minha vida mais feliz e completa.

A minha prima Clélia, que o termo “prima” já não cabe entre nós, pois somos irmãos, amigos ou algo assim. Sempre esteve presente na minha vida, principalmente nos momentos de extrema dificuldade, nunca esquecendo de mim e sempre demonstrando um enorme carinho, que é extremamente recíproco. Uma pessoa com um enorme potencial que quando colocar o primeiro pé no caminho certo, irá muito longe.

A um casal cujo meu respeito e admiração é muito grande. Meus tios César e Elza, quais faço questão de visitar quando retorno à minha terra natal, que sempre me recebem com muito carinho e que sempre acreditaram em mim. Para as minhas avós Leonilda (*in memoriam*), que sonhava em me ver Doutor (pois é vó, acho que chegou a hora) e Maria Celeste, que foi uma segunda mãe durante a minha infância.

Não posso esquecer dois membros da minha família que são muito importantes, o meu avô Attilio Fava, que sempre me inspirou muita admiração e qual tenho um carinho imenso, por toda a sua trajetória de vida, que não foi fácil, mas que serve como fonte de inspiração. E a minha bisavó Philomena Ladeira Vieira, que é uma pessoa presente na minha vida e pensamentos até hoje, e que o meu amor por ela é maior que as limitações de tempo e espaço. Jamais vou esquecer suas doces palavras e a agradável convivência que tivemos, e principalmente de todo o seu carinho, do seu bisneto que a senhora mesmo chamava de “Xodó”. Ambos já cumpriram suas etapas aqui e já retornaram ao plano espiritual, mas eu espero ansiosamente nosso reencontro.

Ao Waldir Mariano Machado Júnior, talvez a primeira pessoa que realmente acreditou em mim, e me incentivou a dar continuidade aos estudos logo que finalizei a educação básica (pelo menos o que eu considero básico). Um amigo para toda a hora, sempre disposto a ajudar e com um coração sem tamanho e segundo ele, falta-lhe apenas a humildade (risos). Um exemplo de vida, é claro, pois um garoto pobre (muito pobre...) que perdeu o pai aos três anos de idade e por isso passou por muitas dificuldades na vida, conseguiu estudar, formar-se engenheiro mecânico e é uma das pessoas mais inteligentes que eu conheço.

Ao meu irmão Paulo Roberto Ellerbrock, um cara que tem o coração maior que ele, uma pessoa que não tem como descrever, agradeço muito pelos anos de amizade e por ser essa pessoa iluminada.

Ao Marcel Fatibello, um irmão que eu conheço faz algumas encarnações, e que insiste em continuar essa caminhada comigo (risos). Essa figura apareceu em um momento difícil na minha vida e rapidamente se tornou um grande amigo que sempre aparece nas horas mais oportunas com sábios conselhos.

À Sônia, Ivan, Carol, Lua e Vincent que têm sido a minha família aqui em São Carlos, que sempre me acolheu com amor e muita alegria. Todo o apoio de vocês foi fundamental para o meu trajeto de vida e serei eternamente grato pelo privilégio de conhecer e conviver com vocês.

A Família Formigoni, representada por Rubens e Dora. Esta linda família que foi meu primeiro contato aqui em São Carlos logo que cheguei, e que sou eternamente grato à solicitude deles, sempre me ajudando e me agradando com seu acolhimento e amizade. Também ao meu grande amigo Claudio

Marcelo (*in memoriam*), que precocemente nos deixou para ir ao plano superior, mas sempre foi uma pessoa maravilhosa, com um espírito grande e me sinto honrado por ter convivido contigo e com sua esposa Patricia, uma pessoa igualmente iluminada. O que vocês fizeram por mim não tem preço e não há palavras que sejam suficientes para agradecer.

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pela orientação, parceria, pela atenção, dedicação, pelas conversas (algumas mais turbulentas) que sempre visaram meu crescimento profissional. Hoje, depois de quase dez anos de parceria você já é para mim um grande amigo, acima de tudo, pois nos piores momentos da minha vida você esteve me dando suporte que vão além da relação aluno-professor. Enfim, se hoje sou um pesquisador um pouco (mesmo que extremamente pouco) melhor, devo isso a ele.

Aos meus colegas do LABBES (Ademar, Amauri, Anderson, Daniel, Gabriela, Helena, Karen, Laís e Thiago) e do LABIE (em especial para o Wilson e à Tássia) pelos anos de convivência e bons momentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da UFSCar por fornecer todo o suporte necessário para o meu bom desenvolvimento acadêmico, em especial para as secretárias Ariane, Cristina e Luciani, pela dedicação, atenção e cordialidade com que sempre fui tratado todas as vezes que necessitei.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo 2016/10012/4) pelo grande apoio e pela bolsa concedida.

Enfim, agradeço a todos que, em algum momento (mesmo que seja breve), tenha sido significativo para que eu pudesse chegar até aqui.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AuNPs	Nanopartículas de ouro
CV	Voltametria cíclica (<i>Cyclic Voltammetry</i>)
DPV	Voltametria de pulso diferencial (<i>Differential pulse voltammetry</i>)
CA	Creatininase
CB	Carbon Black
CE	Contra-eletrodo
CNN	Creatinina
GOD	<i>Glucose oxidase</i>
CNT	<i>Carbon Nanotubes</i> (Nanotubo de carbono)
DPCSV	Voltametria de redissolução catódica por pulso diferencial (<i>differential pulse cathodic stripping voltammetry</i>)
E_μPAD	Dispositivo microfluídico baseado em papel (<i>electrochemical microfluidic paper-based analytical device</i>)”
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
ELISA	– Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FADH₂	Flavina-adenina dinucleotídeo na forma reduzida)
FCA	Ácido ferrocenocarboxílico (<i>ferrocenecarboxylic acid</i>)
GLU	D-(+)-Glicose
GO	Óxido de grafeno (<i>graphene oxide</i>)
GQD	<i>Quantum dots</i> de grafeno
SWV	Voltametria de onda quadrada (<i>Square-wave voltammetry</i>)
LOD	Limite de detecção
NHS	Hidroxisuccinamida
PBS	Tampão fosfato salino
PDDA	Cloreto de polidialildimetilamônio

PSA	Antígeno prostático específico (<i>prostatic-specific antigen</i>)
RE	Eletrodo de referência
RSD	Desvio padrão relativo
sPAb2-AuNPs	Anticorpo anti-PSA secundário ligado a nanopartículas de ouro
sPAb1	Anticorpo anti-PSA primário
SPE	Eletrodo impresso (<i>Screen printing electrode</i>)
SWV	Voltametria por onda quadrada (<i>square wave voltammetry</i>)
TW20	Tampão Tween 20
UA	Ácido úrico (<i>uric acid</i>)
WE	Eletrodo de trabalho (<i>working electrode</i>)
μFD	Dispositivo microfluídico (<i>microfluidic device</i>)
μPBDMA	Dispositivo microfluídico baseado em papel para análise multiplexada (<i>microfluidic paper-based device for multiplexed analysis</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura ilustrativa de um SPE.....	2
Figura 2. Representação esquemática da fabricação dos eletrodos: a) folha de transparência; b) transferência do adesivo vinílico recortado para folha de transparência; c) serigrafia da tinta de carbono e da tinta de Ag/AgCl em cada respectivo eletrodo; d) retirada do adesivo vinílico e e) WE e pseudo-RE.....	16
Figura 3.(a) contra eletrodo e (b) fabricação do canal microfluídico.....	17
Figura 4. Ilustrações de (a) sequência de montagem do dispositivo e (b) dispositivo com as camadas sobrepostas.....	17
Figura 5. Ilustrações do (a) CE e (b) pseudo-RE.....	19
Figura 6. Ilustração do componente do μ PBDMA contendo o CE e o pseudo-RE na mesma camada.....	20
Figura 7. Ilustração do (a) componente contendo o CE e o pseudo-RE e (b) CE e pseudo-RE contendo abertura para a injeção de solução.....	20
Figura 8. Ilustração da primeira versão do arranjo de WEs fabricado.....	21
Figura 9. <i>Ilustração da segunda versão do arranjo de WEs fabricado.</i>	22
Figura 10. Ilustração do procedimento utilizado para medir a resistência elétrica de cada série de WEs.....	23
Figura 11. <i>Ilustração da terceira versão do arranjo de WEs fabricado.</i>	24
Figura 12. Ilustração da segunda versão dos caminhos microfluídicos.....	26
Figura 13. (a) Ilustração e (b) fotos demonstrativas do caminho percorrido por um fluido no caminho microfluídico.....	27
Figura 14. Ilustração do esquema de montagem do (a) dispositivo proposto no projeto de pesquisa e (b) dispositivo com os componentes otimizados.....	27
Figura 15. Fotografia do μ PBDMA construído; (a) face superior e (b) face inferior.....	28
Figura 16. Imagens do ângulo de contato do WE (a) sem tratamento e (b) com tratamento ácido (H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , sob agitação por um período de 60 min.).....	29
Figura 17. Voltamogramas cíclicos obtidos para o ácido ferrocenocarboxílico 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,5 mol L^{-1} ; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, sendo que o CV em preto corresponde ao WE submetido ao tratamento ácido e o vermelho refere-se ao WE sem tratamento.....	30
Figura 18. (a) Canais avaliados (01, 05, 09 e 13) em um caminho microfluídico; (b) Voltamogramas cíclicos obtidos para o ácido ferrocenocarboxílico 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} ; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; (c) ampliação do voltamograma cíclico (b) e (d) ampliação do voltamograma cíclico (c).....	31

Figura 19. Diagramas de barras das correntes de pico obtidas por voltametria cíclica utilizando como sonda eletroquímica o ácido ferrocenocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,5 mol L ⁻¹ ; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ para os 16 canais do μ PBDMA. (a) correntes de pico anódicas e (b) correntes de pico catódicas.....	32
Figura 20. Ilustração da CCD para (a) analito aplicado sobre a fase estacionária e (b) analito dissolvido na fase móvel.	33
Figura 21. Ilustração do efeito da CCD no caminho microfluídico.....	34
Figura 22. Fotografia do ensaio de injeção de corante Vermelho 40 no caminho microfluídico.	34
Figura 23. Ilustração do projeto do caminho microfluídico de modelo hexadecagonal.....	35
Figura 24. Fotos mostrando o fluxo de uma solução do corante Vermelho 40 no μ PBDMA com caminho microfluídico hexadecagonal.....	36
Figura 25. Ilustração dos componentes do μ PBDMA, sendo (a) CE, em preto, pseudo-RE em cinza; (b) caminho microfluídico e (c) WEs.....	37
Figura 26. Fotografia do μ PBDMA fabricado.....	38
Figura 27. Diagramas de barras das correntes de pico obtidas por voltametria cíclica utilizando como sonda eletroquímica o ácido ferrocenocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ . $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ para os 16 canais do μ PBDMA com caminho microfluídico com modelo hexadecagonal. (a) correntes de pico anódicas e (b) correntes de pico catódicas.	38
Figura 28. Ilustração dos projetos da camada contendo (a) o WE (versão anterior) e (b) Camada contendo o WE e o pseudo-RE na mesma camada. ..	40
Figura 29. Ilustração dos projetos da camada contendo (a) Camada contendo o CE e o pseudo-RE na mesma camada WE (versão anterior) e (b) O projeto atual do CE.	41
Figura 30. Ilustração dos projetos de canal microfluídico, sendo (a) versão anterior e (b) a versão atual.	42
Figura 31. Fotografia do módulo de multiplexação AUTOLAB (MUx).	44
Figura 32. Imagem ilustrativa da janela do software NOVA® 2.2 para o ajuste dos parâmetros no caso da técnica de voltametria cíclica.	44
Figura 33. Ilustração do comando schedule para a análise multiplexada utilizando o μ PBDMA, com o software NOVA® 2.2.	45
Figura 34. Resultados obtidos com a análise multiplexada do μ PBDMA com a sonda eletroquímica FCA 1 mmol L ⁻¹ . (a) Voltamogramas cíclicos; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (b) Voltamogramas de onda quadrada; $f = 80 \text{ Hz}$; amplitude = 90 mV e incremento de potencial = 1 mV, (c) Voltamogramas de pulso diferencial; amplitude = 90 mV e tempo de modulação = 5 ms, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$; e (d) cronoamperogramas, potencial aplicado = 200 mV.	46

Figura 35. Espectros Raman obtidos para os materiais de carbono utilizados para a modificação dos eletrodos de trabalho no μ PBDMA (CB, GO, RGO e grafeno).	50
Figura 36. Ilustração das reações ocorridas no biossensor mediado por FCA (segunda geração).	53
Figura 37. Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de D-(+)-D-(+)-Glicose 20 mmol L ⁻¹ preparada em NaCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte utilizando-se os biossensores preparados com CB, GO, RGO, grafeno e WE modificado apenas com CTS-GOx. $\nu = 50$ mVs ⁻¹	54
Figura 38. Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de D-(+)-Glicose 10 mmol L ⁻¹ preparada em NaCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte utilizando-se eletrodos modificados com e sem a enzima GOx. $\nu = 50$ mV s ⁻¹	55
Figura 39. Gráfico de corrente de pico versus número de unidades de GOx por eletrodo obtido a partir de voltamogramas cíclicos registrados para uma de de D-(+)-Glicose 10 mmol L ⁻¹ preparada em NaCl 0,1 mol L ⁻¹	56
Figura 40. (a) Cronoamperogramas obtidos no estudo de otimização do potencial aplicado empregando-se o biossensor CB-CTS-GOx/FCA para uma solução de D-(+)-Glicose 20 mmol L ⁻¹ preparada em NaCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte. (b) Gráfico de corrente (subtraída do branco) versus potencial aplicado obtido a partir dos cronoamperogramas mostrados em (a).	57
Figura 41. (a) Cronoamperogramas obtidos para as adições de soluções de D-(+)-Glicose preparadas (- 0,0 - 0,1 - 0,5 - 1,0 - 5,0 - 10,0 - 20,0 - 30,0 e - 40,0 mmol L ⁻¹) em NaCl 0,1 mol L ⁻¹ e (b) ampliação dos cronoamperogramas para as concentrações de 0 a 5,0 mmol L ⁻¹ . Potencial aplicado = +0,6 V.	58
Figura 42. Curva analítica obtida por cronoamperometria utilizando o biossensor CB-CTS-GOx/FCA para as adições de soluções de D-(+)-Glicose (0,0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1,0 ; 5,0 ; 10,0 ; 20,0 ; 30,0 e 40,0 mmol L ⁻¹) preparadas em NaCl 0,1 mol L ⁻¹	59
Figura 43. Etapas que envolvem a construção do novo dispositivo eletroquímico descartável: (a) eletrodo de trabalho, (b) eletrodos de pseudo-referência e contra eletrodo, (c) percurso de amostragem e (d) imagem real do dispositivo montado.	60
Figura 44. Esquema contendo os eletrodos de trabalho modificados. WE 1 com modificação de GQDs para a determinação direta do ácido úrico e WE 2 modificado com GQDs / CA / HMR para determinação da creatinina.	61
Figura 45. Voltamogramas de onda quadrada registrados para ácido úrico 1,0 μ mol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) utilizando-se o WE 1 não-modificado (eletrodo base) e modificado com GQDs.	63
Figura 46. Reação de oxidação do ácido úrico ⁷³	63

Figura 47. Voltamogramas de onda quadrada registrados para creatinina $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) utilizando-se WE 2 submetido a diferentes modificações.....	65
Figura 48. Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de creatinina utilizando-se WEs 2 modificados com GQDs / HMR antes e após a incorporação da enzima CA sobre o eletrodo modificado.	67
Figura 50. Otimização de parâmetros utilizados para a determinação de creatinina e ácido úrico: (a) Influência da quantidade de CA; (b) glutaraldeído e (c) concentração de HMR para o WE 2 e (d) influência do pH do eletrólito suporte sobre as correntes de pico obtidas para ácido úrico e creatinina.....	68
Figura 51. Voltamogramas de onda quadrada registrados para o WE 1 do dispositivo para soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de ácido úrico ($10,0 \text{ nmol L}^{-1}$ – $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$).	70
Figura 52. Voltamogramas de onda quadrada registrados para soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de creatinina ($10,0 \text{ nmol L}^{-1}$ – $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$).	71
Figura 53. Voltamogramas de onda quadrada registrados no dispositivo para soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de ácido úrico e creatinina: 0 (a), 0,01 (b), 0,05 (c), 0,12 (d), 0,20 (e), 0,40 (f), 0,60; (g), 0,85 (h), 1,3 (i), 2,0 (j) e $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. (b) Curvas analíticas obtidas para creatinina e ácido úrico.....	72
Figura 54.(a) ilustração dos componentes da microcélula, (b) ilustração da montagem e (c) fotografia da microcélula montada.	74
Figura 55. Voltamogramas cíclicos obtidos a partir da adição do eletrólito suporte NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (preto) e de uma solução de CNN $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ CNN em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte (vermelho). Velocidade de varredura = 50 mV s^{-1}	76
Figura 56. Espectro de UV-Vis obtido para uma solução de CNN $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	77
Figura 57. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir da adição do eletrólito suporte NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (linhas tracejadas) de uma solução de CNN $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ CNN em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte (linhas sólidas) para eletrodos de trabalho não modificados (preto) e eletrodos de trabalho modificados com carbono black (vermelho).	79
Figura 58 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir das adições de concentrações crescentes de CNN: a) branco; b) 0,1; c) 0,5; d) 1,0 e) 1,75; f) 2,5; g) 3,75; h) 5,0 e i) $6,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. Inserido: respectiva curva analítica.	80
Figura 59. Amperogramas obtidos a partir das adições de concentrações crescentes de D-(+)-Glicose: a) branco; b) 0,626; c) 1,25; d) 2,50; e) 5,00; f)	

10,0; g) 15,0 e h) 20,0 mmol L ⁻¹ em NaCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte, potencial aplicado = +0,4 V. Inserido: respectiva curva analítica.	83
Figura 60. Voltamogramas de pulso diferencial, obtidos a partir das adições de concentrações crescentes de CNN: a) branco; b) 0,106; c) 0,203; d) 0,406 e) 0,813; f) 1,625; g) 3,250 e h) 4,500 mmol L ⁻¹ em NaCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte. Inserido: respectiva curva analítica.	85
Figura 61. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir das adições de UA 2 mmol L ⁻¹ em NaCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte para o eletrodo sem modificação (preto) e o eletrodo modificado com um filme de CB (vermelho).	86
Figura 62. Voltamogramas de pulso diferencial, obtidos a partir das adições de concentrações crescentes de UA: a) branco; b) 0,047; c) 0,094; d) 0,188; e) 0,375; f) 0,750; g) 1,500 and h) 3,000 mmol L ⁻¹ em NaCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte. Inserido: respectiva curva analítica.....	87
Figura 63. Ilustração do componente do dispositivo que contém os eletrodos de trabalho, referência e contra eletrodo.....	93
<i>Figura 64.</i> (a) Componente do canal microfluídico do dispositivo, (b) Esquema de contagem do canal microfluídico, (c) acoplamento do canal microfluidico ao sensor e (d) ilustração do dispositivo montado.	94
Figura 65. Ilustração do dispositivo acoplado ao <i>spinner</i> proposto neste trabalho.	95
Figura 66. Esquema para a ilustração das etapas de modificação do eletrodo para a construção do imunossensor para a determinação de PSA.....	99
Figura 66. Mecanismo de ativação do grupo carboxila utilizando EDC/NHS .	101
Figura 67. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir das adições de concentrações crescentes de PSA: a) branco; b) 0,05; c) 0,25; d) 0,50; e) 2,50; f) 5,00 e g) 25,0 ng mL ⁻¹ em HCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte. Inserido: respectiva curva analítica.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos pontos de biossensoriamento do sensor proposto.	18
Tabela 2. Resistências elétricas encontradas para a primeira versão de WEs.	22
Tabela 3. Resistências elétricas encontradas para a segunda versão de WEs.	23
Tabela 4. Resistências elétricas encontradas para a terceira versão de WEs.	25
Tabela 5. Classificação dos pontos de sensoriamento do μ PBDMA.....	28
Tabela 6. Resultados obtidos nos espectros Raman para os materiais de carbono estudados.....	51
Tabela 7. Parâmetros analíticos para SWV estudados neste trabalho.	69
Tabela 8. Eletrodos impressos encontrados na literatura para determinação de CNN.	81
Tabela 9. Comparativo dos resultados obtidos utilizando o μ PBDMA com os valores de referência.....	88
Tabela 10. Estudos de adição/recuperação para determinação de GLU, CNN e UA em amostras de urina fortificadas.	89
Tabela 11. Estudos de adição/recuperação para determinação de PSA em amostras de soro humano sintético fortificadas.	103

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Eletrodos impressos.....	1
1.2. Plataformas microfluídicas	4
1.3. Microfluídica em papel	6
1.4. D-(+)-glicose, creatinina e ácido úrico	8
1.5. PSA.....	11
2. Desenvolvimento do μ PBDMA.....	14
2.1. Objetivo	14
2.2. Material e equipamentos	14
2.2.1. Confecção dos componentes do dispositivo.....	14
2.2.2. Ensaio de desempenho do dispositivo.....	14
2.3. Proposta inicial.....	15
2.3.1. Eletrodos de trabalho e pseudo-referência.....	15
2.3.2. Contra-eletrodo e canal microfluídico	16
2.3.3. Montagem do arranjo de eletrodos	17
2.4. Segunda geração do μ PBDMA	18
2.4.1. Contra-eletrodo e eletrodo de <i>pseudo</i> -referência	19
2.4.2. Eletrodos de trabalho.....	21
2.4.3. Caminhos microfluídicos.....	25
2.5. Estudo do desempenho do μ PBDMA.....	27
2.6. Terceira geração do μ PBDMA	35
2.7. Estudo do desempenho analítico do μ PBDMA	37
2.8. Aprimoramento do μ -PBDMA.....	39
2.9. Estudo de análise de desempenho do μ -PBDMA	42
3. DETERMINAÇÃO DE D-(+)-GLICOSE, CREATININA E ÁCIDO ÚRICO	48
3.1. Objetivos	48
3.2. Material e equipamentos	48
3.3. Construção de um biossensor para a determinação de D-(+)-Glicose	49
3.4. Desenvolvimento de um biossensor para a determinação de creatinina	59
3.5. Construção de um sensor para determinação de creatinina baseado	
em reação de complexação	73

3.6. Determinação sequencial de d-(+)-glicose, creatinina e ácido úrico utilizando o μ PBDMA	82
3.6.1. Determinação de D-(+)-Glicose	82
3.6.2. Determinação de creatinina	84
3.6.3. Determinação de ácido úrico	85
3.7. Desempenho μ PBDMA para detecção sequencial de D-(+)-Glicose, creatinina e ácido úrico na urina.	88
4. DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO PARA DETERMINAÇÃO DE PSA	91
4.1. Objetivo	91
4.2. Materiais e equipamentos	91
4.3. Desenvolvimento do dispositivo para determinação de PSA	92
4.4. Imunossensor para o monitoramento dos níveis de psa para câncer de próstata	95
4.4.1. Desenvolvimento do imunossensor	95
4.5. Desenvolvimento e construção de dispositivo imunossensor para determinação de um biomarcador para o câncer de próstata	100
5. CONCLUSÕES.....	104
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO DESCARTÁVEL CONTENDO ARRANJOS DE BIOSSENSORES PARA A DETERMINAÇÃO MULTIPLEXADA DE ESPÉCIES DE INTERESSE BIOLÓGICO EM DIFERENTES MATRIZES

Neste trabalho, desenvolveu-se um dispositivo microfluídico descartável com 16 pontos de sensoriamento para a construção de um arranjo de biossensores. Os componentes deste dispositivo foram individualmente avaliados e seu projeto de construção foi otimizado para o melhor desempenho dos sensores. Comprovado o bom desempenho do μ PBDMA, realizou-se então a construção do biossensor para a determinação de D-(+)-Glicose. Utilizando a técnica de voltametria cíclica para uma solução de D-(+)-Glicose, as maiores correntes de pico obtidas foram para os filmes que continham *carbon black* CB, selecionando-se assim este nanomaterial de carbono na fabricação do biossensor. A curva analítica obtida apresentou faixa de resposta linear para concentrações de D-(+)-Glicose de 0,1 a 40 mmol L⁻¹, e um limite de detecção de 0,03 mmol L⁻¹, mostrando o sucesso da proposta de arquitetura do biossensor construído, sendo posteriormente utilizado para a consolidação da proposta do projeto que é a multiplexação de análise utilizando o μ PBDMA. Como alternativa ao método enzimático para a determinação de creatinina, desenvolveu-se um sensor baseado na complexação do íon Fe³⁺ com o analito, determinando assim indiretamente a concentração de creatinina na amostra por voltametria de pulso diferencial, monitorando-se a redução do Fe³⁺ livre (não complexado) a Fe²⁺. Esta arquitetura foi aplicada com sucesso em duas plataformas, utilizando-se um

dispositivo de baixo volume (3 μL), obtendo uma faixa linear de trabalho para creatinina (CNN) de 0,1 a 6,5 mmol L^{-1} , com um limite de detecção de 0,043 mmol L^{-1} . No μPBDMA , os estudos foram realizados sequencialmente com D-(+)-Glicose, creatinina e ácido úrico, obtendo-se faixas lineares de 0,625 a 20 mmol L^{-1} para D-(+)-Glicose, de 0,106 a 4,500 mmol L^{-1} para creatinina e de 0,047 a 3,000 mmol L^{-1} para ácido úrico, com limites de detecção de 0,12, 0,084 e 0,012 mmol L^{-1} para D-(+)-Glicose, creatinina e ácido úrico, respectivamente. Foram realizados estudos de repetibilidade do sistema proposto, sendo obtidos RSDs inferiores a 6,25 %. Investigou-se também estudos da influência de interferentes em potencial, sendo os RSDs menores do que 8,25%. Além disso, o desempenho do μPBDMA foi avaliado utilizando amostras de urina, obtendo-se recuperações entre 97,4 e 104% para todos os biomarcadores. Foi desenvolvido também um dispositivo microfluídico acoplado a um imunossensor para a detecção de altos níveis de PSA. Para a utilização deste sistema, foi adaptado a um *Spinner*, um brinquedo que possui um rolamento central para girá-lo em torno de seu eixo. Para isso, utilizou-se uma base com uma haste e fixou-se ao rolamento do *Spinner* para utilizá-lo como uma centrífuga. Este sistema foi desenvolvido para carregar as soluções do ponto de injeção ao ponto de descarte e para fazer a separação do soro sanguíneo e as hemácias em tubos capilares. Os resultados obtidos para a determinação de PSA pelo imunossensor mostraram-se promissores, dado a boa faixa linear obtida (0,5 a 25,0 ng mL^{-1}), e também o limite de detecção (0,0014 ng mL^{-1}). O desempenho do imunossensor foi verificado para soro humano sintético fortificado com três concentrações diferentes de PSA, obtendo-se boas recuperações do analito.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A DISPOSABLE MICROFLUID DEVICE CONTAINING BIOSENSOR ARRANGEMENTS FOR THE MULTIPLEXED DETERMINATION OF SPECIES OF BIOLOGICAL INTEREST IN DIFFERENT MATRICES

16 sensing points for the construction of an array of biosensors. The components of this device have been individually evaluated and their construction design has been optimized for the best performance of the sensors. Once the good performance of μ PBDMA was proven, the construction of the biosensor was then carried out to determine D-(+)-Glucose. Using the cyclic voltammetry technique for a D-(+)-Glucose solution, the highest peak currents obtained were for films containing carbon black CB, thus selecting this carbon nanomaterial in the manufacture of the biosensor. The analytical curve obtained showed a linear response range for D-(+)-Glucose concentrations from 0.1 to 40 mmol L⁻¹, and a detection limit of 0.03 mmol L⁻¹, showing the success of the proposed architecture of the built biosensor, being later used for the consolidation of the project proposal which is the analysis multiplexing using the μ PBDMA. As an alternative to the enzymatic method for the determination of creatinine, a sensor was developed based on the complexation of the Fe³⁺ ion with the analyte, thus indirectly determining the concentration of creatinine in the sample by differential pulse voltammetry, monitoring the reduction of free Fe³⁺ (not complexed) to Fe²⁺. This architecture was successfully applied on two platforms, using a low volume device (3 μ L), obtaining a linear working range for creatinine (CNN) from 0.1 to 6.5 mmol L⁻¹, with a limit detection of 0.043 mmol L⁻¹. In μ PBDMA, studies were performed sequentially with D-(+)-Glucose,

creatinine and uric acid, obtaining linear ranges from 0.625 to 20 mmol L⁻¹ for D-(+)-Glucose, from 0.106 to 4.500 mmol L⁻¹ for creatinine and 0.047 to 3.000 mmol L⁻¹ for uric acid, with detection limits of 0.12, 0.084 and 0.012 mmol L⁻¹ for D-(+)-Glucose, creatinine and uric acid, respectively. Repeatability studies of the proposed system were carried out, with RSDs of less than 6.25% being obtained. Studies on the influence of potential interferents were also investigated, with the RSDs being less than 8.25%. In addition, the performance of μ PBDMA was assessed using urine samples, obtaining recoveries between 97.4 and 104% for all biomarkers. A microfluidic device coupled to an immunosensor was also developed to detect high levels of PSA. For the use of this system, it was adapted to a Spinner, a toy that has a central bearing to rotate it around its axis. For this, a base with a rod was used and fixed to the Spinner bearing to use it as a centrifuge. This system was developed to load the solutions from the injection point to the disposal point and to separate the blood serum and red blood cells in capillary tubes. The results obtained for the determination of PSA by the immunosensor proved to be promising, given the good linear range obtained (0.5 to 25.0 ng mL⁻¹), and also the detection limit (0.0014 ng mL⁻¹). The performance of the immunosensor was verified for synthetic human serum fortified with three different concentrations of PSA, obtaining good recoveries of the analyte.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ELETRODOS IMPRESSOS

As pesquisas envolvendo métodos eletroanalíticos objetivam basicamente aprimorar o desempenho dos eletrodos de trabalho para otimizar/melhorar as características analíticas dos métodos, a saber: sensibilidade, seletividade, rápida resposta, robustez, baixo custo, entre outros. A vasta gama de possibilidades de modificação de eletrodos sólidos ainda atendem muitas destas características, porém, a regeneração da superfície do eletrodo para o seu reuso e/ou modificação necessita, na maioria dos casos, de tratamentos químicos, eletroquímicos e/ou mecânicos, que dependem da experiência do analista, podendo assim influenciar de forma positiva ou negativa o desempenho do método eletroanalítico¹. Assim, buscam-se alternativas para que o sensor tenha menor necessidade (ou nenhuma) de tratamentos de sua superfície antes de uso e/ou modificação, sendo os eletrodos impressos (SPE, do inglês “*Screen-printing Electrode*”) uma possibilidade viável para este fim.

Um dos grandes atrativos para o uso de SPEs é o seu relativo baixo custo devido à possibilidade de fabricação em larga escala e a disponibilidade de eletrodos comerciais diversificados (e.g. de carbono, de ouro, platina, CNTs, carbono modificados etc.). Outra vantagem do uso deste tipo de sensor é a possibilidade de miniaturização da célula eletroquímica, uma vez que os três eletrodos (eletrodos de trabalho, referência e contra-eletrodo) são impressos em uma mesma base, sendo necessários alguns mililitros ou até microlitros por determinação, o que é apreciável do ponto de vista econômico e ambiental².

Existem diversos procedimentos para a fabricação de SPEs, derivando da deposição de um filme sobre um substrato inerte, seguido da cobertura parcial do sensor com uma camada isolante para os contatos elétricos, dispondo apenas a área dos três eletrodos (**Figura 1**).

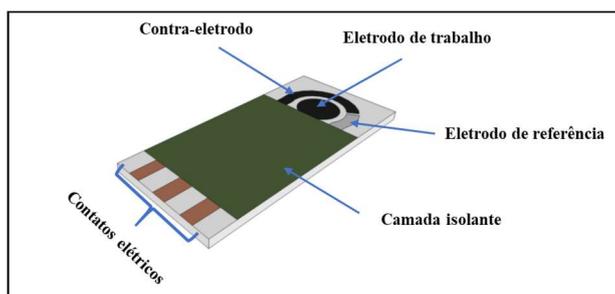


Figura 1. Figura ilustrativa de um SPE.

