UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

Cristiane Margarete Daikuzono

Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para análise de sistemas líquidos complexos

> São Carlos 2017

CRISTIANE MARGARETE DAIKUZONO

Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para análise de sistemas líquidos complexos

Versão corrigida

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior

São Carlos 2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC/USP

Daikuzono, Cristiane Margarete
 D132d Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para
 análise de sistemas líquidos complexos / Cristiane
 Margarete Daikuzono; orientador Osvaldo Novais de
 Oliveira Junior. São Carlos, 2017.

 Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
 Ciência e Engenharia de Materiais e Área de
 Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e
 Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São
 Carlos da Universidade de São Paulo, 2017.
 1. língua eletrônica. 2. filmes nanoestruturados.
 3. hidrogéis. 4. gliadina. 5. ácido borônico. 6.
 monossacarídeos. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel CRISTIANE MARGARETE DAIKUZONO.

Título da tese: "Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para análise de sistemas líquidos complexos".

Data da defesa: 23/05/2017.

Comissão Julgadora:

Resultado:

APROVADA

APROVADA

Prof. Titular **Osvaldo Novais de Oliveira Junior** (**Orientador**) (Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

Prof. Dr. Lucas Fugikawa Santos (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP – São José do Rio Preto)

Prof. Titular **Emanuel Carrilho** (Instituto de Químiça de São Carlos/IQSC)

Prof. DE Danie Lúis Chinaglia <u>A Provodo</u> (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP – Rio Claro)

Prof. Dr. Antonio Riul Junior

Prof. Dr. Antonio Riul Junid^e (Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Antonio Rivel Jr APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais: Prof. Titular **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Associado Luís Fernando Costa Alberto

.

Dedico este trabalho aos Doutores Flávio Makoto Shimizu e Larisa Florea pelo conhecimento transmitido, pela paciência, amizade e por me apoiarem nos momentos mais difíceis. Dedico também à minha família por todo apoio dado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Professor Dr. Oliveira Jr. pela orientação, por todo conhecimento transmitido e pelas oportunidades dadas. Aos doutores Flávio M. Shimizu e Larisa Florea pela supervisão, apoio e por me ensinarem a ser uma boa pesquisadora. Dois exemplos de excelentes pesquisadores a serem seguidos. Agradeço ao grupo de polímeros do Instituto de Física de São Carlos- USP por todo apoio dado, em especial aos técnicos e secretárias. Ao grupo do laboratório de microfabricação do CNPEM-Campinas, em especial ao Dr. Angelo Gobbi e a Maria Helena Piazzetta por todo apoio e colaboração. Agradeço também a EMBRAPA Instrumentação - São Carlos, em especial ao pesquisador Dr. Daniel S. Corrêa que me supervisionou na parte inicial do doutorado e a todos os técnicos da instituição. Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Dermot Diamond por ter me recepcionado tão bem em seu grupo e por toda orientação dada no doutorado sanduíche. Agradeço a todos os membros do grupo de pesquisa do departamento Insight da Dublin City University - Irlanda. Agradeço ao Prof. Dr. Riul, que mesmo indiretamente me orientou, apoiou, e sempre me incentivou a seguir a diante. Ao amigo Tiago Pedroso pelas medidas de Raman. A secretaria de pós graduação do programa de Ciência e Engenharia de Materias, em especial ao Victor. Agradeço a todos os meus amigos e colegas de trabalho pelos momentos de descontração e desabafos. E claro ao apoio sempre dado da minha família.

Muito obrigada galera!!!

RESUMO

DAIKUZONO, Cristiane Margarete. **Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para análise de sistemas líquidos complexos**. 2017. 110 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia dos Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

O objetivo principal desta tese foi desenvolver dispositivos microfluídicos do tipo língua eletrônica baseada em espectroscopia de impedância para análise de líquidos complexos. Dois tipos de língua eletrônica foram desenvolvidos. O primeiro com unidades sensoriais fabricadas com eletrodos interdigitados de ouro sobre vidro, selados com microcanal de PDMS, e recobertos com filmes automontados de polímeros condutores, materiais orgânicos e semicondutores. Essa língua eletrônica foi usada para diferenciar os sabores básicos, representados por soluções aquosas de NaCl (salgado), sacarose (doce), cafeína (amargo), HCl (azedo) e glutamato monosódico (umami), distinguir diferentes tipos de cafés, e detectar a presença de gliadina em soluções e alimentos. A distinção foi possível processando-se os dados de magnitude da capacitância com técnicas de projeção multidimensional IDMAP (Interactive Document Map) e análise de componentes principais (PCA). O segundo tipo de língua foi produzido com eletrodos interdigitados de carbono impressos sobre papel com canal hidrofílico e barreiras hidrofóbicas também impresso, modificado com hidrogel funcionalizado com ácido fenil-borônico (PBA) ou polilíquido iônico (PIL). Com dados de capacitância tratados com PCA e IDMAP, a língua foi usada para distinguir soluções dos açúcares glicose, frutose e sacarose, em diferentes concentrações, e diferentes marcas de suco de maçã. Nesta última língua, empregou-se a capacidade de intumescimento de hidrogéis contendo PBA na presença de açúcares, principalmente frutose, que também foi explorada na confecção de sensores com eletrodos de papel que puderam detectar concentrações baixas de glicose, próximas às encontrados no suor humano. Com a tecnologia de sensores em papel e microfluídica, podem-se conceber aplicações futuras, de baixo custo, em sensores na forma de emplastro para monitorar o nível de glicose no suor humano de maneira não invasiva e língua eletrônica para verificar a presença de glúten em alimentos.

Palavras chaves: língua eletrônica, microfluídica, filmes nanoestruturados e hidrogel.

ABSTRACT

DAIKUZONO, Cristiane Margarete. **Development of microfluidic devices for analysis of complex liquid systems**. 2017. 110 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia dos Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

The main aim of this thesis was to develop microfluidic devices of electronic tongue (etongue) type based on impedance spectroscopy to analyze complex liquids. Two types of e-tongue were developed. The first had sensing units fabricated with gold interdigitated electrodes onto glass with a microchannel sealed with PDMS and coated with layer-bylayer films of conducting polymers, organic and semiconductors. This e-tongue was used to distinguish the basic tastes, represented by aqueous solutions of NaCl (salty), sucrose (sweet), caffeine (bitter), HCl (sour) and monosodium glutamate (umami), to distinguish different types of coffees, and detect the presence of gliadin in solutions and food. The distinction was made possible by processing the capacitance data with the multidimensional projection techniques IDMAP (Interactive Document Map) and principal component analysis (PCA). The second type of e-tongue was produced with carbon interdigitated electrodes printed on paper with a hydrophilic channel with hydrophobic barriers, also printed, modified with functionalized hydrogel with phenylboronic acid (PBA) or poly(ionic liquid) (PIL). With capacitance data treated with PCA and IDMAP, the e-tongue was used to distinguish solutions at various concentrations of glucose, fructose and sucrose, in addition to different brands of apple juice. In this latter e-tongue, use was made of the ability of the hydrogel containing PBA to swell in the presence of sugars, mainly fructose, which was exploited in producing sensors with paper electrodes that could detect low concentrations of glucose, close to the values found in human sweat. With the technology of paper-based sensors and microfluidics, one may envisage future low cost applications, including patch sensors to monitor glucose in human sweat in a non-invasive manner and e-tongues to determine the presence of gluten in food.

Key words: electronic tongue, microfluidics, nanostructured films and hydrogel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Epidemiologia da doença celíaca no mundo25
Figura 2 - Esquema de deposição de filmes nanoestruturados por automontagem (LbL).29
Figura 3 - Estímulos externos que podem influenciar o intumescimento do hidrogel30
Figura 4 - Gráfico de trabalhos publicados por ano na área de sensores de hidrogéis.
Sensor and hydrogel foram as palavras chaves utilizadas na pesquisa realizada no site do
Web of Sciense
Figura 5 - Equilíbrio de complexação entre grupos do ácido fenilborônico e glicose.
Interação da glicose com grupos de PBA resulta no inchamento do hidrogel32
Figura 6 - Esquema de interação do ácido borônico imobilizado em matriz de hidrogel
com grupo diol do açúcar; Fotos de discos de hidrogel em tampão e diferentes
concentrações de glicose
Figura 7 - Representação da impedância elétrica como vetor usando coordenadas polares
e cartesianas
Figura 8 - Os filmes são depositados por LbL dinâmico através da injeção de
polieletrólitos no microcanal42
Figura 9 - Imagens de MEV de filmes finos depositados através da técnica LbL
dinâmico:44
Figura 10 - Imagens de AFM em diferentes regiões do filme de 5 bicamadas de
PAH/CuTsPc, mostrando: (a) Espessura de 170 a 180 nm da região da borda do filme e
(b) espessura de 12 nm da região central do filme44
Figura 11 - Imagens de AFM para filme de 5 bicamadas de PAH/PEDOT:PSS: (a)
Espessura de 170 a 180 nm da região da borda do filme e (b) espessura de 96 nm da
região central do filme45
Figura 12 - Imagens de AFM para filme de 5 bicamadas de PAH/PPy. (a) Espessura de
170 a 180 nm da região da borda do filme e (b) espessura de 48 nm da região central do
filme
Figura 13 - Perfil de velocidade
Figura 14 - Espectro Raman da região de borda do microcanal com filme de
CuTsPc/PAH
Figura 15 - Espectro Raman da região de borda do microcanal com filme de
PAH/PEDOT:PSS47

Figura 16 - Espectro Raman da região de borda do microcanal com filme de PAH/PPy. 48
Figura 17 - PCA de soluções de 1mM de NaCl (salgado), C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ (doce), HCl (azedo),
$C_8H_{10}N_4O_2$ (anidra) (amargo) e $C_5H_8NNaO_4.xH_2O$ (umami) [23]49
Figura 18 - PCA dos diferentes tipos de café
Figura 19 - Espectros UV-vis de diferentes concentrações de gliadina (1309, 941, 776,
576, 227 e 50 ppm) com banda característica em 280 nm
Figura 20 - Distinção dos grupos alimentares com, sem e contaminados com gliadina
através da análise com o software PEx-Sensors dos resultados de espectroscopia no UV-
vis
Figura 21 – (A) Medidas de magnitude da capacitância da solução padrão com diferentes
concentrações de gliadina para o sensor sem filme e (B) diferentes concentrações de
gliadina monitoradas através de valores de capacitância em 1kHz53
Figura 22 - (A) Medidas de magnitude da capacitância da solução padrão com diferentes
concentrações de gliadina para o sensor com 5 bicamadas de filme de PAH/CuTsPc e (B)
diferentes concentrações de gliadina monitoradas através de valores de capacitância em
1kHz
Figura 23 - (A) Medidas de magnitude da capacitância da solução padrão com diferentes
concentrações de gliadina para o sensor com 5 bicamadas de filme de PAH/PEDOT:PSS e
(B) diferentes concentrações de gliadina monitoradas através de valores de capacitância
em 1kHz
Figura 24 - (A) Medidas de magnitude da capacitância da solução padrão com diferentes
concentrações de gliadina para o sensor com 5 bicamadas de filme de PAH/PPy e (B)
diferentes concentrações de gliadina monitoradas através de valores de capacitância em
1kHz55
Figura 25 - IDMAP plot para diferentes concentrações de gliadina em solução analisadas
em uma faixa de frequência de 1 Hz a 1 kHz56
Figura 26 - PCAs de soluções padrões de gliadina com diferentes concentrações 57
Figura 27 - Medidas elétricas de alimentos com glúten em 4 diferentes sensores. (A) sem
filme, (B) PAH/CuTsPc, (C) PAH/PEDOT:PSS e (D) PAH/PPy58
Figura 28 - Análise de alimentos sem glúten através da curva de capacitância vs
frequência em 4 sensores. (A) sem filme, (B) PAH/CuTsPc, (C) PAH/PEDOT:PSS e (D)
РАН/РРу
Figura 29 - Medidas de amostras que foram contaminadas com 200 ppm de gliadina e
analisadas nos sensores sem filme, com filme de PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS e

PAH/PPy respectivamente. (A) sem filme, (B) PAH/CuTsPc, (C) PAH/PEDOT:PSS e (D)
РАН/РРу
Figura 30 - (A) PCA de amostras de alimentos com e sem glúten; (B) PCA de amostras
sem glúten e de amostras sem glúten contaminadas com gliadina61
Figura 31 - Gráfico IDMAP dos espectros de UV-vis das amostras de alimentos com, sem
e contaminados com gliadina62
Figura 32 - Espectro PM-IRRAS de filme com 5 bicamadas de PAH/CuTsPc depositado
sobre lâmina de vidro recoberto com ouro63
Figura 33 - (A) espectro de 5 bicamadas de filme CuTsPc + gliadina; (B) espectro do
filme CuTsPc + gliadina pós-lavagem63
Figura 34 - Espectro de filme com 5 bicamadas de PAH/PEDOT:PSS64
Figura 35 - (A) 5 bicamadas de PAH/PEDOT:PSS + gliadina; (B) filme PAH/PEDOT:PSS
+ gliadina pós lavagem65
Figura 36 - Espectro PM-IRRAS para filme LbL com 5 bicamadas de PAH/PPy65
Figura 37 - Espectro PM-IRRAS para (A) 5 bicamadas de PAH/PPy + gliadina; (B)
PAH/PPy + gliadina
Figura 38 - Etapas de fabricação dos eletrodos interdigitados de carbono impressos em
papel pela técnica screen-printing71
Figura 39 - Preparação de amostras de hidrogel em molde de PDMS para o teste de
intumescimento72
Figura 40 - Eletrodos interdigitados de carbono cobertos com hidrogel; A) Foto do
eletrodo interdigitado de carbono antes da funcionalização; B) Esquema de deposição do
coquetel sobre os eletrodos via drop-casting e C) Protocolo de fotopolimerização do
hidrogel73
Figura 41 - Aparato experimental para detecção de impedância de monossacarídeos
usando eletrodos funcionalizados com hidrogel funcionalizado74
Figura 42 - Imagens de microscópio do hidrogel funcionalizado com 20 % mol PBA,
quando imerso em (a) tampão PBS, (b) 20 mM glicose em PBS e (c) 20 mM frutose em
PBS75
Figura 43 - Equilíbrio de inchamento de hidrogéis de p (AAm-co-PBA) com 20% mol de
PBA em solução tampão em diferentes concentrações de glicose e frutose75
Figura 44 - Imagens de MEV de eletrodos interdigitados de carbono impressos sobre
papel antes (A) e depois de cobertos com 1 (B), 3 (C) e 5 (D) camadas de hidrogel,

respectivamente76
Figura 45 - Medidas da magnitude da impedância (círculo) e magnitude da capacitância
(quadrado) para o aumento de número de camadas de hidrogel sobre os eletrodos, em
água deionizada77
Figura 46 - Detecção de glicose em tampão PBS através de mudanças na capacitância
relativa, para hidrogéis contendo 5 mol % PBA (azul) e 20 mol % PBA (vermelho) 78
Figura 47 - Espectro de impedância para eletrodos cobertos com uma camada de hidrogel
funcionalizado com 20 mol % PBA quando exposto para uma variedade de concentrações
de glicose (A) e frutose (B), respectivamente
Figura 48 - Alterações de capacitância (ΔC) a 1 kHz para o eletrodo revestido com
hidrogel funcionalizado com 20 mol % de PBA versus concentração de açúcar. Os dados
foram analisados em triplicata e foram obtidas barras de erro a partir dos desvios-padrão.
O eletrodo sem hidrogel (estrela) foi testado com diferentes concentrações de glicose para
verificar o efeito de PBA na resposta de capacitância. (A) alterações de capacitância
analisadas para concentrações entre 0 a 5 mM. (B) alterações de capacitância analisadas
para concentrações entre 0 a 1,2 mM80
Figura 49 - Fabricação de eletrodos interdigitados de carbono com canal impresso 85
Figura 50 - (A) eletrodo interdigitado de carbono impresso via screen-printing; (B) canal
impresso sobre o eletrodo; (C) canal derretido sobre os eletrodos
Figura 51 - Polimerização de hidrogel funcionalizado sobre o canal impresso sobre o
eletrodo
Figura 52 - Conjunto de eletrodos da língua eletrônica: (A) sem hidrogel, (B) 5 mol %
PBA, (C) 20 mol % PBA e (D) PIL
Figura 53 - Aparato experimental para medidas de impedância com língua eletrônica
microfluídica
Figura 54 - Espectros de capacitância das unidades sensoriais, modificadas com PIL, 5 e
20 mol % PBA e 1 eletrodo sem hidrogel, em (A) água deionizada e (B) solução aquosa
de PBS (pH 7,4)
Figura 55 - PCA de diferentes concentrações de glicose, sacarose e frutose
Figura 56 - (A) curvas de capacitância dos açúcares sacarose, glicose e frutose com
concentração de 0.016 g.mL ⁻¹ analisados em canais modificados com PIL; (B) gráfico 3D
de capacitância analisada em 100 Hz para 3 tipos de açúcar90
Figura 57 - PCA 3D de diferentes concentrações de frutose (bola vermelha), glicose (bola
verde) e sacarose (bola azul) e buffer PBS (bola preta)

Figura 58 - Imagem gerada a partir do método IDMAP de diferentes concentrações de
frutose e solução PBS91
Figura 59 - Imagem gerada pelo método IDMAP de diferentes concentrações de glicose e
PBS92
Figura 60 - Imagem gerada pelo método IDMAP de diferentes concentrações de sacarose
e PBS
Figura 61 - Espectros de impedância de sucos de maçã com diferentes concentrações de
açúcar
Figura 62 - PCA de diferentes marcas de suco de maçã analisadas em 3 línguas
eletrônicas94
Figura 63 - Gráfíco de PCA 3D de amostras medidas em triplicata de amostras de
diferentes marcas suco de maçã95
Figura 64 - Gráfico 3D de respostas para unidades sensoriais com sucos de maçã e
respectivas capacitâncias
Figura 65 - PCA de amostras de sucos de maçã utilizando o mesmo conjunto de unidades
sensoriais da língua eletrônica. À esquerda está o gráfico para a primeira medida, sendo
que o gráfico à direita se refere à segunda medida96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atribuições de bandas do espectro Raman da CuTsPc [75,80]	47
Tabela 2 - Atribuições de bandas do espectro Raman do PEDOT [81,82]	47
Tabela 3 - Atribuições de bandas do espectro Raman do PPy [83,84]	48
Tabela 4 - Amostras de café analisadas com a língua eletrônica microfluídica	49
Tabela 5 - Amostras de glicose, sacarose e frutose e suas respectivas concentrações	89
Tabela 6 - Amostras de suco de maçã e suas respectivas concentrações de açúcar em 1	00
mL de suco	93

Lista de Abreviações

BA: do inglês Boronic acid.

CuTsPc: ftalocianina tetrasulfonada de cobre.

IDMAP: do inglês Interactive Document Map.

LbL: do inglês layer-bu-layer.

LOC: do inglês *lab-on-a-chip*.

µPAD: do inglês Microfluidic paper-based analytical devices.

PAH: poli(cloridrato de alilamina).

PBA: do inglês fenilboronic acid.

PC: do inglês Principal Component.

PCA: do inglês Principal Component Analysis.

PDMS: polidimetilsiloxano.

PEDOT:PSS: poli(3,4-etilenodioxitiofeno):poli(estireno sulfonado).

PIL: do inglês poli(ionic liquid).

PM-IRRAS: reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização.

PPy: polipirrol.

SM: Sammon's Map

Sumário

CAPÍTULO 1 – MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	25
1.1 - Motivação	25
1.2 - Objetivos	26
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 – Língua eletrônica	27
2.2 - Microfluídica	28
2.3 – Técnicas de automontagem (layer-by-Layer)	29
2.4 – Hidrogéis	30
2.5 – Sensores baseados em hidrogéis funcionalizados com ácido borônico	32
2.6 – Glúten e Doença Celíaca	33
2.7 – Conceito básico de Impedância	34
2.8 – Espectroscopia de Impedância	36
2.9 – Análise de Componentes Principais	36
2.10 – Método de visualização de informação	37
Capitulo 3 – INTEGRAÇÃO DE UMA LINGUA ELETRONICA EM DISPOSI MICROFLUÍDICOS PARA ANÁLISE DE LÍQUIDOS COMPLEXOS E DETECÇ. GLIADINA EM ALIMENTOS	ÃO DE
Resumo	
3.1 – Introdução	40
3.2 – Materiais e Métodos	41
3.3 – Resultados e Discussão	43
3.4 – Conclusão	66
CAPÍTULO 4 – DETECÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS ATRAVÉS ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA UTILIZANDO ELETROD CARBONO IMPRESSO EM PAPEL E FUNCIONALIZADOS COM HIDROGEL	5 DE OS DE 67
Resumo	67
4.1 – Introdução	68
4.2 – Materiais e Métodos	70
4.2.1 – Fabricação de eletrodos interdigitados	71
4.2.2 – Estudo de síntese e inchaço de hidrogel funcionalizado	71

4.2.3 – Protocolo de funcionalização de eletrodos e análises	72
4.2.4 – Espectroscopia de impedância elétrica	73
4.3 – Resultados e Discussão	74
4.3.1 – Caracterização do hidrogel	74
4.3.2 - Camada de hidrogel funcionalizado com PBA para revesti	mento de
eletrodos	76
4.3.3 – Análises de impedância e capacitância	77
4.4 – Conclusão	80
CAPÍTULO 5 – DETECÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE AÇÚCARES E MA SUCO MAÇÃ A PARTIR DE UMA LÍNGUA ELETRÔNICA MICROFLUÍI PAPEL COM ELETRODOS FUNCIONALIZADOS COM HIDROGEL	RCAS DE DICA EM 82
Resumo	
5.1 – Introdução	83
5.2 – Materiais e Métodos	84
5.2.1 – Materiais	
5.2.2 - Fabricação de eletrodos interdigitados de carbono via screen-	printing e
impressão de canais hidrofóbicos	84
5.2.3 – Modificação da superfície do canal com polimerização de	hidrogel
funcionalizado	86
5.2.4 – Unidades sensoriais da língua eletrônica microfluídica	86
5.2.5 – Espectroscopia de impedância	87
5.2.6 – Análise de dados com PCA e IDMAP	87
5.3 – Resultados e Discussão	
5.4 – Conclusão	97
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO GERAL E PERPESCTIVAS FUTURAS	98
REFERENCIAS	

Apresentação

Esta tese está dividida em 5 Capítulos: O Capítulo 1 discorre sobre a motivação e principais objetivos do trabalho; no Capítulo 2 é feita uma breve revisão conceitual dos principais tópicos abordados no trabalho; o Capítulo 3 discorre sobre a integração de uma língua eletrônica em dispositivos microfluídicos para análise de líquidos complexos e detecção de gliadina em alimentos. Os Capítulos 4 e 5 apresentam os trabalhos desenvolvidos no doutorado sanduíche, em um período de 1 ano, realizado na *Dublin City University (DCU)* – Irlanda em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Dermot Diamond. A pesquisa do Capítulo 4 envolveu detecção de monossacarídeos através de espectroscopia de impedância elétrica utilizando eletrodos de carbono impressos em papel e funcionalizados com filmes de hidrogel. Este trabalho foi continuado com a detecção de diferentes tipos de açúcares e marcas de suco de maçã a partir de uma língua eletrônica microfluídica, cujos resultados aparecem no Capítulo 5.

A seguir estão listados os trabalhos derivados da pesquisa no doutorado:

- Alessio, P.; Constantino, C. J. L.; Daikuzono, C. M.; Riul, A.; de Oliveira, O. N. Analysis of Coffees Using Electronic Tongues. In *Electronic Noses and Tongues in Food Science*; Elsevier, 2016; pp. 171–177.
- Daikuzono, C. M.; Delaney, C.; Tesfay, H.; Florea, L.; Oliveira, O. N.; Morrin, A.; Diamond, D. Impedance spectroscopy for monosaccharides detection using responsive hydrogel modified paper-based electrodes. *The Analyst*, 2017, 142, 1133-1139.
- Daikuzono, C.M.; Shimizu, F.M.; Manzoli, A.; Riul Jr.,A.; Piazzetta, M.H.O.; Gobbi, A.L.; Correa, D.S.; Paulovich, F.V.; Oliveira Jr., O. Information visualization and feature selection methods applied to detect gliadin in gluten-containing foodstuff with a microfluidic electronic tongue. ACS Applied Materials and Interfaces, 2017, 9 (23), 19646-19652.
- Paper-based microfluidic electronic tongue for sugar and juices analyzes using thin film of responsive hydrogel (2017) – em andamento.

Capítulo 1 – Motivação e Objetivos

1.1 – MOTIVAÇÃO

O trabalho desenvolvido no doutorado foi motivado pela busca de sensores de baixo custo que possam no futuro auxiliar portadores de doença celíaca e diabéticos a identificarem a presença de gliadina em alimentos e no monitoramento de glicose para aplicação de insulina, respectivamente. A doença celíaca é emergente, acometendo cerca de 1 % da população mundial [1,2], cuja incidência é ilustrada na Figura 1. Pacientes celíacos sofrem com inflamações severas no trato gastrointestinal quando da ingestão de alimentos que contenham glúten, causando inúmeros problemas de saúde. O tratamento mais eficaz para esta doença, hoje, é a não ingestão de alimentos com glúten. O desenvolvimento de um sensor capaz de identificar a presença de glúten nos alimentos é, portanto, de grande interesse para os celíacos por permitir um consumo seguro.





Fonte:Adaptado de <u>http://www.drschaer-institute.com/us/professional-articles/a-global-map-of-celiac-</u> disease-1229.html acessado 12/06/2017.

A segunda parte do trabalho de doutorado teve como motivação desenvolver sensores de açúcares focando no desenvolvimento futuro de um *skin-patch* para detecção de glicose no suor de diabéticos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*), diabetes é uma doença crônica e silenciosa, que provoca falecimento de órgãos, cegueira,

perda de peso e amputação de membros. Sua incidência tem aumentado: de 1980 a 2014 o número de pessoas acometidas com diabetes aumentou de 108 milhões para 422 milhões. Os maus hábitos alimentares e o aumento de sobrepeso na população colaboram para o aumento de casos de diabetes. Por isso é necessário o monitoramento constante de glicose no paciente diabético. Infelizmente, o método mais eficaz é através de uma pequena incisão no dedo para extração de sangue para análise [3]. Em nosso trabalho, pretendemos desenvolver um sensor não invasivo, mas eficiente na detecção de glicose.

1.2 – OBJETIVOS

Os principais objetivos são desenvolver diferentes design de língua eletrônica que possam ser aplicados em: (i) detecção de gliadina em solução aquosa através de unidades sensoriais em eletrodos interdigitados de ouro sobre um substrato de vidro e com canal fabricado em PDMS, ambos fabricados pela técnica de fotolitografia. As unidades sensoriais foram funcionalizadas com filmes nanoestruturados de polímeros condutores, materiais orgânicos e semicondutores depositados via técnica de automontagem (*layer-by-layer*); (ii) detecção de monossacarídeos em solução aquosa através de sensores de papel com eletrodos interdigitados de carbono impresso via *screen-printing* e com canal impresso via impressora de cera. As unidades sensoriais foram modificadas com filmes finos de líquidos iônicos e hidrogéis funcionalizados com ácido borônico. Com língua eletrônica em duas plataformas diferentes, realizamos o estudo das unidades sensoriais para detectar a gliadina em alimentos e monitorar diferentes concentrações de açúcares em solução aquosas através da técnica de espectroscopia de impedância elétrica.

Capítulo 2 – Revisão Conceitual

Neste capítulo abordaremos os principais tópicos envolvidos na tese, dando uma breve introdução para cada assunto.

2.1 – Língua eletrônica

De acordo com a IUPAC, língua eletrônica é um instrumento analítico composto por um arranjo de unidades sensoriais não específicos e não seletivo utilizado para análises quantitativas e qualitativas de soluções complexas [4]. As unidades sensoriais da "língua eletrônica" podem ser compostas por membranas, eletrodos interdigitados recobertos com filmes finos de materiais diversos, que são capazes de distinguir líquidos complexos semelhantes empregando o conceito de seletividade global, no qual a diferença de resposta elétrica de diferentes materiais serve como uma impressão digital para classificar a amostra analisada [5,6]. O número de sensores que compõem o arranjo sensorial pode variar de 4 a 40 unidades sensoriais, dependendo da complexidade da amostra analisada e do material disponível para fabricação da unidade sensorial. Quanto maior o número de unidades sensoriais, maior sua aplicabilidade para testes analíticos de amostras complexas [4]. A "língua eletrônica" pode ser utilizada em diversas análises, como as de alimentos, bebidas, de vestígios de impurezas ou poluentes em águas e biocombustível [7-10]. Este tipo de sensor pode empregar diferentes princípios de detecção, que incluem medidas eletroquímicas (potenciometria, amperometria e voltametria cíclica) [5,9] e espectroscopia de impedância [10].

A vantagem de se utilizar medidas eletroquímicas é de usarem instrumentação simples e de alta sensibilidade, mas são limitados por necessitarem de espécies eletroativas. Segundo Riul Jr. *et al.* [11], são vantagens da espectroscopia de impedância em relação aos métodos eletroquímicos: i) não ser necessário usar eletrodo de referência; (ii) o material da unidade sensorial não precisa ser eletroativo. As medidas de espectroscopia de impedância são realizadas variando-se a faixa de frequência do sinal aplicado sobre os eletrodos interdigitados recobertos com filmes nanoestruturados de diferentes materiais [5]. A escolha dos filmes nanoestruturados é relevante para aumentar a sensibilidade do dispositivo através da interação do analito em solução com esses filmes. É essa utilização de materiais com propriedades distintas que permite criar uma "impressão digital" da solução analisada [11-12]. O processamento de dados gerados pelas unidades sensoriais através de análises qualitativas e

quantitativas pode ser processado através de métodos estatísticos como análise de componentes principais [13-14] e computacional (técnica de projeção multidimensional) [15-16]. Além disso, podem-se usar técnicas de inteligência artificial para correlacionar com a percepção humana de distinção de sabores e odores [5].

2.2 – Microfluídica

A microfluídica é uma área de ciência e tecnologia em que dispositivos são produzidos com canais na ordem de 10 a 100 μ m, permitindo a passagem de fluidos com volumes que podem variar de 10⁻⁹ a 10⁻¹⁸ litros [17]. Uma vantagem óbvia desta técnica é a redução de uso de reagentes, o que gera redução de descarte e de custo. Com microfluídica é possível construir dispositivos simples ou mais complexos que permitem realizar separações e detecções com alta resolução e sensibilidade, diminuição no tempo de análise, além do baixo custo envolvido [18-19]. Dispositivos microfluídicos têm sido usados em biossensores [19], análise de DNA [20-21], análise química [22] e em língua eletrônica [23]. Com processos litográficos [24-25] e a integração da microeletrônica à tecnologia microfluídica [26] é possível produzir os chamados *lab-on-a-chip*, em que todas as funções de um laboratório são integradas em um único chip, sem a necessidade de operador qualificado. Todo procedimento laboratorial, incluindo transferência de amostras, mistura de reagentes, titulação e seleção de materiais, é realizado num único dispositivo de poucos centímetros quadrados [27- 28].

Usando miniaturização, pode-se também integrar os elementos fluídicos com as partes ópticas e elétricas [29-30]. Isso permite usar dispositivos *lab-on-a-chip* em diversas áreas [31-33], com as vantagens de redução do volume de reagentes e descartes, redução nos custos e aumento das velocidades de reação. Em 2007 Martinez *et.al.* [34] introduziram a microfluídica em dispositivos analíticos produzidos em papel, o chamados µPADs (do inglês *Microfluidic paper-based analytical devices*). Os µPADs são dispositivos simples fabricados em papel com microcanais hidrofóbicos que podem ser impressos via fotolitografia, carimbados com tinta hidrofóbica e *screen-printing*, entre outras técnicas [35]. Esta plataforma analítica pode servir para ensaios biológicos de baixo custo e são portáteis e de fácil manuseio. Os dispositivos microfluídicos de papel são mais baratos que os convencionais fabricados sobre silicone ou vidro, e não requerem instrumentos complexos para análise de dados. Muitos dispositivos microfluídicos de papel utilizam a força de capilaridade para escoar os líquidos ao longo do canal e as detecções geralmente são colorimétrica, eliminado assim grande parte de equipamentos analíticos. Para tanto, não há

necessidade de pessoas capacitadas para analisar dados, e o material pode ser incinerado evitando o acúmulo de dispositivo e contaminação do meio ambiente.

2.3 – Técnica de automontagem (Layer-by-Layer)

A língua eletrônica pode ser composta por um arranjo cujas unidades sensoriais formadas por eletrodos interdigitados recobertos com filmes nanoestruturados. A técnica de automontagem por adsorção física (LbL) é a mais usada para depositar filmes finos sobre os eletrodos interdigitados, por oferecer a vantagem de incorporação de diferentes materiais com arquitetura controlada [36]. A Figura 2 ilustra a técnica de automontagem LbL que consiste basicamente em alternar a imersão do substrato em uma solução de poliânion e policátion. Soluções de lavagem são usadas entre as deposições poliiônicas para remoção do excesso de moléculas não adsorvidas. As camadas nanoestruturadas são formadas por atração eletrostática entre as cargas opostas das moléculas em solução, gerando multicamadas de espessura da ordem de nm [37].



Figura 2 - Esquema de deposição de filmes nanoestruturados por automontagem (LbL).

Fonte: Elaborada pela autora.

A técnica de automontagem possibilita a aplicação de filmes nanoestruturados em diversas áreas, tais como sensores [38-39] e biossensores [40-41]. Yang *et.al.*, por exemplo, recorreram à técnica LbL para desenvolver um biossensor eletroquímico capaz de detectar colesterol com eletrodos de ouro modificados com filme fino de nanopartículas de platina dopada com quitosana e nanotubos de carbono combinados com sal de poli(sódio-p-estirenossulfonato) (PSS) [41]. Filmes nanoestruturados são usados também na modificação

de arranjos sensoriais de língua eletrônica. Borato *et.al.* modificaram o arranjo de uma língua eletrônica com eletrodos de cromo com filmes finos produzidos a partir da interação de poli (o-etoxianilina) (POEA) com nanopartículas de quitosana-poli(ácido metacrílico) (CS-PMAA) para detecção de íons cobre em soluções aquosas [42]. Daikuzono *et.al.* também usaram a técnica LbL para produzir as unidades sensoriais de uma língua eletrônica microfluídica, sendo que a deposição dos polímeros foi feita em fluxo dentro do microcanal e sobre os eletrodos interdigitados de ouro. Filmes finos de polímeros condutores, materiais orgânicos e semicondutores foram utilizados para detecção de diferentes "sabores" (amargo, doce, salgado, azedo e umami) em solução aquosa [23].