Uma técnica de deposição para a construção de SPEs muito utilizada é a “silk screen”, baseando-se na simples incorporação das tintas, empregando-se uma tela vazada contendo a configuração e/ou dimensões dos três eletrodos (WE, CE e RE). A passagem da tinta condutora através destas três regiões definidas anteriormente irá imprimir os eletrodos na superfície de um substrato não condutor selecionado. Em uma segunda etapa, o eletrodo de trabalho poderá ser modificado e sobre a superfície do eletrodo de *pseudo*-referência é depositada uma fina camada de resina epóxi contendo prata ou uma tinta de prata³.

Para a fabricação dos eletrodos de trabalho nestes dispositivos, costuma-se utilizar uma tinta contendo material metálico condutor como ouro, platina, prata entre outros ou tintas à base de carbono (pó de grafite, nanotubos, grafeno, carbono black, etc.)⁴. As tintas utilizadas na fabricação dos eletrodos impressos

devem atender algumas características como viscosidade adequada para ser utilizada no processo de *silk screen*, aderência apreciável no substrato, para evitar a lixiviação e, flexibilidade, visando evitar rachaduras na superfície, principalmente quando se trata de eletrodos fabricados a partir de materiais flexíveis. Após a impressão da tinta no suporte, o filme é seco e usualmente curado a altas temperaturas. O emprego deste processo produz um filme rígido e aderente, com espessura de 10-20 μm e propriedades mecânicas e elétricas desejadas⁵.

Assim como em eletrodos convencionais, é muito comum a utilização de materiais de carbono na construção SPEs. O carbono é um dos materiais mais abundantes do planeta, que pode ser encontrado livremente na forma cristalina como grafite, diamante ou amorfo. Devido sua versatilidade, a utilização de materiais de carbono, como grafeno, nanotubos de carbono (CNTs), carbono vítreo, fulereno, grafite e fibras de carbono, têm sido utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos⁶. As características analíticas desejáveis para um sensor eletroquímico são: baixo custo (em relação à maioria dos materiais utilizados para a fabricação de sensores), alta condutividade elétrica e baixa corrente residual, quando comparados aos eletrodos metálicos e uma ampla janela de potencial de trabalho, principalmente em potenciais positivos⁷.

São diversas as vantagens obtidas empregando-se o SPEs, além de menor custo de fabricação e a possibilidade de construção deste tipo de dispositivo em diversas conformações. Como exemplo, destaca-se o acoplamento de SPEs em sistemas microfluídicos. Sistemas microfluídicos são constituídos de canais que podem conduzir quantidades muito pequenas de

amostras, que podem ser fabricados com uma ampla variedade de materiais de baixo custo⁸.

1.2. PLATAFORMAS MICROFLUÍDICAS

A microfluídica é uma ciência que estuda o controle e manipulação de pequenos volumes de fluidos (na ordem de μL , nL , pL , fL) em rede de microcanais e tamanho reduzido, levando a um baixo consumo de energia e efeitos especiais de microdomínio, sendo que pelo menos uma dimensão do canal deve estar na faixa de micrômetros. O comportamento dos fluidos em microescala pode diferir do comportamento em macroescala. Fatores como tensão superficial, dissipação de energia e resistência fluídica começam a dominar o sistema em nível micro⁹.

Intensos esforços têm sido direcionados nos últimos anos no desenvolvimento de plataformas microfluídicas para o propósito em aplicações analíticas. Os dispositivos microfluídicos (μFDs) são muito atrativos em diversas áreas, como análises clínicas e de alimentos, com vantagens na redução do uso de reagentes, redução do tempo total de processamento, considerando uma possível plataforma para substituir a configuração convencional de bancada úmida. Agora é possível aumentar a capacidade de processamento paralelo, bem como a confiabilidade e a sensibilidade por meio da automação, integração e miniaturização^{10,11}. Além disso, nas últimas décadas, avanços na tecnologia foram alcançados, resultando em melhorias significativas na fabricação de

dispositivos microfluídicos, e é possível desenvolver sistemas de diagnóstico no local de atendimento (*Point of Care*)¹².

Plataformas microfluídicas têm sido amplamente aplicadas na detecção de biomarcadores clinicamente relevantes, como resultado de suas vantagens intrínsecas, incluindo baixo consumo de reagentes, baixo custo, menores tempos de reação e a possibilidade de se desdobrarem pela integração de um laboratório inteiro em um único chip^{13,14,15}.

Os μ FDs são geralmente construídos com polímeros ou vidros usando uma variedade de técnicas para produzir canais microfluídicos. Diversas técnicas focadas no desenvolvimento de μ FDs têm sido empregadas utilizando-se materiais como silício, vidro, papel, cerâmicas cozidas a baixa temperatura e polímeros. Entre esses materiais, o silício tem sido amplamente utilizado como resultado de suas propriedades bem conhecidas e métodos de fabricação bem estabelecidos baseados na fotolitografia da indústria de semicondutores^{16,17,18}. Nas últimas décadas, com o desenvolvimento da litografia suave, o poli (dimetilsiloxano, PDMS) ganhou popularidade crescente e desempenhou um papel fundamental na promoção de melhorias significativas na pesquisa de dispositivos microfluídicos devido aos procedimentos de fabricação relativamente baratos e relativamente simples envolvidos¹⁹. Essas vantagens subjacentes contribuíram muito para o amplo uso do PDMS no desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para a detecção de biomarcadores²⁰. Apesar das vantagens, técnicas como litografia suave requerem condições especiais, incluindo uma sala limpa com controle de luz e diferentes fotomáscaras para cada novo padrão. Esses requisitos especiais tendem a diminuir a simplicidade

do processo. Desvantagens semelhantes são encontradas em técnicas como moldagem por injeção, moldagem de réplica e gravação a quente.

1.3. MICROFLUÍDICA EM PAPEL

Dentre os diversos materiais que podem ser utilizados em sistemas microfluídicos em SPEs, destaca-se o uso de papel em dispositivos conhecido como μ PAD (do inglês, *microfluidic paper-based analytical device*). O primeiro trabalho utilizando μ PAD foi relatado por Martinez e colaboradores²¹, que desenvolveram um dispositivo baseado na determinação simultânea colorimétrica de D-(+)-Glicose e BSA (Albumina de soro bovino, do inglês “*Bovine serum albumine*”) em amostras de urina, obtendo-se uma faixa linear de 2,5 a 500 mmol L⁻¹ para D-(+)-Glicose e de 0,38 a 75 μ mol L⁻¹ para BSA. Neste trabalho relata-se que o papel está emergindo como uma plataforma de baixo custo para a construção de dispositivos microfluídicos. O papel funciona como substrato microfluídico 3D porque sua rede de fibras de celulose atua como capilares, absorvendo soluções aquosas sem a necessidade de bombeamento ativo.

Um dos grandes atrativos do uso de papel para μ PADs deve-se as suas características como o baixo custo, facilidade de operação e também por serem descartáveis²². Um dos tipos de papel mais utilizados na fabricação de μ PADs é o papel cromatográfico Whatman #1 e, em menor escala o Whatman P81²³, devido ao seu elevado custo (cerca de 10 vezes mais caro que o Whatman #1).

No campo da análise eletroquímica, este tipo de dispositivo é muito difundido, sendo o trabalho realizado por Dungchai e colaboradores²⁴, o primeiro publicado utilizando a técnica de *screen-printing* para a confecção de sensores para a detecção de D-(+)-Glicose, lactato e ácido úrico. O dispositivo foi denominado como ePAD (do inglês, *electrochemical paper-based analytical device*), também chamado de E μ PAD (do inglês, *electrochemical microfluidic paper-based analytical device*). Métodos eletroquímicos possuem algumas características de grande interesse para a análise química em relação aos métodos colorimétricos, como maior sensibilidade, maior rapidez de análise e principalmente, as detecções eletroquímicas são insensíveis à luz ambiente e amostras coloridas²³.

Pode-se desta forma constatar que o custo final de uma determinação empregando-se um dispositivo do tipo PAD (*Paper-based Analytical Device*, dispositivos analíticos baseados no uso do papel) é bem menor que aquele empregando-se os métodos convencionais de análise. Outrossim, além do baixo custo de fabricação, é possível se obter diversos dispositivos em um único lote e acoplar estes dispositivos em sistema microfluídico com redução considerável do consumo de reagentes e geração de resíduos.

Sendo assim, torna-se interessante a construção de biossensores em plataformas E μ PAD, considerando-se a miniaturização do sistema e a possibilidade de se empregar equipamentos portáteis para análises diagnósticas em testes *point-of-care*. Com base nisso, a busca por métodos de análises clínicas mais simples, com menor tempo e baixo custo de análise para o diagnóstico de doenças, torna-se cada vez mais relevante⁸.

A integração de biossensores enzimáticos em sistemas EμPAD, mostra-se bastante promissora, devido à utilização de volumes reduzidos no sistema, o que auxilia no menor consumo de reagentes (em geral microlitros) e maior rapidez na resposta. Rungsawang e colaboradores²⁵ desenvolveram um EμPAD para a determinação de D-(+)-Glicose com detecção amperométrica empregando-se a enzima glicose oxidase. A faixa linear de concentração obtida para D-(+)-Glicose foi de 0 (sic) a 100 mmol L⁻¹ e o limite de detecção foi de 0,86 mmol L⁻¹

1.4. D-(+)-GLICOSE, CREATININA E ÁCIDO ÚRICO

A D-(+)-Glicose é um carboidrato importante para os seres vivos. Nos seres humanos, é utilizada como fonte de energia no processo de respiração celular gerando ATP como produto de sua degradação, além de ser um intermediário metabólico. Em geral a D-(+)-Glicose é monitorada no sangue, contudo, por ser excretada na urina é possível a quantificação neste fluido biológico onde a concentração para um indivíduo saudável é cerca de 15 mg dL⁻¹ (0,83 mmol L⁻¹)²⁶. Este valor não é detectado em exames de urina convencionais, pois os rins reabsorvem a D-(+)-Glicose, redirecionando-a para a corrente sanguínea. Porém, quando há um aumento excessivo da concentração de D-(+)-Glicose na corrente sanguínea, os rins podem perder a capacidade de reabsorvê-la, ocorrendo um aumento da concentração de D-(+)-Glicose na urina acima do valor normal (15 mg dL⁻¹)²⁷. Esta perda da capacidade dos rins em filtrar e reabsorver a D-(+)-Glicose é conhecida como

glicosúria (presença de altas concentrações de D-(+)-Glicose na urina). Tal deficiência é considerada um indicativo de problemas renais e diabetes²⁸.

A enzima glicose oxidase (GOx) é uma flavoproteína responsável pela catálise da oxidação da β -D-glicose em glucono- δ -lactona, que é hidrolisada a ácido glicônico, gerando peróxido de hidrogênio²⁹. A produção de GOx é realizada por alguns fungos e insetos, e o peróxido de hidrogênio gerado é utilizado como agente bactericida e também como fungicida³⁰. A GOx é uma enzima da classe das oxirredutases, catalisando reações de oxirredução a partir do oxigênio molecular como receptor de elétrons²⁹.

A creatina é um bioproduto do metabolismo de aminoácidos, sendo uma fonte de energia para os tecidos musculares³¹. Durante os movimentos de contração muscular, a creatina é espontaneamente convertida em creatinina, que é transportada pela corrente sanguínea até os rins, sendo excretada pela urina³². Em um indivíduo sadio, a concentração de creatinina na urina é relativamente constante na faixa de concentração de 40 – 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Sendo assim, concentrações inferiores a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pode ser um indicativo de perda da massa muscular e em concentrações superiores a 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pode estar relacionado com disfunções renais desde uma obstrução do trato urinário até problemas mais graves. Por exemplo, um indivíduo com uma insuficiência renal grave apresentará concentrações de creatinina superior a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, exigindo assim que esta pessoa seja submetida a um procedimento de diálise ou mesmo transplante de rins³³. O ácido úrico (UA, do inglês *uric acid*) é um metabólito do metabolismo das purinas e cerca de 70% de sua produção diária é excretada pelos rins³⁴. Os limites normais de excreção de UA no corpo humano estão entre 750 a 800 mg por dia³⁵. O aumento anormal desses níveis pode ser indicativo

de várias doenças, como riscos cardiovasculares³⁶ e doença renal crônica³⁷. Sha *et al.*³⁸ desenvolveram um eletrodo flexível baseado em MoS₂ de baixo custo para determinação de UA em amostras de urina humana obtendo o limite de detecção de 1,169 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e sensibilidade de $(98,3 \pm 1) \text{ nA } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Majoritariamente, as determinações de ácido úrico e creatinina em laboratórios de análises clínicas são realizadas por métodos colorimétricos. O ácido úrico é determinado através da reação enzimática da uricase, ocorrendo o acoplamento oxidativo catalisado pela peroxidase e, o peróxido de hidrogênio formado reage com diclorofenolsulfonato e 4-aminoantipirina produzindo a antipirilquinonimina de cor vermelha. A absorbância deste complexo formado é monitorada em 520 nm, sendo diretamente proporcional à concentração de ácido úrico da amostra.

A determinação da creatinina baseia-se na reação de Jaffé, na qual a creatinina reage com o íon picrato em meio alcalino, formando um complexo colorido laranja-avermelhado, monitorado em um comprimento de onda de 500 nm. Entretanto, ensaios clínicos para a determinação dessas espécies requerem a coleta de toda a urina produzida pelo paciente dentro de 24 horas e pré-concentração da amostra para a análise^{39,40,41,42}. Há relatos na literatura que usam outros métodos para a detecção desses analitos, como eletroforese capilar^{13,43}, HPLC^{44,45}, e outros^{46,47}.

Pudir *et. al.*⁴⁸ descreveram diversos tipos de biossensores (amperométricos, potenciométricos, etc.) destinados à determinação de creatinina. Lad *et. al.*³³ desenvolveram um biossensor com três enzimas, onde a creatininase converte creatinina em creatina. Em seguida, é convertido em sarcosina e ureia via creatina amidino-hidrolase. Então, a sarcosina oxidase

converte a sarcosina em glicina, acetaldeído e peróxido de hidrogênio. A determinação da creatinina foi realizada através de cronoamperometria, monitorando o peróxido gerado.

Cincotto *et al.*⁴⁹ desenvolveram um dispositivo eletroquímico microfluídico em papel contendo duas manchas: uma modificada com pontos quânticos de grafeno para a determinação do ácido úrico e a outra funcionando como biossensor modificado com pontos quânticos de grafeno. A enzima nesse caso foi a creatininase e o cloreto de hexaminrutênio atuou como mediador de elétrons na determinação da creatinina. O dispositivo permitiu a detecção simultânea de ácido úrico e creatinina com LODs de 8,4 nmol L⁻¹ e 3,7 nmol L⁻¹, respectivamente.

Rossini *et al.*⁵⁰, desenvolveram um dispositivo miniaturizado descartável baseado em papel para a determinação colorimétrica de creatinina e ácido úrico. Para isso, a determinação da creatinina foi baseada na reação de Jaffé e para a detecção de ácido úrico a redução de Fe³⁺ para Fe²⁺ foi monitorada utilizando 1,10-fenantrolina. Os limites de detecção foram 0,139 mmol L⁻¹ para CNN e 0,098 mmol L⁻¹ para o ácido úrico.

1.5. PSA

O PSA (Antígeno prostático específico, do inglês, *Prostatic Specific Antigen*) é uma glicoproteína pertencente ao grupo das calicreínas, no fluido prostático. Sua função consiste em degradar proteínas sintetizadas na vesícula seminal, com o objetivo de evitar a coagulação do sêmen. Quando há perda da

arquitetura normal da glândula, os níveis de PSA no sangue aumentam, indicando tumorigênese da próstata, pois o PSA passa a ter acesso à circulação periférica⁵¹. O câncer de próstata é o segundo tipo de tumor mais incidente entre os homens brasileiros⁵², sendo que a maior taxa de ocorrência é entre homens com idade superior a 65 anos (cerca de 75%). O primeiro exame a ser realizado para a detecção do câncer de próstata é o exame retal, onde se observa um aumento anormal na próstata. Mediante as alterações na próstata é realizado o exame de monitoramento dos níveis de PSA no sangue⁵³. Quando os níveis de PSA do paciente superam o valor de 10 ng mL^{-1} , as chances de o indivíduo estar desenvolvendo o câncer de próstata superam os 50%. O método usual para a detecção de PSA é o ELISA (do inglês “*enzyme-linked immunosorbent assay*” - ensaio de imunoabsorção enzimática), porém este tipo de ensaio costuma ter elevado custo. Além disso, existem outros métodos que vêm sendo desenvolvidos para este fim, como eletroquimioluminescência, fluorescência, quimioluminescência, espectroscopia Raman e detecção eletroquímica⁵⁴⁻⁵⁹.

Yang e colaboradores⁶⁰ desenvolveram um imunossensor com folhas de grafeno para a imobilização dos anticorpos e antígenos, utilizando-se tionina como mediador de elétrons e HRP. Este imunossensor apresentou uma faixa linear de resposta de $0,002\text{--}10 \text{ ng mL}^{-1}$ e um limite de detecção de 1 pg mL^{-1} . Shin *et al.*⁶¹ relatam um imunossensor feito a partir de microesferas magnéticas presas a micropoços, onde os processos de captura e de detecção são realizados num sistema microfluídico. A determinação dos níveis de PSA foi realizada por espectroscopia de impedância eletroquímica, obtendo-se um limite de detecção de 1 pg mL^{-1} . Çevik e colaboradores⁶² realizaram a determinação de PSA utilizando um eletrodo de ouro modificado com cisteína e dendrímeros

de poliamidiamina com núcleo de ferroceno utilizando a técnica de monocamadas auto-organizadas. O anticorpo monoclonal de PSA (anti-PSA) foi imobilizado covalentemente nos dendrímeros que foram anexados à superfície de ouro modificada (Au / Cys / Fc-PAMAMs / anti-PSA). Os níveis de PSA foram analisados quantitativamente usando voltametria de pulso diferencial e o limite de detecção obtido foi de $0,001\text{ng mL}^{-1}$.

Para a análise diagnóstica, a possibilidade de monitoramento de duas ou mais doenças em um único dispositivo é de fundamental importância, assim, o acoplamento de diversos biossensores em um único dispositivo em sistemas μ PAD torna-se muito promissor. Desta forma, a possibilidade de construção de vários biossensores em um único arranjo é bastante relevante, pois pode possibilitar o monitoramento multiplexado de vários biomarcadores em uma única amostra em um sistema microfluídico, diminuindo o tempo de análise, consumo de amostra e aumento da precisão dos diagnósticos (diferentes biomarcadores relacionados a uma mesma doença podem ser acompanhados ou monitorados) ⁶³⁻⁶⁵.

2. DESENVOLVIMENTO DO μ PBDMA

2.1. OBJETIVO

O objetivo desta etapa do trabalho foi o desenvolvimento e fabricação de dispositivos impressos microfluídicos descartáveis de baixo custo para a sua utilização em análise multiplexada.

2.2. MATERIAL E EQUIPAMENTOS

2.2.1. Confeção dos componentes do dispositivo

Para a fabricação dos componentes utilizou-se:

- Folhas de poliéster (USA Folien)
- Adesivo de vinil (Imprimax)
- Adesivo dupla face 3M
- Tinta condutiva de carbono (Gwent)
- Tinta condutiva de prata/cloreto de prata (Gwent)
- Impressora de recorte Silhouette CAMEO 3 gerenciada pelo *software* Silhouette Studio

2.2.2. Ensaios de desempenho do dispositivo

- Corante vermelho 40 (Sigma-Aldrich – USA)
- Ácido ferroceno carboxílico (Sigma-Aldrich – USA)

- Carbon black VX-72R (Cabot)
- Quitosana (Sigma-Aldrich – USA)
- Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura (resistividade > 18,0 MΩ cm) obtida em um sistema Millipore Milli-Q
- Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT-12 (Eco Chemie, Holanda) com um módulo de multiplexação (MUX) controlado pelo software NOVA 2.1
- Para o ensaio de ângulo de contato utilizou-se o equipamento TECHNIQUIP modelo 21AC, gerenciado pelo software DROPimage advanced

2.3. PROPOSTA INICIAL

O dispositivo sensor é composto pelo arranjo de eletrodos, que consiste em quatro camadas: o eletrodo de trabalho (WE, do inglês *working electrode*), o eletrodo de pseudo-referência (*pseudo-RE*, do inglês *pseudo-reference electrode*) o contra-eletrodo (CE, do inglês *counter electrode*) e canal microfluídico

2.3.1. Eletrodos de trabalho e pseudo-referência

Os eletrodos de trabalho e o de pseudo-referência foram confeccionados empregando-se procedimentos similares. Os eletrodos foram construídos utilizando uma máscara de adesivo de vinil contendo os formatos desejados dos eletrodos. Os formatos foram desenhados utilizando-se o programa Silhouette

Studio 4.1 e uma impressora de recorte foi utilizada para recortar o adesivo, gerando a máscara. A máscara foi fixada sobre o substrato de poliéster, neste caso, transparência para impressão em impressora laser e, em seguida, feita a deposição das tintas condutoras de carbono e de prata/cloreto de prata utilizando a técnica de serigrafia. Após a deposição, foi feita a cura das tintas por meio de tratamento térmico a 90°C para a tinta de carbono e 60°C para a tinta de Ag/AgCl por 30 min, conforme ilustrado no esquema mostrado na **Figura 2**.

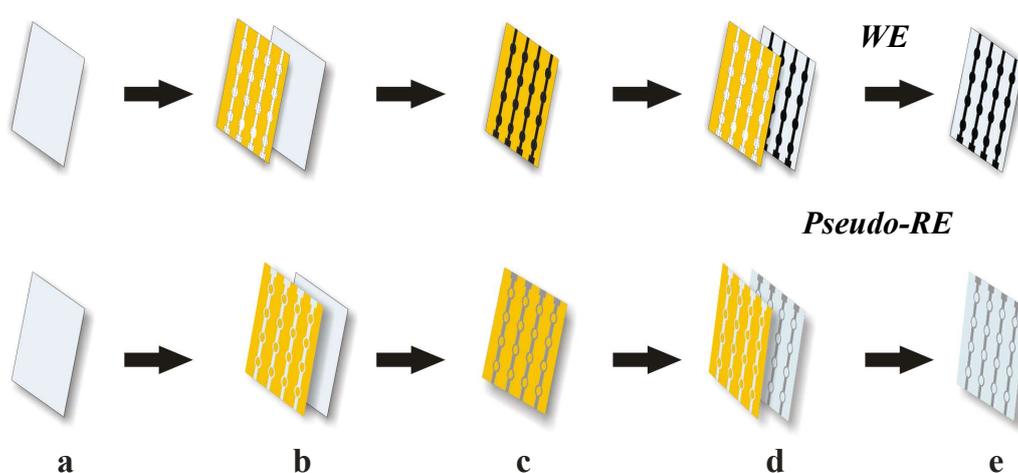


Figura 2. Representação esquemática da fabricação dos eletrodos: a) folha de transparência; b) transferência do adesivo vinílico recortado para folha de transparência; c) serigrafia da tinta de carbono e da tinta de Ag/AgCl em cada respectivo eletrodo; d) retirada do adesivo vinílico e e) WE e pseudo-RE.

2.3.2. Contra-eletródo e canal microfluídico

Para o CE, uma folha de poliéster com as mesmas dimensões dos eletrodos descritos anteriormente foi recoberta com uma tinta condutiva de carbono em sua totalidade (**Figura 3a**). Para a fabricação do canal microfluídico, uma folha de papel de filtro foi cortada em quatro tiras retangulares de mesmo tamanho, como ilustrado na **Figura 3b**.

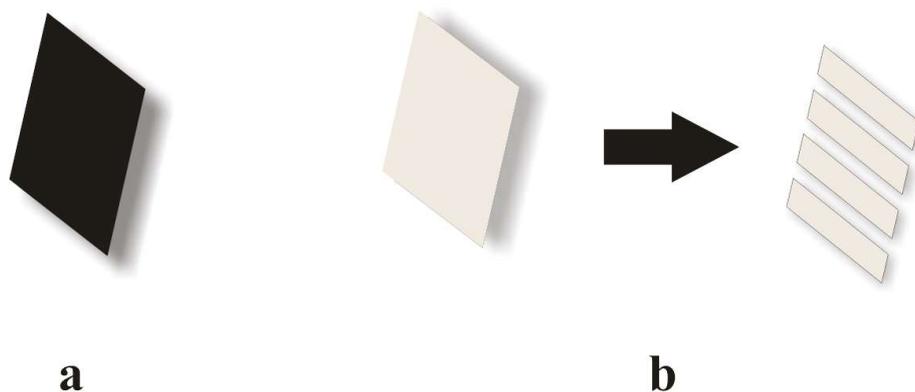


Figura 3.(a) contra eletrodo e (b) fabricação do canal microfluídico.

2.3.3. Montagem do arranjo de eletrodos

A partir da fabricação de todos os componentes (WE, RE, CE e canal microfluídico), a montagem do sensor foi feita pela sobreposição destes componentes (camadas), seguindo a ordem que está ilustrada na **Figura 4**.

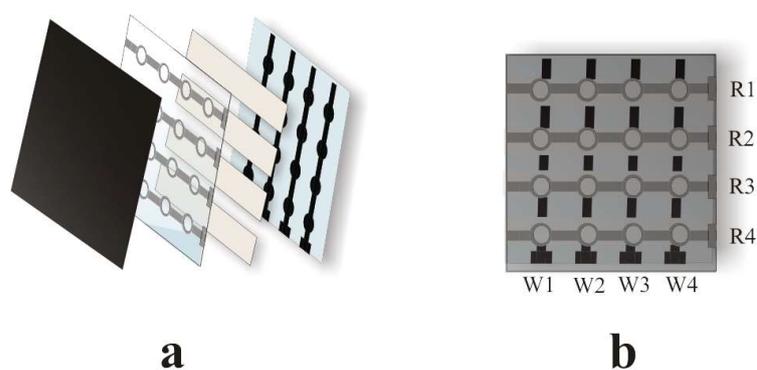


Figura 4. Ilustrações de (a) sequência de montagem do dispositivo e (b) dispositivo com as camadas sobrepostas.

Desta forma, os eletrodos de trabalho estão dispostos na orientação vertical enquanto os eletrodos de referência na orientação horizontal para que cada

sensor esteja alocado na intersecção WE vs. RE, formando uma rede com 16 pontos de sensoriamento independentes entre si. Esta independência se dá devido ao formato em tiras dos canais microfluídicos, que estão dispostos na mesma orientação dos REs, e assim impedir a intercomunicação entre os sensores. Isto aconteceria caso o canal microfluídico fosse constituído de apenas uma folha de papel com as dimensões do sensor, pois ao conectar um WE e um RE, toda a coluna do WE estaria ligada. Os pontos de sensoriamento, então, foram nomeados de acordo com os WE e RE que os constituem, conforme esquematizado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificação dos pontos de biossensoriamento do sensor proposto.

	W1	W2	W3	W4
R1	W1R1	W2R1	W3R1	W4R1
R2	W1R2	W2R2	W3R2	W4R2
R3	W1R3	W2R3	W3R3	W4R3
R4	W1R4	W2R4	W3R4	W4R4

2.4. SEGUNDA GERAÇÃO DO μ PBDMA

Durante o processo de desenvolvimento dos componentes do dispositivo proposto, ocorreram diversas modificações no *design* destes componentes. Cada modificação foi realizada visando a correção de imperfeições, melhoria no desempenho do dispositivo, chamado μ PBDMA (do inglês, *microfluidic paper-based device for multiplexed analysis*) e a minimização de gastos de material,

gerando menores custos de fabricação. Sendo assim, em seguida será relatado o processo de desenvolvimento destes componentes.

2.4.1. Contra-eletrodo e eletrodo de *pseudo*-referência

Na proposta original do projeto de pesquisa CE seria fabricado com folha de poliéster recoberta com uma tinta condutiva de carbono e o eletrodo de *pseudo*-referência seria confeccionado em uma etapa independente, como ilustrado na **Figura 5**.

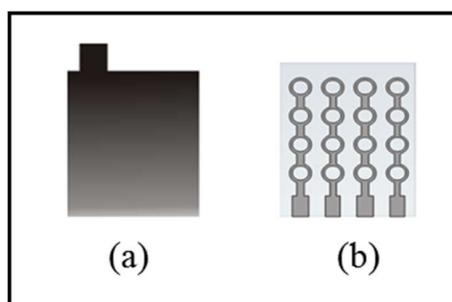


Figura 5. Ilustrações do (a) CE e (b) *pseudo*-RE.

Baseando-se na ideia de minimizar o consumo de materiais na fabricação do μ PBDMA, durante o remodelamento do projeto de fabricação do CE, optou-se também por adicionar a etapa de construção do *pseudo*-RE na mesma camada. Entendeu-se que esta estratégia seria benéfica pois, além de diminuir uma etapa na fabricação, a distância entre os eletrodos seria menor após a sua montagem, minimizando a possibilidade de mal contato no μ PBDMA. Assim, desenvolveu-se um novo projeto de construção do CE na mesma camada do *pseudo*-RE, como ilustrado na **Figura 6**.

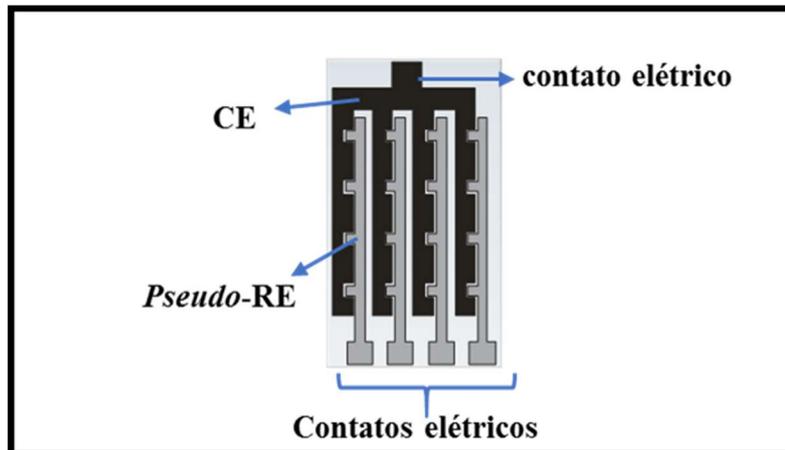


Figura 6. Ilustração do componente do μ PBDMA contendo o CE e o *pseudo*-RE na mesma camada.

Além disso, durante o processo de otimização do formato ou geometria deste componente, outras modificações, como a adição de mais um contato elétrico para o CE e mudança no desenho do *pseudo*-RE, conforme a **Figura 7**.

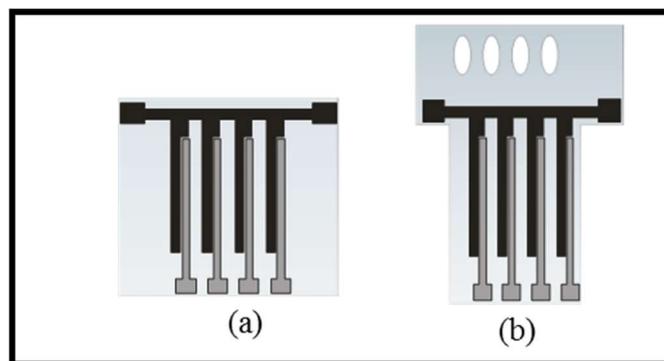


Figura 7. Ilustração do (a) componente contendo o CE e o *pseudo*-RE e (b) CE e *pseudo*-RE contendo abertura para a injeção de solução.

A inserção de um novo contato elétrico no CE foi realizada com o intuito de minimizar a diferença na resistência elétrica ao longo deste eletrodo, sendo que a modificação da posição dos contatos elétricos, bem como a abertura para a injeção foram projetadas devido à otimização do projeto do caminho

microfluídico, que será discutido adiante. A mudança no desenho do *pseudo*-RE foi realizada por uma questão de menor dificuldade para se retirar a máscara de adesivo de vinil e também devido a pequena distância entre os eletrodos, pois sendo o processo manual, frequentemente ocorria a aplicação da tinta de Ag/AgCl sobre o CE, inutilizando este componente.

2.4.2. Eletrodos de trabalho

A primeira versão dos eletrodos de trabalho foi fabricada conforme sugerido no projeto inicial (**Figura 8**), consistindo de uma série de quatro eletrodos conectados em linha, ligados em cada contato elétrico, formando assim, quatro séries de quatro eletrodos.

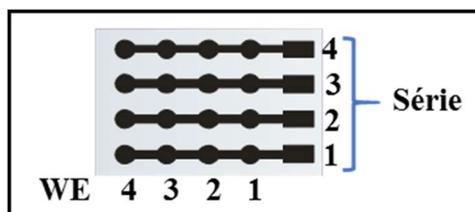


Figura 8. Ilustração da primeira versão do arranjo de WEs fabricado.