2.4 – Hidrogéis

Os hidrogéis são materiais poliméricos hidrofílicos que podem inchar e reter grande quantidade de água, sem se dissolver. São produzidos a partir da reação de um ou mais monômeros e podem ser classificados através do tipo de *cross-linking*. As junções podem ser naturais e químicas, e por isso os hidrogéis são classificados em categorias químicas e físicas. As ligações químicas são permanentes, enquanto que as físicas ocorrem através de interações iônicas, ligações de hidrogênio e interações hidrofílicas [43]. Estímulos químicos (pH, composição do solvente, espécies moleculares, etc.) e físicos (temperatura, campo elétrico, magnético, pressão e luz) podem influenciar no intumescimento do hidrogel.



Figura 3 - Estímulos externos que podem influenciar o intumescimento do hidrogel.



O hidrogel é versátil para aplicação em inúmeras áreas, tais como na agricultura [44], liberação controlada de drogas [45], engenharia de tecidos [46] e sensores [47]. Romero *et.al*.

desenvolveram uma válvula inteligente a partir de hidrogel, que controlam a umidade do solo para irrigação de plantas. O hidrogel inchou e desinchou sem se desintegrar em contato com o solo, e esta válvula polimérica foi testada durante quatro meses em uma planta utilizando somente 3 litros de água, o que torna esta peça viável para irrigação controlada [44]. Os hidrogéis podem ser usados também na liberação controlada de medicamentos. Um grupo de pesquisadores desenvolveu nanogéis para liberação controlada de medicamentos a partir de estímulos externos, tais como mudança de pH e temperatura. A liberação do medicamento é acelerada quando os nanogéis passam de um meio neutro para outro ácido em altas temperaturas [45]. A engenharia de tecido também emprega hidrogéis em suas pesquisas, por exemplo, com peptídeos incorporados em fibras de hidrogel sem *cross-linker* que podem ser metabolizadas por células. As fibras de hidrogel funcionalizadas podem ser empregadas em regeneração de ossos, cartilagem, ligamentos, fígado, nervo óptico, entre outras aplicações [46].

Hidrogéis têm sido usados também em sensores. A Figura 4 ilustra o crescente interesse em hidrogéis para sensores em um gráfico de trabalhos publicados ao longo dos últimos 19 anos. Estes sensores podem ser colorimétricos [48], eletroquímicos [49], ópticos [50] e elétricos [51]. Uma parte do trabalho de doutorado envolveu o estudo de sensores com hidrogéis funcionalizados com ácido borônico, tema da próxima seção.

Figura 4 - Gráfico de trabalhos publicados por ano na área de sensores de hidrogéis. *Sensor and hydrogel* foram as palavras chaves utilizadas na pesquisa realizada no site do *Web of Sciense*.



Fonte adaptada do site de pesquisa Web of Sciense.

2.5 – Sensores baseados em hidrogéis funcionalizados com ácido borônico

Os ácidos borônicos são compostos de baixa massa molecular que possuem propriedades eletrônicas e físico-químicas úteis para várias aplicações. Em química orgânica, ácidos borônicos são usados como agentes protetores para o grupo diol e intermediários em reações como as de acoplamento. São utilizados também para inibir atividade enzimática, em carreadores de drogas e sensoriamento de sacarídeos [52]. Sua utilidade em sensores se deve principalmente ao fato de apresentarem base forte de Lewis, como fluoreto ou ânions cianeto e pela interação do grupo borônico com grupo diol de sacarídeos [53]. Servem como alicerces para fabricação de sensores ópticos [50], eletroquímicos [54] e elétricos [51].

A incorporação de ácido fenilborônico (PBA) em matrizes de hidrogel permite produzir sensores para detectar e monitorar o nível de glicose, em virtude da alta afinidade pelo grupo diol de açúcares [47]. A interação de grupos dióis com PBAs induz mudança de volume da matriz de hidrogel permitindo o monitoramento de diferentes concentrações de glicose. A Figura 5 ilustra o esquema de ligação entre grupos do PBA e diol da glicose.

Figura 5 – Equilíbrio de complexação entre grupos do ácido fenilborônico e glicose. Interação da glicose com grupos de PBA resulta no inchamento do hidrogel.



Fonte adaptada [52].

A Figura 6 apresenta o esquema de inchamento da matriz de hidrogel funcionalizado com ácido fenilborônico (PBA), que ocorre quando o hidrogel se liga a grupos diol de monossacarídeos. A mudança no volume do hidrogel serve para o sensoriamento de diferentes concentrações e tipos de açúcares [47,53], podendo ser detectada com métodos ópticos, piezelétricos, eletroquímicos e impedância elétrica [55, 56].

Figura 6 - Esquema de interação do ácido borônico imobilizado em matriz de hidrogel com grupo diol do açúcar; Fotos de discos de hidrogel em tampão e diferentes concentrações de glicose.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.6 – Glúten e Doença Celíaca

O glúten é uma proteína encontrada no trigo, centeio, cevada e aveia. Tem baixo valor nutritivo, sendo consumida pela população por ser responsável pela elasticidade, viscosidade e capacidade de absorver água, o que favorece a fabricação de pães, bolos e massas em geral [57]. É constituído por duas frações protéicas classificadas de acordo com a solubilidade em álcool: a prolamina é solúvel em solução de etanol 60-70% (v/v), enquanto a glutenina é insolúvel [57]. As prolaminas estão presentes no centeio (secalina), cevada (hordeína), aveia (avenina) e trigo (gliadina). A gliadina é subdividida em frações monoméricas α , β , $\gamma \in \omega$ [57]. É resistente à digestão no trato gastrointestinal, pancreático e afeta o lúmen intestinal [58], o que a torna nociva para indivíduos com pré-disposição genética à intolerância ao glúten. Mesmo pessoas que não têm pré-disposição à doença celíaca também sofrem com alguns sintomas de intolerância ao glúten [59].

A doença celíaca é genética e autoimune, afeta cerca de 1% da população mundial [58], sendo definida como intolerância permanente à ingestão de alimentos que contenham glúten. As prolaminas são resistentes à digestão no trato gastrointestinal e causam inflamação crônica no intestino delgado, dificultando a absorção de nutrientes [58]. As manifestações clínicas são

geralmente caracterizadas por má absorção de nutrientes, perda de peso, diarréia, distensão abdominal, anemia, osteoporose, entre outras complicações [2]. O único tratamento até o momento é a dieta sem glúten, ou seja, os pacientes devem confiar nos rótulos dos alimentos comercializados. De acordo com o Codex Alimentarius, o limite de glúten permitido nos produtos alimentícios comercializados como sem glúten deve ser no máximo 20 ppm ou 20 mg/kg em massa seca. Os alimentos naturalmente sem glúten devem ter menos que 20 mg/kg [60].

2.7 - Conceito básico de impedância

O conceito básico de impedância (Z) é a oposição de fluxo de corrente elétrica em um circuito de corrente alternada. Essa oposição à passagem de corrente é representada por um termo real e outro imaginário reflete a capacidade de o circuito armazenar energia elétrica. Matematicamente, a impedância pode ser definida como a razão entre a tensão elétrica alternada (V) e a corrente (I) aplicada no dispositivo.

$$Z(\omega) = \frac{V(t)}{I(t)}$$
(1)

Na equação (1), a frequência angular é definida como $\omega = 2\pi f$, sendo f a frequência do sinal aplicado. A equação (2) indica que a impedância pode ser tratada como uma grandeza complexa por depender da relação da fase e da amplitude de sinais aplicados.

$$Z(\omega) = Z + jZ$$
⁽²⁾

Os símbolos Z' e Z"na equação (2) representam as componentes real e imaginária da impedância; e o operador imaginário j é definido como $j = \sqrt{-1}$. A impedância em um plano complexo está ilustrada na Figura 7, na qual se pode coletar as duas coordenadas cartesianas da impedância representadas nas equações (3) e (4).
Figura 7 - Representação da impedância elétrica como vetor usando coordenadas polares e cartesianas.



Fonte – Figura adaptada do livro Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications [61].

$$Re(Z) \equiv Z' = |Z|\cos\theta \tag{3}$$

$$Im(Z) \equiv Z'' = |Z|sen\theta \tag{4}$$

Nas equações (3) e (4), o ângulo θ e o módulo da impedância podem ser descritos através das equações (5) e (6).

$$\theta = \operatorname{arctg}(Z''/Z') \tag{5}$$

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} \tag{6}$$

A impedância em coordenadas polares é representada matematicamente pela equação (7), equacionada a partir da relação de Euler, $e^{j\theta} = cos\theta + jsen\theta$, e das equações (3) e (4).

$$Z(\omega) = Z' + jZ'' = |Z|(\cos\theta + j\sin\theta) \text{ que implica em } Z(\omega) = |Z|e^{j\theta}$$
(7)

A partir do valor de impedância é possível determinar a capacitância através de cálculos envolvendo equações de admitância (Y), que é o inverso da impedância, e da condutância (G).

$$Y = \frac{1}{Z} = \frac{1}{Z' + jZ''} = \frac{Z' - jZ''}{(Z'^2) + (Z''^2)} = \frac{Z'}{(Z'^2) + (Z''^2)} - j\frac{Z''}{(Z'^2) + (Z''^2)}$$
(8)

$$Y = G + j\omega C \tag{9}$$

Rearranjando as equações (8) e (9), obtemos equações para condutância (10) e capacitância (11):

$$G = \frac{Z'}{(Z'^2) + (Z''^2)}$$
(10)

$$C = -\frac{1}{\omega} \frac{Z''}{(Z'^2) + (Z''^2)} = -\frac{1}{2\pi f} \frac{Z''}{(Z'^2) + (Z''^2)}$$
(11)

2.8 Espectroscopia de impedância elétrica

A espectroscopia de impedância elétrica é utilizada para caracterizar dispositivos eletrônicos, propriedade elétricas de materiais sólidos/líquidos (semicondutor, iônico, dielétrico e etc) e suas interfaces com eletrodos condutores [61]. O protocolo mais comum para medir a impedância real e complexa dos materiais é a aplicação de uma voltagem ou corrente AC na interface ou no material analisado em uma determinada faixa de frequência. Analisadores de impedância comerciais oferecem uma faixa de frequência de 1mHz a 1 MHz para realizar análises de propriedades intrínsecas de materiais que podem influenciar na condutividade entre amostra-eletrodo. Através do espectro de impedância diversos parâmetros podem ser avaliados, tais como condutividade, constante dielétrica, mobilidade de cargas, interface do material com eletrodo, equilíbrio de cargas sobre as interfaces, capacitância da região de interface, difusão de íons sobre o eletrodo. Por essa versatilidade, a espectroscopia de impedância elétrica é também útil para analisar dados obtidos com as unidades sensoriais da língua eletrônica. Para este trabalho de doutorado todas as medidas elétricas foram realizadas através do método de espectroscopia de impedância elétrica.

2.9 - Análises de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA- Principal Component Analysis) é uma técnica de análise multivariada, cujo objetivo é eliminar sobreposição e reduzir um grande número de dados em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas, sem perder muita informação dos dados originais [62]. A técnica PCA reduz o espaço de variáveis, gerando eixos ortogonais que são combinações lineares das variáveis originais, denominadas componentes principais (PC). As componentes principais são obtidas em ordem decrescente de variância [14,62]. Portanto, PC1 agrega mais informação sobre os dados do que a PC2 e assim sucessivamente, e as componentes principais não se correlacionam. A redução do número total de variáveis é possível porque geralmente as primeiras componentes principais (PC1 e PC2) possuem mais de 90% de informação estatística dos dados originais. Os resultados ou unidades amostrais são arranjados em gráficos que podem ser bidimensionais ou

tridimensionais, onde seus eixos ortogonais são as componentes principais.

2.10 – Método de visualização de informações

Os dados obtidos com uma língua eletrônica podem ser analisados com outros métodos de visualização de informações. O *software* PEx-Sensors desenvolvido por Paulovich *et.al.*[15] permite visualizar os dados de espectroscopia de impedância de diversas amostras em diferentes unidades sensoriais em uma única etapa. Para tanto, empregam-se técnicas não lineares como *Sammon's Mapping* ou *Interactive Document Map* (IDMAP). Isto permite um estudo aprofundado da sensibilidade das unidades sensoriais e de suas respectivas respostas a estímulos externos, como interação de moléculas na superfície dos eletrodos modificados. Esta técnica se assemelha à técnica PCA, pois também emprega a redução de dimensões, o que gera uma maior precisão de classificação das amostras. A técnica de projeção multidimensional aborda a redução de dimensionalidade preservando as relações de distância Eucleudiana.

Formalmente, pode-se descrever uma técnica de projeção com um exemplo genérico. Seja um conjunto de dados X, contendo n amostras, representado por $X = [x_1, x_2, ..., x_n]$ com $\delta(x_i, x_j)$ sendo a função de dissimilaridade entre duas amostras, que geram a distância entre as amostras no espaço X. A análise de dados gerados pela língua eletrônica é analisada através da distância Euclidiana. Considera-se $Y = [y_1, y_2, ..., y_n]$ para o mapeamento de X em um gráfico de duas ou três dimensões, em que a distância entre elementos do conjunto Y pode ser definida como $d(y_i, y_j)$. A projeção é feita com uma função $f : X \rightarrow Y$, onde f é denominada função erro, com o objetivo de minimizar o erro das diferenças $|\delta(x_i, x_j) - d(y_i, y_j)| \forall xi, xj \in X$, porque a projeção inevitavelmente gera perda de informação.

A técnica de visualização *Sammon's Mapping (SM)* emprega a função erro *S* definida na equação 12.

$$S_{SM} = \frac{1}{\sum_{i < j} \delta(xi, xj)} \sum \frac{(d(yi, yj) - \delta(xi, xj))^2}{\delta(xi, xj)}$$
(12)

A técnica IDMAP reduz a dimensão recursivamente projetando pontos de alta dimensionalidade em direções ortogonais reduzidas entre si, utilizando a técnica *Fastmap*. A combinação da técnica *Fastmap* com o conceito de forças de atração e repulsão (*Force Scheme*) melhora a disposição inicial dos pontos. Considera-se Y um conjunto de amostras já

posicionadas no plano e para cada amostra projetada $(y_i \in Y)$ um vetor, $[\overrightarrow{v_{ij}} = (y_j - y_i), \forall y_i \neq y_j]$, é calculado. A quantidade de movimento da componente yi na direção de \overrightarrow{vij} é calculada através da equação 13, onde ômin e ômax são as distâncias mínimas e máximas entre as amostras.

$$S_{IDMAP} = \frac{\delta(x_i, x_j) - \delta_{min}}{\delta_{max} - \delta_{min}} - d(y_i, y_j)$$
(13)

A colocação mais precisa dos pontos nas projeções, respeitando a distância em relação ao espaço inicial, pode ser obtida com a aplicação sucessiva deste processo em todas as amostras analisadas, resultado da diferença $|\delta(xi,xj) - d(f(xi,xj))| \forall xi,xj \in X$. Dados gerados de sensores e biossensores podem ser analisados com estas técnicas de visualização de informação. Capítulo 3 – Integração de uma "língua eletrônica" em dispositivos microfluídicos para análise de líquidos complexos e detecção de gliadina em alimentos.

RESUMO

O trabalho neste capítulo visa à integração de uma "língua eletrônica" em dispositivos microfluídicos para análise de diferentes tipos de líquidos. Os filmes finos utilizados em cada unidade sensorial foram depositados nos microcanais usando-se a técnica de automontagem (laver-by-laver, LbL) dinâmica, com bicamadas de ftalocianina tetrassulfonada de cobre poli(cloridrato (CuTsPc) e de alilamina) (PAH), bicamadas de poli(3,4etilenodioxitiofeno):poli(estireno sulfonado) (PEDOT:PSS) e PAH, e bicamadas de polipirrol (PPy) e PAH. A adsorção de filme LbL no substrato de ouro, assim como a adsorção de gliadina no filme, foi verificada por espectroscopia no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS), enquanto a distribuição do filme ao longo dos dígitos dos eletrodos de ouro foi observada por microscopia de força atômica (AFM) e espectroscopia Raman. A espectroscopia no UV-VIS foi utilizada para verificar a presença de gliadina nas soluções padrões e amostras de alimentos diluídos em etanol 70% (v/v), para que pudessem posteriormente ser analisadas através da espectroscopia de impedância. Os espectros de UV-VIS foram analisados com o software PEx-Sensors, com clara distinção dos grupos de amostras sem gliadina, contendo e contaminados com gliadina. Usando análise de componentes principais (PCA) para medidas de impedância obtidas nos dispositivos microfluídicos com filmes nanoestruturados, foi possível distinguir diversos tipos de líquidos. Por exemplo, foram separados sabores básicos representados por soluções de 1mM de NaCl, sacarose, HCl, cafeína anidra, glutamato monossódico, da água ultrapura. Distinguiram-se diferentes tipos de café (tradicional, orgânico, gourmet e premium). De relevância para monitoramento de alimentos, com o dispositivo distinguiram-se diferentes concentrações de soluções de gliadina, e foi possível separar amostras de alimentos com e sem glúten e alimentos sem glúten contaminados com gliadina.

Palavras chaves: automontagem (*layer-by-layer*), PM-IRRAS, AFM, língua eletrônica, PCA e gliadina.

3.1 - INTRODUÇÃO

O trabalho neste capítulo está relacionado à microfluídica, com a deposição de filmes nanoestruturados sobre eletrodos interdigitados no interior de microcanais fabricados em uma matriz de polidimetilsiloxano (PDMS). O objetivo é integrar uma "língua eletrônica" em dispositivos "lab-on-a-chip" (LOC) para análises de líquidos complexos, tais como soluções de gliadina, alimentos, diferentes tipos de café e a análise clássica da língua eletrônica que consiste em diferenciar sabores básicos (doce, salgado, amargo, azedo e umami). A "língua eletrônica" é formada por um conjunto de sensores para análise de sistemas líquidos, como vinhos, café, suco de frutas, cerveja, vestígios de impurezas ou poluentes em águas [7,63-66], além do emprego na indústria de alimentos e farmacêutica [67,68]. Sua integração com dispositivos microfluídicos é promissora por permitir uso de muito menos reagentes e amostras, com volumes de nano a picolitros, uma vez que pelo menos uma das dimensões dos canais é da ordem de 10⁻⁶ m [17]. A aplicação da microfluídica em dispositivos LOC pode ser útil para as áreas médica, biológica, ambiental, farmacêutica, alimentícia e até na eletrônica [18,29,69-71], estando na fronteira dos desenvolvimentos de nanociência e nanotecnologia. Estes dispositivos oferecem vantagens de poder separar e detectar analitos com alta resolução, sensibilidade, diminuição no tempo de análise e baixo custo [17].

A "língua eletrônica" microfluídica [23] possui eletrodos recobertos com filmes nanoestruturados depositados através da técnica LbL dinâmica [72]. A escolha da técnica LbL foi baseada na possibilidade de controlar a arquitetura dos filmes pela sequência de deposição [36]. Podem-se depositar polieletrólitos em dispositivos nanofluídicos [73], além de facilitar o processo de selagem nos dispositivos. Todo estudo de deposição de filmes nanoestruturados no interior do microcanal foi realizado no mestrado [23]. Algumas análises complementares foram realizadas neste trabalho, por exemplo, a utilização de MEV para verificar a presença de filme sobre os eletrodos interdigitados. A microscopia de força atômica (AFM) foi usada para obter o perfil de distribuição de material ao longo do filme sobre os eletrodos. Análises com Raman foram realizadas para confirmar a deposição de mais material na região de borda do microcanal em relação à região central do canal. A espectroscopia de PM-IRRAS confirmou a adsorção de filmes de PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS e PAH/PPy. Foi possível também verificar que a gliadina adsorve sobre o filme e que não é removida após a lavagem com etanol 70 % (v/v).

Usando análise de componentes principais (PCA), foi possível distinguir diferentes soluções de 1mM de NaCl, sacarose, HCl, cafeína anidra, glutamato monossódico e água

ultrapura medidas nos dispositivos microfluídicos com filmes nanoestruturados [23]. Com os dispositivos microfluídicos conseguimos também analisar diferentes tipos de café (gourmet, tradicional, Premium e orgânico [74], diferentes concentrações de soluções padrões de gliadina e amostras com e sem glúten, e alimentos sem glúten contaminados com gliadina. Neste trabalho, focamos nas análises de soluções padrões de gliadina e na análise de alimentos com e sem glúten. Os dados de análises de soluções padrões de gliadina e de alimentos com ou sem glúten foram analisados também através da técnica de visualização de informação (*software* PEx-Sensors). Aspiramos futuramente desenvolver um dispositivo microfluídico que auxilie os portadores de doença celíaca a identificar glúten nos alimentos por eles ingeridos.

3.2 - Materiais e Métodos

A PAH, CuTsPc, PEDOT:PSS, PPy e gliadina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. NaCl, C₁₂H₂₂O₁₁, HCl, C₈H₁₀N₄O₂ (anidra) e C₅H₈NNaO₄.xH₂O para preparar soluções de 1mM foram adquiridos da Vetec, Quemis, Synth e Sigma-Aldrich, respectivamente. Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura de um sistema Direct-Q5 Millipore, com exceção da gliadina e alimentos que são preparados em etanol 70 % (v/v). Os alimentos com glúten (cerveja, torrada, bolacha salgada e mix de cereal) e sem glúten (leite em pó, saquê e mistura para "papinha" de bebê a base de amido de milho) foram adquiridos em um supermercado de São Carlos. Os cafés foram adquiridos em supermercados de Campinas (Pilão, Três Corações, Astro, Taeq, Chini e Demeter). Os filmes de PAH/CuTsPc foram obtidos de soluções aquosas de PAH e CuTsPc nas concentrações de 0,5 mg.mL⁻¹ a um pH = 8 [75]. Os filmes de PAH/PEDOT:PSS foram produzidos com soluções aquosas de PAH e PEDOT:PSS nas concentrações de 3 mg.mL⁻¹ e 0,1 mg.mL⁻¹, respectivamente, em pH = 3,5 [76]. Para o filme de PAH/PPy a concentração de PAH foi de 0,5 mg.mL⁻¹ e de PPy foi 1,12 mg.mL⁻¹, ambos preparados com solução de NaCl de 0,5 M [77], sem correção de pH. Os filmes LbL foram depositados no interior do microcanal de PDMS em condição de fluxo com vazão de 10³ µL/h. Os polieletrólitos foram injetados alternadamente no microcanal usando microsseringas Hamilton alocadas em uma bomba de seringa da marca New Era pump systems, conforme indica o esquema da Figura 8.



Figura 8 - Os filmes são depositados por LbL dinâmico através da injeção de polieletrólitos no microcanal.

Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

Com um bisturi, o microcanal em PDMS foi removido da superfície do dispositivo e uma análise da superfície do eletrodo interdigitado foi feita com microscopia eletrônica de varredura (MEV), modelo JEOL 6510, para verificar a presença de filmes finos. A distribuição de material na superfície do eletrodo foi estudada com microscopia de força atômica (AFM), modelo Dimension V (Veeco), utilizando pontas de silício em um microcantilever de constante de mola 5,6 N.m⁻¹ e frequência de ressonância de 180 kHz. As imagens foram geradas em modo de contato intermitente (tappingTM) com frequência de varredura de 0,5 Hz. O Micro Raman Xplora Horiba, com laser de 638 nm, objetiva de x100, grade de 1800 gr/mm e filtro de 100%, foi utilizado para confirmar a maior deposição de filmes nas bordas dos microcanais. A espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS), modelo PMI 550, foi usada para confirmar a adsorção dos filmes. Para obter espectros de cada filme, foi utilizado um modelo composto por um detector de HgCdTe, modelo PCI-3TE-10.6, uma lâmpada de carbeto de silício e um modulador fotoelástico de cristal de ZnSe.

As soluções padrões de gliadina e os alimentos foram preparados com etanol 70% (v/v) e misturas em um Vortex por cerca de 10 min. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e centrifugado na centrífuga, modelo Hanil – Continent R, por 20 min em 5000 rpm. As soluções de gliadina e as soluções de alimentos foram analisadas no

espectrofotômetro UV-VIS, UV-160 1PC-Shimadzu, em um comprimento de onda de 280 nm.

Para o arranjo de sensores da língua eletrônica foram usados chips com filmes de PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS, PAH/PPy e outro sem filme. As amostras foram analisadas por espectroscopia de impedância variando a frequência de 1Hz a 1MHz, com tensão alternada de 20 mV. Foram analisadas soluções aquosas de 1mM de NaCl, sacarose, cafeína anidra, glutamato monossódico e HCl, além de água ultrapura. Foram analisados também diferentes tipos de café (tradicional, orgânico, gourmet e premium) e soluções com diferentes concentrações de gliadina (0,005 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 227 ppm, 570 ppm, 770 ppm, 950 ppm e 1310 ppm) dissolvidas em etanol 70% (v/v). Os valores de capacitância usados posteriormente na análise com PCA foram extraídos da região intermediária da faixa de frequência (1 kHz). A técnica PCA foi empregada com o *software Statistica 12*. Análises de soluções de gliadina e de alimentos com e sem glúten foram feitas também com a técnica de visualização de informação através do software *PEx-Sensors*.

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As imagens de MEV foram realizadas utilizando 10 kV e aumento de 100 x e confirmam a deposição de filmes ao longo da região do microcanal e sobre os eletrodos interdigitados de ouro, como ilustrado na Figura 9 para filmes de PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS e PAH/PPY. O tracejado delimita a região com filmes finos depositados (regiões ligeiramente mais escuras nas imagens). Os filmes parecem homogêneos, mas imagens de superfície de AFM indicam maior acúmulo de material na borda do filme.

Figura 9 - Imagens de MEV de filmes finos depositados através da técnica LbL dinâmico: (a) PAH/CuTsPc, (b) PAH/PPy e (c) PAH/PEDOT:PSS.



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

A Figura 10 ilustra imagens de AFM em que a espessura da borda (170-180 nm) é significativamente maior do que no centro (12 nm) do filme de 5 bicamadas de PAH/CuTsPc.

Figura 10 - Imagens de AFM em diferentes regiões do filme de 5 bicamadas de PAH/CuTsPc, mostrando: (a) Espessura de 170 a 180 nm da região da borda do filme e (b) espessura de 12 nm da região central do filme.



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

As imagens de AFM na Figura 11 indicam que para o filme de 5 bicamadas de PAH/PEDOT:PSS a espessura da borda é 170-180 nm, ao passo que no centro do filme é de 96 nm.



Figura 11 - Imagens de AFM para filme de 5 bicamadas de PAH/PEDOT:PSS: (a) Espessura de 170 a 180 nm da região da borda do filme e (b) espessura de 96 nm da região central do filme.

Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

Assim como nos outros filmes, a espessura do filme de 5 bicamadas de PAH/PPy foi de 170 - 180 nm na borda, como mostra a Figura 12. Já no centro a espessura foi de 48 nm.

Figura 12 - Imagens de AFM para filme de 5 bicamadas de PAH/PPy. (a) Espessura de 170 a 180 nm da região da borda do filme e (b) espessura de 48 nm da região central do filme.



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

A espessura no centro do filme de PAH/CuTsPc (12 nm) é menor que para os filmes de PAH/PEDOT:PSS (96 nm) e PAH/PPy (48 nm), provavelmente porque o CuTsPc é uma pequena molécula orgânica e não um polímero. Uma busca da literatura foi realizada para

tentar comparar com filmes similares, mas nada foi encontrado sobre o método que empregamos (verificação de espessura riscando o filme e analisando por AFM). Podemos verificar que filmes de ftalocianina depositados em fluxo são bem mais finos (12 nm) que os filmes depositados, por exemplo, por método *cast* (500 nm) [79]. A deposição de filme em fluxo gera filmes mais finos e homogêneos. A maior deposição de material na borda dos filmes era esperada devido ao perfil de velocidade dos líquidos dentro de um canal, pois a velocidade é maior no centro do fluxo. A Figura 13 ilustra o perfil de velocidade do líquido num duto, em que a velocidade é maior no núcleo de escoamento, enquanto nas paredes do canal a velocidade é menor devido à viscosidade do líquido e atrito com as paredes.

Figura 13 - Perfil de velocidade .



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

O maior acúmulo de material nas bordas do microcanal foi confirmado através de medidas de espalhamento Raman. Foi observada maior intensidade dos espectros Raman nas bordas, o que corrobora os resultados de AFM. A Figura 14 apresenta o espectro da região de borda do microcanal com filme de CuTsPc/PAH com seus picos característicos, listados na Tabela 1.

Figura 14 - Espectro Raman da região de borda do microcanal com filme de CuTsPc/PAH.



Fonte: Elaborado pela autora.

Atribuições	Número de onda (cm ⁻¹)
Estiramento no anel; vibração do macrociclo; C-H <i>wag</i> .	746
Estiramento isoindol; respiração benzeno.	956
Estiramento (SO ₃) ⁻² ; Deformação angular C-H.	1212
Estiramento isoindol e pirrol.	1338
C=N estiramento do anel pirrólico.	1528

Tabela 1 - Atribuições de bandas do espectro Raman da CuTsPc [75,80].

A Figura 15 apresenta os espectros do filme de PAH/PEDOT:PSS depositado na região de borda do microcanal, com as atribuições das bandas mostradas na Tabela 2.





Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 - Atribuições de bandas do espectro Raman do PEDOT [81,82].

Atribuições	Número de onda (cm ⁻¹)
Deformação do anel de oxietileno	991
Estiramento Cβ – Cβ	1368
Estiramento simétrico $C\alpha = C\beta$ (-o)	1421
Estiramento $C\alpha = C\beta$	1532

Filmes de PAH/PPy depositados na borda do canal também foram analisados com espectroscopia Raman, apresentando um espectro com as bandas esperadas. A Figura 16 apresenta o espectro, com atribuições das bandas listadas na Tabela 3



Figura 16 - Espectro Raman da região de borda do microcanal com filme de PAH/PPy.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3 - Atribuições de bandas do espectro Raman do PPy [83,84].

Atribuições	Número de onda (cm ⁻¹)
Deformação do anel associado ao	929
bipolaron.	
Vibrações de deformação do anel	982
Simétrico C-H em plano de flexão.	1046
Estiramento da estrutura C=C do	1581
estado de redução.	

Após confirmar a presença de filmes PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS e PAH/PPy sobre os IDES, foram utilizados 4 sensores em análises de diferentes líquidos. Assim como a língua humana, o dispositivo conseguiu distinguir diferentes tipos de sabores (doce, salgado, azedo, umami e amargo) em soluções de 1mM (abaixo do limiar humano para paladares que é de 10 mM) de sacarose, NaCl, HCl, $C_5H_8NNaO_4.xH_2O$ e cafeína [23], como ilustra o gráfico PCA da Figura 17.



Figura 17 - PCA de soluções de 1mM de NaCl (salgado), $C_{12}H_{22}O_{11}$ (doce), HCl (azedo), $C_8H_{10}N_4O_2$ (anidra) (amargo) e $C_5H_8NNaO_4.xH_2O$ (umami) [23].

Fonte – Adaptado do Daikuzono et.al., 2015 [23].

Foi possível também distinguir, com medidas de impedância, diferentes tipos de café [74]. No gráfico de PCA da Figura 18, observa-se a distinção do café tradicional, orgânico, gourmet e Premium. Os cafés com grãos selecionados (100% arábicos) ficaram bem próximos entre si (cafés da marca Astro, Taeq, Chini e Demeter), em que os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 representam os cafés Pilão (tradicional), Três Corações (tradicional), Astro (orgânico), Taeq (orgânico), Chini (gourmet), Demeter (gourmet) e Três Corações (Premium) respectivamente, organizados na Tabela 4. Cafés *gourmet* possuem grãos mais selecionados e de alta qualidade, o que os diferencia dos tradicionais. Do gráfico de PCA é possível ver a clara distinção dos grupos de café tradicionais e premium dos demais grupos de café *gourmet*.

Amostra	Marca	Classificação
1	Pilão	Tradicional
2	3 corações	Tradicional
3	Astro	Orgânico
4	Taeq	Orgânico
5	Chini	Gourmet
6	Demeter	Gourmet
7	3 corações	Premium

Tabela 4 - Amostras de café analisadas com a língua eletrônica microfluídica.

Figura 18 - PCA dos diferentes tipos de café.



Fonte - Adaptado Alessio et.al. 2016 [74].

A língua eletrônica microfluídica foi usada também para analisar soluções de gliadina e amostras reais contendo ou não glúten em sua composição. O objetivo é produzir no futuro um dispositivo que auxilie celíacos a identificar a presença de glúten em alimentos. Para análises de soluções contendo gliadina, inicialmente empregou-se espectroscopia no UV-VIS para tentar distinguir as diferentes amostras. As soluções padrão apresentaram a banda característica da gliadina (280 nm), como mostra a Figura 19. Figura 19 - Espectros UV-vis de diferentes concentrações de gliadina (1309, 941, 776, 576, 227 e 50 ppm) com banda característica em 280 nm.



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

Os espectros para as amostras de alimentos com glúten (cerveja, torrada, mix de cerais/Neston e bolacha salgada), sem glúten (saquê, leite em pó/ Molico-Ninho e preparo de papinha de bebê a base de amido de milho/cremogema) e amostras sem glúten contaminadas com gliadina são obviamente mais variados. Para estes empregamos uma técnica de projeção multidimensional, IDMAP, implementada na ferramenta PEx-Sensors [16,85]. Embora seja semelhante à PCA, que também reduz dimensionalidade, a técnica IDMAP se distingue por permitir otimização da visualização dos dados, maximizando a capacidade de distinguir amostras. A Figura 20 mostra o gráfico de IDMAP, com clara distinção dos grupos alimentares com, sem e contaminados com a gliadina.

Figura 20 - Distinção dos grupos alimentares com, sem e contaminados com gliadina através da análise com o *software* PEx–Sensors dos resultados de espectroscopia no UV-vis.



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

Empregando o conceito de língua eletrônica, foram utilizadas 3 unidades sensoriais com filmes de PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS, PAH/PPy e 1 eletrodo sem filme para obter os dados de capacitância (magnitude) em 1kHz, para essas amostras padrão e de alimentos que foram tratados posteriormente com PCA (*software Statistica 12*) e PEx-Sensors. A Figura 21 (A) mostra curvas de capacitância vs frequência e a Figura 21 (B) gráfico de capacitância vs concentração de gliadina analisado em uma frequência de 1kHz de diferentes concentrações de amostra padrão de gliadina medidas no sensor sem filme.