Com o auxílio de um multímetro, mediu-se a resistência elétrica entre o contato elétrico e cada WE em uma série de eletrodos e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resistências elétricas encontradas para a primeira versão de WEs.

		Resistência (Ω)			
S é r i e		WE 1	WE 2	WE3	WE4
	1	998	1236	1746	2457
	2	1023	1328	1841	2529
	3	1127	1296	1957	2630
	4	936	1184	1596	2328
média	1021	1261	1785	2486	

Nota-se, pelos valores mensurados, que houve um significativo aumento na resistência de cada WE medido na série e isso foi análogo à cada uma das quatro séries de eletrodos analisadas, havendo um aumento de aproximadamente 2,5 vezes nos valores de resistência elétrica entre o primeiro e o quarto eletrodo em cada série.

Em seguida, uma estratégia abordada para minimizar este efeito foi o de construir séries de eletrodos com dois contatos elétricos, sendo um em cada extremidade da série de eletrodos, conforme a **Figura 9**.

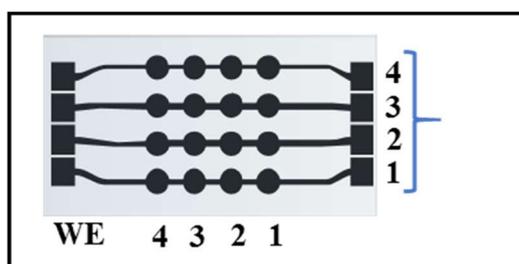


Figura 9. Ilustração da segunda versão do arranjo de WEs fabricado.

Com dois contatos em cada série, objetivava-se minimizar a diferença na resistência elétrica entre cada WE. Assim, com o auxílio de um multímetro,

realizou-se um procedimento análogo ao anterior, onde mediu-se a resistência elétrica em cada eletrodo da série em relação aos dois contatos elétricos, conforme a **Figura 10**.

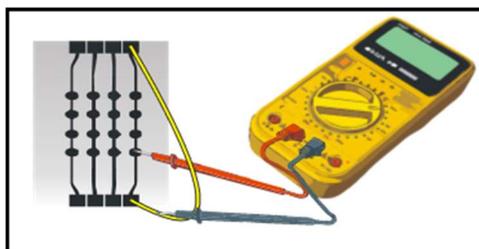


Figura 10. Ilustração do procedimento utilizado para medir a resistência elétrica de cada série de WEs.

Assim, os dois contatos de cada série estão conectados entre si por um fio de cobre, ligados à um dos cabos do multímetro e o outro cabo ligado a cada eletrodo. Com os resultados obtidos neste experimento (**Tabela 3**), observou-se que houve um significativo decréscimo na resistência elétrica nos eletrodos em relação aos contatos elétricos.

Tabela 3. Resistências elétricas encontradas para a segunda versão de WEs.

		Resistência (Ω)			
		WE 1	WE 2	WE3	WE4
S é r i e	1	512	653	627	489
	2	503	684	656	512
	3	536	664	603	478
	4	525	647	638	529
	média	519	662	631	502

Segundo as Leis de Ohm⁶⁷, a resistência de um material é diretamente proporcional ao seu comprimento e inversamente proporcional à sua área transversal e também a resistência equivalente é igual a somas das resistências de um conjunto de resistores em série. Trazendo esta analogia para o sistema proposto, o aumento da resistência ocorre porque os eletrodos de trabalhos estão ligados em série pelas trilhas dos contatos elétricos, aumentando assim a resistência à medida que se aumenta a distância entre o eletrodo e o contato elétrico.

Seguindo essa lógica, optou-se então por desenvolver um conjunto de eletrodos ligados entre si em paralelo (**Figura 11**), buscando uma menor diferença de resistência elétrica entre cada eletrodo.

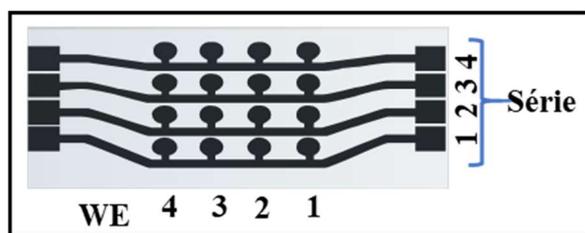


Figura 11. *Ilustração da terceira versão do arranjo de WEs fabricado.*

Baseando-se em que o inverso da resistência equivalente de resistores ligados em paralelo é igual à soma do inverso de cada resistência, esperava-se uma grande diminuição na diferença de resistência entre os eletrodos e os contatos elétricos para cada um dos WEs. Assim, o teste realizado para a versão anterior foi repetido para a terceira versão de eletrodos, cujos resultados encontram-se na **Tabela 4**.

Tabela 4. Resistências elétricas encontradas para a terceira versão de WEs.

		Resistência (Ω)			
S é r i e		WE 1	WE 2	WE3	WE4
	1	261	279	273	243
	2	291	300	295	271
	3	287	295	285	271
	4	273	282	287	275
média	278	289	285	265	

E, de fato, a diferença de resistência entre cada eletrodo foi diminuída significativamente em relação às outras versões. A variação destes valores ao longo de cada série também diminuiu, minimizando-se a possível variação da resposta analítica causada pela resistência elétrica em futuras análises de desempenho do μ PBDMA. Sendo assim, esta versão deste componente foi selecionada para os trabalhos futuros.

2.4.3. Caminhos microfluídicos

Em princípio, o projeto dos caminhos microfluídicos consistia em tiras de papel retangulares que abrangeriam toda a área de uma série de pontos de sensoriamento (i.e., WE, CE e *pseudo*-RE). O material a ser analisado e eletrólito suporte seria conduzido em fluxo para o μ PBDMA *via* capilaridade, conforme proposto no projeto inicial. Com este modelo, seria necessário a utilização de reservatórios contendo a amostra com o eletrólito suporte que, por sua vez, seriam conduzidos por um fluxo contínuo através do caminho microfluídico. Após a fabricação deste componente com o arranjo de sensores, notou-se que haveria a possibilidade de lixiviação dos produtos de reação (enzimática, por exemplo)

de um ponto de sensoriamento até o seguinte, comprometendo os resultados obtidos, pois desta forma, estes produtos de reação seriam carregados até o final do canal.

Assim, desenvolveu-se um novo formato do caminho microfluídico para que não houvesse intercomunicação entre os pontos de sensoriamento, como ilustrado na **Figura 12**.

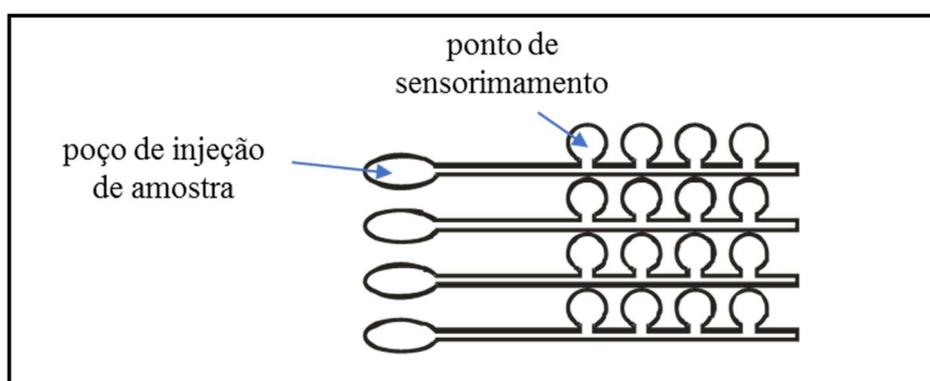


Figura 12. Ilustração da segunda versão dos caminhos microfluídicos.

Este formato de caminho microfluídico, diferente da versão anterior, não possui comunicação direta entre os eletrodos de trabalho, e desta forma os produtos de reação de cada eletrodo ficam confinados em cada ponto de sensoriamento, evitando assim efeitos de interferência nos eletrodos vizinhos. Esta nova versão possui um poço para a injeção de amostra com capacidade para 60 μL para cada série totalizando uma capacidade total de 240 μL para o preenchimento de todo o dispositivo. A partir da injeção da amostra, o fluxo percorre o caminho microfluídico, abastecendo cada ponto de sensoriamento, conforme ilustrado na **Figura 13**.

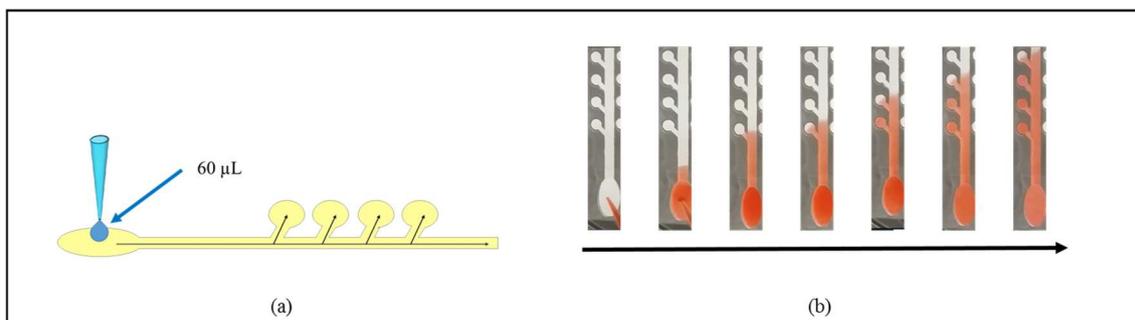


Figura 13. (a) Ilustração e (b) fotos demonstrativas do caminho percorrido por um fluido no caminho microfluídico.

2.5. Estudo do desempenho do μ PBDMA

O dispositivo foi então montado a partir da sobreposição de cada componente otimizado (como descrito anteriormente). A selagem deste μ PBDMA foi realizada utilizando-se adesivo dupla face, que foi recortado para a exposição das áreas de contato entre os eletrodos, conforme ilustrado na **Figura 14(b)**.

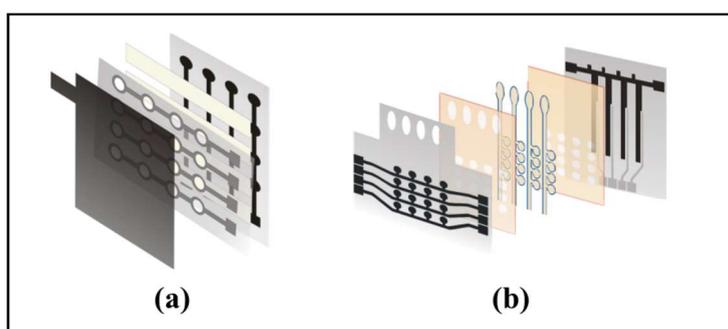


Figura 14. Ilustração do esquema de montagem do (a) dispositivo proposto no projeto de pesquisa e (b) dispositivo com os componentes otimizados.

Com o dispositivo devidamente montado (**Figura 15**), foi feita a avaliação do seu desempenho, que consiste na avaliação do seu funcionamento utilizando

a sonda eletroquímica ácido ferrocenocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pela técnica de voltametria cíclica para cada eletrodo do μ PBDMA.

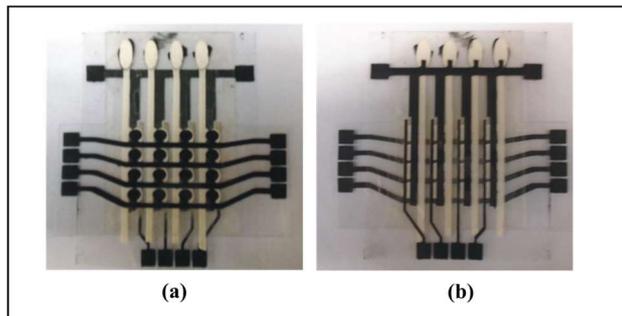


Figura 15. Fotografia do μ PBDMA construído; **(a)** face superior e **(b)** face inferior.

Como pode ser observado na **Figura 15**, os caminhos microfluídicos foram montados em posição ortogonal em relação aos WEs, sendo isso projetado para que não houvesse intercomunicação entre os eletrodos de cada série. Assim, para cada ponto de sensoriamento do μ PBDMA, há uma intersecção entre o CE, *pseudo*-RE, caminho microfluídico e um WE, sendo denominado como “canal” e sua classificação feita de acordo com a posição dos WEs no μ PBDMA, como ilustrado na **Tabela 5**.

Tabela 5. Classificação dos pontos de sensoriamento do μ PBDMA.

	WE 1	WE 2	WE 3	WE 4
Série 1	CH 01	CH 02	CH 03	CH 04
Série 2	CH 05	CH 06	CH 07	CH 08
Série 3	CH 09	CH 10	CH 11	CH 12
Série 4	CH 13	CH 14	CH 15	CH 16

*CH, do inglês *channel*

Inicialmente, realizou-se um tratamento ácido das superfícies dos WEs utilizando-se H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, sob agitação por um período de 60 min. Este procedimento foi adotado com o propósito de modificar a superfície de cada um dos eletrodos com grupos funcionais oxigenados (e.g. carboxila, carbonila e hidroxila, cetona entre outros), tornando a superfície menos hidrofóbica, aumentando assim a interação na interface eletrodo/solução e auxiliando na modificação dos eletrodos com dispersões aquosas. Isso foi estudado a partir da avaliação do ângulo de contato com uma gota d' água da superfície. O ângulo de contato do WE sem tratamento foi igual a 115° (**Figura 16a**), enquanto que o ângulo de contato do WE submetido ao tratamento ácido de sua superfície foi igual a 70° (**Figura 16b**), mostrando que o tratamento ácido auxiliou na diminuição da hidrofobicidade da superfície do eletrodo.

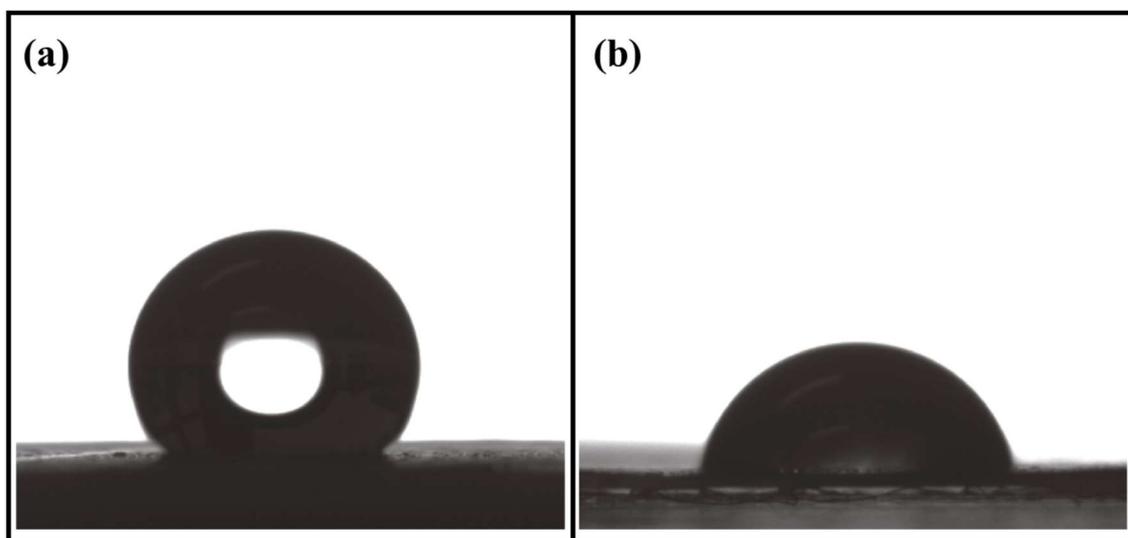


Figura 16. Imagens do ângulo de contato do WE (a) sem tratamento e (b) com tratamento ácido (H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, sob agitação por um período de 60 min.)

Em seguida, um estudo comparativo utilizando dispositivos com e sem tratamento ácido foi feito por voltametria cíclica utilizando a sonda eletroquímica,

ácido ferrocenocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, como apresentado na **Figura 17**.

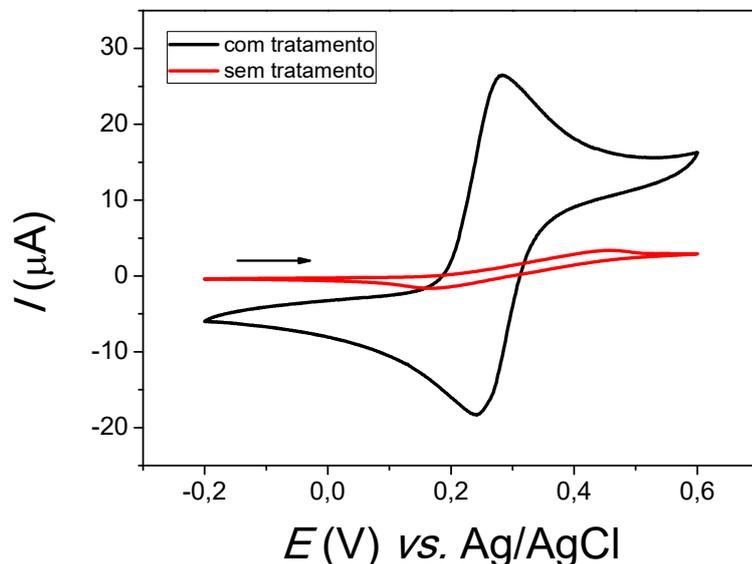


Figura 17. Voltamogramas cíclicos obtidos para o ácido ferrocenocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, sendo que o CV em preto corresponde ao WE submetido ao tratamento ácido e o **vermelho** refere-se ao WE sem tratamento.

Desta forma, observou-se um aumento da magnitude de corrente de pico de aproximadamente 16 vezes ao submeter o WE ao tratamento ácido. Além disso, ocorreu um decréscimo no ΔE_p , indicando maior reversibilidade do sistema. Considerando o aumento significativo da resposta, o tratamento ácido do WE foi adotado nos trabalhos posteriores.

Com este procedimento estabelecido, a etapa seguinte do trabalho consistiu na avaliação do desempenho do μPBDMA utilizando uma sonda eletroquímica. Na **Figura 18** observou-se um acentuado decréscimo da corrente

de pico (catódica e anódica) em relação a medida seguinte em cada canal estudado (em cada um dos WE).

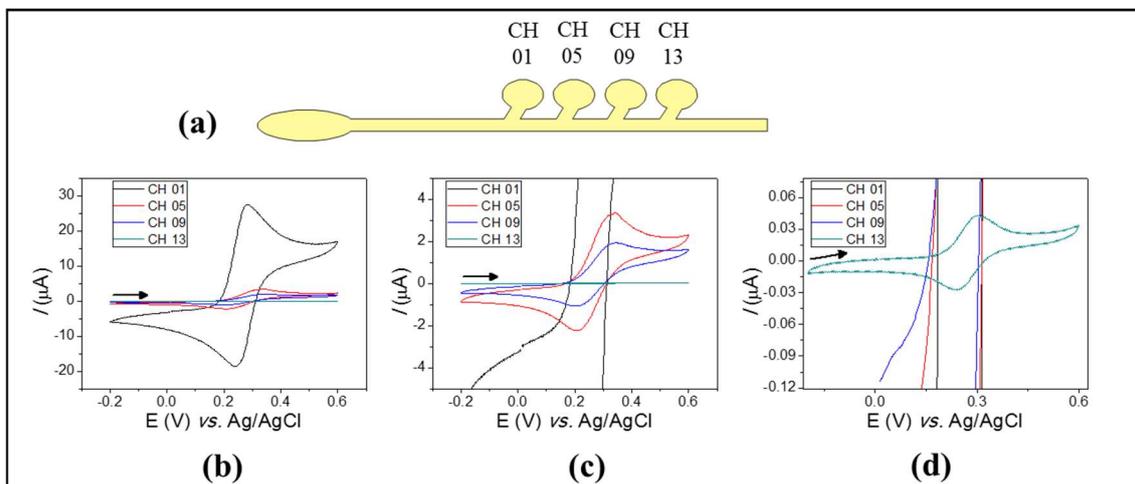


Figura 18. (a) Canais avaliados (01, 05, 09 e 13) em um caminho microfluídico; (b) Voltamogramas cíclicos obtidos para o ácido ferrocenocarboxílico 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; (c) ampliação do voltamograma cíclico (b) e (d) ampliação do voltamograma cíclico (c).

Ao se avaliar a resposta dos 16 canais do μ PBDMA, pode-se observar que o mesmo ocorre em todos os canais (correntes anódicas e catódicas) como mostrado na **Figura 19**.

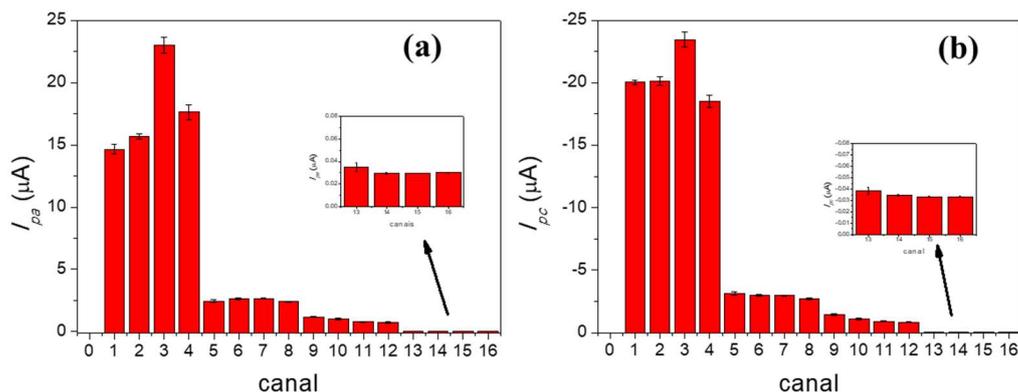


Figura 19. Diagramas de barras das correntes de pico obtidas por voltametria cíclica utilizando como sonda eletroquímica o ácido ferrocenocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ para os 16 canais do μPBDMA . **(a)** correntes de pico anódicas e **(b)** correntes de pico catódicas.

Este estudo revelou que a queda da magnitude de corrente de pico não é um efeito aleatório, que poderia ser causado apenas por imperfeições na fabricação dos componentes ou mesmo por imprecisão na etapa de montagem do dispositivo, mas sim um efeito sistemático, que pode ser proveniente das características de um ou mais componentes. Sendo assim, realizou-se estudos que levassem a uma elucidação da causa desse efeito e efetuar as devidas correções no projeto de fabricação do dispositivo.

O gradiente de concentração obtido no sistema em estudo pode estar relacionado com o comportamento observado nas técnicas de separação como a cromatografia em camada delgada (CCD)⁶⁸.

A CCD consiste na separação de dois ou mais compostos com base em suas polaridades. Usualmente, esta mistura é aplicada na fase estacionária (papel, por exemplo), que por sua vez tem sua base mergulhada em um solvente

(ou mistura de solventes) chamado fase móvel. Por capilaridade, a fase móvel é conduzida em direção à outra extremidade da fase estacionária. Compostos que possuem polaridades semelhantes à fase móvel serão conduzidos juntamente com essa e, compostos com polaridades diferentes (ou com maior afinidade com a fase estacionária) terão menor velocidade de eluição, ocorrendo assim a separação. Quando um composto está dissolvido na fase móvel, pode ocorrer (por diferença de polaridade) a formação de gradientes de concentração ao longo da fase móvel⁶⁹, como ilustrado na **Figura 20**.

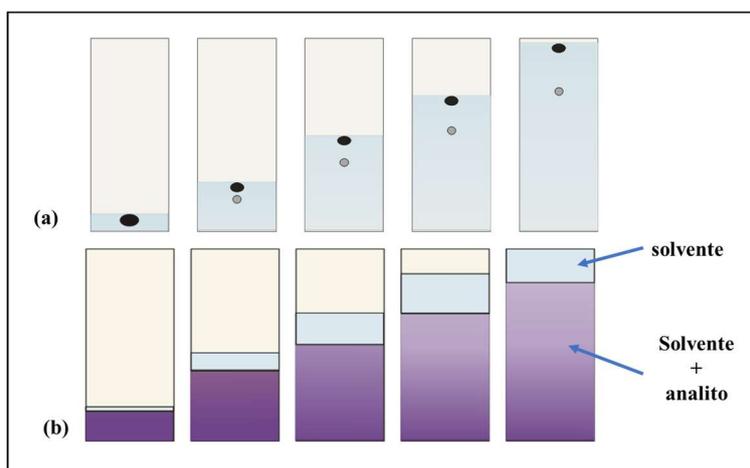


Figura 20. Ilustração da CCD para **(a)** analito aplicado sobre a fase estacionária e **(b)** analito dissolvido na fase móvel.

Sendo assim, pode-se esperar o mesmo comportamento para os caminhos microfluídicos desenvolvidos neste trabalho, ou seja, a formação de gradientes de concentração à medida em que a solução injetada no μ PBDMA avança (por capilaridade) pelo caminho microfluídico, conforme ilustrado na **Figura 21**.

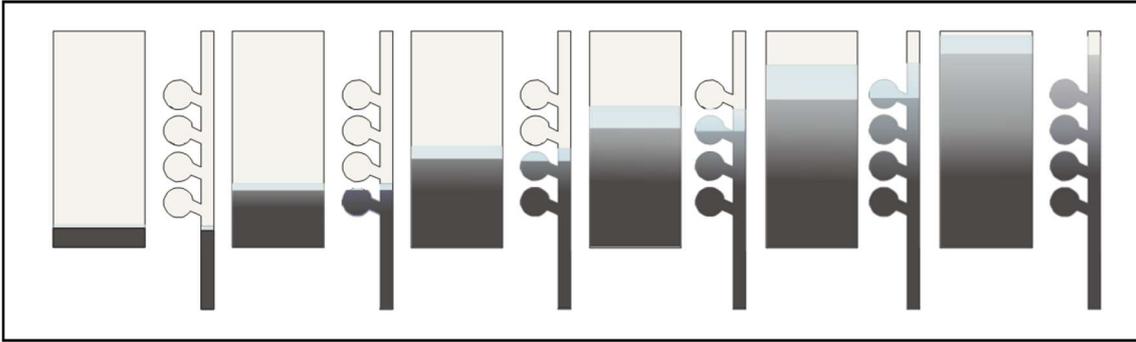


Figura 21. Ilustração do efeito da CCD no caminho microfluídico.

Este comportamento foi observado ao injetar uma solução aquosa do corante Vermelho 40 no caminho microfluídico, sendo que diferentes tonalidades de cor foram observadas em cada ponto de sensoriamento, mostrando assim que a intensidade de cor é diminuída gradativamente ao longo do sistema microfluídico como pode ser observado na **Figura 22**.



Figura 22. Fotografia do ensaio de injeção de corante Vermelho 40 no caminho microfluídico.

Este efeito cromatográfico é intrínseco ao material proposto para este componente do dispositivo e, diferente dos demais componentes, fica-se limitado a minimizar os efeitos causados para a obtenção de resultados mais consistentes. Desta forma entende-se que, a estratégia que deveria ser adotada seria projetar este componente de forma que este efeito seja exatamente igual

para cada ponto de sensoriamento, ou seja, que a concentração de analito que é transportada para cada um dos 16 pontos seja similar.

2.6. TERCEIRA GERAÇÃO DO μ PBDMA

Considerando-se os resultados obtidos anteriormente, estudou-se diversas possibilidades de configuração do sistema microfluídico, chegando-se a uma hexadecagonal com 16 canais, como mostrada na **Figura 23**. Neste sistema, os 16 canais de sensoriamento estão equidistantes do poço de injeção da amostra e/ou das soluções padrão.

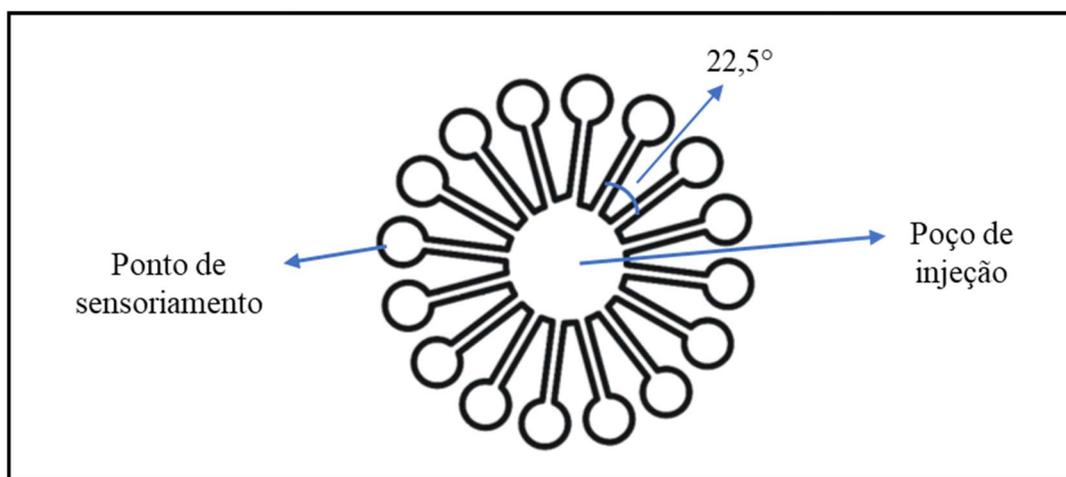


Figura 23. Ilustração do projeto do caminho microfluídico de modelo hexadecagonal.

Com este novo projeto de caminho microfluídico, realizou-se a avaliação do comportamento do fluxo, utilizando uma solução de corante, desde o poço de

injeção de amostra até os pontos de sensoriamento. Como previsto, o fluxo da amostra do corante, fotografado em diversos tempos após a injeção foi praticamente o mesmo, como pode ser observado na **Figura 24**.

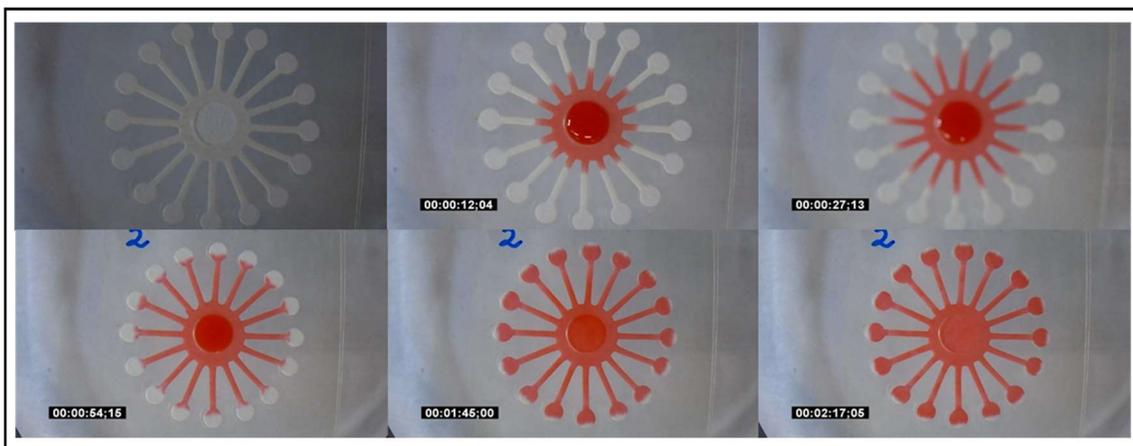


Figura 24. Fotos mostrando o fluxo de uma solução do corante Vermelho 40 no μ PBDMA com caminho microfluídico hexadecagonal

Como pode ser observado, o fluxo ocorre de forma uniforme durante todo o percurso. Injetou-se um volume de 60 μ L e o tempo de preenchimento de todo o caminho microfluídico ocorreu em 1 minuto e 45 segundos, (ver na **Figura 24**) porém, como previsto, o efeito cromatográfico no papel foi observado (após o tempo de preenchimento do componente, pode-se verificar a separação entre o solvente e o corante na extremidade de cada ponto de sensoriamento), mas com esta nova conformação, este efeito é similar para todos os canais, minimizando a possibilidade de grande diferença entre as respostas analíticas entre cada canal. Como será discutido no item a seguir, será avaliado como este efeito cromatográfico pode influenciar na resposta analítica do μ PBDMA, através de ensaios eletroquímicos.

Os demais componentes do μ PBDMA foram, então, projetados e construídos para se adaptarem ao novo formato de caminho microfluídico, conforme apresentado na **Figura 25**.