Figura 21 – (A) Medidas de magnitude da capacitância da solução padrão com diferentes concentrações de gliadina para o sensor sem filme e (B) diferentes concentrações de gliadina monitoradas através de valores de capacitância em 1kHz.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota-se na Figura 21 (A) que ao injetar gliadina há um decréscimo na capacitância em comparação com o valor de capacitância da solução de etanol 70%. Provavelmente isto se deve à presença de proteína sobre o eletrodo, que aumenta a resistência à passagem de corrente elétrica. Porém, através da Figura 21 (B), notamos que após o primeiro contato do eletrodo com a proteína e de sua estabilização, o aumento da concentração de gliadina na solução gera aumento na capacitância. Isto ocorre porque as medidas foram feitas em fluxo $(10^3 \mu L)$ o que permite uma maior mobilidade de íons sobre o eletrodo. Entretanto o aumento de concentração de gliadina sobre o eletrodo, especialmente após 30 ppm, tende a uma estabilização do valor de capacitância. Provavelmente este fato decorre de um maior acúmulo de material sobre o eletrodo reduzindo a condução de corrente elétrica. Este comportamento se repete para as análises em eletrodos com filmes de PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS e PAH/PPy, os quais podem ser visualizados nas Figuras subsequentes. Além disso, nas Figuras subsequentes assim como na anterior, observa-se um forte ruído na região de altas frequências, fato ocasionado por mal contado do conector com a entrada do Solartron.

As Figuras 22 (A) e 22 (B) ilustram os gráficos de capacitância vs frequência e capacitância vs concentração de gliadina de soluções padrões no sensor com 5 bicamadas de filme de PAH/CuTsPc. Notamos novamente uma tendência de estabilização do valor de capacitância após a concentração de 30 ppm.

Figura 22 - (A) Medidas de magnitude da capacitância da solução padrão com diferentes concentrações de gliadina para o sensor com 5 bicamadas de filme de PAH/CuTsPc e (B) diferentes concentrações de gliadina monitoradas através de valores de capacitância em 1kHz.



Fonte - Elaborada pela autora.

As Figuras 23 (A) e 23 (B) ilustram os gráficos de capacitância vs frequência e capacitância vs concentração de gliadina de soluções padrões no sensor com 5 bicamadas de filme de PAH/PEDOT:PSS.

Figura 23 - (A) Medidas de magnitude da capacitância da solução padrão com diferentes concentrações de gliadina para o sensor com 5 bicamadas de filme de PAH/PEDOT:PSS e (B) diferentes concentrações de gliadina monitoradas através de valores de capacitância em 1kHz.



Fonte: Elaborado pela autora.

As Figuras 24 (A) e 24 (B) ilustram os gráficos de capacitância vs frequência e capacitância vs concentração de gliadina de soluções padrões no sensor com 5 bicamadas de filme de PAH/PPy.

Figura 24 - (A) Medidas de magnitude da capacitância da solução padrão com diferentes concentrações de gliadina para o sensor com 5 bicamadas de filme de PAH/PPy e (B) diferentes concentrações de gliadina monitoradas através de valores de capacitância em 1kHz.



Fonte: Elaborado pela autora.

Não foi possível ver clara distinção das diferentes concentrações de gliadina nos espectros obtidos do gráfico de capacitância *vs* frequência. Então recorremos a técnicas de IDMAP e PCA para obter melhor visualização dos dados utilizando o PEx-sensor e o *software Statistica 12*. A Figura 25 mostra a análise com a técnica IDMAP para amostras com concentrações entre 0 a 200 ppm, na qual observou-se clara distinção das diferentes concentrações de gliadina em solução.

Figura 25 - IDMAP plot para diferentes concentrações de gliadina em solução analisadas em uma faixa de frequência de 1 Hz a 1 kHz.



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

Análises em triplicata das amostras também foram feitas através da técnica de PCA. As medidas em triplicata foram realizadas em 3 línguas eletrônicas utilizando o conjunto de 4 unidades sensoriais formada por um sensor sem filme, PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS e PAH/PPy. O gráfico da Figura 26 mostra os resultados para as amostras padrão, em que se nota ser possível detectar uma baixa quantidade de gliadina (0,005 ppm). Ainda mais relevante é a clara separação entre amostras com menos de 20 ppm das demais. O valor de 20 ppm é importante porque é o limite, de acordo com a Codex Alimentarius [60], para considerar alimentos sem glúten nos rótulos de embalagens. Para facilitar a análise, foram colocados na Figura 26 B os dados para as altas concentrações de gliadina, que também podem ser distinguidas entre si.



Figura 26 - PCAs de soluções padrões de gliadina com diferentes concentrações.

Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

O próximo passo foi analisar as amostras de alimentos com e sem glúten através de medidas de impedância, sendo as curvas de capacitância vs frequência mostradas nas Figuras 27 (A), 27 (B), 27 (C) e 27 (D) para 4 sensores (sem filme, PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS e PAH/PPy, respectivamente). Observa-se que cada unidade sensorial respondeu de maneira diferente ao mesmo conjunto de amostras, o que é adequado para análises com língua eletrônica. Como as amostras formam um conjunto complexo para análise, o número de unidades sensoriais respondendo de maneira diferente auxilia na distinção do conjunto de dados.



Figura 27 - Medidas elétricas de alimentos com glúten em 4 diferentes sensores. (A) sem filme, (B) PAH/CuTsPc, (C) PAH/PEDOT:PSS e (D) PAH/PPy.

Fonte: Elaborado pela autora.

As Figuras 28 (A), 28 (B), 28 (C) e 28 (D) mostram curvas de capacitância vs frequência das amostras sem glúten (cremogema, leite em pó Molico, leite em pó Ninho e saquê), medidos em 4 sensores (sem filme, PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS e PAH/PPy, respectivamente). Novamente, as unidades responderam de maneira diferente para o mesmo conjunto de amostras, facilitando as análises de dados por PCA ou método de visualização de informação.

Figura 28 - Análise de alimentos sem glúten através da curva de capacitância vs frequência em 4 sensores. (A) sem filme, (B) PAH/CuTsPc, (C) PAH/PEDOT:PSS e (D) PAH/PPy.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após as análises de amostras sem glúten, as amostras foram contaminadas com 200 ppm de gliadina e analisadas por medidas de impedância, cujas curvas de capacitância estão nas Figuras 29 (A), 29 (B), 29 (C) e 29 (D) para sensores sem filme, com filme de PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS e PAH/PPy, respectivamente.

Figura 29 - Medidas de amostras que foram contaminadas com 200 ppm de gliadina e analisadas nos sensores sem filme, com filme de PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS e PAH/PPy respectivamente. (A) sem filme, (B) PAH/CuTsPc, (C) PAH/PEDOT:PSS e (D) PAH/PPy.



Fonte: Elaborado pela autora.

A distinção das amostras sem gliadina e contaminadas com gliadina não pode ser conclusiva através dos gráficos de capacitância *vs* frequência. Houve, assim, a necessidade de recorrer à técnica de PCA para visualização dos dados. Para as amostras de alimentos, a Figura 30 ilustra gráficos de PCA obtidos com capacitâncias a 1 kHz. Há clara distinção na Figura 30 (A) de grupos de alimentos com glúten (cerveja, torrada, bolacha salgada e mix de cereal/Neston) e sem glúten (saquê, amido de milho/cremogema, leite em pó/Ninho e leite em pó/Molico). A contaminação deliberada de alimentos sem glúten com 200 ppm de gliadina é facilmente perceptível na Figura 30 (B).



Figura 30 - (A) PCA de amostras de alimentos com e sem glúten; (B) PCA de amostras sem glúten e de amostras sem glúten contaminadas com gliadina.

Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

Os alimentos com, sem e contaminados com gliadina foram analisados também por espectros de UV-vis, cujos dados foram processados coma técnica IDMAP. A espectroscopia de UV-vis foi empregada somente para o monitoramento de solução de alimentos com, sem e contaminados com gliadina para corroborar os resultados obtidos pelo sensor. A Figura 31 ilustra a análise de amostras com, sem e contaminadas com gliadinas, em que se observa clara distinção destes grupos. Apesar de a técnica de UV-vis em conjunto com análises IDMAP terem apresentados bons resultados, a técnica de espectroscopia UV-vis é mais cara e requer uma pessoa com conhecimento prévio para realizar a preparação de amostra, análise de dados e operação do equipamento. Além disso, a comunidade científica que trabalha com análises de glúten não considera espectroscopia Uv-vis como técnica prioritária para análise de alimentos com glúten. Geralmente empregam técnicas mais precisas e caras, tais como HPLC (do inglês *High performance liquid chromatography*) e ELISA (do inglês *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) [86,87].



Figura 31 - Gráfico IDMAP dos espectros de UV-vis das amostras de alimentos com, sem e contaminados com gliadina.

Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

O uso de técnicas como espectroscopia no UV-VIS e espectroscopia de impedância permite distinguir amostras similares, mas não fornece informações sobre os mecanismos de detecção. Para as amostras de alimento, em particular, interessa determinar se a gliadina adsorve nas unidades sensoriais, e se isso ocorre verificar se um processo de lavagem do sensor é suficiente para dessorvê-la. Para responder a essas questões, empregamos a técnica de PM-IRRAS, que também serviu para comprovar a adsorção dos filmes que compõem as unidades sensoriais sobre a superfície de ouro. Nos experimentos relatados a seguir, filmes de PAH/CuTsPc, PAH/PEDOT:PSS e PAH/PPy foram imersos em solução de gliadina (200 ppm) por cerca de 20 minutos e foram secos com nitrogênio, analisados e lavados (10 minutos com etanol 70 %).

A Figura 32 ilustra o espectro de um filme de 5 bicamadas de PAH/CuTsPc, com bandas características da CuTsPc. A atribuição de bandas é a seguinte: 800 cm⁻¹, 900 cm⁻¹ (C-H, deformação fora do plano), 1100 cm⁻¹ (vibração C-H no plano) [88], 1034 cm⁻¹ (SO₃ estiramento simétrico) [89], 1467 cm⁻¹ e 1564 cm⁻¹ (estiramento C-N) [88].

Figura 32 - Espectro PM-IRRAS de filme com 5 bicamadas de PAH/CuTsPc depositado sobre lâmina de vidro recoberto com ouro.



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

As Figuras 33 (A) e 33 (B) mostram espectros PM-IRRAS do filme com gliadina e após a lavagem do filme com etanol 70 %. As bandas atribuídas à gliadina no filme são: 1547 (Amida I), 1600-1609 (NH₂⁺), 1606-1611 (NH₂⁺), 1617-1623 (β -folha), 1627-1632 (β -folha), 1636-1643 (*random coil*), 1647-1655 (α -hélice), 1668-1671 (β -turn) e 1692-1693 (β -folha) [90-92]. Como as bandas de gliadina permanecem no espectro, mesmo após a lavagem, uma unidade sensorial com filme LbL deverá ser descartável.

Figura 33 - (A) espectro de 5 bicamadas de filme CuTsPc + gliadina; (B) espectro do filme CuTsPc + gliadina pós-lavagem.



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

A Figura 34 mostra o espectro para 5 bicamadas de PAH/PEDOT:PSS sobre uma lâmina de ouro. As bandas características do filme PAH/PEDOT:PSS estão em 830 cm⁻¹ (C-S ligação dentro do anel de tiofeno), (-SO₃ vibrações de estiramento simétricos), 1005 cm⁻¹, 1057 cm⁻¹ (C-O-C estiramento da ligação no grupo etilenodioxi do monômero PEDOT), 1320 cm⁻¹ e 1520 cm⁻¹ (C-C ou C = C modos de estiramento de anel de tiofeno), 1410 cm⁻¹ (C = C vibrações de estiramento no anel aromático) e 1394 e 1454 cm¹ (C = C e C-C estiramento do anel tiofeno) [93-96].

Figura 34 - Espectro de filme com 5 bicamadas de PAH/PEDOT:PSS.



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

As Figuras 35 (A) e 35 (B) ilustram espectros de 5 bicamadas de PAH/PEDOT:PSS + gliadina e PAH/PEDOTSS + gliadina pós-lavagem, respectivamente. Novamente observamos que a gliadina não é removida do filme.



Figura 35 - (A) 5 bicamadas de PAH/PEDOT:PSS + gliadina; (B) filme PAH/PEDOT:PSS + gliadina pós lavagem.

Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

A deposição de um filme de PAH/PPy de 5 bicamadas foi confirmada com o espectro da Figura 36, cujas bandas características são: 1250 e 1400 cm⁻¹ (C-H ou C-N modo de deformação do plano de PPY), 1300 cm⁻¹ (C-N vibração de estiramento), 1462 - 1442 cm⁻¹ (deformação do anel para vibrações simétricas), 1540 cm⁻¹ (C = C, vibração de estiramento do anel) [97-101].

Figura 36 - Espectro PM-IRRAS para filme LbL com 5 bicamadas de PAH/PPy



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

Também para o filme de PAH/PPy observa-se adsorção de gliadina, com suas bandas características mostradas nas Figuras 37 (A) e 37 (B), antes e após a lavagem, respectivamente. Como para os outros filmes, a adsorção da gliadina é irreversível e, portanto, as unidades sensoriais terão que ser descartáveis.

Figura 37 - Espectro PM-IRRAS para (A) 5 bicamadas de PAH/PPy + gliadina; (B) PAH/PPy + gliadina.



Fonte: Adaptada de Daikuzono et.al. [78].

3.4 - CONCLUSÃO

Conclui-se que os filmes estão sendo depositados sobre os eletrodos de ouro e que a distribuição de material se concentra mais nas bordas, como era de se esperar devido ao perfil de velocidade do líquido no interior do microcanal. Além disso, com medidas de PM-IRRAS, verificou-se que o filme não é removido com a passagem de solução de etanol 70% (v/v). Esta informação é importante para o desenvolvimento de sensores de glúten, em que as soluções de amostras reais são preparadas em etanol 70% (v/v). Observamos que a gliadina adsorve ao filme, não sendo removida após lavagem. Assim, as unidades sensoriais terão que ser descartáveis, como ocorre na maioria dos biossensores. A língua eletrônica microfluídica se mostrou eficiente na diferenciação de sabores, diferentes tipos de café, diferentes concentrações de gliadina em solução padrão e atingiu o objetivo central do trabalho que é conseguir distinguir alimentos com e sem glúten.

Capítulo 4 – Detecção de monossacarídeos através de espectroscopia de impedância elétrica utilizando eletrodos de carbono impresso em papel e funcionalizados com hidrogel

RESUMO

Em parceria com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Dermot Diamond foram desenvolvidos sensores de baixo custo para detecção de monossacarídeos (glicose, frutose e etc) em solução, usando espectroscopia de impedância elétrica. Para fabricação dos sensores foram utilizados eletrodos interdigitados de carbono impresso em papel, cuja superfície foi funcionalizada com hidrogel contendo acrilamido copolimerizado com 20 mol % 3-ácido acrilamido fenilborônico ((Acrylamido)phenylboronicacid (PBA)). Os hidrogéis funcionalizados com 20 mol % PBA apresentaram aumento considerável no volume em presença de soluções aquosas de glicose e frutose. O intumescimento do hidrogel altera a impedância medida através dos eletrodos, possibilitando o uso do sensor em detecção quantitativa de acúcares. Investigamos as variações de impedância e capacitância variando a concentração, de 0 a 5 mM, de soluções de glicose e frutose preparadas em tampão fosfato (pH 7.4). As moléculas de açúcar entram por difusão no hidrogel e se ligam ao boro, o que induz o aumento de volume do hidrogel. O intumescimento do gel por consequência altera as propriedades dielétricas do hidrogel sob um campo elétrico aplicado levando a variações na impedância. As medidas de impedância monitoradas em 1 kHz indicam que o inchamento da matriz de hidrogel causa a mobilidade de íons através da camada de hidrogel inchado. Verificamos que ao aumentar a concentração de açúcar em solução, a impedância diminui e as curvas de capacitância relativa são diferentes para frutose e glicose. Observou-se que o hidrogel exibe maior inchaço na presença de frutose do que em glicose na mesma faixa de concentrações. O sensor se mostrou eficiente em detecção de baixas concentrações de açúcares, o que o torna adequado para detecção de glicose em níveis de concentração encontrados em suor humano. Esperamos futuramente aplicar estes sensores em *skin patch* para monitoramento não invasivo do açúcar no suor.

Palavras chaves: sensor, hidrogel, ácido borônico e screen printing.

4.1 – INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 422 milhões de adultos no mundo sofrem de diabetes, uma doença crônica caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue. A diabetes pode causar complicações graves para a saúde, como cegueira, falecimento de órgãos, insuficiência renal e ataque cardíaco. Devido a estas complicações há um interesse crescente no desenvolvimento de dispositivos invasivos [102] e não invasivos [103] para monitoramento de glicose. Métodos comumente utilizados para monitoramento de glicose no sangue envolvem uma pequena perfuração no dedo (ou antebraço, coxa) [104] ou de implante subcutâneo de sensores. Embora minimamente invasivos ainda causam desconfortos aos pacientes. Os métodos não invasivos são vantajosos porque são indolores por utilizarem amostras corporais como suores [105], lágrimas [106] ou saliva [107]. Porém, para que esses sensores sejam eficazes há necessidade de uma sensibilidade maior, porque os níveis de glicose variam de 4-8 mM (72-144 mg.dL⁻¹) [108], enquanto que para suor o valor é 0.28-1.11 mM (5-20 mg.dL⁻¹) [109].

A comunidade científica vem tentando desenvolver sensores de baixo custo e com limite de detecção cada vez mais baixo. Para isto, vários métodos vêm sendo utilizados para detecção de glicose em intervalos de concentração distintos. Os métodos empregados podem ser eletroquímicos [110,111], óticos [112,113] e espectroscopia de impedância [85,114], em que o mecanismo de detecção geralmente emprega a utilização da enzima glicose oxidase [105,112] ou moléculas de ligação a açúcar tais como derivados de ácido borônico [111]. Os ácidos borônicos (BA do inglês *boronic acid*) representam uma boa alternativa às enzimas para detecção de monossacarídeos por serem utilizados como receptores de quimiossensores. A detecção de açúcar em concentrações abaixo de mM é possível devido à interação covalente reversível de BA com grupo diol de açúcares. Os ácidos borônicos são considerados ácidos de Lewis porque são compostos de um átomo de boro deficiente em elétrons com dois grupos hidroxila ligados [115]. As fortes interações com grupos hidroxila eletronegativas em moléculas de açúcar podem ser explicadas por este comportamento ácido de Lewis [115] e permite assim o reconhecimento de sacarídeos na gama de pH fisiológico.

Em solução, derivados de BA podem ser utilizados em detecção óptica (fluorescente) de açúcares quando atuam em conjunto com fluoróforos, através de ligação covalente ou não covalente. A fluorescência do sistema é alterada devido à alteração conformacional em torno do átomo de boro após a ligação do açúcar, que por consequência afeta a interação entre o BA

e a porção fluorescente. A dopagem não covalente de lentes de contatos com soluções de BA fluorescentes foi proposta por Badugu *et al.* [106], em que lentes de contatos inteligentes poderiam detectar glicose em fluidos oculares em concentrações entre 50 a 100 μ M. Porém, a lixiviação do sensor ao longo do tempo consiste em uma grande desvantagem para este tipo de sensor. Também foi proposta a incorporação covalente de derivados de BA em sistemas poliméricos ou transistores de efeito de campo, a fim de fabricar sensores BA integrados com estabilidade melhorada.

Transistores de efeito de campo podem ser fabricados com nanotubos de carbono funcionalizados com ácido pireno-1-borônico para detecção de glicose na gama clinicamente relevante para sangue ou saliva [117]. A detecção de frutose, manose e glicose pode ser eficiente quando se utiliza o ácido fenilborônico (PBA) modificado com óxido de grafeno, atingindo limite de detecção de 0,8 mM para glicose [118], e empregando voltametria diferencial de pulso. Funcionalizando eletrodos de ouro com BA e utilizando a técnica de impedância eletroquímica foi possível detectar quatro tipos de monossacarídeos: glicose, sorbitol, manitol e frutose [119].

Vários grupos de pesquisa têm incorporado os derivados de BA em matrizes de hidrogel para detectar açúcar, uma vez que a interação entre o ácido borônico e o açúcar induz uma alteração no volume de hidrogel, modulado pela concentração de açúcar. O aumento de volume do hidrogel pode ser convertido em concentração de açúcar [120], porém este monitoramento de intumescimento não tem a precisão necessária para sensores de açúcar. No entanto, as diferenças no volume da matriz podem, por sua vez, causar alterações nas propriedades ópticas ou elétricas do hidrogel, permitindo vários meios de detecção com precisão significativamente melhorada. Tierney et al. [121] incorporaram o PBA em um hidrogel como uma cavidade Fabry-Perot na extremidade de uma fibra óptica para desenvolver um sensor óptico que detecta glicose. Com uma onda formada pela reflexão da luz em interfaces fibra-gel e gel-solução é possível detectar o comprimento óptico do gel. Uma resposta com intumescimento linear do hidrogel em solução aquosa com 2,5 mM de carboidratos gerou o valor de -1760 nm mM⁻¹ para a glicose. O uso de uma matriz coloidal incorporada ao hidrogel funcionalizado com PBA permite que o inchamento do gel causado pela interação de PBA-glucose seja convertido num desvio de comprimento de onda da luz difratada de Bragg [122].

A incorporação de hidrogel funcionalizado com PBA em transdutor capacitivo de MEMS permite medir as alterações nas propriedades dielétricas do hidrogel sobre a ligação de

açúcar [123]. Entre dois microeletrodos paralelos foi depositado um filme fino de hidrogel e verificou-se que com mudanças nas concentrações de glicose o valor da capacitância efetiva do sensor podia ser medida. No entanto, a variação absoluta na capacitância efetiva na região de baixa concentração de glicose (0-40 mg.dL⁻¹) foi inferior a 0.5 pF, sem as concentrações intermediárias analisadas, tornando este sensor provavelmente inadequado para a análise de suor.

Neste trabalho de doutorado apresentamos uma alternativa de sensor descartável de baixo custo com sensibilidade melhorada para baixas concentrações de açúcar. O sensor foi desenvolvido a partir de eletrodos interdigitados de carbono impresso em papel revestido com uma fina camada de hidrogel contendo PBA. A interação do açúcar com hidrogel funcionalizado induziu mudanças nas propriedades dielétricas do hidrogel que foram detectadas através da espectroscopia de impedância elétrica. Variações de impedância e capacitância com diferentes concentrações de glicose e frutose, preparados em tampão fosfato, foram investigadas na faixa de concentração de 0-5 mM. O dispositivo oferece a vantagem de ser facilmente fabricado (por exemplo, impressão de serigrafia) e produzido em larga escala devido à simplicidade da técnica empregada. O uso de papel como substrato reduz o custo e permite imobilização direta do hidrogel devido a sua estrutura porosa/fibrosa, eliminando o uso de membranas semipermeáveis que seriam necessárias para manter o material sensível à glicose [102] no lugar. A sensibilidade e o alcance operacional do sensor permitem que futuramente se possa desenvolver um dispositivo microfluídico com papel para detecção de açúcar no suor.

4.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Para este trabalho foram utilizados acrilamida 99% (AAm), N, N'-metilenobis (acrilamida) 99% (MBIS), 2-hidroxi-2-metilpropiofenona 97% (HMPP), 3- (Acrylamido)phenylboronicacid 98% (PBA), D- (-) - Frutose, D - (+) - glicose, sulfóxido de dimetilo (DMSO) e papel de filtro *Watman* (grade 158 x 68 cm e tamanho de poro 11 μ m) que foram adquiridos da Sigma-Aldrich, e utilizados como recebidos. A tinta de carbono foi adquirida de GWENT GROUP Inc. Pontypool, UK (código de produto C2030519P4). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura (18,2 M Ω cm de resistividade, Millipore Milli-Q).
4.2.1 - Fabricação de eletrodos interdigitados

Os eletrodos interdigitados de carbono foram fabricados através da técnica de *screen printing*. Para este trabalho utilizamos o equipamento *screen printer* DEK 248 que permite a automatização de impressão em poucos minutos de centenas de eletrodos em substratos, como polietileno tereftalato (PET) e papel. A Figura 38 ilustra as etapas de impressão dos eletrodos. Uma tela de náilon com as máscaras de eletrodos interdigitados impressas foi fixada no equipamento e em seguida espalhou-se a pasta de carbono na parte móvel do equipamento ("rodo"). Os eletrodos interdigitados de carbono (15 mm de comprimento x 10 mm de largura, 10 dígitos com 1mm de espaçamento) foram impressos em papel e secos no forno a 50 °C por 40 minutos.

Figura 38 - Etapas de fabricação dos eletrodos interdigitados de carbono impressos em papel pela técnica *screen*printing.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.2 - Estudos de síntese e inchaço de hidrogel funcionalizado

Testes de intumescimento para o hidrogel funcionalizado com PBA foram feitos para verificar seu comportamento em diferentes concentrações de glicose e frutose. O hidrogel foi preparado misturando-se 0,25 g AAm, 1 mol % HMPP e 20 mol % PBA, respectivamente, dissolvidos em 500 μ L água/DMSO (1:1). A Figura 39 ilustra a preparação do molde de pequenos hidrogéis para o teste de intumescimento. Em um molde de PDMS com 10 mm de

diâmetro, foram depositados 200 μ L deste coquetel e expostos em luz UV (CL-1000 Ultravioletcrosslinker UVP) por 30 minutos para permitir a polimerização do hidrogel. A partir deste molde, pequenos hidrogéis (4 mm diâmetro) foram cortados com um cortador manual e pesados (W*dry*). Cada disco de hidrogel foi hidratado por 24 h em tampão fosfato (pH 7,4), ou em soluções tampão com diferentes concentrações de glicose e frutose. Após a hidratação, os discos foram cuidadosamente secos com papel filtro para remoção de líquido em sua superfície; cada disco foi pesado novamente (W*w*) para calcular a taxa de intumescimento do hidrogel utilizando a equação 14.

$$Taxa \ de \ intumes cimento = \frac{W_w - W_{dry}}{w_{dry}}$$
(14)

Figura 39 - Preparação de amostras de hidrogel em molde de PDMS para o teste de intumescimento.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.3 – Protocolos de funcionalização de eletrodos e análises

Um estudo foi feito para verificar a influência da funcionalização do hidrogel na medida de impedância. Para isto, 10 µL do coquetel de hidrogel (sem PBA) foram depositados sobre os eletrodos via *drop casting* e polimerizados por cerca de 30 min com luz UV para cada camada depositada. Foram depositadas 5 camadas de hidrogel sobre os eletrodos e entre cada camada de hidrogel, a impedância e a capacitância dos eletrodos foram medidas em água deionizada. Separadamente, imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos eletrodos foram coletadas depois de cada camada de hidrogel depositado. Após este estudo, os eletrodos para o sensoriamento de açúcares foram modificados com apenas uma fina camada de hidrogel usando o mesmo protocolo de funcionalização. Figura 40 - Eletrodos interdigitados de carbono cobertos com hidrogel; A) Foto do eletrodo interdigitado de carbono antes da funcionalização; B) Esquema de deposição do coquetel sobre os eletrodos via *drop-casting* e C) Protocolo de fotopolimerização do hidrogel.



Fonte: Figura adaptada de Daikuzono, et.al. [56].

4.2.4 – Espectroscopia de impedância elétrica

Todas as medidas de espectroscopia de impedância foram realizadas usando um analisador de impedância (Solartron 1260). A Figura 41 ilustra o aparato usado nas medidas. Espectros de impedância foram obtidos aplicando-se um sinal AC de 20 mV através de eletrodos interdigitados numa faixa de frequência de 0,1 Hz a 10 MHz com 5 pontos por década. Para garantir a estabilização da dupla camada elétrica, os eletrodos foram imersos em tampão PBS por 12 minutos. Nas análises subsequentes em soluções tampões contendo açúcar foram deixadas estabilizando durante 6 minutos entre as medições. Soluções de glicose e frutose com diferentes concentrações (0-5 mM) foram preparadas em solução tampão (pH 7,4) e monitoradas em uma frequência de 1 kHz. A partir de dados de capacitância em 1 kHz, a capacitância relativa (Δ C) foi calculada usando a equação 15, onde *C_s* é a capacitância do dispositivo em presença de açúcar em tampão fosfato e *C_b* capacitância do dispositivo em tampão.

$$\Delta \boldsymbol{C} = \boldsymbol{C}_{\boldsymbol{s}} - \boldsymbol{C}_{\boldsymbol{b}} \tag{15}$$

Figura 41 - Aparato experimental para detecção de impedância de monossacarídeos usando eletrodos funcionalizados com hidrogel funcionalizado.



Fonte: Figura adaptada de Daikuzono, et.al. [56].

4.3 – RESULTADO E DISCUSSÃO

4.3.1 – Caracterização do Hidrogel

Fez-se inicialmente uma caracterização dos hidrogéis em solução tampão e em soluções com concentrações de 20 mM de glicose e frutose. Pequenos discos (4 mm de diâmetro) de hidrogel funcionalizados com 20 mol % PBA foram imersos nestas soluções por 24 horas, e então observado seu intumescimento. A Figura 42 ilustra que os hidrogéis expandem consideravelmente em presença de açúcar, com mudança volumétrica maior para frutose do que glicose. Pode-se atribuir a maior mudança volumétrica para a frutose ao fato de o PBA ter força de ligação para frutose aproximadamente 40 vezes maior do que a da glicose, em condições fisiológicas [118]. A força de ligação do BA com sacarídeos está relacionada à orientação e posição relativa da hidroxila na molécula de açúcar. Figura 42 - Imagens de microscópio do hidrogel funcionalizado com 20 % mol PBA, quando imerso em (a) tampão PBS, (b) 20 mM glicose em PBS e (c) 20 mM frutose em PBS.



Fonte: Figura adaptada de Daikuzono, et.al. [56].

Com o aumento de concentração de açúcar (0-5 mM), neste caso glicose e frutose em solução tampão, é possível ver na Figura 43 a taxa de intumescimento do hidrogel em relação à concentração de açúcar. Assim, conclui-se que este material tem potencial para ser aplicado como filme em sensores de monossacarídeos. A próxima etapa do estudo foi observar quantas camadas seriam necessárias para obter bom desempenho do sensor, o que é discutido na próxima seção.

Figura 43 - Equilíbrio de inchamento de hidrogéis de p (AAm-co-PBA) com 20% mol de PBA em solução tampão em diferentes concentrações de glicose e frutose.



Fonte: Figura adaptada de Daikuzono, et.al. [56].

4.3.2 – Camada de hidrogel funcionalizado com PBA para revestimentos de eletrodos.

Hidrogéis funcionalizados com PBA foram depositados via *drop cast* e a cada camada adicionada foi realizada a polimerização do mesmo. Imagens de MEV com aumento de 1000x de cada camada depositada sobre os eletrodos de carbono impresso em papel mostram o aumento da espessura com aumento das camadas depositadas, que podem ser visualizadas na Figura 44. Nas Figuras 44 (A), 44 (B), 44 (C) e 44 (D), observamos as fibras de celulose, 1 camada, 3 camadas e 5 camadas de hidrogel, respectivamente.

Figura 44 - Imagens de MEV de eletrodos interdigitados de carbono impressos sobre papel antes (A) e depois de cobertos com 1 (B), 3 (C) e 5 (D) camadas de hidrogel, respectivamente.



Fonte: Figura adaptada de Daikuzono, et.al. [56].

É importante verificar o número otimizado de camadas de hidrogéis nos sensores porque o polímero é isolante, e assim um aumento na espessura pode afetar as análises. Medidas com eletrodos cobertos com diferentes camadas de hidrogel (sem PBA) mostraram que há um aumento da magnitude da impedância e decréscimo da magnitude da capacitância com aumento de camadas, o que era esperado. Estes comportamentos podem ser verificados na Figura 45. Portanto, seguindo as medidas de triagem, todos os experimentos foram realizados com eletrodos interdigitados recobertos com apenas uma fina camada de hidrogel. Uma camada fina de hidrogel funcionalizado permite difusão rápida através do gel, aumentando a mobilidade iônica e consequentemente tempos de inchamento de equilíbrio mais rápidos. Figura 45 - Medidas da magnitude da impedância (círculo) e magnitude da capacitância (quadrado) para o aumento de número de camadas de hidrogel sobre os eletrodos, em água deionizada.



Fonte: Figura adaptada de Daikuzono, et.al. [56].

4.3.3 – Análises da magnitude da impedância e capacitância

Usando espectroscopia de impedância elétrica foi possível detectar mudanças nas propriedades dielétricas do hidrogel devido à interação entre o açúcar e o grupo PBA. Camadas de hidrogel, depositados via *drop casting*, em contato com diferentes concentrações de açúcar em solução incham e aumentam de volume. Isso permite difusão de íons e aumento da corrente elétrica, facilmente detectados como alterações na impedância e/ou capacitância. A capacitância relativa, analisada em uma frequência de 1 kHz, para diferentes concentrações de glicose (5-30 mM) em distintas composições de PBA (5 mol % e 20 mol %) em hidrogel pode ser visualizado na Figura 46. O aumento de variação na capacitância para hidrogéis com maior concentração de PBA se deve ao fato de haver mais grupos ligantes para moléculas de glicose. Mudanças nas propriedades dielétricas causadas pelo aumento de volume do gel podem ser monitoradas através da variação da capacitância em 1 kHz. Figura 46 - Detecção de glicose em tampão PBS através de mudanças na capacitância relativa, para hidrogéis contendo 5 mol % PBA (azul) e 20 mol % PBA (vermelho).



Fonte: Figura adaptada de Daikuzono, et.al. [56].

Os espectros da Figura 47 (A) e 47 (B) são de eletrodos recobertos com uma camada de hidrogel funcionalizado com 20 mol % PBA. O aumento no volume de hidrogel sobre os eletrodos permite a mobilidade de íons provenientes de moléculas de açúcar que penetraram no gel por difusão e consequentemente alteram a propriedade elétrica do hidrogel [119]. Variações no espectro de impedância foram detectados para diferentes concentrações de glicose e frutose em uma faixa de frequência de 0,1 Hz a 1 MHz. Uma maior distinção das curvas de impedância foi observada em 1 kHz para a exposição a concentrações de açúcar. A Figura 47 mostra que para na faixa de frequência em 1 kHz, os espectros para as concentrações de glicose e frutose decrescem monotonicamente. Este decréscimo pode estar relacionado ao aumento da mobilidade iônica no hidrogel intumescido.

Figura 47 - Espectro de impedância para eletrodos cobertos com uma camada de hidrogel funcionalizado com 20 mol % PBA quando exposto para uma variedade de concentrações de glicose (A) e frutose (B), respectivamente.