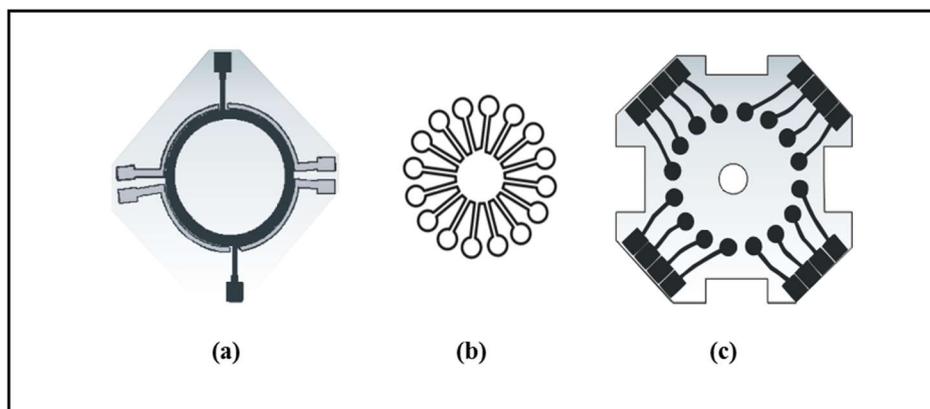


Figura 25. Ilustração dos componentes do μ PBDMA, sendo **(a)** CE, em preto, *pseudo*-RE em cinza; **(b)** caminho microfluídico e **(c)** WEs.

2.7. Estudo do desempenho analítico do μ PBDMA

Inicialmente, assim como na versão anterior, foi realizado o tratamento ácido da superfície dos WEs antes da montagem do μ PBDMA e, então, com este novo formato de dispositivo (**Figura 26**), foram avaliadas as respostas analíticas por voltametria cíclica empregando-se o μ PBDMA e o ácido ferrocenocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como sonda eletroquímica.

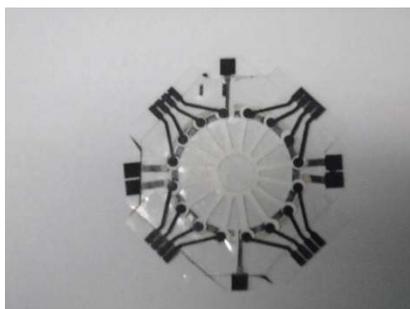


Figura 26. Fotografia do μ PBDMA fabricado.

Comparando-se as respostas analíticas para cada canal, obteve-se respostas em função de corrente de pico (**Figura 27**), com um desvio inferior a 17 %. Como a aplicação da tinta de carbono é feita manualmente, pode-se conjecturar que a contribuição relativa do desvio observado, deve estar relacionada a esta etapa do processo.

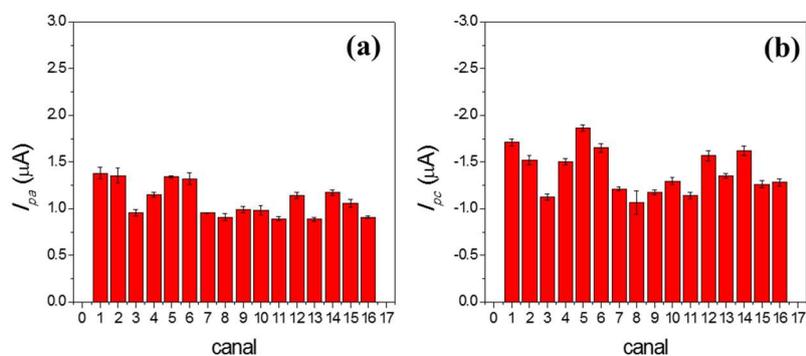


Figura 27. Diagramas de barras das correntes de pico obtidas por voltametria cíclica utilizando como sonda eletroquímica o ácido ferrocenocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ para os 16 canais do μ PBDMA com caminho microfluídico com modelo hexadecagonal. **(a)** correntes de pico anódicas e **(b)** correntes de pico catódicas.

2.8. Aprimoramento do μ -PBDMA

Levando em consideração a busca pela melhoria no desempenho do dispositivo, algumas alterações no *design* do dispositivo foram realizadas. Percebeu-se que durante a montagem de alguns dispositivos a sobreposição dos eletrodos não ficaram corretas, e assim alguns eletrodos de trabalho se encontravam fora da área de sensoriamento, a área do contra eletrodo sobreposta ao WE poderia variar ou mesmo a distância entre o WE e o RE aumentava. Estes fatores contribuíram para a variação do valor de corrente de pico obtida, utilizando a sonda eletroquímica.

Sendo assim, todos os componentes do dispositivo foram modificados, como descrito a seguir.

a) Eletrodo de trabalho

No último projeto de *design* do dispositivo apresentado, os 16 WEs foram impressos em um formato para se adaptar ao caminho fluídico com desenho hexadecagonal sem nenhum componente impresso na mesma camada (CE ou *pseudo*-RE). O projeto remodelado deste componente é composto pelo WE e o *pseudo*-RE na mesma camada, conforme **Figura 28**.

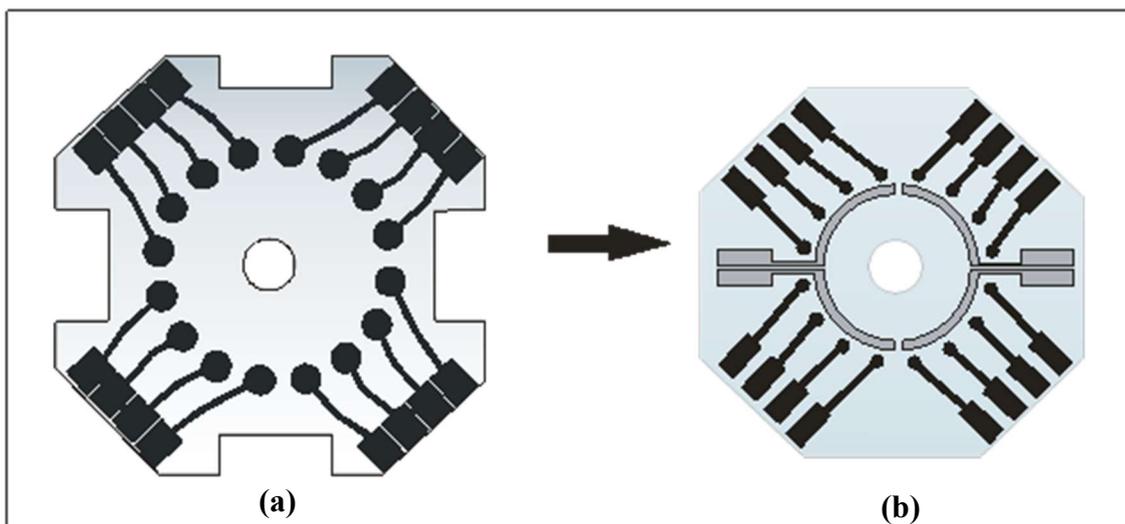


Figura 28. Ilustração dos projetos da camada contendo (a) o WE (versão anterior) e (b) Camada contendo o WE e o pseudo-RE na mesma camada.

Desta forma, também se optou por diminuir o diâmetro de cada WE, isto para adaptá-lo ao novo modelo e minimizar as danificações que ocorriam nos eletrodos ao manuseá-los, principalmente porque na superfície do WE, devido ao grande tamanho, alguns eletrodos eram riscados ao retirar o adesivo de vinil após o tempo de secagem da tinta. Além disso, o WE na mesma camada do *pseudo-RE* permitiu uma montagem do dispositivo na qual a distância entre os três eletrodos permanecia constante, diminuindo desta maneira o desvio padrão obtido para as análises com este dispositivo.

b) Contra Eletrodo

No projeto de CE apresentado anteriormente, o *pseudo-RE* estava contido na mesma camada que este, porém, no novo projeto, o *pseudo-RE* encontra-se

na mesma camada do WE, pôde-se aumentar a área do CE para os 16 pontos de sensoriamento, conforme a **Figura 29**.

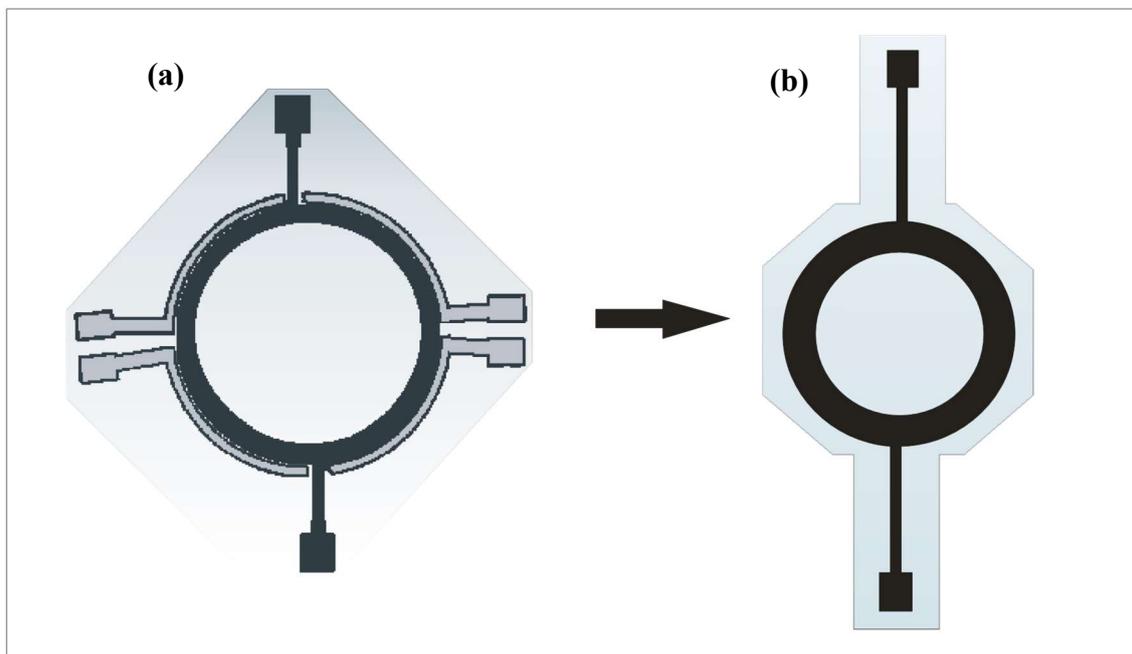


Figura 29. Ilustração dos projetos da camada contendo (a) Camada contendo o CE e o pseudo-RE na mesma camada WE (versão anterior) e (b) O projeto atual do CE.

Com o aumento da espessura do CE, foi possível, no processo de montagem, obter os 16 pontos de sensoriamento com a mesma distância entre os três eletrodos, possibilitando uma melhor repetibilidade dos sinais analíticos obtidos.

c) Canal microfluídico

A evolução no desenho do canal microfluídico está apresentado na **Figura**

30.

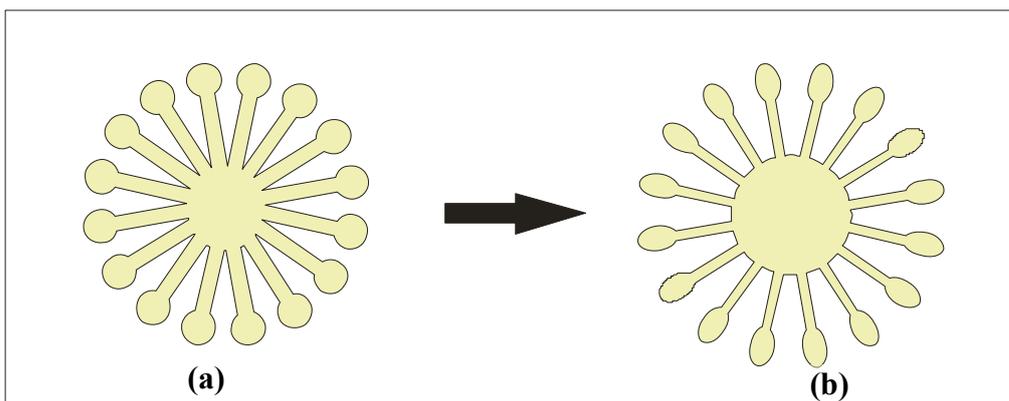


Figura 30. Ilustração dos projetos de canal microfluídico, sendo (a) versão anterior e (b) a versão atual.

A modificação do canal microfluídico deu-se simplesmente para adaptar-se ao novo *design* das novas camadas do dispositivo, limitando-se somente à modificação dos pontos de sensoriamento, de circular para elipsoidal, porém resguardando os mesmos princípios funcionais atribuídos ao seu modelo antecessor.

2.9. Estudo de análise de desempenho do μ -PBDMA

Com as devidas alterações dos componentes do μ PBDMA realizadas, retomou-se os experimentos referentes à análise do desempenho deste dispositivo utilizando-se a sonda eletroquímica de ácido ferrocenocarboxílico (FCA, do inglês “*ferrocenecarboxylic acid*”) $1,0 \text{ m mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. O primeiro ensaio realizado foi o de repetibilidade de medida dos 16 pontos de sensoriamento, utilizando a técnica de voltametria cíclica.

Nestes ensaios, os valores de desvio-padrão relativo (RSD, do inglês “*Relative Standard Deviation*”) obtidos para as correntes de pico anódica e catódica foram iguais a 8,6% e 9,3%, respectivamente. Além disso, os RSDs obtidos para os potenciais de pico medidos para cada ponto de sensoriamento também foram avaliados, obtendo-se um RSD de 4,4% para o potencial de pico anódico e 5,5% para o potencial de pico catódico. Levando-se em consideração os resultados obtidos para o *layout* anterior do dispositivo, verificou-se uma melhoria no desempenho do dispositivo frente às modificações realizadas, pois anteriormente os desvios obtidos foram de 14,7 e 16,5% para as correntes de pico (anódica e catódica, respectivamente) e de 12,8 e 11,0% para os potenciais de pico (anódico e catódico, respectivamente).

Outro ensaio realizado foi a utilização do dispositivo no modo de multiplexação. Neste caso, monitorou-se de forma sequencial o sinal obtido para a mesma sonda de FCA empregando-se quatro técnicas eletroquímicas diferentes. As técnicas foram a voltametria cíclica (para os canais de 1 a 4), voltametria de pulso diferencial (para os canais de 5 a 8), voltametria de onda quadrada (para os canais de 9 a 12) e cronoamperometria (para os canais de 13 a 16). Para isso, utilizou-se o potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT12, sendo que o ensaio sequencial destas quatro diferentes técnicas foi possível utilizando o módulo de multiplexação (MUX), que permitiu que o potenciostato convencional (monocanal) pudesse ser estendido para 16 canais (ou seja, 16 WE e 16 RE) (**Figura 31**)



Figura 31. Fotografia do módulo de multiplexação AUTOLAB (MUX).

A programação do ensaio foi realizada empregando-se o *software* NOVA® 2.2, inicialmente estabelecendo-se os parâmetros desejados para cada técnica (**Figura 32**), como o número de replicatas para cada técnica, janela de potencial (para as técnicas voltamétricas) e tempo e potencial aplicado (para a cronoamperometria), entre outras.

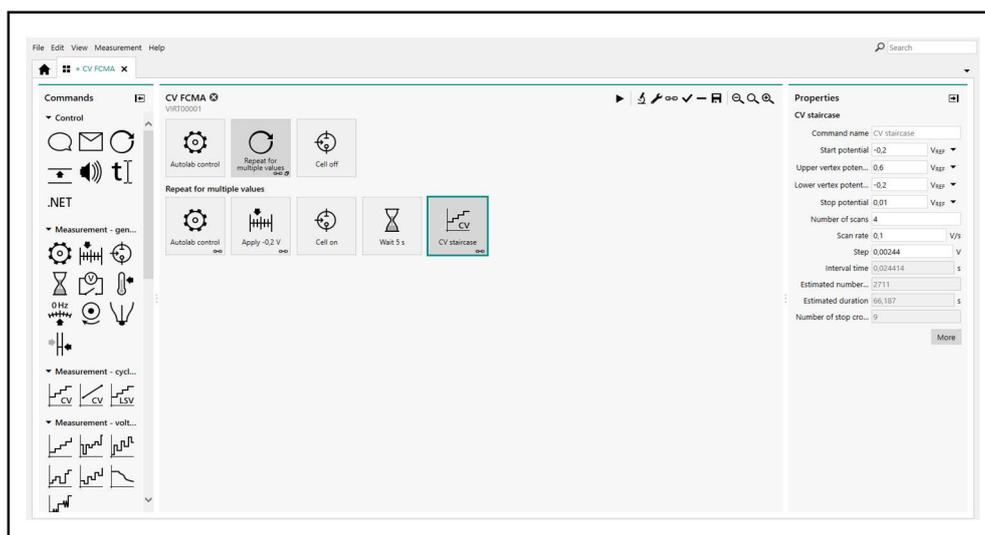


Figura 32. Imagem ilustrativa da janela do software NOVA® 2.2 para o ajuste dos parâmetros no caso da técnica de voltametria cíclica.

Após definidos todos os parâmetros a serem utilizados, as técnicas foram reunidas em uma única rotina de trabalho, para que a análise sequencial do μ PBDMA pudesse ser realizada em um comando chamado *schedule* (agenda, planejamento) como também mostrado na imagem da **Figura 33**.

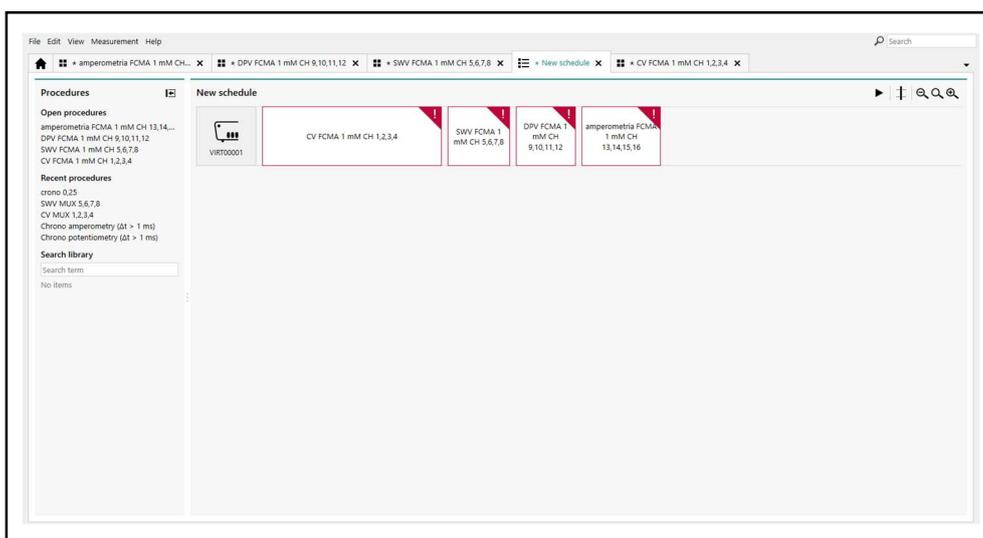


Figura 33. Ilustração do comando *schedule* para a análise multiplexada utilizando o μ PBDMA, com o software NOVA® 2.2.

Assim, monitorou-se a resposta obtida com a sonda eletroquímica FCA, contando com 4 canais para cada uma das técnicas acima mencionadas, objetivando-se, além da verificação da possibilidade de utilização de diversas técnicas analíticas em uma única rotina, a repetibilidade entre as quadruplicatas de cada técnica (**Figura 34**).

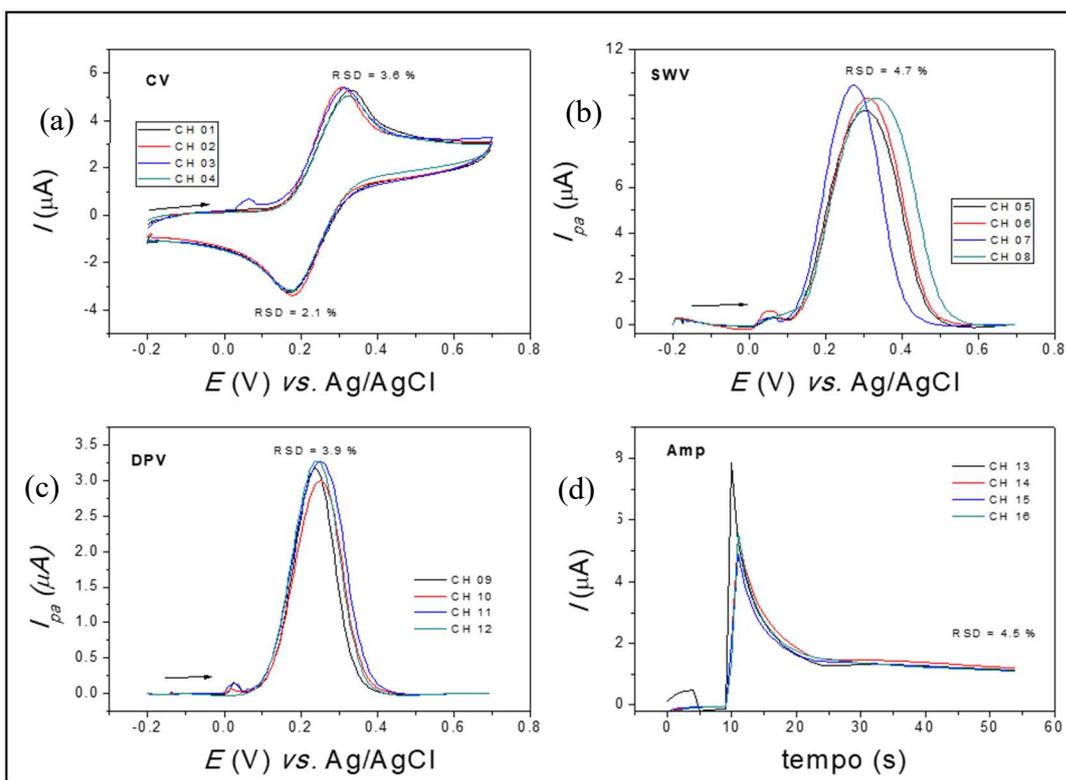


Figura 34. Resultados obtidos com a análise multiplexada do μ PBDMa com a sonda eletroquímica FCA 1 mmol L^{-1} . (a) Voltamogramas cíclicos; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (b) Voltamogramas de onda quadrada; $f = 80 \text{ Hz}$; amplitude = 90 mV e incremento de potencial = 1 mV , (c) Voltamogramas de pulso diferencial; amplitude = 90 mV e tempo de modulação = 5 ms , $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$; e (d) cronoamperogramas, potencial aplicado = 200 mV .

Com estes resultados, verifica-se o sucesso na aplicação do μ PBDMa para análise multiplexada, pois obteve-se êxito na programação e execução de quatro técnicas eletroanalíticas para um único dispositivo utilizando uma alíquota de $60 \mu\text{L}$ de solução padrão para realizar as 16 medidas (4 para cada técnica). Ademais, o RSD dos resultados obtidos empregando-se cada uma das técnicas, foram $3,6 \%$ para a voltametria cíclica, $4,7\%$ para a voltametria de onda

quadrada, 3,9 % para voltametria de pulso diferencial e 4,5 % para cronoamperometria. No estudo da repetibilidade entre os dispositivos, utilizou-se 4 μ PBDMAAs fabricados seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, sendo que o RSDs obtidos não excederam o valor de 5,0 %.

3. DETERMINAÇÃO DE D-(+)-GLICOSE, CREATININA E ÁCIDO ÚRICO

3.1. OBJETIVOS

Os objetivos desta etapa do trabalho foram a determinação de D-(+)-Glicose, creatinina e ácido úrico, utilizando dispositivos microfluídicos descartáveis como sensores e biossensores e a análise multiplexada destes analitos em uma única amostra utilizando o μ PBDMA.

3.2. Material e equipamentos

- Folhas de poliéster (USA Folien)
- Adesivo de vinil (Imprimax)
- Adesivo dupla face 3M
- Tinta condutiva de carbono (Gwent)
- Tinta condutiva de prata/cloreto de prata (Gwent)
- Impressora de recorte Silhouette CAMEO 3 gerenciada pelo *software* Silhouette Studio
- Ácido ferrocenocarboxílico (Sigma Aldrich, USA)
- Carbon black VX-72R (Cabot)
- Grafeno (Sigma Aldrich, USA)
- Quitosana (Sigma Aldrich, USA)
- Glicose oxidase de *Aspergillus niger* (Sigma Aldrich, USA)
- D-(+)-Glicose (Sigma Aldrich, USA)
- Creatininase (Sigma Aldrich, USA)

- Creatinina (Sigma Aldrich, USA)
- Cloreto férrico tetra hidratado (Sigma Aldrich, USA)
- Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura (resistividade > 18,0 MΩ cm) obtida em um sistema Millipore Milli-Q
- Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT-12 (Eco Chemie, Holanda) com um módulo de multiplexação (MUX) controlado pelo software NOVA 2.2
- Espectrofotômetro Shimadzu UV-2550

3.3. Construção de um biossensor para a determinação de D-(+)-Glicose

O biossensor para determinação de D-(+)-Glicose foi construído a partir de uma dispersão contendo *carbon black* (CB), que foi o material selecionado dentre outros materiais de carbono (grafeno, óxido de grafeno (GO, do inglês “*Graphene Oxide*”) e óxido de grafeno reduzido (RGO, do inglês “*Reduced Graphene Oxide*”). Para esta escolha, avaliou-se a resposta analítica do biossensor enzimático construído com os diferentes materiais supracitados frente a adições de uma solução-estoque de D-(+)-Glicose.

Para caracterização dos diferentes materiais de carbono empregados, obteve-se os espectros Raman (CB, GO, RGO e grafeno) a partir de uma amostra de cada material seco. A espectroscopia Raman é uma técnica muito útil para a obtenção de informações químicas e estruturais de uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, e esta baseia-se na incidência de uma radiação de laser monocromático sobre a amostra, ocorrendo um espalhamento da radiação em todas as direções. Uma parte desta radiação

espalhada é inelástica (frequência diferente da radiação incidente). Esta diferença de energia entre a radiação incidente e espalhada corresponde à energia vibracional dos átomos na região estudada, permitindo assim definir como estes átomos estão ligados⁷⁰.

Na **Figura 35** são apresentados os espectros Raman coletados para CB, GO, RGO e grafeno. Analisando-se os espectros obtidos, observa-se a presença da banda G ao redor de 1600 cm^{-1} , relacionada às vibrações das ligações duplas carbono – carbono (sp^2), e a banda D ao redor de 1360 cm^{-1} , relacionada à desordem e presença de defeitos.

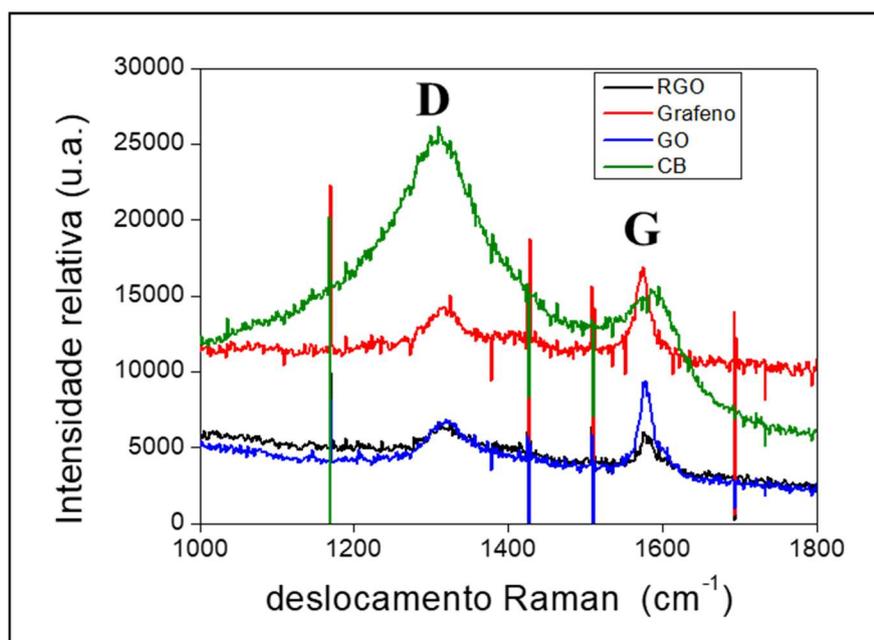


Figura 35. Espectros Raman obtidos para os materiais de carbono utilizados para a modificação dos eletrodos de trabalho no μPBDMA (CB, GO, RGO e grafeno).

O estudo da relação entre a intensidade das bandas D e G pode ser utilizada como uma estimativa do grau de desordem em materiais de carbono e, espera-se um incremento do valor desta relação como consequência do aumento do número de defeitos no material e a diminuição no tamanho das estruturas cristalinas. Assim, a intensidade relativa dessas bandas para cada material estudado foi tomada para efeitos de comparação. Na **Tabela 6** encontram-se as intensidades relativas das bandas D (I_D) e G (I_G) bem como a razão entre as intensidades das bandas D e G (razão I_D/I_G). Com base nos valores apresentados na **Tabela 6**, fica evidente que o CB apresenta maior número de defeitos e menor tamanho nas estruturas cristalinas em relação aos demais materiais.

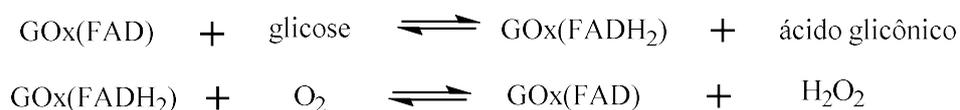
Tabela 6. Resultados obtidos nos espectros Raman para os materiais de carbono estudados.

Amostra	Banda D	Banda G	I_D/I_G
CB_	1310* (0,952**)	1589 (0,327)	2,91
GO_	1323 (0,456)	1578 (0,917)	0,50
Grafeno	1317 (0,486)	1572 (1,00)	0,49
RGO	1313 (0,783)	(1579 (1,00))	0,78

*Comprimento de onda; **Intensidade relativa

Em seguida, todos os materiais de carbono caracterizados foram testados na forma de modificador para a construção do biossensor para a determinação de D-(+)-Glicose. Porém, a estratégia de modificação inicialmente proposta foi

adaptada. Inicialmente, o biossensor foi projetado para determinação de D-(+)-Glicose por meio do monitoramento da concentração de peróxido de hidrogênio produzido na reação enzimática. A glicose oxidase (GOx) é uma enzima que catalisa a oxidação da D-(+)-Glicose para ácido glicônico. Na reação enzimática o cofator FAD (Flavina-Adenina Dinucleotídeo) presente na enzima é reduzido a FADH₂, sendo em seguida reoxidado pela doação do par de elétrons recebido anteriormente para o oxigênio molecular (O₂), que é reduzido a peróxido de hidrogênio⁷¹, conforme as seguintes equações químicas (1 e 2):



Considerando-se que a detecção eletroquímica do H₂O₂ é dependente do oxigênio disponível, e que o sistema μ PBDMA é fechado, (dispositivo com montagem do tipo sanduíche) não permitindo assim o controle da saturação de oxigênio da solução após a injeção da solução do analito, decidiu-se pelo uso de um mediador redox, sendo os elétrons da oxidação enzimática da D-(+)-Glicose transferidos do cofator FAD (reação 1) para o mediador de elétrons, neste caso o FCA, caracterizando assim um biossensor de segunda geração (**Figura 36**).

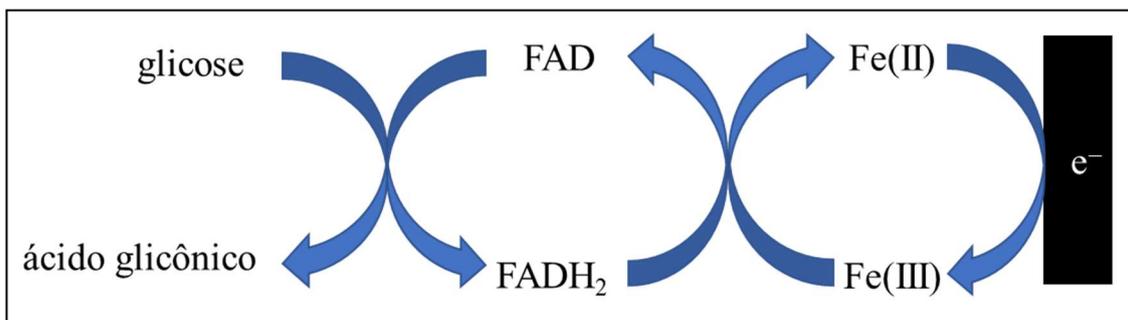


Figura 36. Ilustração das reações ocorridas no biossensor mediado por FCA (segunda geração).