Fonte: Figura adaptada de Daikuzono, et.al. [56].

A Figura 48 (A) ilustra as alterações nos valores de capacitância (ΔC) a 1 kHz detectados para concentrações (0 a 5 mM) de soluções de glicose e frutose. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Para assegurar a reprodutibilidade do sensor, atenção especial deve ser dedicada para a reprodutibilidade dos eletrodos sem hidrogel em solução de tampão, antes de os eletrodos serem funcionalizados. Isso garante que quaisquer variações na resposta do sensor não sejam causadas pela característica intrínseca dos eletrodos interdigitados de carbono. A região tracejada na Figura 48 (A) indica a região de baixas concentrações (0-1,2 mM) que foi plotada novamente para análise do sensor em baixas concentrações. A análise pode ser verificada na Figura 48 (B), onde ambos os açúcares apresentaram aumento linear para concentração de açúcar de 0,2 a 1,2 mM e uma leve alteração no eletrodo sem hidrogel decorrente do inchamento o papel. Sensores recobertos com hidrogel funcionalizado com 20 mol % PBA têm maior sensibilidade para a frutose do que a glicose, o que já era esperado do estudo de intumescimento do hidrogel. O maior aumento de volume do hidrogel causado pela frutose torna as alterações de capacitância mais significativas para frutose do que para a glicose em concentrações semelhantes. Esta afinidade do sensor por frutose permite diferenciar a frutose e a glicose com base na inclinação da curva de resposta do sensor. A Figura 48 (A) mostra que para concentrações acima de 2 mM há uma tendência de saturação de sinal de capacitância. Provavelmente esta saturação advém de o hidrogel atingir sua capacidade máxima de intumescimento. Do gráfico da Figura 48 (B), nota-se que o sensor é adequado para detectar baixas concentrações de açúcares (0, 2 - 1, 2 mM), sendo relevante para a análise do suor humano em que a concentração de glicose varia de 0,28 a 1,11 mM.

Figura 48 - Alterações de capacitância (Δ C) a 1 kHz para o eletrodo revestido com hidrogel funcionalizado com 20 mol % de PBA versus concentração de açúcar. Os dados foram analisados em triplicata e foram obtidas barras de erro a partir dos desvios-padrão. O eletrodo sem hidrogel (estrela) foi testado com diferentes concentrações de glicose para verificar o efeito de PBA na resposta de capacitância. (A) alterações de capacitância analisadas para concentrações entre 0 a 5 mM. (B) alterações de capacitância analisadas para concentrações entre 0 a 1,2 mM.



Fonte: Figura adaptada de Daikuzono, et.al. [56].

4.4 – CONCLUSÃO

Neste trabalho apresentamos eletrodos interdigitados de carbono impressos em papel e modificados com hidrogel para detecção de monossacarídeos em solução, usando espectroscopia de impedância. Os eletrodos foram modificados cobrindo sua superfície com uma fina camada de hidrogel contendo 20 mol % ácido fenilborônico (PBA). À medida que as moléculas de açúcar penetram no hidrogel, elas se ligam às porções de ácido borônico, resultando na formação de grupos boronato. Esta ligação permite um aumento na quantidade de carga negativa no hidrogel e, através de uma força osmótica, causa o inchamento do gel. Este inchaço induzido por açúcar aumenta a mobilidade dos íons no hidrogel, alterando assim suas propriedades elétricas [119]. Os resultados mostraram que as variações de impedância e capacitância do dispositivo, na faixa de frequência de medição, responderam consistentemente a concentrações de açúcares de 0 a 5 mM, em soluções tampão aquosas de fosfato. A impedância medida em 1 kHz diminui com a concentração de açúcar. As variações de capacitância relativas são marcadamente diferentes para frutose e glicose, uma vez que o hidrogel exibe maior inchaço na presença de frutose do que em glicose na mesma faixa de concentrações. No entanto, com este sensor simples, a quantificação de diferentes tipos de açúcares numa amostra não é possível, e para este âmbito é imaginada uma matriz de eletrodos interdigitados funcionalmente diferentes e a utilização de método estatístico, como análise de componentes principais (PCA), para análise de dados. Como o sensor proposto mostrou ser adequado para a detecção de glicose a níveis de concentração encontrados no suor humano, o trabalho futuro consistirá na incorporação desses eletrodos modificados em papel em *skin-patch* para monitoramento não invasivo do açúcar no suor. Nesta fase futura do desenvolvimento, as interferências externas do suor, juntamente com a concentração variada de eletrólitos e as taxas de transpiração, poderão ser potencialmente superadas utilizando uma abordagem multissensor que permita a quantificação de influências externas, tais como concentração de íons e hidratação do revestimento de hidrogel.

Capítulo 5 – Detecção de diferentes tipos de açúcares e marcas de suco de maçã a partir de uma língua eletrônica microfluídica em papel com eletrodos funcionalizados com hidrogel

RESUMO

O trabalho do capítulo 5 foi desenvolvido em parceria com o grupo do Prof. Dr. Dermot Diamond-DCU. Foram produzidas línguas eletrônicas microfluídicas com unidades sensoriais em papel (paper-based), que são de baixo custo e descartáveis. Com microfluídica reduziu-se drasticamente o volume de hidrogéis funcionalizados e das amostras testadas. A língua contém quatro unidades com eletrodos interdigitados de carbono impressos por screen printing e canal impresso com uma impressora a cera. Três unidades sensoriais tiveram a superfície do canal modificada com hidrogéis funcionalizados com 5 e 20 mol% PBA e um com polilíquido iônico, polimerizados por radiação no UV-vis. A escolha destes materiais foi estratégica, pois estes polímeros têm afinidade por monossacarídeos. Foram analisadas amostras de glicose, frutose e sacarose com concentrações entre 0,008 e 0,056 g.mL⁻¹, preparadas em tampão fosfato (pH 7,49). A técnica de detecção foi espectroscopia de impedância, com registro da capacitância entre 100 Hz e 1 kHz, cujos dados foram analisados com os métodos PCA e IDMAP. A língua eletrônica foi eficiente na diferenciação de concentrações e grupos de açúcares, com maior afinidade dos sensores por frutose devido à interação com PBA. Também foi usada para discriminar várias marcas de suco de maçã com diferentes concentrações de açúcares, o que poderia ser esperado pois o açúcar mais usado nesses sucos é a frutose.

Palavras chaves: língua eletrônica, microfluídica, hidrogel, PBA e PIL.

5.1 – INTRODUÇÃO

A língua eletrônica é um sistema de multissensores capazes de distinguir líquidos complexos e semelhantes. As unidades sensoriais são formadas por sensores com baixa seletividade que geram muitos dados que precisam ser processados com métodos estatísticos, como a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e outros métodos de projeção multidimensional, implementados na ferramenta PEx-Sensors [15,16]. As unidades sensoriais geralmente são formadas por um conjunto de eletrodos que podem ser modificados através de membranas [124], polímeros condutores [12], semicondutores [23] e hidrogéis funcionalizados.

Neste trabalho utilizamos polilíquidos iônicos (PIL) e PBA para modificar as unidades sensoriais da língua eletrônica. Os PILs são polieletrólitos fortes, com alta densidade de carga, que combinam propriedades de líquidos iônicos (ILs) em uma arquitetura macromolecular [126,127]. Há grupos catiônicos e aniônicos nas unidades repetitivas da cadeia, sendo a solubilidade do PIL governada por grupos aniônicos [125]. Kim et.al utilizaram os PILs para modificar eletrodos de grafeno [126] e aumentar a área efetiva. A resposta eletroquímica era estável com o dispositivo operando em 3.5 V, produzindo um máximo de densidade de energia de 6.5 W.h/kg com densidade de potência de 2.4 kW/kg. PBAs têm sido usados em sensores, como em nosso trabalho recente [56] para detecção de açúcares. Numa língua eletrônica, utilizam-se técnicas eletroquímicas e de impedância para analisar bebidas como café [74], vinho [128], leite [129], água [10]. Nery et.al. desenvolveram uma língua eletrônica eletroquímica a base de papel para análise de cervejas e vinhos [130]. O uso de papel é importante para reduzir custo e empregar microfluídica através da força de capilaridade. Martinez et.al. [131] introduziram os chamados µPADs (do inglês microfluidic paper-based analytical devices). Os µPADs são plataformas de papel com canais hidrofílicos limitados por barreiras hidrofóbicas que permitem a realização de análises de forma simples e rápida. As fibras de celulose hidrofílicas permitem o fluxo de soluções aquosas ao longo do canal. A velocidade de fluxo é influenciada pelas dimensões do canal e temperatura/umidade do ambiente. A fabricação dos µPADs pode ser feita, por exemplo, através do uso de uma impressora com cartuchos de cera (*wax printer*) e de uma chapa aquecedora. Este tipo de fabricação permite a obtenção de canais com dimensões de 561 \pm 45 μ m e barreiras de 850 \pm 50 µm [129]. Estes dispositivos permitem o uso de pouco volumes de soluções e dispensam o uso de equipamentos (análise por colorimetria). Neste capítulo apresentamos uma língua eletrônica microfluídica com eletrodos de papel, usando espectroscopia de impedância que não requer eletrodo de referência e contra eletrodo. Isso torna o sistema mais simples, permitindo imprimir o canal em cera, o que limita o espaço do sensor, e reduzir o volume da amostra, de 5 mL para 6 μ L. A língua eletrônica tem quatro unidades sensoriais modificadas com hidrogel funcionalizado com PBA, PIL e um sem hidrogel para detecção de diferentes grupos e concentrações de glicose, frutose e sacarose, além da análise de diferentes marcas de suco de maçã.

5.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 – Materiais

Foram utilizados acrilamida 99% (AAm), N, N'-metilenobis (acrilamida) 99% (MBIS), 2-hidroxi-2-metilpropiofenona 97% (HMPP), ácido 3-acrilamido fenil borônico 98% (PBA), D- (-) - Frutose, D - (+) - glicose, sulfóxido de dimetila (DMSO) e papel de filtro *Watman* (grade 158 x 68 cm e tamanho de poro 11 μ m), adquiridos da Sigma-Aldrich, e utilizados como recebidos. A tinta de carbono foi adquirida de GWENT GROUP Inc. Pontypool, UK (código de produto C2030519P4). O PIL foi sintetizado pelo grupo de química do Prof. Dr. Dermot Diamond – Dublin City University. A sacarose e as cinco diferentes marcas de suco de maçã foram adquiridas em supermercados de Dublin, Irlanda. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura (18,2 M Ω cm de resistividade, Millipore Milli-Q).

5.2.2 – Fabricação de eletrodos interdigitados de carbono via *screen-printing* e impressão de canais hidrofóbicos.

A Figura 49 apresenta o esquema de fabricação dos eletrodos interdigitados de carbono com canal hidrofóbico impresso. Os eletrodos interdigitados de carbono (15 mm de comprimento x 10 mm de largura, 10 dígitos com 1 mm de espaçamento) foram impressos em papel por *screen-printing* utilizando o equipamento DEK 248 screen printer. Os eletrodos foram secos no forno a uma temperatura de 50°C por cerca de 40 minutos. O *design* dos canais foi feito através do *software* AutoCAD, impresso sobre os eletrodos utilizando a impressora a cera XEROX.



Figura 49 - Fabricação de eletrodos interdigitados de carbono com canal impresso.



Os eletrodos com canal impresso foram postos em uma chapa quente (80°C) por cerca de 1 minuto para derreter a cera dos canais. Com o derretimento a largura do canal diminui de 3 para 2 mm. A Figura 50 mostra os eletrodos interdigitados de carbono impresso em papel (A), com canal impresso (B) e com canal de cera pós aquecimento (C). Os eletrodos da Figura 50 (C) serão as bases das unidades sensoriais da língua eletrônica microfluídica.

Figura 50 - (A) eletrodo interdigitado de carbono impresso via *screen-printing*; (B) canal impresso sobre o eletrodo; (C) canal derretido sobre os eletrodos.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.3 – Modificação da superfície do canal com polimerização de hidrogel funcionalizado.

As unidades sensoriais foram modificadas com hidrogéis funcionalizados com PBA e com PIL. Não há informação de preparação do mesmo devido a segredo industrial. Os hidrogéis funcionalizados com PBA foram preparados misturando 0,25 g de acrilamida, 1 mol % bis acrilamida, 1 mol % HMPP e 20 ou 5 mol % PBA, respectivamente, dissolvidos em 500 μ L de água/DMSO na proporção 1:1. A Figura 51 ilustra o procedimento de polimerização do hidrogel no canal impresso. Cada canal recebeu 0,6 μ L deste coquetel e o mesmo volume foi usado para o PIL; os líquidos fluíram por capilaridade no canal e foram expostos em luz UV (CL-1000 Ultraviolet crosslinker UVP) por 30 minutos para a polimerização dos hidrogéis.





Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.4 – Unidades sensoriais da língua eletrônica microfluídica.

A Figura 52 ilustra as unidades sensoriais: (A) eletrodo sem hidrogel, (B) eletrodo com 5 mol % PBA, (C) eletrodo com 20 mol % PBA e (D) eletrodo modificado com PIL

Figura 52 - Conjunto de eletrodos da língua eletrônica: (A) sem hidrogel, (B) 5 mol % PBA, (C) 20 mol % PBA e (D) PIL.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.5 – Espectroscopia de Impedância elétrica

As análises de espectroscopia de impedância foram feitas com o analisador de impedância Solartron 1260, com 20 mV aplicados nos eletrodos interdigitados em uma faixa de frequência de 0,1 a 10 MHz com 5 pontos por década. Diferentes concentrações (0 a 0,056 g.mL⁻¹) de glicose, sacarose e frutose foram preparadas em tampão fosfato (pH 7,4) e foram usadas diferentes marcas de suco de maçã. As medidas se iniciaram com solução de tampão (8 μ L) no canal por 12 minutos para estabilizar o sistema, antes de usar outras amostras. Para cada amostra foram utilizados 6 μ L e tempo de 6 minutos. Entre as medidas de suco de maçã, o canal foi lavado com solução de buffer. A Figura 53 ilustra o aparato experimental para as medidas.





Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.6 – Análise de dados com PCA e IDMAP.

Os dados obtidos foram analisados através de *softwares Statistica 13, Origin e PEx-Sensors*. Para amostras de açúcar os dados de capacitância foram analisados em 100 Hz e 1 kHz e para amostras de suco de maçã os dados foram analisados em 1 kHz. As análises foram feitas nessas frequências porque nelas foi observada maior distinção entre as curvas de capacitância.

5.3 – RESULTADO E DISCUSSÃO

As Figuras 54 (A) e 54 (B) exibem curvas de capacitância de unidades sensoriais modificadas, com PIL, 5 e 20 mol % PBA e 1 eletrodo sem hidrogel, imersos em água deionizada e tampão fosfato pH 7,4. Os resultados após 20 minutos de estabilização da dupla camada elétrica indicam a presença de hidrogel funcionalizado sobre o canal impresso. Verificamos que a resposta das unidades sensoriais é mais diversa em água do que em tampão, especialmente para o espectro de PIL medido em água. Isso era esperado, pois os PIL são polieletrólitos fortes [123].

Figura 54 - Espectros de capacitância das unidades sensoriais, modificadas com *PIL*, 5 e 20 mol % PBA e 1 eletrodo sem hidrogel, em (A) água deionizada e (B) solução aquosa de PBS (pH 7,4).



Fonte: Elaborado pela autora.

Diferentes concentrações de glicose, sacarose e frutose preparadas em solução tampão PBS, como indicado na Tabela 5, foram analisadas com espectroscopia de impedância. A Figura 55 mostra o gráfico de PCA obtido para medidas a 1 kHz das diferentes concentrações de glicose, sacarose e frutose, em que é possível distinguir diferentes concentrações e grupos de açúcar. Os grupos de glicose e sacarose estão próximos entre si, e distantes do grupo de frutose. Fato que pode ser explicado pela maior afinidade do PBA e PIL por grupo diol dos açucares, como já demonstrado por Daikuzono *et.al.* em que eletrodos interdigitados de carbono impressos em papel e recobertos com 20 mol % PBA têm maior afinidade por frutose do que glicose [56].

Amostras	Concentração (g.mL ⁻¹)
0g, 0s e 0f	Tampão pH 7.4
g1,s1 e f1	0,008
g2, s2 e f2	0,016
g3, s3 e f3	0,032
g4, s4 e f4	0,04
g5, s5 e f5	0,056

Tabela 5 - Amostras de glicose, sacarose e frutose e suas respectivas concentrações.

*g (glicose), s (sacarose) e f (frutose)

Figura 55 - PCA de diferentes concentrações de glicose, sacarose e frutose.



Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 56 (A) apresenta a curva de capacitância da sacarose, glicose e frutose, com concentração de 0,016 g.mL⁻¹, analisadas nos canais modificados com filme polimerizado de PIL. A diferença de respostas dos açúcares pode ser mais bem averiguada na Figura 56 (B) que ilustra um gráfico 3D com as respostas em 100 Hz de 3 unidades modificadas com PIL. Dos valores de capacitância, verifica-se que o PIL tem maior afinidade por frutose do que para a glicose e sacarose. Isso é consistente com o isolamento do grupo de frutose dos demais açúcares no PCA da Figura 55.