Sendo assim, a estratégia de modificação dos eletrodos baseou-se na preparação dos filmes a partir de dispersões contendo 1 mg do material de carbono estudado, 50 μL de uma solução de FCA $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e 950 μL de uma solução de quitosana (CTS, do inglês “Chitosan”) 0,02 % (m/v), com volume final de 1 mL de dispersão. A opção pela utilização da CTS baseou-se na capacidade deste bio-polímero na formação de dispersões aquosas estáveis dos nanomateriais de carbono, bem como, a geração de filmes homogêneos e estáveis sobre a superfície eletródica. A GOx não foi adicionada nesta etapa porque durante a formação da dispersão foi necessário submetê-la a um banho ultrassônico por 60 minutos para a obtenção de uma dispersão homogênea. Após a preparação da dispersão, a enzima foi adicionada ao volume de dispersão, e a mistura obtida submetida à agitação mecânica por um período adicional de 30 minutos. Uma alíquota de 2 μL da dispersão foi então depositada sobre o eletrodo de trabalho e o solvente deixado secar à temperatura ambiente, obtendo-se assim os biossensores para D-(+)-Glicose. Após a secagem, o dispositivo foi devidamente montado e empregado nos estudos do comportamento eletroquímico por voltametria cíclica empregando-se uma

solução de D-(+)-Glicose 20,0 mmol L⁻¹ preparada em eletrólito suporte (neste caso, NaCl 0,1 mol L⁻¹).

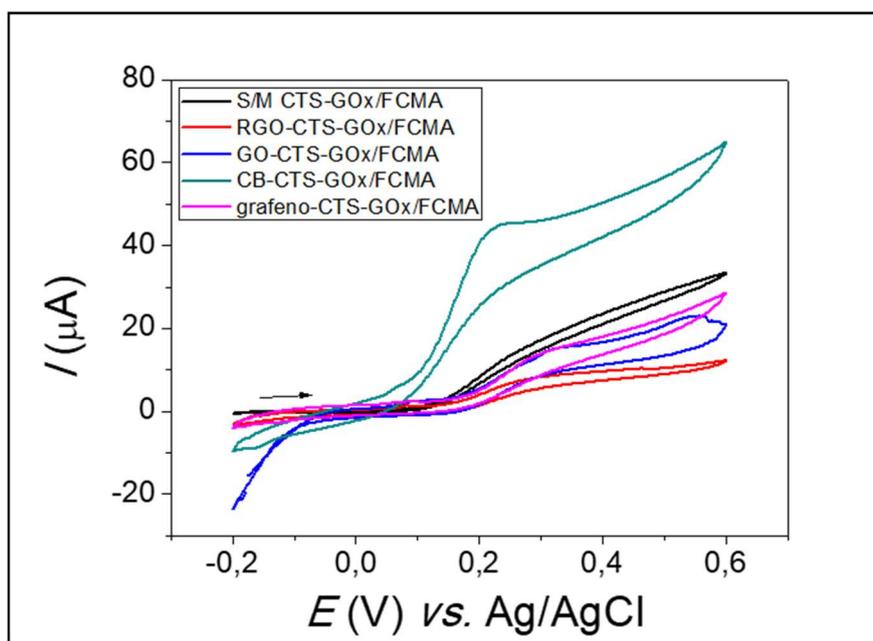


Figura 37. Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de D-(+)-D-(+)-Glicose 20 mmol L⁻¹ preparada em NaCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte utilizando-se os biossensores preparados com CB, GO, RGO, grafeno e WE modificado apenas com CTS-GOx. $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Como se pode verificar na **Figura 37**, o biossensor modificado com CB apresentou os resultados mais promissores (em relação aos biossensores construídos com os demais materiais de carbono estudados), fornecendo um maior incremento de corrente para a adição de D-(+)-Glicose, quando comparado aos demais materiais de carbono estudados e assim, o CB foi selecionado como material modificador para os demais estudos.

Para compreensão do perfil voltamétrico apresentado anteriormente para a resposta do biossensor na presença de D-(+)-Glicose, avaliou-se a resposta do eletrodo modificado com e sem enzima com a solução de D-(+)-Glicose. Os voltamogramas obtidos empregando-se sensores modificados construídos com e sem a enzima GOx são apresentados na **Figura 38**. Desta forma, verificou-se que na ausência da enzima no filme, o comportamento eletroquímico apresentado refere-se à oxirredução Fe(III)/Fe(II) do FCA, ou seja, um voltamograma cíclico similar ao obtido no ensaio de desempenho do μ PBDMA onde monitorou-se somente a presença do FCA (ver **seção 2.9**). Todavia, na presença da GOx observa-se um efeito biocatalítico⁷² monitorado pelo incremento na corrente anódica que não é observado na ausência da enzima, na presença de uma solução de D-(+)-Glicose 10 mmol L⁻¹.

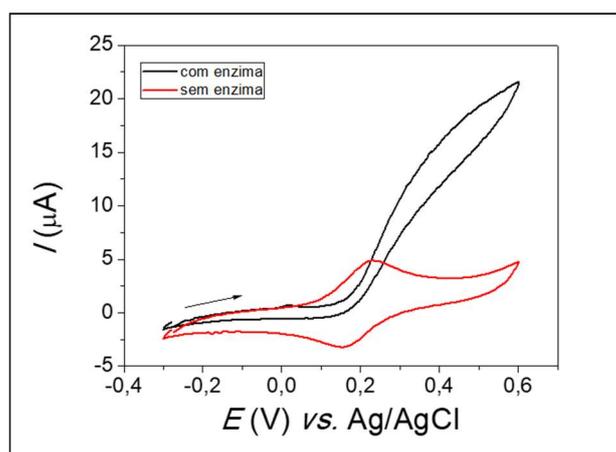


Figura 38. Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de D-(+)-Glicose 10 mmol L⁻¹ preparada em NaCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte utilizando-se eletrodos modificados com e sem a enzima GOx. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A partir dos estudos preliminares por voltametria cíclica, iniciou-se os estudos para a otimização do biossensor, sendo que a primeira etapa foi a determinação da concentração ótima (número de unidades) de GOx por eletrodo. Para isso, preparou-se quatro dispersões de CB-CTS, cada uma contendo uma quantidade definida de GOx a fim de que cada filme depositado contivesse quantidades de enzima iguais a 5, 10, 15 e 20 unidades por eletrodo, respectivamente. Com base nos resultados mostrados na **Figura 39**, verificou-se que o maior incremento de corrente foi obtido para o biossensor contendo 15 unidades de GOx por eletrodo e, conseqüentemente, todos os resultados mostrados posteriormente foram para eletrodos modificados com esta concentração da enzima GOx.

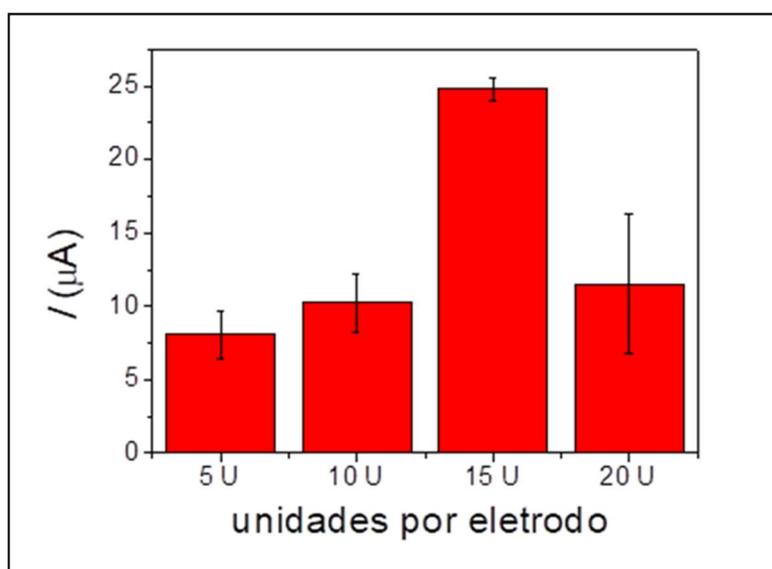


Figura 39. Gráfico de corrente de pico versus número de unidades de GOx por eletrodo obtido a partir de voltamogramas cíclicos registrados para uma de de D-(+)-Glicose 10 mmol L⁻¹ preparada em NaCl 0,1 mol L⁻¹.

Portanto, a arquitetura do biossensor enzimático para D-(+)-Glicose foi consolidada como um filme obtido através da deposição de 2 μL de uma dispersão de CB-CTS contendo a concentração de GOx de $7,5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$. Para a determinação de D-(+)-Glicose com o biossensor proposto foi utilizada a técnica de cronoamperometria e, assim, a etapa posterior do trabalho consistiu na otimização do potencial aplicado, variando este de +0,3 a +0,7 V. Na **Figura 40 (a)** apresentam-se os cronoamperogramas obtidos neste estudo. A partir dos cronoamperogramas, o gráfico de corrente versus potencial aplicado mostrado na **Figura 40 (b)** foi construído. O potencial de 0,6 V mostrou-se o mais adequado para o biossensor CB-CTS-GOx-FCA, pois apresentou o maior incremento de corrente para uma solução de D-(+)-Glicose 20 mmol L^{-1} em relação aos demais potenciais estudados, sendo este então selecionado para a construção da curva analítica para D-(+)-Glicose.

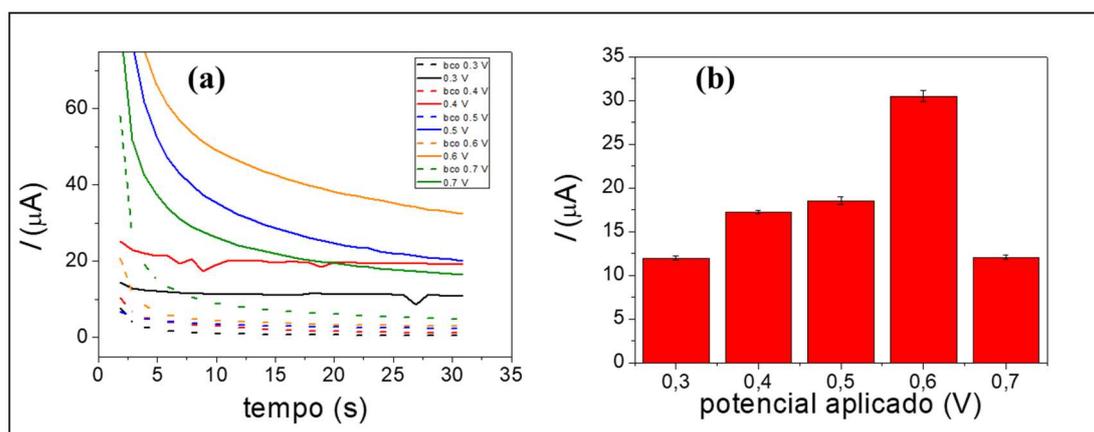


Figura 40. (a) Cronomperogramas obtidos no estudo de otimização do potencial aplicado empregando-se o biossensor CB-CTS-GOx/FCA para uma solução de D-(+)-Glicose 20 mmol L^{-1} preparada em $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito

suporte. **(b)** Gráfico de corrente (subtraída do branco) versus potencial aplicado obtido a partir dos cronoamperogramas mostrados em (a).

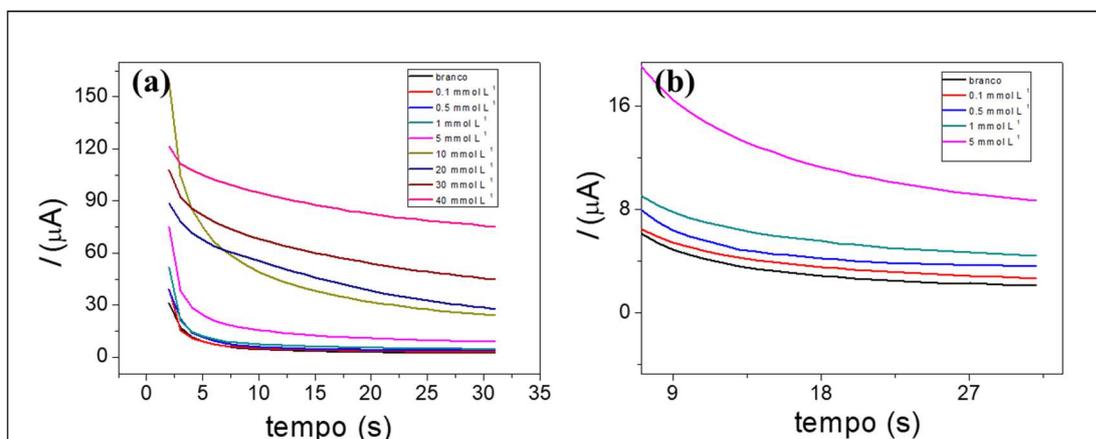


Figura 41. (a) Cronoamperogramas obtidos para as adições de soluções de D-(+)-Glicose preparadas (– 0,0 – 0,1 – 0,5 – 1,0 – 5,0 – 10,0 – 20,0 – 30,0 e – 40,0 mmol L⁻¹) em NaCl 0,1 mol L⁻¹ e **(b)** ampliação dos cronoamperogramas para as concentrações de 0 a 5,0 mmol L⁻¹. Potencial aplicado = +0,6 V.

Neste estudo, obteve-se uma faixa linear de trabalho de 0,1 a 40 mmol L⁻¹, (18,3 a 7212,0 mg dL⁻¹) e um limite de detecção de 0,03 mmol L⁻¹, demonstrando o sucesso na proposta de arquitetura de biossensor construído, o qual será utilizado para a consolidação da proposta do projeto que é a multiplexação de análise utilizando o μPBDMa .

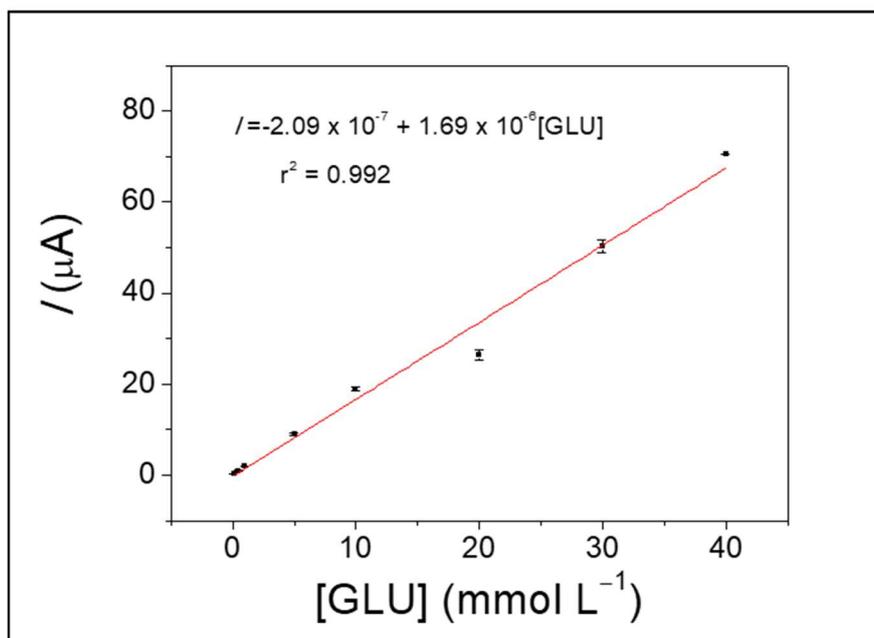


Figura 42. Curva analítica obtida por cronoamperometria utilizando o biossensor CB-CTS-GOx/FCA para as adições de soluções de D-(+)-Glicose (0,0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1,0 ; 5,0 ; 10,0 ; 20,0 ; 30,0 e 40,0 mmol L⁻¹) preparadas em NaCl 0,1 mol L⁻¹.

Este estudo proporcionou o desenvolvimento da arquitetura do biossensor para a determinação de D-(+)-Glicose que posteriormente foi utilizada no sistema multiplexado de análise com o μPBDMA em amostras de urina sintética e real, juntamente com os demais sensores e analitos propostos.

3.4. DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR PARA A DETERMINAÇÃO DE CREATININA

Para a determinação de creatinina, desenvolveu-se um dispositivo partindo dos mesmos princípios funcionais do μ PBDMA, ou seja, contendo 3 camadas: uma camada para os WEs, outra para o caminho microfluídico de papel e uma terceira camada contendo o CE e os *pseudo*-RE (**Figura 43**)

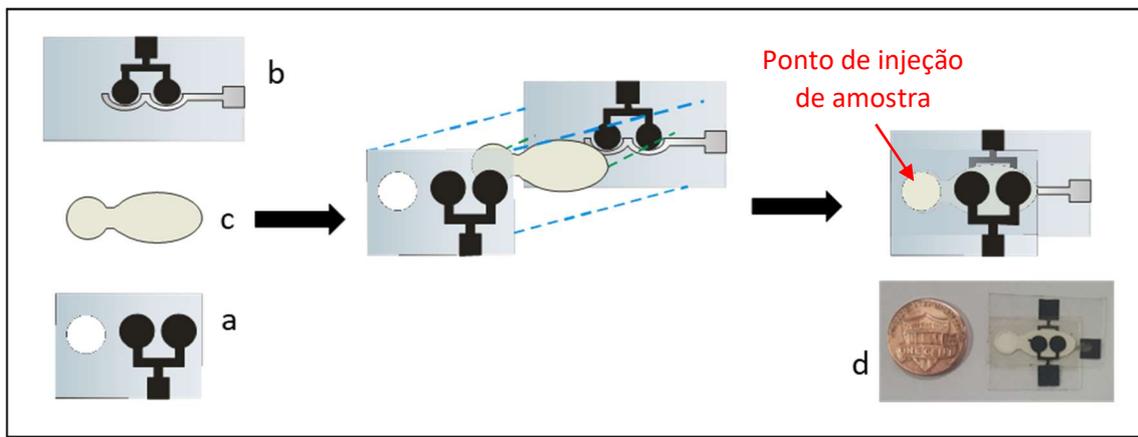


Figura 43. Etapas que envolvem a construção do novo dispositivo eletroquímico descartável: (a) eletrodo de trabalho, (b) eletrodos de pseudo-referência e contra eletrodo, (c) percurso de amostragem e (d) imagem real do dispositivo montado.

O dispositivo microfluídico descartável consistiu de dois WEs, sendo o WE 1 dedicado à determinação de ácido úrico e o WE 2 voltado para a determinação de creatinina. Para a determinação de ácido úrico e creatinina, estes eletrodos de trabalho foram sujeitos à uma etapa preliminar de modificação. No caso do WE 1, a estratégia de modificação da superfície do eletrodo envolveu o uso de *quantum dots* de grafeno (GQDs, do inglês “*Graphene Quantum Dots*”) e o ácido úrico foi determinado via oxidação direta sobre o eletrodo modificado, e no caso

do WE 2 a modificação foi realizada com o uso dos mesmos GQDs, além da enzima creatininase (CA, de *creatinina amidohidrolase*) e do mediador redox cloreto de hexaaminrutênio (III) (HMR). O mecanismo de detecção da creatinina sobre WE 2 modificado é discutido a seguir. A **Figura 44**, mostra esquematicamente a composição dos eletrodos modificados propostos para determinação simultânea de ácido úrico e creatinina. Cabe destacar, portanto, que o novo dispositivo eletroquímico microfluídico descartável compôs um sistema misto de detecção, envolvendo um sensor eletroquímico no caso da determinação de ácido úrico e de um biossensor eletroquímico para a determinação de creatinina.

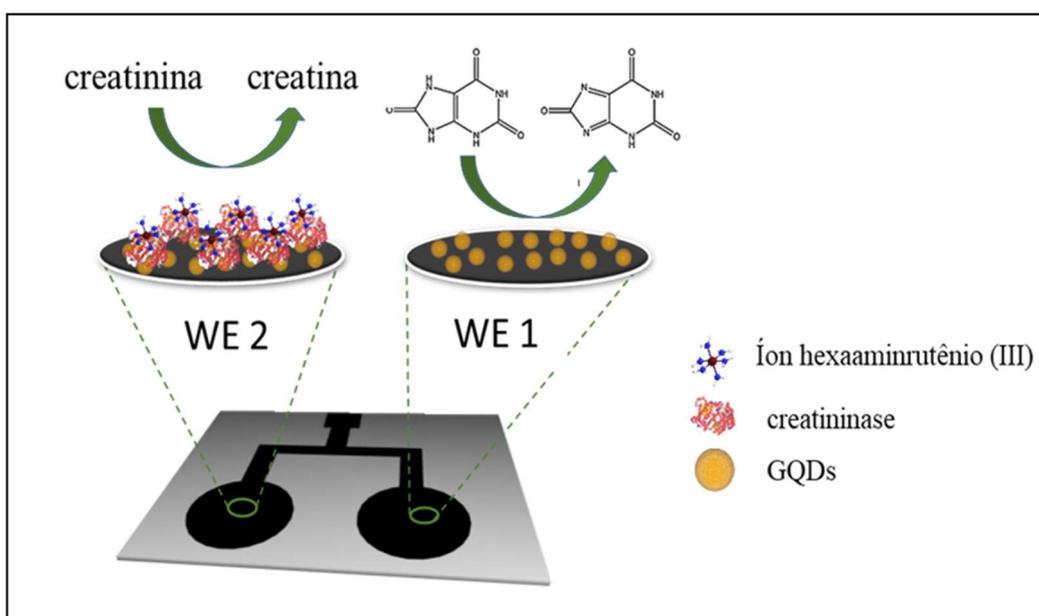


Figura 44. Esquema contendo os eletrodos de trabalho modificados. WE 1 com modificação de GQDs para a determinação direta do ácido úrico e WE 2 modificado com GQDs / CA / HMR para determinação da creatinina.

O comportamento eletroquímico dos analitos alvo sobre os eletrodos modificados foi inicialmente estudado de forma separada. Como já mencionado,

o WE 1 foi recoberto com um filme de GQDs, e a resposta eletroquímica do ácido úrico caracterizada por voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês “*Square-Wave Voltammetry*”) em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7). Para avaliar a influência destas partículas monocristalinas de GQDs sobre o comportamento eletroquímico do ácido úrico, os voltamogramas de SWV foram registrados empregando-se o WE 1 não modificado e modificado com GQDs. Os voltamogramas obtidos para ácido úrico 1,0 μmol L⁻¹ são apresentados na **Figura 45**. Em ambos os casos (WE 1 não modificado e WE 1 modificado com GQDs), um pico de oxidação foi observado durante a varredura de potenciais anódica na janela de potenciais empregada. O pico anódico obtido está de acordo com o esperado para a molécula de ácido úrico, como mostrada na **Figura 46** e envolve a eletrooxidação do ácido úrico à alantoína^{73,74}. O mais interessante a ser observado dos resultados da **Figura 45**, é a comparação da resposta do ácido úrico sobre o WE 1 antes e após a modificação com GQDs. Em comparação com o WE 1 não modificado, baseado apenas na tinta de carbono, o potencial de pico para oxidação do ácido úrico sofreu um deslocamento de 120 mV para potenciais menos positivos e a corrente de pico anódica aumentou em 5 vezes.

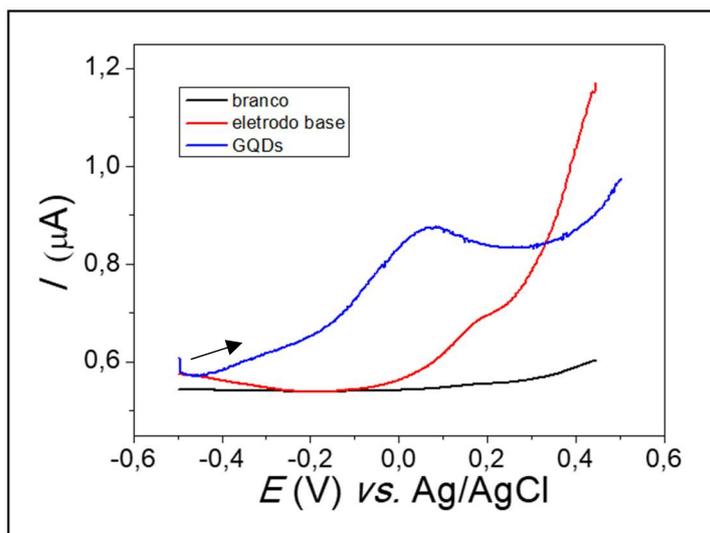


Figura 45. Voltamogramas de onda quadrada registrados para ácido úrico $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) utilizando-se o WE 1 não-modificado (eletrodo base) e modificado com GQDs.

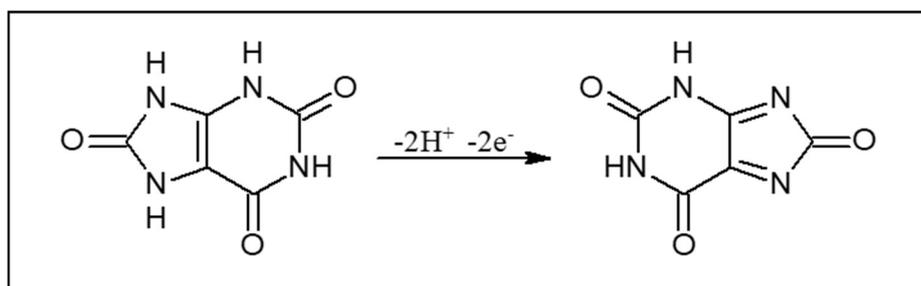


Figura 46. Reação de oxidação do ácido úrico ⁷³.

Como ilustrado na **Figura 44**, para determinação de creatinina, o WE 2 do dispositivo foi modificado com as partículas nanocristalinas de GQD e, posteriormente, com a enzima CA (WE 2) utilizando glutaraldeído como agente de reticulação. Sabe-se bem que o glutaraldeído pode formar ligações cruzadas estáveis pela reação com muitos nucleófilos, como os grupos amina, tiol,

hidroxila e imidazol⁷⁵, e esse reagente têm sido amplamente empregado para preparar biocatalisadores imobilizados, filmes poliméricos, micropartículas, hidrogéis e membranas^{76,77,78}. Além da enzima CA, o HMR foi incorporado à superfície eletródica para funcionar como mediador redox.

Para o estudo da resposta do biossensor enzimático preparado sobre a superfície do WE 2, também foi empregada a técnica de SWV. Como experimentos de controle, voltamogramas do WE 2 modificados com outras combinações dos componentes da interface biossensora também foram registrados. Como pode ser observado na **Figura 47**, os eletrodos mostraram respostas analíticas, que podem ser atribuídas à transformação eletroquímica do HMR na superfície do eletrodo. A presença de GQDs na interface causou um efeito catalítico na determinação analítica da creatinina, que foi obtida pela combinação de CA ativa, GQDs e do mediador redox na superfície modificada, demonstrando que a arquitetura da interface proposta é uma boa alternativa para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a creatinina.

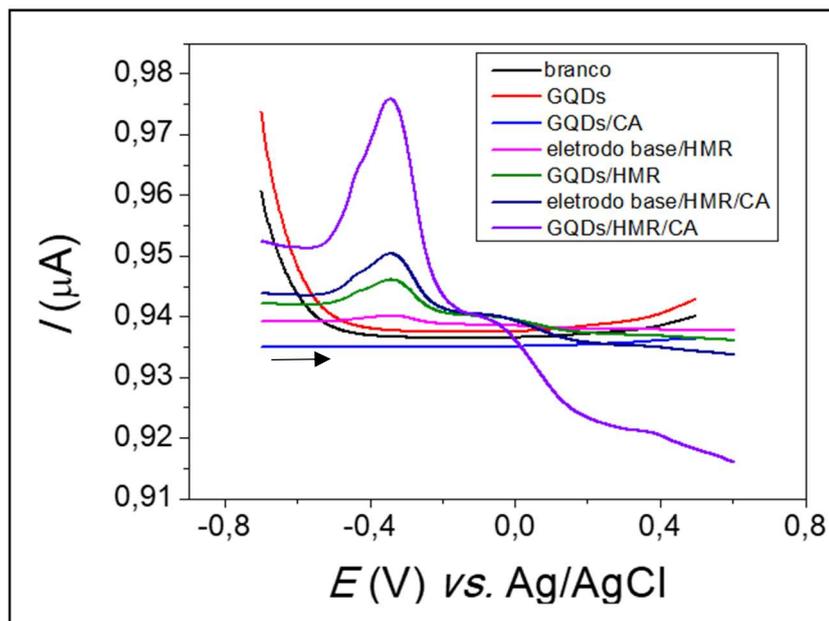
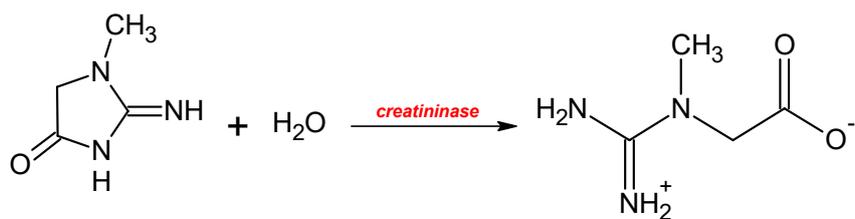


Figura 47. Voltamogramas de onda quadrada registrados para creatinina $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) utilizando-se WE 2 submetido a diferentes modificações.

O mecanismo envolvido consistiu no conjunto de reações mostradas abaixo. Através do mecanismo proposto, a creatinina é convertida em creatina pela enzima CA (reação 1). Na presença do mediador redox (HMR), o rutênio III reage com a creatina sendo convertido em rutênio II, etapa química (reação 2). Concomitantemente com a reação 2, o rutênio II é re-oxidado a rutênio III em uma reação eletroquímica (reação 3).



Reação 1



Para garantir que o sinal analítico registrado esteja de acordo com o mecanismo proposto, realizou-se um estudo relacionando a transformação de creatinina na presença de cloreto de hexaamminerutênio (III), voltamogramas cíclicos para creatinina foram obtidos utilizando-se o WE 2 modificados com GQDs e HMR com e sem enzima. Como pode ser observado pelos voltamogramas cíclicos da **Figura 48**, na ausência da enzima CA, adicionando creatinina em solução, o processo redox característico do HMR não é alterado. No entanto, com a presença da enzima, verifica-se um incremento na corrente anódica obtida, que ocorre devido ao produto da reação enzimática (creatina, reação 1) promover a redução do Ru (III) a Ru (II) na superfície do biossensor (etapa química, reação 2), aumentando a concentração desta espécie que é oxidada eletroquimicamente (reação 3), resultando no incremento de corrente quando comparado aos voltamogramas cíclicos na ausência da enzima, corroborando com o mecanismo proposto.

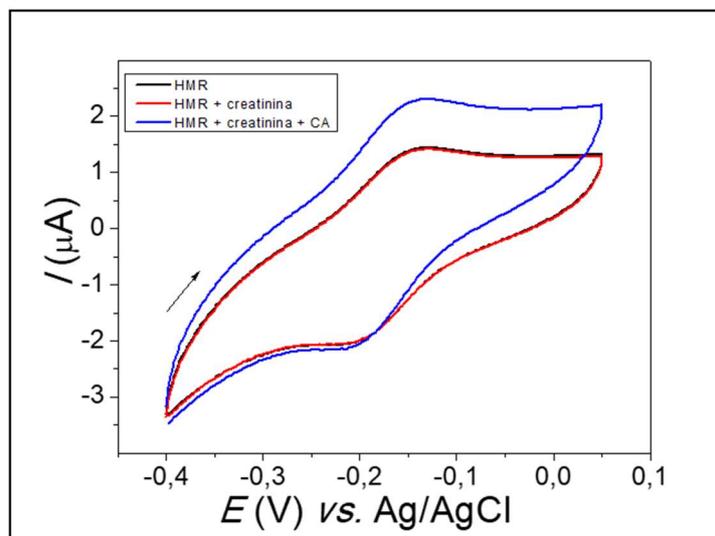


Figura 48. Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de creatinina utilizando-se WEs 2 modificados com GQDs / HMR antes e após a incorporação da enzima CA sobre o eletrodo modificado.

Levando-se em consideração o melhor desempenho eletroanalítico da SWV, as medidas eletroquímicas empregando-se o dispositivo descartável para a determinação simultânea de ácido úrico e creatinina foram realizadas utilizando-se esta técnica. Assim, uma série de otimizações foram realizadas para a obtenção da melhor resposta analítica para ambos os analitos utilizando-se o sistema de detecção mista proposto. Durante as otimizações, as concentrações de ácido úrico e creatinina foram mantidas constantes e iguais a $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Inicialmente, em relação à preparação do biossensor de creatininase, as respostas analíticas (correntes de pico para a oxidação Ru(II)/Ru(III)) mais intensas foram alcançadas utilizando-se os filmes obtidos a partir de dispersões contendo $1,5 \text{ mg/mL}$ de CA e empregando-se solução de glutaraldeído 2,0% (v / v) como agente de reticulação (**Figura 49 (a) e (b)**).

Também foi demonstrado que as maiores correntes de pico foram medidas com concentração de HMR $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (**Figura 49 (c)**). O efeito da concentração hidrogeniônica do meio (pH) também foi estudado, obtendo-se os maiores valores de corrente de pico em pH 7,0 (**Figura 49(d)**),

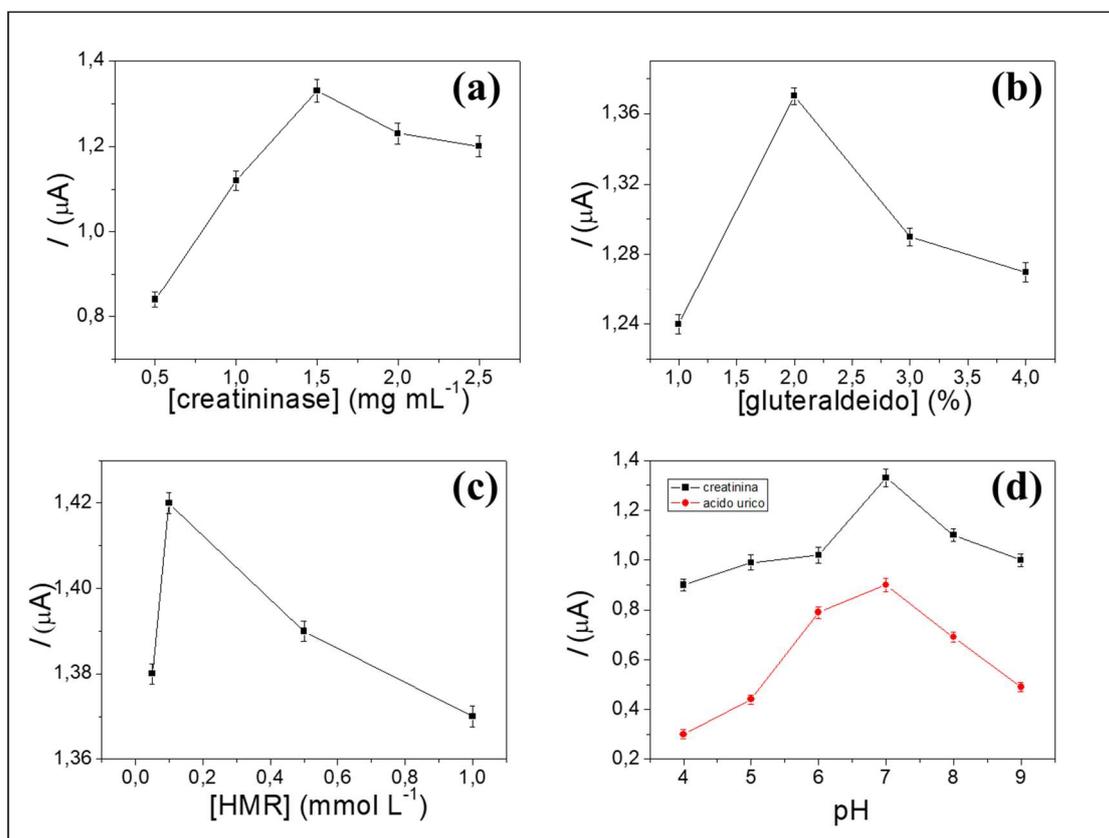


Figura 49. Otimização de parâmetros utilizados para a determinação de creatinina e ácido úrico: (a) Influência da quantidade de CA; (b) glutaraldeído e (c) concentração de HMR para o WE 2 e (d) influência do pH do eletrólito suporte sobre as correntes de pico obtidas para ácido úrico e creatinina.

Os parâmetros analíticos utilizados na técnica de SWV para a determinação simultânea de creatinina e ácido úrico foram estudados, sendo que

os valores ótimos obtidos foram: amplitude de modulação de 20 mV, frequência de 45 Hz e incremento de potencial de 0,5 mV (**Tabela 7**).

Tabela 7. Parâmetros analíticos para SWV estudados neste trabalho.

Técnica	Parâmetro	Intervalo	Selecionado
	Frequência (Hz)	10 a 100	45
SWV	Amplitude (mV)	5 a 100	20
	Incremento (mV)	0,1 a 10	0,5

Antes de avaliar o desempenho analítico do dispositivo eletroquímico descartável para a determinação simultânea dos analitos alvo, a determinação dos analitos sobre cada eletrodo de trabalho do dispositivo foi estudada separadamente. A **Figura 50** mostra os voltamogramas típicos de SW registrados no WE 1 do dispositivo após sucessivas adições de ácido úrico. Verificou-se o incremento na corrente de pico obtida para soluções de ácido úrico com concentração crescente, exibindo um comportamento linear ao longo da faixa de concentração de 10,0 nmol L⁻¹ a 3,0 μmol L⁻¹.

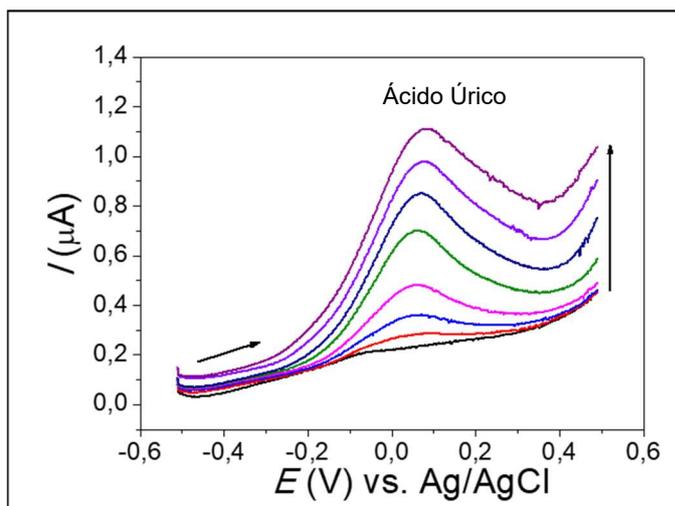


Figura 50. Voltamogramas de onda quadrada registrados para o WE 1 do dispositivo para soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de ácido úrico ($10,0 \text{ nmol L}^{-1}$ – $3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$).

A **Figura 51** mostra os voltamogramas de onda quadrada no caso do WE 2 do dispositivo após sucessivas adições de soluções de creatinina. Os valores de corrente de pico também aumentaram com a concentração de creatinina exibindo um comportamento linear ao longo da faixa de concentração de $10,0 \text{ nmol L}^{-1}$ a $3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

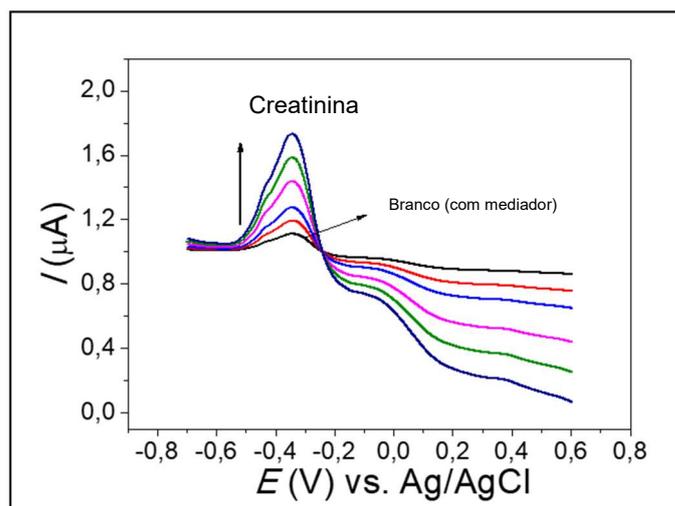


Figura 51. Voltamogramas de onda quadrada registrados para soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de creatinina ($10,0 \text{ nmol L}^{-1}$ – $3,0 \text{ μmol L}^{-1}$).

Depois que os dois WEs do dispositivo foram estudados nas determinações de ácido úrico e creatinina separadamente, o dispositivo foi avaliado na determinação simultânea de ambos os analitos. Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos após sucessivas adições de soluções contendo diversas concentrações de creatinina e ácido úrico em dispositivos são mostrados na **Figura 52(a)**.

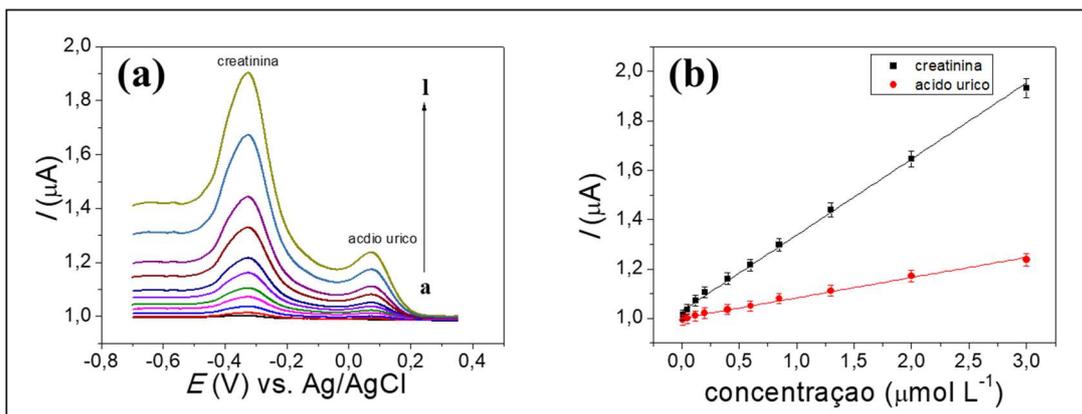


Figura 52. Voltamogramas de onda quadrada registrados no dispositivo para soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de ácido úrico e creatinina: 0 (a), 0,01 (b), 0,05 (c), 0,12 (d), 0,20 (e), 0,40 (f), 0,60; (g), 0,85 (h), 1,3 (i), 2,0 (j) e $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. **(b)** Curvas analíticas obtidas para creatinina e ácido úrico.

Observou-se um incremento nos valores de corrente de pico com o incremento da concentração de creatinina e ácido úrico, exibindo um comportamento linear ($r = 0,997$) e ($r = 0,996$), respectivamente, na faixa de concentração de $10,0 \text{ nmol L}^{-1}$ a $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (para ambos), conforme as seguintes equações:

$$\text{Creatinina: } I_p (\mu\text{A}) = 1,02 \times 10^{-6} (\pm 5,17 \times 10^{-9}) + 0,30 (\pm 0,0057) \times [\text{Creatinina}] (\mu\text{mol L}^{-1})$$

$$\text{Ácido Úrico: } I_p (\mu\text{A}) = 1,00 \times 10^{-6} (\pm 2,79 \times 10^{-9}) + 0,08 (\pm 0,0024) \times [\text{Ácido Úrico}] (\mu\text{mol L}^{-1})$$

Os limites de detecção de $3,75 \text{ nmol L}^{-1}$ e $8,40 \text{ nmol L}^{-1}$ foram estimados empregando-se o dispositivo proposto e SWV para creatinina e ácido úrico, respectivamente. Estes valores foram calculados de acordo com o critério $3 \times (S_b / m)$, sendo m o coeficiente angular da curva analítica e S_b é o desvio-padrão de 10 diferentes sinais do branco obtidos por SWV. A seletividade do dispositivo foi avaliada medindo-se as respostas de SWV geradas por 4 diferentes substâncias interferentes em potencial a uma concentração de $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e comparado com aquelas obtidas para solução contendo creatinina e ácido úrico $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ sob condições de medição similares. Os seguintes valores de RSD foram obtidos pela comparação dos sinais analíticos na presença e ausência dos seguintes possíveis interferentes: ácido ascórbico (0,8%), hidroquinona (0,9%), dopamina (1,3%), catecol (1,1%), sugerindo assim alta seletividade do dispositivo para creatinina e ácido úrico.

3.5. CONSTRUÇÃO DE UM SENSOR PARA DETERMINAÇÃO DE CREATININA BASEADO EM REAÇÃO DE COMPLEXAÇÃO

Como uma alternativa ao método enzimático, desenvolveu-se outro método para a determinação de creatinina, usando como princípio a formação de um complexo entre a creatinina e o cátion Fe(III). Esta etapa tem como proposta a utilização de eletrodo de trabalho modificado de forma mais simples para a determinação de creatinina. Além disso, há também a vantagem de diminuir o custo por determinação, uma vez que no lugar de se empregar a enzima CA com custo de R\$ 2600,00 por 100 mg (1000 unidades), emprega o $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ⁶⁶, com custo R\$ 180,00 por 1,0 kg. Sendo assim, decidiu-se estudar

a possibilidade da elaboração de um sensor para a determinação de creatinina a partir da formação de um composto de coordenação com o íon Fe(III).

Para este estudo, desenvolveu-se um dispositivo com os mesmos princípios desenvolvidos para o μ PBDMA (eletrodos impressos utilizando papel para carregamento e retenção de amostra, montados por sobreposição das camadas tipo sanduiche) denominado microcélula (**Figura 53**). A denominação deste dispositivo foi adotada devido a sua capacidade de 3 μ L para preenchimento total da célula eletroquímica.

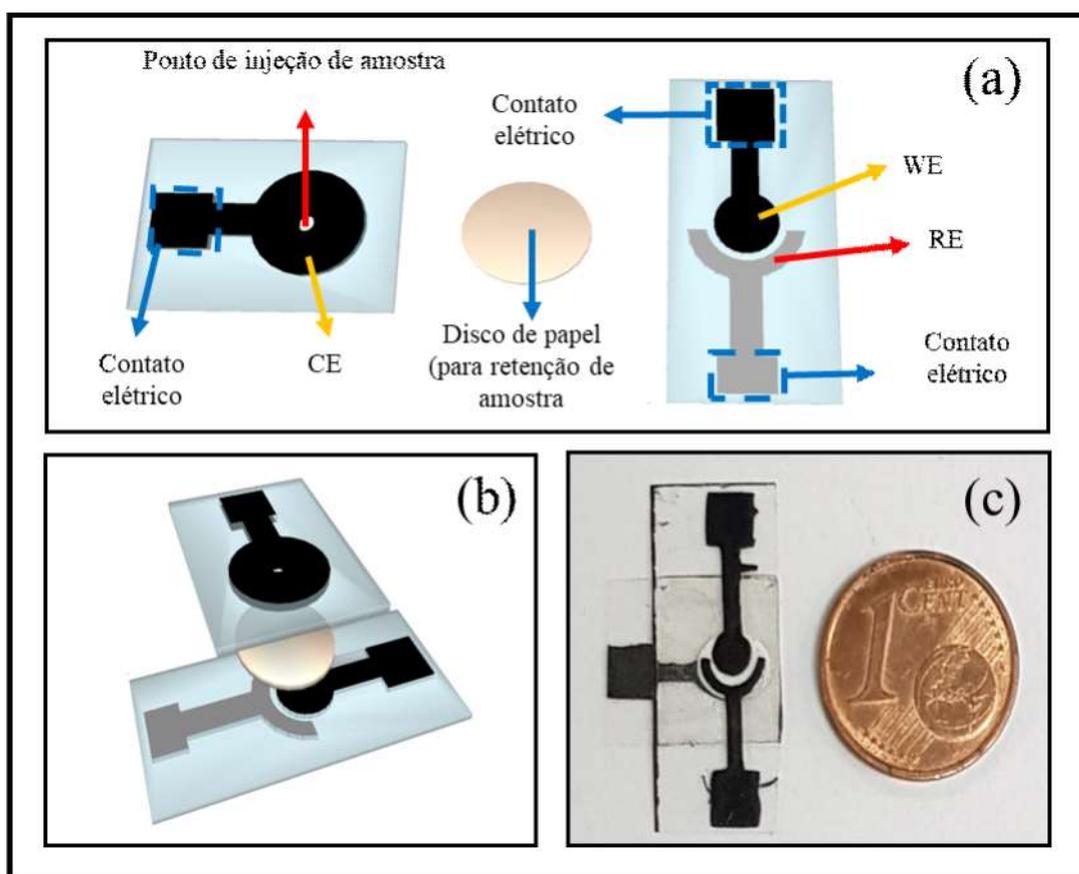


Figura 53.(a) ilustração dos componentes da microcélula, (b) ilustração da montagem e (c) fotografia da microcélula montada.

Antes da montagem da microcélula, o WE foi modificado da seguinte forma. Uma dispersão contendo 1 mg de CB em 1 mL de água ultrapura foi preparada. Em seguida, um volume de 4 μL desta dispersão foi gotejado na superfície do WE e seco à temperatura ambiente. Além disso, 1 μL de solução de Fe^{3+} $0,013 \text{ mol L}^{-1}$ foi gotejado sobre o disco de papel e seco à temperatura ambiente.

A resposta eletroquímica do dispositivo com CB depositado sobre o WE foi primeiramente avaliada por voltametria cíclica (CV) na ausência e presença de CNN. Na **Figura 54** é mostrado o voltamograma cíclico (preto) de uma alíquota de 3 μL de solução de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na microcélula, cujas correntes de pico catódica e anódica correspondem aos processos redox do cátion ferro III adsorvido no disco de papel da microcélula. O pico de corrente a $+0,3 \text{ V}$ corresponde ao processo catódico (redução de Fe^{3+} a Fe^{2+}), e na direção oposta a $+0,5 \text{ V}$ o pico de corrente corresponde ao processo anódico (oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+}). A CNN tem capacidade para coordenar vários cátions de metais, como o cobre, mercúrio, platina, cádmio, cobalto, ferro e outros^{79,80}. Como pode ser visto, após a adição de 3 μL de uma solução de CNN $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, o voltamograma cíclico, **Figura 54** (vermelho), não apresentou o processo redox de Fe^{3+} indicando que o CNN complexou o íon metálico, sendo o complexo não eletroativo na janela de potencial estudado.

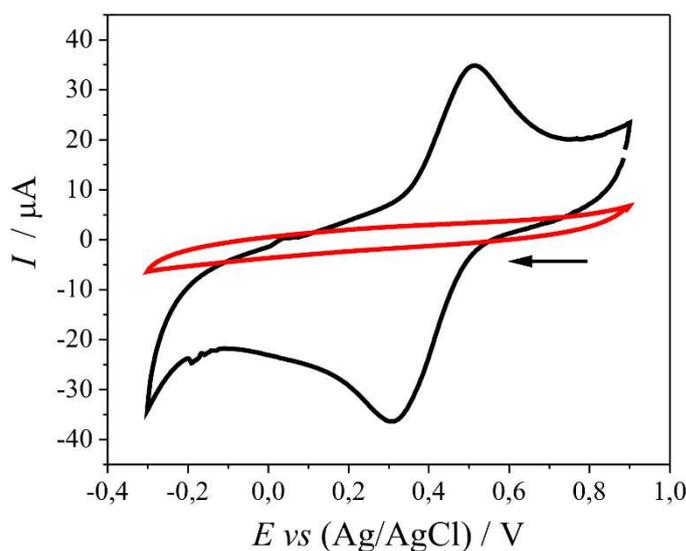
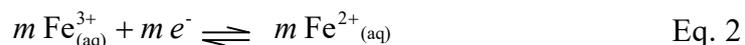
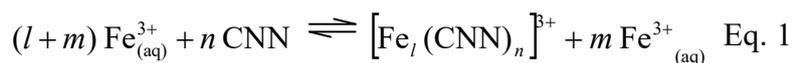


Figura 54. Voltamogramas cíclicos obtidos a partir da adição do eletrólito suporte NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (preto) e de uma solução de CNN $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ CNN em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte (vermelho). Velocidade de varredura = 50 mV s^{-1} .

A determinação da CNN foi realizada através do monitoramento da redução do Fe (III) livre (em excesso), adsorvido em papel sobre WE, após a complexação pelo analito. Quando a amostra foi inserida na microcélula, o excesso de cátion Fe^{3+} foi determinado e a concentração de CNN foi encontrada. Nas reações químicas (Eq. 1) e eletroquímicas (Eq. 2). Os coeficientes estequiométricos l , m e n correspondem ao ferro coordenado, ferro / elétron no processo catódico e CNN necessário para a formação do complexo, respectivamente.



A reação entre a creatinina e o ferro (III) foi analisada por UV-Vis para confirmar a formação do complexo. Para esta reação, a cor da solução contendo 13 mmol L^{-1} de Fe^{3+} muda de amarelo pálido para laranja quando uma alíquota de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de CNN é adicionada. Na **Figura 55**, os espectros de absorvância com valor máximo de absorvância em 333 nm mostram a formação do complexo⁸⁰.

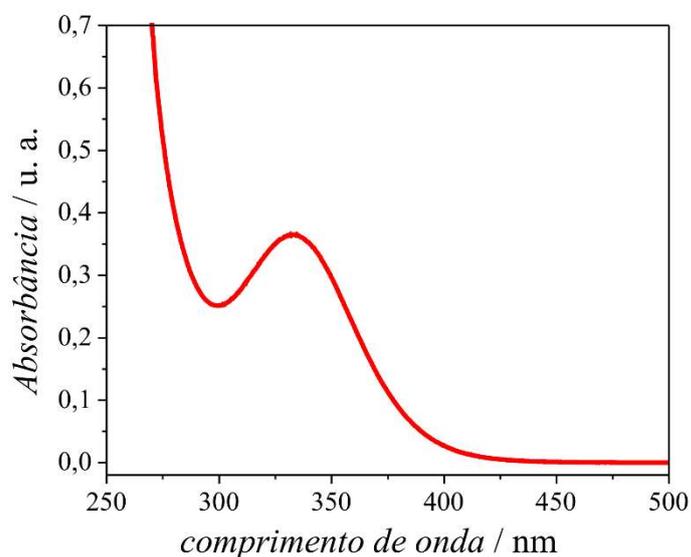


Figura 55. Espectro de UV-Vis obtido para uma solução de CNN $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A **Figura 56** mostra os voltamogramas de pulso diferencial para o eletrólito suporte de NaCl 0,1 mol L⁻¹ (branco / linhas tracejadas) e para uma solução de creatinina 2,5 mmol L⁻¹ em NaCl 0,1 mol L⁻¹ (linhas sólidas) para um WE não modificado (preto) e WE modificado com filme CB (vermelho). Como pode ser observada a partir desta figura, a modificação do WE com CB proporcionou sinal analítico maior que o obtido usando o WE não modificado. Esses resultados podem ser atribuídos à alta área superficial específica, à grande condutividade elétrica e à estabilidade química do CB⁸¹, que resulta em uma cinética de transferência de elétrons mais rápida quando comparada à WE não modificada. Portanto, os WE's modificados com CB foram utilizados para o melhor desempenho analítico da microcélula.

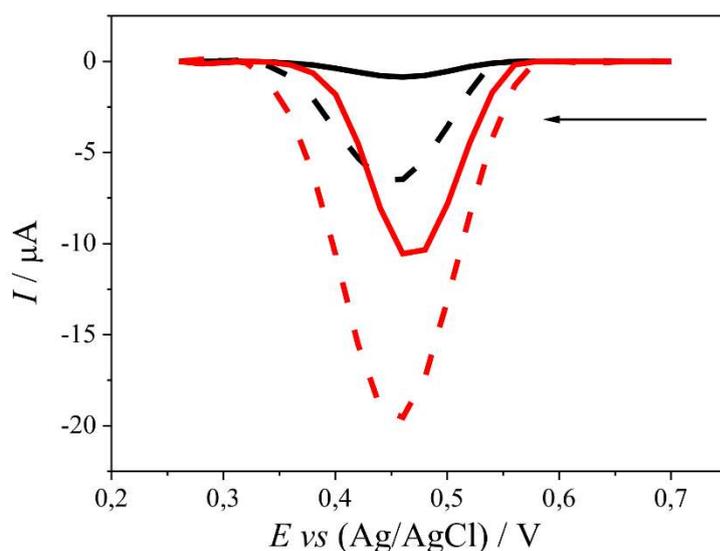


Figura 56. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir da adição do eletrólito suporte NaCl 0,1 mol L⁻¹ (linhas tracejadas) de uma solução de CNN 2,5 mmol L⁻¹ CNN em NaCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte (linhas sólidas) para eletrodos de trabalho não modificados (**preto**) e eletrodos de trabalho modificados com carbono black (**vermelho**).

A determinação quantitativa da CNN foi realizada empregando DPV e como eletrólito suporte solução de NaCl 0,1 mol L⁻¹. Devido à formação do complexo entre CNN e Fe³⁺, os picos de corrente de redução do processo Fe³⁺/Fe²⁺ diminuíram proporcionalmente ao aumento da concentração de CNN. Desse modo, a determinação indireta da CNN foi realizada e a curva analítica obtida foi linear na faixa de concentração de CNN de 0,1 a 6,5 mmol L⁻¹ com um limite de detecção (LOD) de 0,043 mmol L⁻¹, demonstrando assim o bom desempenho da CNN para determinação da creatinina, conforme ilustrado na **Figura 57**.

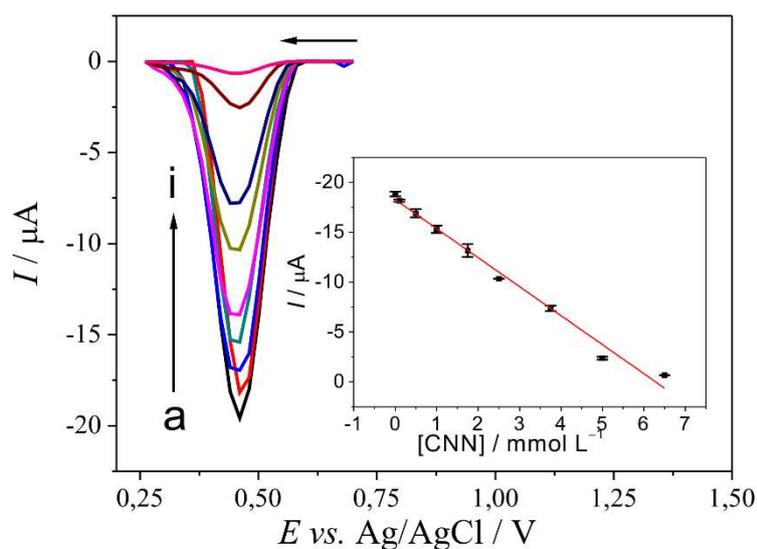


Figura 57 Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir das adições de concentrações crescentes de CNN: a) branco; b) 0,1; c) 0,5; d) 1,0 e) 1,75; f) 2,5; g) 3,75; h) 5,0 e i) 6,5 mmol L⁻¹ em NaCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Inserido: respectiva curva analítica.

Na **Tabela 8**, mostra-se a comparação do desempenho da microcélula em relação a outros sensores desenvolvidos relatados na literatura e, embora alguns biossensores apresentem menor LOD, esses dispositivos necessitam da associação de três enzimas para a detecção da CNN. Isso os torna mais complexos e caros do que a microcélula proposta. O bom desempenho analítico da microcélula torna sua aplicação atrativa, devido à rápida formação do complexo entre Fe³⁺ e CNN, pequeno volume de amostra necessário (3 μL) baixo custo de fabricação e o satisfatório LOD obtido.

Tabela 8. Eletrodos impressos encontrados na literatura para determinação de CNN.

WE	Modificação	Técnica	Faixa linear / mmol L⁻¹	LOD / mmol L⁻¹	Ref.
HF-PGE	CdSe QDs	DPV	0,44 – 8,84	0,230	82
Carbono	Cobre	CV	6,00 - 378	0,070	83
Carbono	Fc-enzy.ink	Cronoamperometria	0,01 – 1,00	0,002	84
Platina	CA/CI/SO	Cronoamperometria	0,01 – 1,00	0,001	85
Carbono	>C=O	SWV	0,37 – 3,60	0,008	86
Carbono	Fe ³⁺ p-a	DPV	0,10 – 6,5	0,043	Este trabalho

HF-PGE: eletrodo de grafite de fibra oca; **CdSe QDs:** *quanta dots* de seleneto de cádmio; **DPV:** voltametria de pulso diferencial; **CV:** voltametria cíclica; **Fc-enzy.ink:** ferrocenometanol recoberto com tinta de enzima contendo amidinohidrolase, creatina amidinohidrolase, sarcosina oxidase e peroxidase; **CA / CI / SO:** creatininase, creatinase e sarcosina oxidase; **> C = O:** grupos carbonila eletrogerados; **SWV:** voltametria de onda quadrada; **Fe³⁺ p-a:** ferro (III) adsorvido no papel.

A seletividade do dispositivo foi testada em relação a substâncias consideradas como potenciais interferentes. Em uma amostra contendo creatinina foram adicionados D-(+)-Glicose, ácido úrico, dopamina, ácido ascórbico e cafeína nas razões em concentração de 1: 0,5; 1: 1 e 1: 2, respectivamente. Experimentos de DPV foram realizados e a variação da

corrente de pico correspondente à determinação de creatinina não ultrapassou 9,5%, demonstrando a boa seletividade do método proposto.

3.6. DETERMINAÇÃO SEQUENCIAL DE D-(+)-GLICOSE, CREATININA E ÁCIDO ÚRICO UTILIZANDO O μ PBDMA

Dois módulos de multiplexação comerciais acoplados (MUX-SCNR8) com 8 canais cada um, foram conectados ao potenciostato Autolab PGSTAT possibilitando análises múltiplas de forma sequencial nas 16 células eletroquímicas do μ PBDMA, devido a capacidade dos módulos em multiplexarem os WEs e REs. Em virtude da possibilidade de detecção de diferentes analitos na mesma amostra utilizando o μ PBDMA, D-(+)-Glicose, creatinina e ácido úrico foram sequencialmente monitorados em uma única matriz de análise. Para isso, uma alíquota contendo 60 μ L de amostra foi adicionada no ponto central do dispositivo e diferentes medidas eletroquímicas foram realizadas nos dezesseis eletrodos sequencialmente. Os resultados obtidos para cada analito são apresentados e discutidos separadamente nos itens abaixo.

3.6.1. Determinação de D-(+)-Glicose

O desempenho analítico foi avaliado por adição de com diferentes concentrações de D-(+)-Glicose para a construção da curva analítica. Para cada

concentração estudada foi utilizado e descartado um novo μ PBDMA e os resultados obtidos são apresentados na **Figura 58**. Obteve-se uma resposta linear para D-(+)-Glicose no intervalo de 0,625 a 20 mmol L^{-1} representada pela equação $I (\mu\text{A}) = -0,603 (\mu\text{A} / \text{mol L}^{-1}) \times [\text{GLU}] (\text{mol L}^{-1}) + 0,163 (\mu\text{A})$ com um coeficiente de correlação (r) de 0,996 e limite de detecção (LOD) estimado em 0,12 mmol L^{-1} , calculado por três vezes o desvio padrão do sinal analítico do branco (n = 10) dividido pelo coeficiente angular da curva analítica.

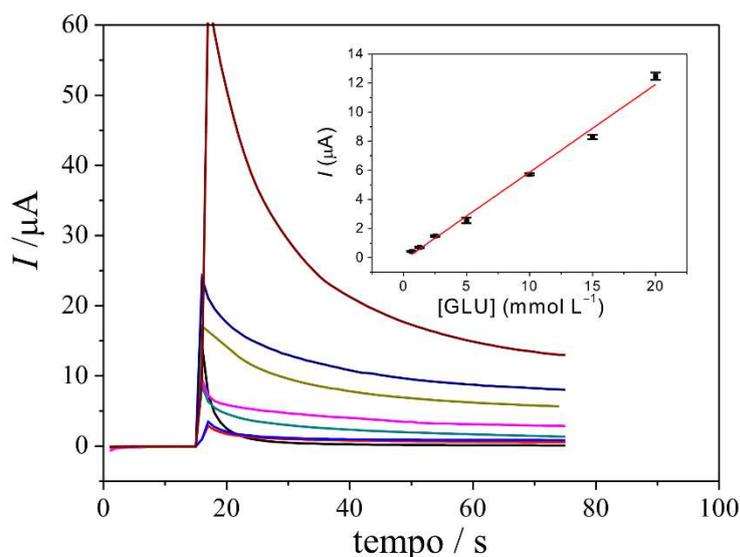


Figura 58. Amperogramas obtidos a partir das adições de concentrações crescentes de D-(+)-Glicose: a) branco; b) 0,626; c) 1,25; d) 2,50; e) 5,00; f) 10,0; g) 15,0 e h) 20,0 mmol L^{-1} em NaCl 0,1 mol L^{-1} como eletrólito suporte, potencial aplicado = +0,4 V. Inserido: respectiva curva analítica.

3.6.2. Determinação de creatinina

A determinação da creatinina foi baseada em etapas químicas e eletroquímicas envolvendo a formação de um complexo entre a creatinina e o íon Fe^{3+} . Este procedimento tem a vantagem de ser simples e menos dispendioso para a determinação da creatinina em comparação com o ensaio enzimático.

Para a determinação da creatinina usando o μPBDMA , o papel foi previamente modificado com uma quantidade conhecida de íons Fe^{3+} pela adição de uma solução $0,013 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{FeCl}_3 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ na superfície do papel logo acima da superfície do eletrodo (ponto de sensoriamento) e após seco à temperatura ambiente, o dispositivo microfluídico foi montado. Desta forma, quando a solução de amostra foi injetada e alcançou a região sobre a superfície do eletrodo, a creatinina reagiu com Fe^{3+} adsorvido em papel, formando o complexo CNN-Fe (III). Após a complexação dos íons Fe^{3+} em concentração constante e em excesso, a intensidade do pico de redução dos íons Fe^{3+} não complexados diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração de creatinina adicionada. Este princípio de operação é baseado no monitoramento do processo de redução $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ para determinação indireta de creatinina.

O desempenho analítico do dispositivo foi avaliado pelas respostas de corrente de pico de redução ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) em função da adição de diferentes concentrações de CNN em $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte nas concentrações 0,0 (branco); 0,106; 0,203; 0,406; 0,813; 1,625; 3,250 e 4,500 mmol L^{-1} em experimentos de voltametria de pulso diferencial (DPV). A **Figura 59** mostra os resultados obtidos para determinação de creatinina usando

μ PBDMA. Como pode ser visto, uma diminuição na intensidade da corrente de pico foi obtida quando a concentração de creatinina aumentou, como esperado. As respostas de pico de corrente catódica apresentaram uma correlação linear com a concentração de creatinina na faixa de 0,106 a 4,500 mmol L⁻¹. O μ PBDMA apresentou a curva analítica, I (μ A) = 2,80 (μ A / mol L⁻¹) \times [CNN] (mol L⁻¹) - 12,32 (μ A), $r = 0,997$ e LOD de 0,084 mmol L⁻¹ demonstrando o emprego do dispositivo proposto como uma boa alternativa aos métodos enzimáticos para a determinação da creatinina.

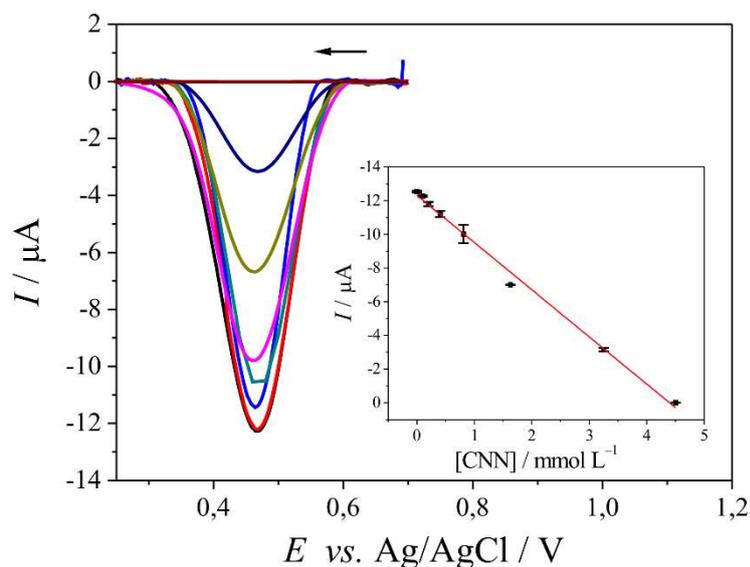


Figura 59. Voltamogramas de pulso diferencial, obtidos a partir das adições de concentrações crescentes de CNN: a) branco; b) 0,106; c) 0,203; d) 0,406 e) 0,813; f) 1,625; g) 3,250 e h) 4,500 mmol L⁻¹ em NaCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Inserido: respectiva curva analítica.

3.6.3. Determinação de ácido úrico

A determinação do ácido úrico utilizando o μ PBDMA compreende a modificação anterior do WE com um filme CB antes da montagem do dispositivo. A contribuição do CB para a resposta eletroquímica de UA foi avaliada por experimentos de DPV comparando o WE modificado e não modificado na presença de 2 mmol L^{-1} de UA, como mostrado na **Figura 60**. O pico de resposta da corrente catódica de WE modificado com CB apresentou valor 6,8 vezes superior ao WE não modificado. Este resultado é atribuído à grande condutividade elétrica e alta área superficial específica do CB, resultando em uma cinética de transferência de elétrons mais rápida ⁸¹. Portanto, os WE's modificados com CB foram utilizados para o desempenho analítico do dispositivo.

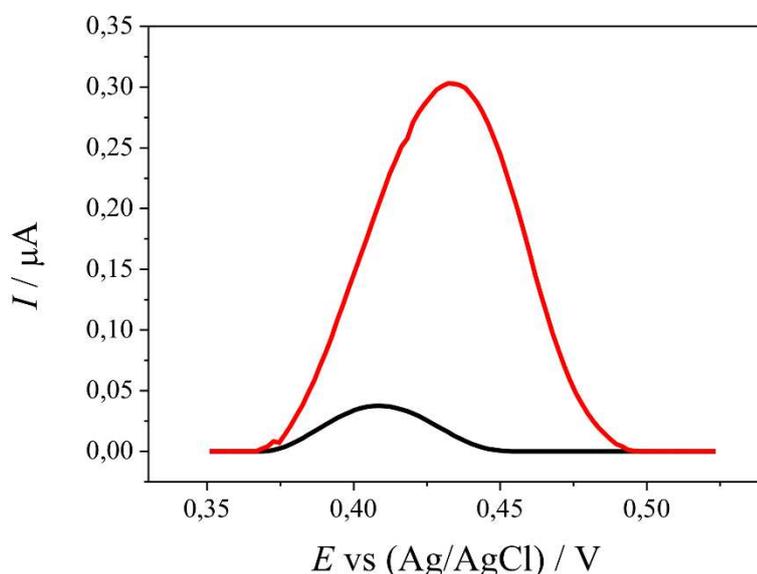


Figura 60. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir das adições de UA 2 mmol L^{-1} em NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte para o eletrodo sem modificação (**preto**) e o eletrodo modificado com um filme de CB (**vermelho**).

Utilizando o μ PBDMA com o eletrodo modificado por CB e a técnica de DPV obteve-se uma resposta linear para adições de solução de UA na faixa de 0,047 a 3,000 mmol L^{-1} e os resultados são apresentados na **Figura 61**. A curva de calibração $I (\mu\text{A}) = 0,012 (\mu\text{A} / \text{mol L}^{-1}) \times [\text{UA}] (\text{mol L}^{-1}) + 0,004 (\mu\text{A})$, com r de 0,999 e LOD de 0,012 mmol L^{-1} .

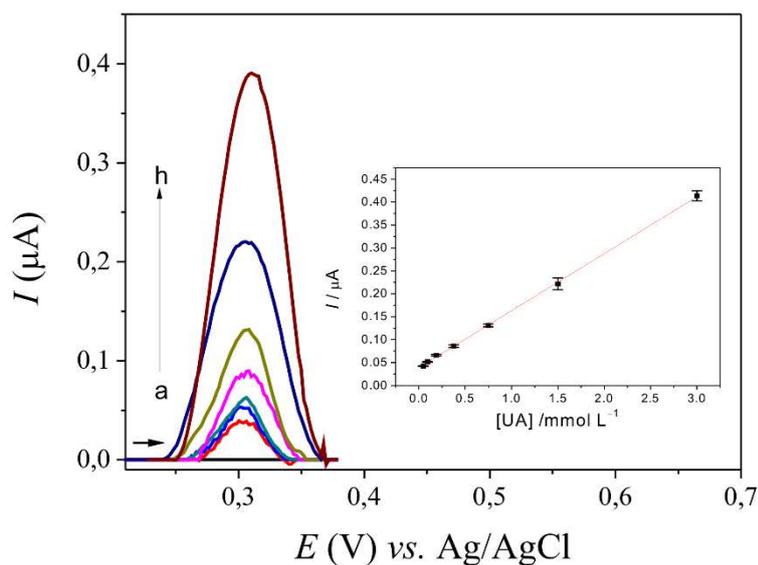


Figura 61. Voltamogramas de pulso diferencial, obtidos a partir das adições de concentrações crescentes de UA: a) branco; b) 0,047; c) 0,094; d) 0,188; e) 0,375; f) 0,750; g) 1,500 and h) 3,000 mmol L^{-1} em NaCl 0,1 mol L^{-1} como eletrólito suporte. Inserido: respectiva curva analítica.

Como descrito acima, o μ PBDMA apresentou excelentes resultados para análise sequencial destes três analitos, obtendo boa resposta linear e limites de

detecção. O design do dispositivo permite o desenvolvimento de 16 sensores independentes e / ou biossensores, dando a possibilidade de múltiplas análises usando apenas um pequeno volume de amostra (60 μL).

Como a proposta deste trabalho baseia-se em análises clínicas, comparou-se os resultados obtidos com os valores de referência^{26,33,35} de cada analito em miligramas por decilitro, como mostrado na **Tabela 9**.

Tabela 9. Comparativo dos resultados obtidos utilizando o μPBDMA com os valores de referência.

Analito	Faixa Linear (mg dL⁻¹)	LOD (mg dL⁻¹)	Ref. (mg dL⁻¹)
GLU	11,2- 360	2,16	0 – 15,0 ²⁶
CNN	1,2 – 50	0,95	0.45 – 1,7 ³³
UA	0,8 – 50	0,20	14 - 16 ³⁵

Desta forma, verificou-se que o μPBDMA foi aplicado com sucesso para a detecção de altos níveis dos analitos, sendo capaz de realizar o diagnóstico de disfunções e até falência renal evidenciado por altas concentrações de GLU, CNN e UA na urina.

3.7. Desempenho μPBDMA para detecção sequencial de D-(+)-Glicose, creatinina e ácido úrico na urina.

O desempenho do dispositivo para análise sequencial foi testado em relação a amostras reais de urina. Para isso, diferentes quantidades de GLU, CNN e UA foram adicionadas em duas amostras contendo 200 µl de urina e 800 µl de eletrólito em cada uma. Os resultados estão apresentados na **Tabela 10**. Estes dados demonstram que usando o µPBDMA foi possível obter bons resultados para a recuperação de todos os biomarcadores com valores entre 97,4 e 104%.

Tabela 10. Estudos de adição/recuperação para determinação de GLU, CNN e UA em amostras de urina fortificadas.

Amostra	GLU / mmol L ⁻¹			CNN / mmol L ⁻¹			UA / mmol L ⁻¹		
	Adic	Rec	Rec. / %	Adic	Rec	Rec. / %	Adic	Rec.	Rec. / %
*Urina 1	2,50	2,61±0,03	104,4	0,50	0,51±0,01	101,8	0,50	0,49±0,02	97,40
*Urina 2	10,00	9,89±0,05	98,9	2,00	2,03±0,06	101,65	1,50	1,55±0,07	103,00

Recuperação = ([encontrada]/[adicionada])*100

*n = 4

A seletividade de µPBDMA para análise sequencial de GLU, CNN e UA foi avaliada para potenciais interferentes inerentes às amostras de urina. Para isto, em uma amostra contendo os três analitos com mesmo valor de concentração (2,5 mmol L⁻¹) em 0,1 mmol L⁻¹ de NaCl, foram adicionadas ureia, ácido ascórbico, dopamina e cafeína nas proporções de 1: 0,5; 1: 1 e 1: 2 (analito: interferente). Os resultados obtidos mostraram variações de sinais analíticos inferiores a 8,25% indicando a não interferência dos compostos avaliados e na resposta dos sensores.

A repetibilidade da resposta analítica do μ PBDMA foi também estudada. Inicialmente foi monitorada a resposta obtida para cada analito no mesmo dispositivo ⁸⁷ nas concentrações 10, 1,75 e 1,5 2,5 mmol L⁻¹ (GLU, CNN e UA respectivamente) e os RSD obtidos foram de 3,97% para GLU, 5,28% para a CNN e 3,56% para a UA Este estudo também foi realizado para diferentes dispositivos (n = 5) para as mesmas concentrações utilizadas anteriormente e de RSDs obtidos foram 5,45% para GLU, 6,92% para CNN e 6,25% para UA.

Os resultados comprovam que a combinação de canais microfluídicos baseados em papel e múltiplos sensores eletroquímicos ao redor do local da amostra permitiram uma distribuição radial homogênea da amostra, permitindo determinações simples e de baixo para GLU, CNN e UA, de modo sequencial em um único dispositivo.

4. DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO PARA DETERMINAÇÃO DE PSA

4.1. OBJETIVO

O objetivo desta etapa da pesquisa foi o desenvolvimento de um dispositivo para a sua utilização como imunossensor para a determinação dos níveis de PSA em sangue, para diagnóstico de câncer de próstata

4.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Folhas de poliéster (USA Folien)
- Adesivo de vinil (Imprimax)
- Adesivo dupla face 3M
- Tinta condutiva de carbono (Gwent)
- Tinta condutiva de prata/cloreto de prata (Gwent)
- Impressora de recorte Silhouette CAMEO 3 gerenciada pelo *software* Silhouette Studio
- Ácido ferrocenocarboxílico (Sigma Aldrich, USA)
- BSA – Albumina de soro bovino (Sigma Aldrich, USA)
- Grafeno (Sigma Aldrich, USA)
- PDDA - Poli (cloreto de dialildimetilamônio) (Sigma Aldrich, USA)
- Ácido Cloroáurico (Sigma Aldrich, USA)
- Tampão TW20 (Sigma Aldrich, USA)
- Anticorpos primários e secundário Anti-p16 e o peptídeo p16 (IMUNY)

- Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura (resistividade > 18,0 MΩ cm) obtida em um sistema Millipore Milli-Q
- Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT-12 (Eco Chemie, Holanda) com um módulo de multiplexação (MUX) controlado pelo software NOVA 2.2

4.3. Desenvolvimento do dispositivo para determinação de PSA

Para esta parte do trabalho, desenvolveu-se um novo dispositivo para adequar-se à proposta de utilização de um imunossensor para a determinação dos níveis de PSA, relacionados com o câncer de próstata. Para isso, alguns aspectos foram levados em consideração para a obtenção de um dispositivo descartável robusto e que atenda às necessidades da arquitetura do imunossensor, cujas etapas estão descritas a seguir:

A técnica envolvida para a confecção dos eletrodos foi a mesma já discutida anteriormente, que é a produção de uma máscara de vinil com o formato dos eletrodos, a fixação deste em uma folha de poliéster seguido pela deposição das tintas condutoras e cura por aquecimento. O WE, RE e o CE estão alocados na mesma camada, conforme ilustrado na **Figura 62**.

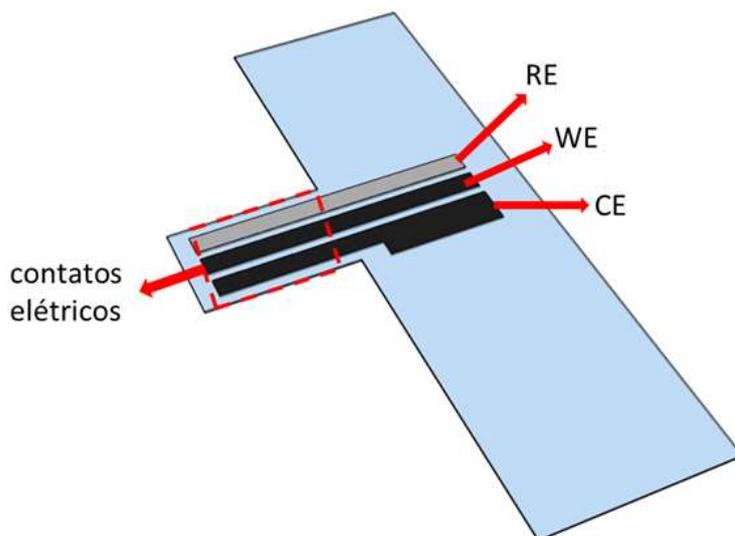


Figura 62. Ilustração do componente do dispositivo que contém os eletrodos de trabalho, referência e contra eletrodo.

O canal microfluídico foi construído utilizando um cartão dupla-face com espessura de 0,5 mm com um canal retangular de 2 mm de largura e com dois reservatórios: um para a injeção de amostra e outro para a captação do resíduo após a centrifugação. Além disso, este componente do dispositivo foi construído utilizando mais duas folhas de poliéster, uma com um canal retangular de 2 mm de largura (tal como o cartão dupla-face) e outro com um orifício de injeção de solução e uma janela para a etapa de incubação e medidas eletroquímicas, conforme ilustrado na **Figura 63(a,b,c,d)**.

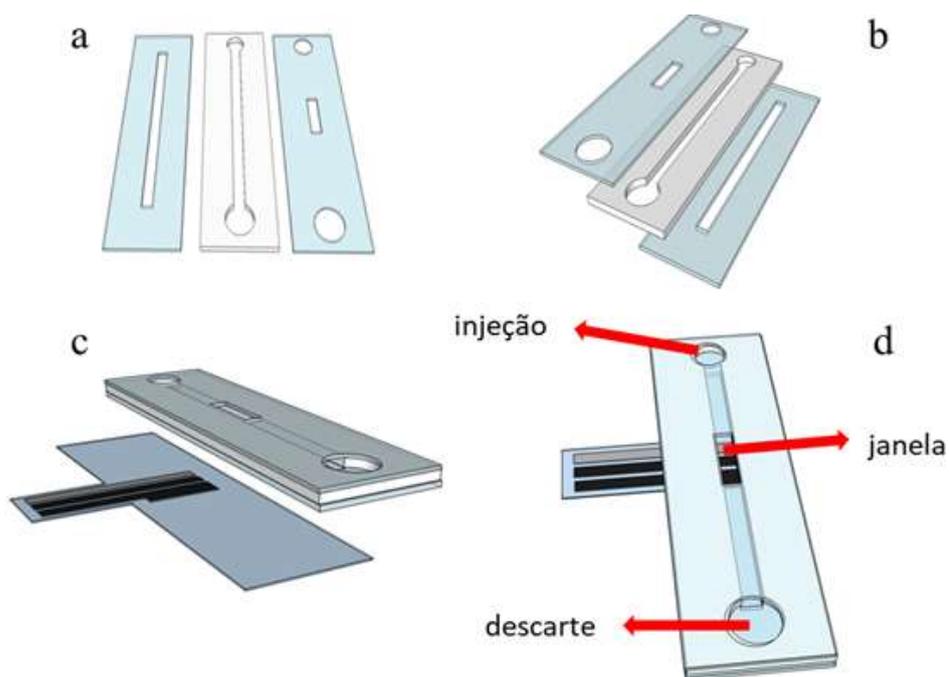


Figura 63. (a) Componente do canal microfluídico do dispositivo, (b) Esquema de contagem do canal microfluídico, (c) acoplamento do canal microfluidico ao sensor e (d) ilustração do dispositivo montado.

Para a utilização deste sistema, foi adaptado a um *Spinner*, um brinquedo que possui um rolamento central para girá-lo em torno de seu eixo. Para isso, utilizou-se uma base com uma haste e fixou-se ao rolamento do *Spinner* para utilizá-lo como uma centrífuga. Este sistema foi desenvolvido para transportar as soluções do ponto de injeção ao ponto de descarte e para fazer a separação do soro sanguíneo e as hemácias em tubos capilares fixados no *Spinner*. Na **Figura 64** é ilustrada a proposta do sistema proposto.

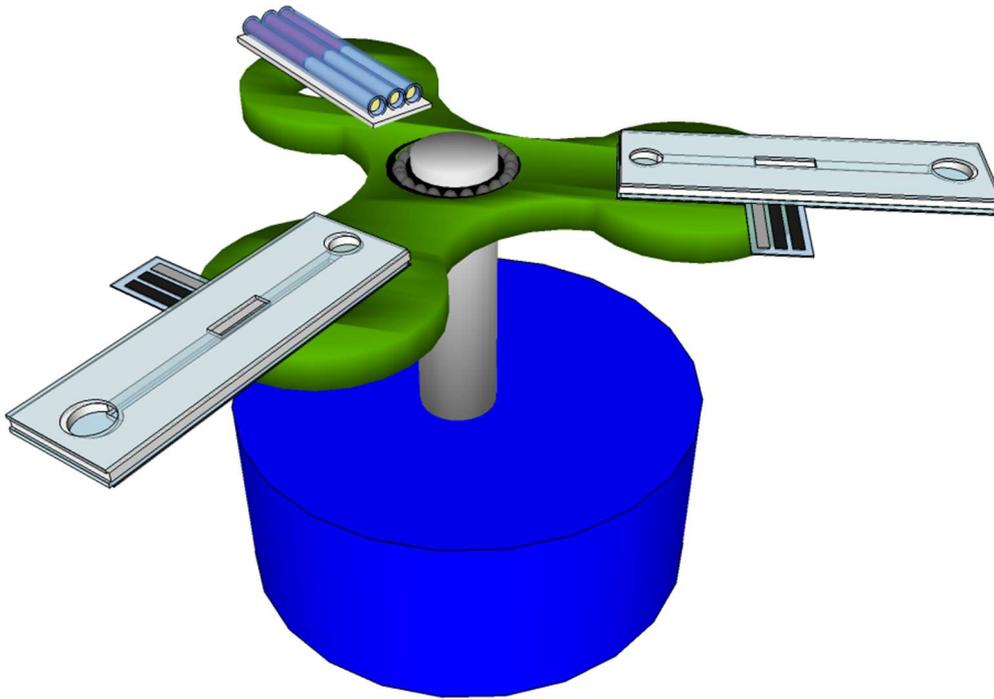


Figura 64. Ilustração do dispositivo acoplado ao *spinner* proposto neste trabalho.

4.4. IMUNOSENSOR PARA O MONITORAMENTO DOS NÍVEIS DE PSA PARA CÂNCER DE PRÓSTATA

4.4.1. Desenvolvimento do imunossensor

A modificação do WE foi realizada seguindo algumas etapas de preparo utilizando a técnica *layer by layer*, conforme descrito a seguir.

- Síntese de óxido de grafeno

Em 100 mL de uma mistura de H₂SO₄/HNO₃ concentrado em uma proporção 1:1 adicionou-se 100 mg de grafeno, mantendo esta mistura sob

agitação por 24 horas à temperatura ambiente e em seguida a suspensão de GO (óxido de grafeno, do inglês “*graphene oxide*”) obtida foi filtrada e lavada com água ultrapura até um pH entre 6,5-7,0 e depois seco em uma estufa a 100 °C.

- Síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs)

A síntese das AuNPs foi realizada baseando-se no método de Turkevich⁸⁸. Primeiro, uma solução de 0,508 mL de H₂AuCl₄ (1% m/v) em 49,492 mL de água ultrapura foi aquecida até atingir a ebulição. Posteriormente, adicionou-se rapidamente 5 mL de uma solução de citrato de sódio (40 mmol L⁻¹), mantendo o aquecimento e agitação por aproximadamente 10 minutos até observar-se a mudança na coloração da solução de amarelo pálido para vermelho; agitando-se por mais 15 min à temperatura ambiente⁸⁹. Após essa etapa as AuNPs foram protegidas da luz e armazenadas a 4 °C.

- Conjugação do anticorpo secundário anti-PSA com AuNPs.

Primeiro, 100 mL do anticorpo secundário policlonal anti-PSA (sPAb2) (1mg mL⁻¹) foram adicionados com agitação suave em 1,5 mL de suspensão de ouro coloidal com pH ajustado para 9,0 usando tampão borato 50 mM. Foi incubado por 20 min a 25 °C e 650 rpm e depois disso, 100 mL de BSA 5% (em água milli-Q) foram adicionados e incubados novamente por 20 min a 25 °C e 650 rpm. Finalmente, a suspensão de sPAb2-AuNPs foi centrifugada por 20 min a 14000 rpm a 4 °C e suspensa em 1,5 mL de tampão PBS 10 mmol L⁻¹, pH = 7,4 com 0,3% de BSA.

- Modificação do eletrodo.

A modificação do WE para a obtenção do imunossensor foi realizada utilizando a técnica *layer by layer*, cujas etapas estão descritas a seguir e ilustradas posteriormente na **Figura 65**:

- ➔ Etapa 1: Depositou-se 1 μL de uma solução do polímero catiônico PDDA (cloreto de polidialildimetilamônio) (2 mg mL^{-1} em $\text{NaCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$) deixando esta solução por 20 minutos em repouso, sendo em seguida o eletrodo lavado com água ultrapura e seco;
- ➔ Etapa 2: Uma alíquota de 1 μL de uma dispersão de GO (1 mg mL^{-1} em água) foi gotejada sobre o WE deixando-se em repouso por 20 minutos. Em seguida, lavou-se o eletrodo e seco a temperatura ambiente;
- ➔ Etapa 3: Uma alíquota de 1 μL de uma solução mista de EDC/NHS ($0,4$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente, preparada em tampão MES 100 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 5,6$) foi depositada sobre o WE deixando-se reagir por 10 minutos para a ativação dos grupos carboxílicos presentes no GO e posterior ligação covalente com o anticorpo secundário (item a seguir) e lavado repetidamente com água ultrapura para a remoção do excesso e posteriormente seco;
- ➔ Etapa 4: Adicionou-se 1 μL de uma solução do anticorpo primário anti-PSA (sPAb1) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, cuja incubação deu-se em um período de uma hora, via ligação covalente com o GO através do EDC/NHS. Lavou-se os eletrodos com tampão PBS 10 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,4$ e TW20 0,05% (m/v) seguido de secagem.

- Etapa 5: Adicionou-se 1 μL de uma solução de BSA 2% (em tampão PBS 10 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,4$ e TW20 0,05% (m/v)) e após uma hora o WE foi lavado cuidadosamente para a retirada do excesso de BSA e seco;
- Etapa 6: O procedimento anterior foi repetido usando etanolamina 1 mmol L^{-1} $\text{pH} = 8,5$. Estas duas últimas etapas foram realizadas com o objetivo de realizar o bloqueio de possíveis sítios ativos para ligações não específicas dos anticorpos ou mesmo da superfície do WE.
- Etapa 7: Adicionou-se 1 μL de uma solução de PSA (em tampão PBS 10 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,4$) e deixou-se reagir por um período de uma hora para ocorrer a incubação deste analito. Nesta etapa, concentrações diferentes de PSA foram utilizadas para a construção da curva analítica, conforme será mostrado posteriormente;

As etapas de modificação do WE e captura do PSA foram realizadas antes da montagem do eletrodo. Porém, a etapa de conjugação do anticorpo secundário e a medida eletroquímica são feitas com o dispositivo já montado, conforme descrito nas etapas a seguir.

- Etapa 8: Adicionou-se 2 μL da solução de sPAb2-AuNPs (preparada anteriormente) sobre o WE. Esta etapa de incubação ocorreu por um período de uma hora e após injetou-se 20 μL de tampão PBS 10 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,4$ e centrifugou-se utilizando o *spinner* para a remoção de sPAb1-AuNPs não ligado.
- Etapa 9: Sobre a janela de sensoriamento, injetou-se uma solução de HCl 0,1 mol L^{-1} (utilizada como eletrólito) e então, utilizando a técnica de

DPCSV (voltametria de redissolução catódica por pulso diferencial, do inglês, “*differential pulse cathodic stripping voltammetry*”) para o monitoramento dos níveis de PSA para cada imunossensor baseado no sinal analítico obtido a partir da redissolução catódica das AuNPs, que é proporcional a concentração de PSA na solução/amostra. Utilizou-se um potencial de pré-concentração de +1,25 V por 180 segundos antes das medidas eletroquímicas. Posteriormente, realizou-se uma varredura de potencial de +1,25 a 0 V empregando a técnica de DPCSV⁹⁰.

As etapas de construção do imunossensor estão ilustradas na **Figura 65**, a seguir

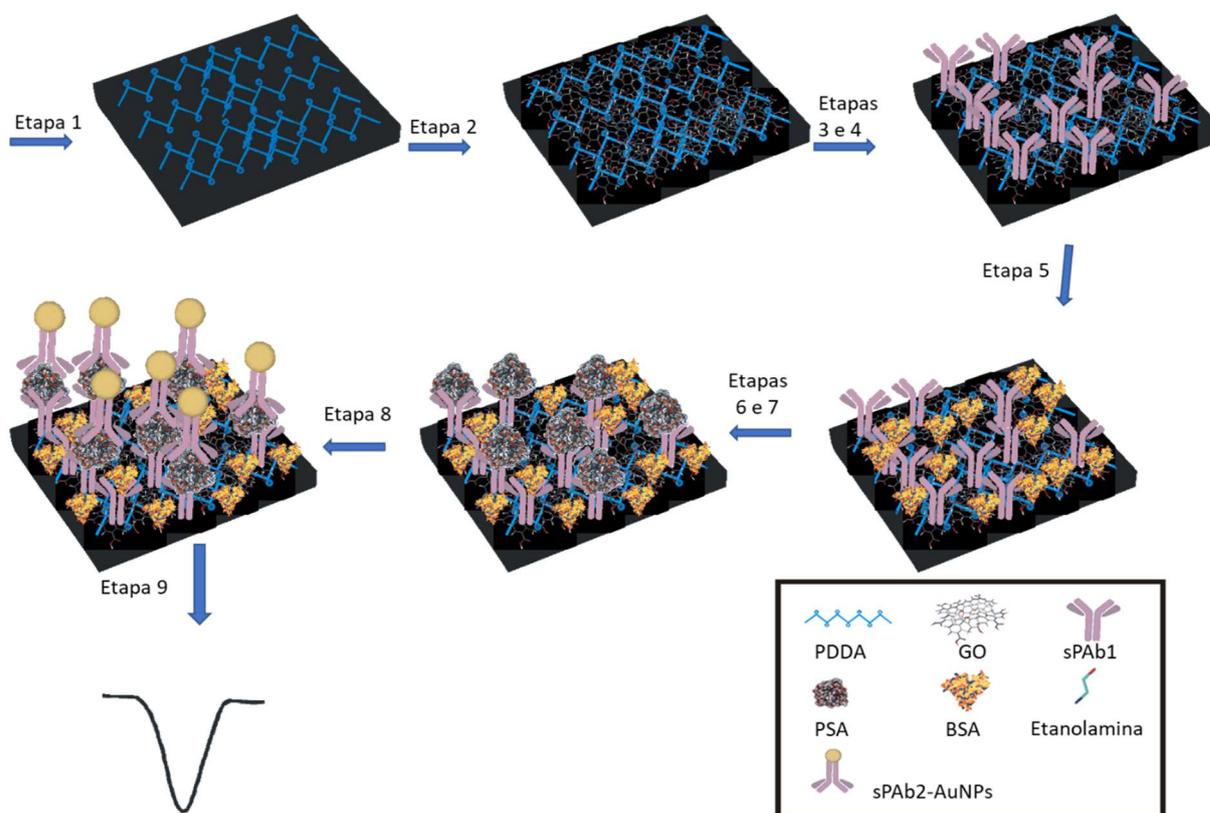


Figura 65. Esquema para a ilustração das etapas de modificação do eletrodo para a construção do imunossensor para a determinação de PSA.

4.5. DESENVOLVIMENTO E CONSTRUÇÃO DE DISPOSITIVO IMUNOSSENSOR PARA DETERMINAÇÃO DE UM BIOMARCADOR PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA

O princípio de funcionamento do imunossensor é baseado em alguns fundamentos, descritos a seguir. É importante ressaltar que a cada etapa de modificação do imunossensor o eletrodo foi lavado para a retirada do excesso de cada componente depositado que não foi ligado ao WE (evitando resultados equivocados). Primeiramente foi depositado um filme com o polímero catiônico PDDA, para a obtenção de uma superfície carregada negativamente e posterior deposição do filme de óxido de grafeno. A opção pelo filme de GO é justificada pela presença de grupos carbonila em sua estrutura, e assim obter-se ligações amida com os grupos amina do sPAb1 utilizando EDC/NHS, onde o EDC reage com o grupo carboxila, formando um intermediário que reage com aminas primárias (o-acilsouréia). Como este intermediário sofre hidrólise facilmente, regenerando o grupo carboxila, utilizou-se o NHS, formando um intermediário mais estável⁹¹ (mecanismo geral mostrado na **Figura 66**) na etapa anterior à ancoragem do sPAb1.

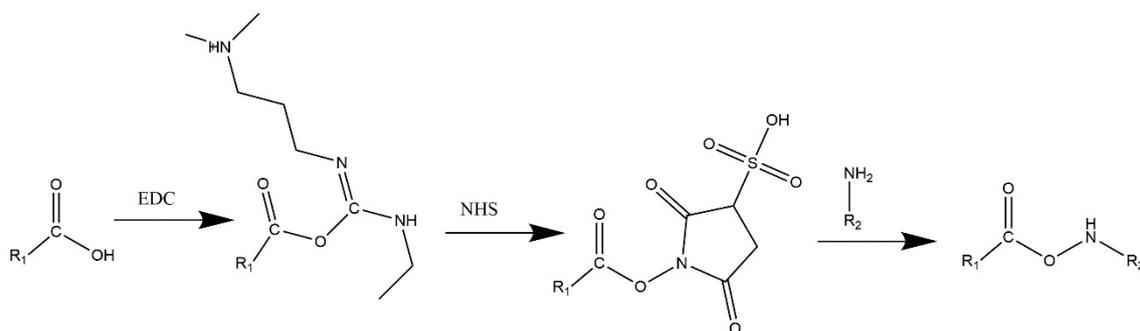


Figura 66. Mecanismo de ativação do grupo carboxila utilizando EDC/NHS

Reações inespecíficas (não desejadas) podem ocorrer sem o bloqueio adequado da superfície do eletrodo, devido a “lacunas” entre os anticorpos ligados ao WE. Neste caso, tanto o BSA quanto a etanolamina foram utilizados para o bloqueio da superfície do eletrodo de possíveis regiões na qual os anticorpos não se ligaram.

Na etapa a seguir, uma das mais importantes do procedimento, foi feito a incubação do PSA sobre o eletrodo modificado com o anti-PSA. Cada conjunto de 5 dispositivos foram incubados com uma concentração determinada de PSA para a construção da curva analítica e suas respectivas replicatas. No dispositivo montado, procedeu-se com as seguintes etapas: modificação do WE com o anticorpo secundário, captura do biomarcador PSA, incubação com o sPAb2-AuNPs, na janela do dispositivo por 1 hora, ocorrendo a ligação específica do tipo sanduíche entre sPAb2-AuNPs e sPAb1 com o alvo PSA. Posteriormente, o eletrodo foi lavado com tampão PBS (pH 7,4) para remoção do sPAb2-AuNPs não ligado, evitando assim a obtenção de resultados equivocados.

A performance analítica dos imunossensores eletroquímicos foi avaliada para diferentes concentrações de PSA, apresentando correlação logarítmica entre os sinais analíticos obtidos e as concentrações de PSA, conforme

representado pela curva analítica, $|I (\mu\text{A})| = 0,51 (\mu\text{A} / \text{ng mL}^{-1}) \times \log [\text{PSA}] (\text{ng mL}^{-1}) + 0,64 (\mu\text{A})$, onde a faixa linear de trabalho obtida foi de 0,05 a 25,0 ng mL⁻¹, conforme ilustrado na **Figura 67**.

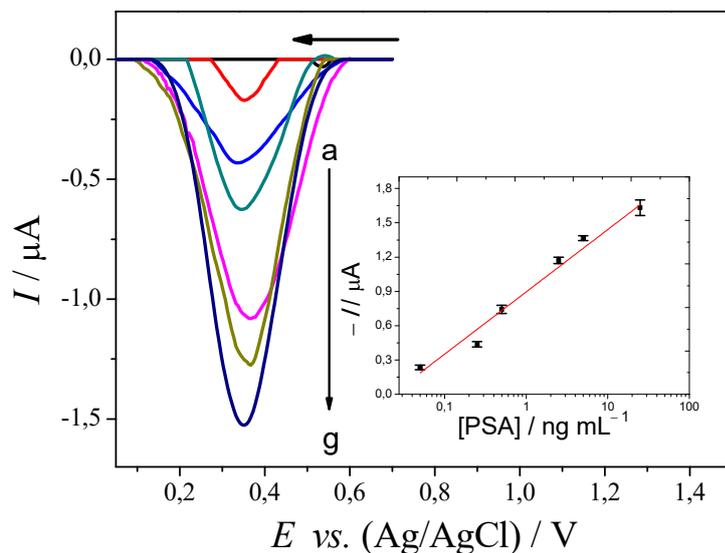


Figura 67. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir das adições de concentrações crescentes de PSA: a) branco; b) 0,05; c) 0,25; d) 0,50; e) 2,50; f) 5,00 e g) 25,0 ng mL⁻¹ em HCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Inserido: respectiva curva analítica.

Estes resultados obtidos para a determinação de PSA pelo imunossensor mostraram-se promissores, dado a boa faixa linear obtida, o LOD (0,0014 ng mL⁻¹) e também o coeficiente de correlação ($r = 0,984$), mostrando que o imunossensor tem a capacidade de operar dentro e acima dos limites considerados normais da concentração de PSA (10 ng mL⁻¹) podendo inclusive trabalhar com amostras diluídas, além disso, o dispositivo possibilita a operação com pequenos volumes de amostra, sendo também possível a utilização do dispositivo em análises *point of care* para auxiliar no diagnóstico de câncer de

próstata, resultados estes que foram corroborados ao realizar os experimentos de análise em amostras de soro sintético, como explorado a seguir.

A amostra de soro humano sintético foi preparada utilizando 3,0 g de NaCl, 0,16 g de NaHCO₃, 3,5 mg de triptofano, 2,3 mg de glicina, 3,2 mg de serina, 3,7 mg de tirosina, 6,6 mg de fenilalanina, 9,1 mg de lisina, 6,3 mg de histidina, 29,0 mg de ácido aspártico, 9,1 mg de alanina e 10,0 mg de arginina foram dissolvidos em água em um balão volumétrico de 250 mL. As amostras foram, em seguida, fortificadas com concentrações conhecidas de PSA, e analisadas diretamente pelo respectivo método voltamétrico, cujos resultados estão expressos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Estudos de adição/recuperação para determinação de PSA em amostras de soro humano sintético fortificadas.

Amostra	PSA / ng mL ⁻¹		
	Adic	Rec	Rec / %
*Soro 1	0,5	0,47±0,02	94,0
*Soro 2	2,5	2,61±0,05	104,4
*Soro 3	5,0	4,99±0,04	99,8

Recuperação = ([encontrada]/[adicionada])*100
 *n = 4

Como mostrado acima, três amostras de soro humano sintético fortificada com diferentes concentrações de PSA (0,5, 2,5 e 5,0 ng mL⁻¹) foram utilizadas obtendo-se bons valores de recuperação, demonstrando sucesso na proposta de desenvolvimento deste biossensor, como um dispositivo de baixo custo e de análise rápida (em relação aos métodos convencionais de análise).

5. CONCLUSÕES

Quando se trata de novas plataformas para a construção de biossensores, as etapas do projeto, construção, avaliação do desempenho e otimização do dispositivo utilizado são de grande importância. Por isso, destaca-se todo o processo de desenvolvimento do μ PBDMA, que sofreu diversas alterações em seus componentes em relação ao proposto no projeto de pesquisa. Durante o desenvolvimento do trabalho, diversos desafios foram encontrados, como a questão da diferença na resistência obtida para os eletrodos, que levou a modificação do desenho dos WEs. Porém, o componente do μ PBDMA que foi significativo para a elaboração da versão atual do dispositivo foi o caminho microfluídico. Inicialmente, o projeto foi alterado para evitar a lixiviação dos produtos de reação de um ponto de sensoriamento até o seguinte, resultando em um componente que evita a intercomunicação entre os pontos de sensoriamento e mantém os produtos de reação confinados nestes. Foi realizado então ensaios de desempenho deste dispositivo e verificou-se que havia uma acentuada queda no sinal analítico obtido para cada ponto de sensoriamento avaliado. Ao estudar este efeito verificou-se que este gradiente de concentração ocorria devido a efeitos cromatográficos no caminho microfluídico, levando-se então a elaboração do projeto de construção do caminho microfluídico de geometria hexadecagonal. Com este novo modelo de caminho microfluídico, o transporte do fluido, do ponto de injeção até o ponto de sensoriamento ocorreu igualmente para todos os 16 canais do μ PBDMA, minimizando os efeitos causados pela CCD no dispositivo. Assim, todos os demais componentes do dispositivo foram projetados e construídos para se adaptarem ao novo tipo de caminho microfluídico proposto, obtendo assim a

respostas analíticas similares para todos os canais, utilizando a sonda eletroquímica. Com base nisso, estes estudos foram muito importantes, pois o processo de desenvolvimento do dispositivo, a avaliação de seu desempenho e os estudos para a obtenção de um biossensor com a plataforma do μ PBDMA proporcionaram um grande acréscimo de conhecimento.

Durante esta etapa do trabalho, verificou-se a necessidade de mudanças estruturais no μ PBDMA, e isso acarretou na melhoria do desempenho do dispositivo, no que diz respeito à repetibilidade entre eletrodos e também entre dispositivos, refletindo na qualidade dos dados coletados em experimentos utilizando o dispositivo. A partir dos aprimoramentos realizados, obteve-se sucesso nos testes em modo de análise multiplexada, onde conseguiu-se utilizar quatro técnicas distintas (CV, DPV, SWV e cronoamperometria) num mesmo dispositivo no modo sequencial automático. Estudou-se a arquitetura do biossensor destinado à determinação de D-(+)-Glicose no μ PBDMA, e determinou-se que o melhor arranjo para o biossensor foi aquele construído utilizando-se o CB como nanomaterial de carbono e GOx ($7,5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) contendo o mediador redox FCA, obtendo-se uma faixa linear de trabalho de $0,1$ a 40 mmol L^{-1} , e um limite de detecção de $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$. Para a construção de um sensor para a determinação de creatinina, abordou-se duas propostas, uma consistiu na construção do biossensor contendo a enzima CA com detecção de creatinina mediada pelo HMR, e outra baseada na formação de um complexo de Fe (III) com o analito em questão. Para o biossensor, a arquitetura proposta, composta por GQDs-CA-HMR, demonstrou um bom desempenho analítico, sendo obtida uma faixa linear de concentração de $10,0 \text{ nmol L}^{-1}$ a $3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e baixos limites de detecção ($3,75 \text{ nmol L}^{-1}$ e $8,40 \text{ nmol L}^{-1}$ para a creatinina e ácido úrico,

respectivamente). Não obstante, propôs-se uma nova arquitetura de sensor para a determinação de creatinina, baseado na formação de um complexo de Fe (III) com a creatinina, a partir do monitoramento da redução do Fe (III) para Fe (II) na presença de creatinina. Com esta arquitetura, obteve-se uma faixa linear de trabalho de 0,10 a 6,5 nmol L⁻¹ e um limite de detecção de 0,0043 nmol L⁻¹, evidenciando o sucesso desta etapa, sendo assim escolhido estes parâmetros para ser utilizado na análise multiplexada. Um grande destaque do μ PBDMA foi, além de sua robustez, a possibilidade de realizar experimentos sequenciais para 3 analitos diferentes utilizando uma única alíquota de amostra. Para a análise de D-(+)-Glicose, creatinina e ácido úrico, obteve-se faixas lineares de 0,625 a 20 nmol L⁻¹, 0,106 a 4,500 nmol L⁻¹ e 0,047 a 3,000 nmol L⁻¹ além de LODs de 0,12, 0,084 e 0,012 (para GLU, CNN e UA, respectivamente). Esta etapa do trabalho demonstrou que, além do sucesso da proposta de análise destes três analitos, mostra-se que o μ PBDMA tem potencial para sua utilização com mais arranjos de sensores e/ou biossensores, desenvolvendo plataformas de diagnóstico mais completas.

Por fim a proposta de desenvolvimento de um dispositivo para acoplamento de um biossensor para a determinação de PSA foi realizada com sucesso, tanto no desenvolvimento do dispositivo quanto na aplicação do biossensor. O *Spinner* auxiliou nas diversas etapas de lavagem do dispositivo e também será utilizado como centrífuga para a separação do soro e hemácias em amostras de sangue humano posteriormente. Os resultados obtidos com o biossensor evidenciaram seu bom desempenho obtendo uma faixa linear de 0,5 a 5,0 ng mL⁻¹ e limite de detecção de 0,014 ng mL⁻¹. Além disso, o analito foi quantificado com sucesso em amostras de soro humano sintético.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NASCIMENTO, V.B. & ANGNES, L. "Eletrodos fabricados por "silk-screen"". *Química Nova*, **21**: 614, 1998.
2. METTERS, J.P.; KADARA, R.O. & BANKS, C.E. "New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments". *Analyst*, **136** (6): 1067, 2011.
3. KONASH, A.; HARRIS, A.R.; ZHANG, J.; ELTON, D.; HYLAND, M.; KENNEDY, G. & BOND, A.M. "Theoretical and experimental evaluation of screen-printed tubular carbon ink disposable sensor well electrodes by dc and Fourier transformed ac voltammetry". *Journal of Solid State Electrochemistry*, **13** (4): 551, 2009.
4. TALEAT, Z.; KHOSHROO, A. & MAZLOUM-ARDAKANI, M. "Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013)". *Microchimica Acta*, **181** (9): 865, 2014.
5. ALVAREZ-ICAZA, M. & BILITEWSKI, U. "Mass production of biosensors". *Analytical Chemistry*, **65** (11): 525A, 1993.
6. USLU, B. & OZKAN, S.A. "Electroanalytical Application of Carbon Based Electrodes to the Pharmaceuticals". *Analytical Letters*, **40** (5): 817, 2007.
7. KISSINGER, P. & HEINEMAN, W.R., *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Second Edition, Revised and Expanded*, Taylor & Francis. p.198. 1996
8. TOMAZELLI COLTRO, W.K.; CHENG, C.-M.; CARRILHO, E. & DE JESUS, D.P. "Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications". *ELECTROPHORESIS*, **35** (16): 2309, 2014.
9. A. BELL, C. "Clinical Guide to Laboratory Tests. 3rd edition. Norbert W. Tietz, ed". *Transfusion*, **35** (11): 972, 1995.
10. NANTAPHOL, S.; CHANNON, R.B.; KONDO, T.; SIANGPROH, W.; CHAILAPAKUL, O. & HENRY, C.S. "Boron Doped Diamond Paste Electrodes for Microfluidic Paper-Based Analytical Devices". *Analytical Chemistry*, **89** (7): 4100, 2017.
11. SACKMANN, E.K.; FULTON, A.L. & BEEBE, D.J. "The present and future role of microfluidics in biomedical research". *Nature*, **507** (7491): 181, 2014.
12. WHITESIDES, G.M. "The origins and the future of microfluidics". *Nature*, **442** (7101): 368, 2006.
13. FANGUY, J.C. & HENRY, C.S. "The analysis of uric acid in urine using microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection". *ELECTROPHORESIS*, **23** (5): 767, 2002.
14. CAO, J.T.; ZHU, Y.D.; RANA, R.K. & ZHU, J.J. "Microfluidic chip integrated with flexible PDMS-based electrochemical cytosensor for dynamic analysis of drug-induced apoptosis on HeLa cells". *Biosensors and Bioelectronics*, **51**: 97, 2014.
15. NILGHAZ, A.; WICAKSONO, D.H.B.; GUSTIONO, D.; ABDUL MAJID, F.A.; SUPRIYANTO, E. & ABDUL KADIR, M.R. "Flexible microfluidic cloth-based analytical devices using a low-cost wax patterning technique". *Lab on a Chip*, **12** (1): 209, 2012.
16. BOYD-MOSS, M.; BARATCHI, S.; DI VENERE, M. & KHOSHMANESH, K. "Self-contained microfluidic systems: A review". *Lab on a Chip*, **16** (17): 3177, 2016.
17. LI, X.; LUO, L. & CROOKS, R.M. "Faradaic Ion Concentration Polarization on a Paper Fluidic Platform". *Analytical Chemistry*, **89** (7): 4294, 2017.
18. ZHANG, Y.; GE, L.; LI, M.; YAN, M.; GE, S.; YU, J.; SONG, X. & CAO, B. "Flexible paper-based ZnO nanorod light-emitting diodes induced multiplexed photoelectrochemical immunoassay". *Chemical Communications*, **50** (12): 1417, 2014.
19. DUFFY, D.C.; MCDONALD, J.C.; SCHUELLER, O.J.A. & WHITESIDES, G.M. "Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)". *Analytical Chemistry*, **70** (23): 4974, 1998.
20. ZHANG, Y.; GE, S. & YU, J. "Chemical and biochemical analysis on lab-on-a-chip devices fabricated using three-dimensional printing". *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **85**: 166, 2016.

21. MARTINEZ, A.W.; PHILLIPS, S.T.; BUTTE, M.J. & WHITESIDES, G.M. "Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays". *Angewandte Chemie International Edition*, **46** (8): 1318, 2007.
22. JIANG, X. & FAN, Z.H. "Fabrication and Operation of Paper-Based Analytical Devices". *Annual Review of Analytical Chemistry*, **9** (1): 203, 2016.
23. DESMET, C.; MARQUETTE, C.A.; BLUM, L.J. & DOUMÈCHE, B. "Paper electrodes for bioelectrochemistry: Biosensors and biofuel cells". *Biosensors and Bioelectronics*, **76**: 145, 2016.
24. DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O. & HENRY, C.S. "Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics". *Analytical Chemistry*, **81** (14): 5821, 2009.
25. RUNGSAWANG, T.; PUNRAT, E.; ADKINS, J.; HENRY, C. & CHAILAPAKUL, O. "Development of Electrochemical Paper-based Glucose Sensor Using Cellulose-4-aminophenylboronic Acid-modified Screen-printed Carbon Electrode". *Electroanalysis*, **28** (3): 462, 2016.
26. BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. & BRUNS, D.E., *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry Passcode Only*. 6 ed. Elsevier Science Health Science Division. 2007.
27. SHARMA, P. & SHARAN, P. "An Analysis and Design of Photonic Crystal-Based Biochip for Detection of Glycosuria". *IEEE Sensors Journal*, **15** (10): 5569, 2015.
28. REBELO, J.C.; ROCHA, F.; SOUSA, S.G.D. & TEIXEIRA, P. "Glicosúria renal: a propósito de dois casos clínicos". *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, **34**: 291, 2012.
29. LESKOVAC, V.; TRIVIĆ, S.; WOHLFAHRT, G.; KANDRAC, J. & PERICIN, D. "Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors". *Int J Biochem Cell Biol*, **37** (4): 731, 2005.
30. WONG, C.M.; WONG, K.H. & CHEN, X.D. "Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **78** (6): 927, 2008.
31. STEFAN, R.-I.; BOKRETSION, R.G.; VAN STADEN, J.F. & ABOUL-ENEIN, H.Y. "Simultaneous determination of creatine and creatinine using amperometric biosensors". *Talanta*, **60** (6): 1223, 2003.
32. STEFAN, R.I. & BOKRETSION, R.G. "Determination of Creatine and Creatinine Using a Diamond Paste Based Electrode". *Instrumentation Science & Technology*, **31** (2): 183, 2003.
33. LAD, U.; KHOKHAR, S. & KALE, G.M. "Electrochemical Creatinine Biosensors". *Analytical Chemistry*, **80** (21): 7910, 2008.
34. STEELE, T.H. & RIESELBACH, R.E. "The renal mechanism for urate homeostasis in normal man". *The American Journal of Medicine*, **43** (6): 868, 1967.
35. MARANGELLA, M. "Uric acid elimination in the urine. Pathophysiological implications". *Contributions to nephrology*, **147**: 132, 2005.
36. FEIG, D.I.; KANG, D.-H. & JOHNSON, R.J. "Uric Acid and Cardiovascular Risk". *New England Journal of Medicine*, **359** (17): 1811, 2008.
37. JOHNSON, R.J.; NAKAGAWA, T.; JALAL, D.; SÁNCHEZ-LOZADA, L.G.; KANG, D.-H. & RITZ, E. "Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which?". *Nephrology Dialysis Transplantation*, **28** (9): 2221, 2013.
38. SHA, R.; VISHNU, N. & BADHULIKA, S. "MoS₂ based ultra-low-cost, flexible, non-enzymatic and non-invasive electrochemical sensor for highly selective detection of Uric acid in human urine samples". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **279**: 53, 2019.
39. BONSNES, R.W. & TAUSSKY, H.H. "ON THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF CREATININE BY THE JAFFE REACTION". *Journal of Biological Chemistry*, **158** (3): 581, 1945.
40. BURTIS, C.A. & BRUNS, D.E., *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Elsevier Health Sciences. 2014
41. KÜME, T.; SAĞLAM, B.; ERGON, C. & SISMAN, A.R. "Evaluation and comparison of Abbott Jaffe and enzymatic creatinine methods: Could the old method meet the new requirements?". *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **32** (1): e22168, 2018.

42. SCHRIER, R.W., *Diseases of the Kidney and Urinary Tract*. 8th. ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 2007.
43. PARONI, R.; FERMO, I.; CIGHETTI, G.; FERRERO, C.A.; CAROBENE, A. & CERIOTTI, F. "Creatinine determination in serum by capillary electrophoresis". *Electrophoresis*, **25** (3): 463, 2004.
44. DAI, X.; FANG, X.; ZHANG, C.; XU, R. & XU, B. "Determination of serum uric acid using high-performance liquid chromatography (HPLC)/isotope dilution mass spectrometry (ID-MS) as a candidate reference method". *Journal of Chromatography B*, **857** (2): 287, 2007.
45. YUEN, P.S.T.; DUNN, S.R.; MIYAJI, T.; YASUDA, H.; SHARMA, K. & STAR, R.A. "A simplified method for HPLC determination of creatinine in mouse serum". *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **286** (6): F1116, 2004.
46. DONG, X. "Study on Detection methods for Uric Acid in Biological Samples". *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH*, **8** (2): 925, 2017.
47. RANDVIIR, E.P. & BANKS, C.E. "Analytical methods for quantifying creatinine within biological media". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **183**: 239, 2013.
48. PUNDIR, C.S.; YADAV, S. & KUMAR, A. "Creatinine sensors". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **50**: 42, 2013.
49. CINCOTTO, F.H.; FAVA, E.L.; MORAES, F.C.; FATIBELLO-FILHO, O. & FARIA, R.C. "A new disposable microfluidic electrochemical paper-based device for the simultaneous determination of clinical biomarkers". *Talanta*, **195**: 62, 2019.
50. ROSSINI, E.L.; MILANI, M.I.; CARRILHO, E.; PEZZA, L. & PEZZA, H.R. "Simultaneous determination of renal function biomarkers in urine using a validated paper-based microfluidic analytical device". *Analytica Chimica Acta*, **997**: 16, 2018.
51. NOGUEIRA, L.; CORRADI, R. & EASTHAM, J.A. "Other biomarkers for detecting prostate cancer". *BJU International*, **105** (2): 166, 2010.
52. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, *Câncer de próstata*. <https://www.inca.gov.br/assuntos/cancer-de-prostata>, 2018.
53. INSTITUTO ONCOGUIA, *Diagnóstico do Câncer de Próstata*. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/diagnostico/773/149/>, 2017.
54. MA, W.; YIN, H.; XU, L.; WU, X.; KUANG, H.; WANG, L. & XU, C. "Ultrasensitive aptamer-based SERS detection of PSAs by heterogeneous satellite nanoassemblies". *Chemical Communications*, **50** (68): 9737, 2014.
55. KAYA, T.; KANEKO, T.; KOJIMA, S.; NAKAMURA, Y.; IDE, Y.; ISHIDA, K.; SUDA, Y. & YAMASHITA, K. "High-Sensitivity Immunoassay with Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy Using a Plastic Sensor Chip: Application to Quantitative Analysis of Total Prostate-Specific Antigen and GalNAc β 1-4GlcNAc-Linked Prostate-Specific Antigen for Prostate Cancer Diagnosis". *Analytical Chemistry*, **87** (3): 1797, 2015.
56. LIU, A.; ZHAO, F.; ZHAO, Y.; SHANGGUAN, L. & LIU, S. "A portable chemiluminescence imaging immunoassay for simultaneous detection of different isoforms of prostate specific antigen in serum". *Biosensors and Bioelectronics*, **81**: 97, 2016.
57. MA, H.; LI, X.; YAN, T.; LI, Y.; ZHANG, Y.; WU, D.; WEI, Q. & DU, B. "Electrochemiluminescent immunosensing of prostate-specific antigen based on silver nanoparticles-doped Pb (II) metal-organic framework". *Biosensors and Bioelectronics*, **79**: 379, 2016.
58. WEI, B.; MAO, K.; LIU, N.; ZHANG, M. & YANG, Z. "Graphene nanocomposites modified electrochemical aptamer sensor for rapid and highly sensitive detection of prostate specific antigen". *Biosensors and Bioelectronics*, **121**: 41, 2018.
59. ZHOU, X.; YANG, L.; TAN, X.; ZHAO, G.; XIE, X. & DU, G. "A robust electrochemical immunosensor based on hydroxyl pillar[5]arene@AuNPs@g-C₃N₄ hybrid nanomaterial for ultrasensitive detection of prostate specific antigen". *Biosensors and Bioelectronics*, **112**: 31, 2018.

60. YANG, M.; JAVADI, A.; LI, H. & GONG, S. "Ultrasensitive immunosensor for the detection of cancer biomarker based on graphene sheet". *Biosensors and Bioelectronics*, **26** (2): 560, 2010.
61. SHIN, K.S.; JI, J.H.; HWANG, K.S.; JUN, S.C. & KANG, J.Y. "Sensitivity Enhancement of Bead-based Electrochemical Impedance Spectroscopy (BEIS) biosensor by electric field-focusing in microwells". *Biosensors and Bioelectronics*, **85**: 16, 2016.
62. ÇEVİK, E.; BAHAR, Ö.; ŞENEL, M. & ABASIYANIK, M.F. "Construction of novel electrochemical immunosensor for detection of prostate specific antigen using ferrocene-PAMAM dendrimers". *Biosensors and Bioelectronics*, **86**: 1074, 2016.
63. JONES, I.L.; LIVI, P.; LEWANDOWSKA, M.K.; FISCELLA, M.; ROSCIC, B. & HIERLEMANN, A. "The potential of microelectrode arrays and microelectronics for biomedical research and diagnostics". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **399** (7): 2313, 2011.
64. PHEENEY, C.G.; ARNOLD, A.R.; GRODICK, M.A. & BARTON, J.K. "Multiplexed Electrochemistry of DNA-Bound Metalloproteins". *Journal of the American Chemical Society*, **135** (32): 11869, 2013.
65. GE, S.; GE, L.; YAN, M.; SONG, X.; YU, J. & HUANG, J. "A disposable paper-based electrochemical sensor with an addressable electrode array for cancer screening". *Chemical Communications*, **48** (75): 9397, 2012.
66. SIGMA-ALDRICH, <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>, 2018.
67. HALLIDAY, D.; RESNICK, R. & WALKER, J., *Fundamentos de física: volume 3 : eletromagnetismo*, LTC. 2008.
68. BRUICE, P., *Organic Chemistry*, Prentice Hall PTR. 1996.
69. GEISS, F., *Fundamentals of thin layer chromatography (planar chromatography)*, Hüthig. 1987.
70. AN WONG, C.H.; AMBROSI, A. & PUMERA, M. "Thermally reduced graphenes exhibiting a close relationship to amorphous carbon". *Nanoscale*, **4** (16): 4972, 2012.
71. BANKAR, S.B.; BULE, M.V.; SINGHAL, R.S. & ANANTHANARAYAN, L. "Glucose oxidase — An overview". *Biotechnology Advances*, **27** (4): 489, 2009.
72. KRIKSTOPAITIS, K.; KULYS, J. & TETIANEC, L. "Bioelectrocatalytic glucose oxidation with phenoxazine modified glucose oxidase". *Electrochemistry Communications*, **6** (4): 331, 2004.
73. CHEN, W., *ZnWO4 Nanorod Modified Electrode for Uric Acid Electrocatalytic Sensing and Application*. 8516 p, 2017.
74. DA CRUZ, F.S.; PAULA, F.D.S.; FRANCO, D.L.; DOS SANTOS, W.T.P. & FERREIRA, L.F. "Electrochemical detection of uric acid using graphite screen-printed electrodes modified with Prussian blue/poly(4-aminosalicylic acid)/Uricase". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **806**: 172, 2017.
75. MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M.J. & WALDRON, K.C. "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking". *BioTechniques*, **37** (5): 790, 2004.
76. DOS SANTOS, J.C.S.; RUEDA, N.; SANCHEZ, A.; VILLALONGA, R.; GONCALVES, L.R.B. & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. "Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization". *RSC Advances*, **5** (45): 35801, 2015.
77. YEY, J.-T.; HOU, Y.-J.; CHENG, L.; WANG, Y.-Z.; YANG, L. & WANG, C.-K. "Water proof and strength retention properties of thermoplastic starch based biocomposites modified with glutaraldehyde". *Carbohydrate Polymers*, **127**: 135, 2015.
78. ZHANG, X.; SUN, P.; HUANGSHAN, L.; HU, B.-H. & MESSERSMITH, P.B. "Improved method for synthesis of cysteine modified hyaluronic acid for in situ hydrogel formation". *Chemical Communications*, **51** (47): 9662, 2015.
79. MITEWA, M. "Coordination properties of the bioligands creatinine and creatine in various reaction media". *Coordination Chemistry Reviews*, **140**: 1, 1995.

80. KUMAR, V.; HEBBAR, S.; KALAM, R.; PANWAR, S.; PRASAD, S.; SRIKANTA, S.S.; KRISHNASWAMY, P.R. & BHAT, N. "Creatinine-Iron Complex and Its Use in Electrochemical Measurement of Urine Creatinine". *IEEE Sensors Journal*, **18** (2): 830, 2018.
81. IBÁÑEZ-REDÍN, G.; SILVA, T.A.; VICENTINI, F.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Effect of carbon black functionalization on the analytical performance of a tyrosinase biosensor based on glassy carbon electrode modified with dihexadecylphosphate film". *Enzyme and Microbial Technology*, **116**: 41, 2018.
82. HOOSHMAND, S. & ES'HAGHI, Z. "Microfabricated disposable nanosensor based on CdSe quantum dot/ionic liquid-mediated hollow fiber-pencil graphite electrode for simultaneous electrochemical quantification of uric acid and creatinine in human samples". *Analytica Chimica Acta*, **972**: 28, 2017.
83. RAVEENDRAN, J.; RESMI, P.E.; RAMACHANDRAN, T.; NAIR, B.G. & BABU, T.G.S. "Fabrication of a disposable non-enzymatic electrochemical creatinine sensor". *Sensors and Actuators B-Chemical*, **243**: 589, 2017.
84. CHEN, P.; PENG, Y.; HE, M.; YAN, X.C.; ZHANG, Y. & LIU, Y.N. "Sensitive Electrochemical Detection of Creatinine at Disposable Screen-Printed Carbon Electrode Mixed with Ferrocenemethanol". *International Journal of Electrochemical Science*, **8** (7): 8931, 2013.
85. ERLKOTTER, A.; FOBKER, M. & CHEMNITIUS, G.C. "Biosensors and flow-through system for the determination of creatinine in hemodialysate". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **372** (2): 284, 2002.
86. CHEN, J.C.; KUMAR, A.S.; CHUNG, H.H.; CHIEN, S.H.; KUO, M.C. & ZEN, J.M. "An enzymeless electrochemical sensor for the selective determination of creatinine in human urine". *Sensors and Actuators B-Chemical*, **115** (1): 473, 2006.
87. BATRA, B.; LATA, S.; SUNNY; RANA, J.S. & PUNDIR, C.S. "Construction of an amperometric bilirubin biosensor based on covalent immobilization of bilirubin oxidase onto zirconia coated silica nanoparticles/chitosan hybrid film". *Biosensors and Bioelectronics*, **44**: 64, 2013.
88. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C. & HILLIER, J. "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold". *Discussions of the Faraday Society*, **11** (0): 55, 1951.
89. DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; PAROLO, C.; MARAN, F. & MEKOÇI, A. "Size-dependent direct electrochemical detection of gold nanoparticles: application in magnetoimmunoassays". *Nanoscale*, **3** (8): 3350, 2011.
90. DE OLIVEIRA, T.R.; MARTUCCI, D.H. & FARIA, R.C. "Simple disposable microfluidic device for Salmonella typhimurium detection by magneto-immunoassay". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **255**: 684, 2018.
91. BART, J.; TIGGELAAR, R.; YANG, M.; SCHLAUTMANN, S.; ZUILHOF, H. & GARDENIERS, H. "Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices". *Lab on a Chip*, **9** (24): 3481, 2009.