Figura 56 - (A) curvas de capacitância dos açúcares sacarose, glicose e frutose com concentração de 0.016 g.mL⁻¹ analisados em canais modificados com PIL; (B) gráfico 3D de capacitância analisada em 100 Hz para 3 tipos de açúcar.



Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 57 apresenta o PCA 3D de análises em triplicata, geradas através de valores de capacitância extraídos em 1 kHz, de diferentes concentrações de açúcar. Para confirmar a distinção dos diferentes grupos de açúcar, nota-se novamente a separação desses grupos, e da solução de PBS. Na Figura 57 bolas pretas, vermelhas, verdes e azuis representam soluções de PBS, frutose, glicose e sacarose, respectivamente. A distinção das diferentes concentrações de açúcares neste gráfico não ficou clara, e por isso recorremos ao método computacional IDMAP para analisar separadamente cada açúcar.

Figura 57 - PCA 3D de diferentes concentrações de frutose (bola vermelha), glicose (bola verde) e sacarose (bola azul) e buffer PBS (bola preta).



Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 58 ilustra a imagem gerada pelo método IDMAP das diferentes concentrações de frutose em triplicata, onde F1, F2, F3, F4 e F5 representam as concentrações de 0.008, 0.016, 0.032, 0.040 e 0.056 g.mL⁻¹, respectivamente. Observamos a clara distinção das concentrações de frutose da amostra de PBS.

Figura 58 - Imagem gerada a partir do método IDMAP de diferentes concentrações de frutose e solução PBS.



Fonte: Elaborado pela autora.

Análises em triplicata foram feitas também para a glicose e sacarose que estão ilustradas nas Figuras 59 e 60 geradas pelo método IDMAP, onde as concentrações de 0.008, 0.016, 0.032, 0.040 e 0.056 g.mL⁻¹ são representadas por letras com numeração crescente. Novamente, podemos verificar a distinção do PBS das diferentes concentrações de açúcar.

Figura 59 - Imagem gerada pelo método IDMAP de diferentes concentrações de glicose e PBS.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 60 - Imagem gerada pelo método IDMAP de diferentes concentrações de sacarose e PBS.





Com os resultados positivos da língua eletrônica microfluídica para diferentes açúcares, surgiu a motivação de empregá-la para análise de amostras de suco de maçã com diferentes concentrações de açúcar. A Tabela 6 lista as amostras de sucos, as concentrações de

açúcar em 100 mL de suco e a porcentagem de pureza do suco de maçã. As amostras foram analisadas com espectroscopia de impedância aplicando-se tensão AC de 20 mV com unidades sensoriais modificadas com PBA, PIL e um eletrodo sem hidrogel. A Figura 61 apresenta o espectro de impedância das amostras de sucos e da água. Em 100 Hz é possível observar que ao aumentar a concentração de açúcar no suco, há um aumento na impedância. Este aumento indica maior resistência à passagem de corrente elétrica, que pode ser devido ao hidrogel funcionalizado polimerizado sobre o canal. O confinamento do hidrogel no canal e o intumescimento com o aumento da concentração de açúcar levam a uma camada espessa de material isolante sobre o eletrodo interdigitado, aumentando a impedância.

Amostras	Açúcar em 100 mL	% pureza do suco de maçã
Heinz (h)	4,8 g	50
Fruice (f)	8,5 g	100
Tesco (t)	9,6 g	100
Del Rivo (d)	10 g	99
Homestead (ho)	11,3 g	100

Tabela 6 - Amostras de suco de maçã e suas respectivas concentrações de açúcar em 100 mL de suco.

Figura 61 - Espectros de impedância de sucos de maçã com diferentes concentrações de açúcar.



Fonte: Elaborado pela autora.

Medidas de impedância em triplicata com sucos das marcas Heinz (h), Fruice (f), Tesco (t), Del Rivo (d) e Homestead (ho), com concentrações de 4.8, 8.5, 9.6, 10 e 11.3 g de açúcar em 100 mL de amostra foram analisadas por PCA, cujos gráficos de cada língua eletrônica com o mesmo conjunto de unidades sensoriais são mostrados na Figura 62. A língua eletrônica consegue distinguir a água das amostras de suco, e partindo do ponto da água no gráfico houve distinção crescente das concentrações de açúcar no suco.



Figura 62 - PCA de diferentes marcas de suco de maçã analisadas em 3 línguas eletrônicas.

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 63 apresenta um gráfico de PCA 3D com medidas em triplicata dos sucos de maçã e da água. As amostras dos sucos Tesco (0,096g/mL) e Del Rivo (0,1 g/mL), que possuíam concentrações de açúcar próximas, se agruparam perto uma das outras.

Figura 63 - Gráfíco de PCA 3D de amostras medidas em triplicata de amostras de diferentes marcas suco de maçã.



Fonte: Elaborado pela autora.

O gráfico 3D da Figura 64 apresenta a relação das unidades sensoriais com valores de capacitância e as amostras de sucos analisados. A distinção das amostras foi mais clara, com diferenças maiores na capacitância, para o sensor com PIL. Isto pode ser explicado pelo fato de o PIL ser um polieletrólito forte e ter afinidade por frutose, como já discutido em resultados anteriores. A frutose é o açúcar majoritário nos sucos de frutas e, portanto, esperávamos que os sensores conseguissem fazer a distinção, em especial os modificados com PBA e PIL.



Figura 64 - Gráfico 3D de respostas para unidades sensoriais com sucos de maçã e respectivas capacitâncias.

Fonte: Elaborado pela autora.

Testamos a possibilidade de reutilizar as unidades sensoriais da língua eletrônica, repetindo a mesma série de medidas para os sucos de maçã. Da Figura 65, observa-se que a distinção dos sucos ainda é possível na segunda medida, mostrada no gráfico PCA da direita, mas o valor da primeira componente reduziu de 94,6% para 44,15%. Ou seja, a capacidade de distinção das amostras de suco não foi mantida. Concluímos que os sensores precisam ser descartados, e assim para cada análise é necessário trocar o conjunto de unidades sensoriais devido à saturação ou contaminação dos hidrogéis.

Figura 65 - PCA de amostras de sucos de maçã utilizando o mesmo conjunto de unidades sensoriais da língua eletrônica. À esquerda está o gráfico para a primeira medida, sendo que o gráfico à direita se refere à segunda medida.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 – CONCLUSÃO

A língua eletrônica fabricada em papel com unidades sensoriais modificadas com hidrogéis funcionalizados com PBA e PIL permitiu distinguir diferentes concentrações de glicose, frutose e sacarose em solução aquosa de PBS. Com análise estatística e computacional, foi possível visualizar a distinção de grupos de açúcares, assim como a distinção de diferentes concentrações. A língua eletrônica foi empregada também na análise de marcas de suco de maçã que continham diferentes concentrações de açúcar. As análises demonstraram que o sensor conseguiu distinguir as diferentes marcas de acordo com o aumento de concentração de açúcar. As marcas Tesco e Del Rivo que continham somente 0.4 g de diferença na concentração de açúcar ficaram bem próximas. Verificamos também através de análises de PCA que o alto valor da primeira componente (PC 1) pode estar correlacionado ao sensor com PIL que se mostrou muito sensível às amostras analisadas e à frutose que normalmente é o açúcar predominante em sucos de frutas. Foi constatado também que os dispositivos são descartáveis, o que era esperado já que são fabricados em papel.

Capítulo 6 – Conclusão geral e perspectivas futuras

Do trabalho de doutorado, verificou-se que é possível desenvolver sensores de baixo custo para análises de gliadina, diferentes concentrações de monossacarídeos e análise de bebidas, como sucos de maçã. Sensores do tipo língua eletrônica microfluídica, construídos em plataforma de vidro com canais moldados em PDMS, com unidades sensoriais modificadas com polímeros condutores e semicondutores geraram resultados satisfatórios na distinção de diferentes concentrações de gliadina preparadas em solução de etanol 70 %. Concentrações abaixo e acima de 20 ppm foram detectadas, o que é importante para análises de alimentos que são considerados sem glúten, cuja concentração máxima é 20 ppm. Além disso, a língua eletrônica permitiu distinção de grupos de alimentos com, sem e contaminados com 200 ppm de gliadina. Abre-se a perspectiva, a partir desses resultados, de desenvolver um sensor para os celíacos monitorarem seus alimentos sem o perigo de sofrer os agravantes da doença por consumirem alimentos supostamente sem glúten, mas que podem ter sido contaminados na preparação.

Concluímos também que sensores de papel com eletrodos interdigitados de carbono via *screen-printing*, com unidades modificadas com PBA e PIL, podem diferenciar grupos de glicose, frutose e sacarose com diferentes concentrações. Notou-se que o sensor com hidrogel funcionalizado com 20 mol % PBA é adequado para detectar baixas concentrações de açúcares (0.2 – 1.2 mM), sendo relevante para a análise do suor humano em que a concentração de glicose varia de 0.28 a 1.11 mM. Estes sensores podem ser aplicados futuramente no desenvolvimento de *skin patch* para monitoramento de glicose no suor. A língua eletrônica microfluídica em papel também permitiu a diferenciação de concentração de açúcares e aplicar a língua eletrônica microfluídica em papel para determinar a concentração de glicose no suor. A língua eletrônica microfluídica microfluídica em papel para determinar a concentração de glicose em amostras de suor, incluindo sob ação de interferentes. O objetivo final é desenvolver um sensor não invasivo para monitoramento de glicose através do suor humano.

Referências

1. Fasano, A.; Sapone, A.; Zevallos, V.; Schuppan, D. Nonceliac Gluten Sensitivity. *Gastroenterology* **2015**, *148*, 1195–1204, doi:10.1053/j.gastro.2014.12.049.

2. Kelly, C. P.; Bai, J. C.; Liu, E.; Leffler, D. A. Advances in Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology* **2015**, *148*, 1175–1186, doi:10.1053/j.gastro.2015.01.044.

3. Knapp, P. E.; Showers, K. M.; Phipps, J. C.; Speckman, J. L.; Sternthal, E.; Freund, K. M.; Ash, A. S.; Apovian, C. M. Self-monitoring of blood glucose with finger tip versus alternative site sampling: effect on glycemic control in insulin-using patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* **2009**, *11*, 219–225.

4. Vlasov, Y.; Legin, A.; Rudnitskaya, A.; Di Natale, C.; D'amico, A. Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids. *Pure Appl Chem* **2005**, *77*, 1965–1983.

5. Riul Jr., A.; Dantas, C. A. R.; Miyazaki, C. M.; Oliveira Jr., O. N. Recent advances in electronic tongues. *The Analyst* **2010**, *135*, 2481–2495, doi:10.1039/c0an00292e.

6. Tahara, Y.; Toko, K. Electronic Tongues-A Review. *Ieee Sens. J.* 2013, *13*, 3001–3011.

7. Legin, A.; Rudnitskaya, A.; Vlasov, Y.; Di Natale, C.; Davide, F.; D'Amico, A. Tasting of beverages using an electronic tongue. *Sens. Actuators B Chem.* **1997**, *44*, 291–296.

8. de Queiroz, D. P.; Florentino, A. de O.; Bruno, J. C.; da Silva, J. H. D.; Riul, A.; Giacometti, J. A. The use of an e-tongue for discriminating ethanol/water mixtures and determination of their water content. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *230*, 566–570, doi:10.1016/j.snb.2016.02.080.

del Valle, M. Electronic Tongues Employing Electrochemical Sensors. *Electroanalysis* 2010, 22, 1539–1555, doi:10.1002/elan.201000013.

10. Cabral, F. P. A.; Bergamo, B. B.; Dantas, C. A. R.; Riul, A.; Giacometti, J. A. Impedance e-tongue instrument for rapid liquid assessment. *Rev. Sci. Instrum.* **2009**, *80*, doi:10.1063/1.3084210.

11. Riul; dos Santos; Wohnrath, K.; Di Tommazo, R.; Carvalho, A. C. P. L. F.; Fonseca, F. J.; Oliveira; Taylor, D. M.; Mattoso, L. H. C. Artificial Taste Sensor: Efficient Combination of Sensors Made from Langmuir–Blodgett Films of Conducting Polymers and a Ruthenium Complex and Self-Assembled Films of an Azobenzene-Containing Polymer. *Langmuir* **2002**, *18*, 239–245, doi:10.1021/la011017d.

12. Riul, A.; Gallardo Soto, A. M.; Mello, S. V.; Bone, S.; Taylor, D. M.; Mattoso, L. H. C.

An electronic tongue using polypyrrole and polyaniline. Synth. Met. 2003, 132, 109–116.

13. Richards, E.; Bessant, C.; Saini, S. Multivariate Data Analysis in Electroanalytical Chemistry. *Electroanalysis* 2002, 14, 1533–1542, doi:10.1002/1521-4109(200211)14:22<1533::AID-ELAN1533>3.0.CO;2-T.

14. McIntosh, A. R.; Mišić, B. Multivariate Statistical Analyses for Neuroimaging Data. *Annu. Rev. Psychol.* **2013**, *64*, 499–525, doi:10.1146/annurev-psych-113011-143804.

15. Paulovich, F. V.; Moraes, M. L.; Maki, R. M.; Ferreira, M.; Oliveira Jr., O. N.; de Oliveira, M. C. F. Information visualization techniques for sensing and biosensing. *The Analyst* **2011**, *136*, 1344, doi:10.1039/c0an00822b.

16. Maria Cristina F. de Oliveira; Osvaldo N. Oliveira Jr; Felippe J. Pavinatto; Carlos J. L. Constantino; Fernando V. Paulovich Information Visualization to Enhance Sensitivity and Selectivity in Biosensing. *Biointerphases* 7 **2012**, 1–15, doi:10.1007/s13758-012-0053-7.

17. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 2006, 442, 368–373, doi:10.1038/nature05058.

18. Rivet, C.; Lee, H.; Hirsch, A.; Hamilton, S.; Lu, H. Microfluidics for medical diagnostics and biosensors. *Chem. Eng. Sci.* **2011**, *66*, 1490–1507, doi:10.1016/j.ces.2010.08.015.

19. Prakash, S.; Pinti, M.; Bhushan, B. Theory, fabrication and applications of microfluidic and nanofluidic biosensors. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2012**, *370*, 2269–2303, doi:10.1098/rsta.2011.0498.

20. Parton, J.; Abu-Mandil Hassan, N.; Brown, T. A.; Haswell, S. J.; Brown, K. A.; Shaw,
K. J. Sex identification of ancient DNA samples using a microfluidic device. *J. Archaeol. Sci.*2013, 40, 705–711, doi:10.1016/j.jas.2012.07.012.

21. Sun, Y.; Kwok, Y. C. Polymeric microfluidic system for DNA analysis. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *556*, 80–96.

22. Piruska, A.; Gong, M.; Sweedler, J. V.; Bohn, P. W. Nanofluidics in chemical analysis. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1060–1072, doi:10.1039/B900409M.

23. Daikuzono, C. M.; Dantas, C. A. R.; Volpati, D.; Constantino, C. J. L.; Piazzetta, M. H. O.; Gobbi, A. L.; Taylor, D. M.; Oliveira, O. N.; Riul, A. Microfluidic electronic tongue. *Sens. Actuators B Chem.* 2015, 207, 1129–1135, doi:10.1016/j.snb.2014.09.112.

24. Balciunas, E.; Jonusauskas, L.; Valuckas, V.; Baltriukiene, D.; Bukelskiene, V.; Gadonas, R.; Malinauskas, M. Lithographic microfabrication of biocompatible polymers for tissue engineering and lab-on-a-chip applications. In *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care Iii*; Popp, J., Drexler, W., Tuchin, V. V., Matthews, D. L., Eds.; Spie-Int

Soc Optical Engineering: Bellingham, 2012; Vol. 8427 ISBN 978-0-8194-9119-0.

25. Coltro, W. K. T.; Piccin, E.; Carrilho, E.; Jesus, D. P. de; Silva, J. A. F. da; Silva, H. D. T. da; Lago, C. L. do Microssistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. *Quím. Nova* 2007, *30*, 1986–2000, doi:10.1590/S0100-40422007000800034.

26. Burdallo, I.; Jimenez-Jorquera, C.; Fernández-Sánchez, C.; Baldi, A. Integration of microelectronic chips in microfluidic systems on printed circuit board. *J. Micromechanics Microengineering* **2012**, *22*, 105022, doi:10.1088/0960-1317/22/10/105022.

27. Abgrall, P.; Gué, A.-M. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review. *J. Micromechanics Microengineering* **2007**, *17*, R15–R49, doi:10.1088/0960-1317/17/5/R01.

28. Rios, A.; Zougagh, M.; Avila, M. Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *740*, 1–11, doi:10.1016/j.aca.2012.06.024.

29. Cheng, S.; Wu, Z. Microfluidic electronics. *Lab. Chip* **2012**, *12*, 2782, doi:10.1039/c2lc21176a.

30. Nichols, J.; Landry, E. L.; Born, B.; Wiltshire, M.; Collier, C. M.; Holzman, J. F. Optical sensing for on-chip digital microfluidics. In *Microfluidics, Biomems, and Medical Microsystems X*; Becker, H., Gray, B. L., Eds.; Spie-Int Soc Optical Engineering: Bellingham, 2012; Vol. 8251 ISBN 978-0-8194-8894-7.

31. Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sens. Actuators B Chem.* **1990**, *1*, 244–248, doi:10.1016/0925-4005(90)80209-I.

32. Chow, A. W. Lab-on-a-chip: Opportunities for chemical engineering. *AIChE J.* 2002, 48, 1590–1595.

33. Dittrich, P. S.; Manz, A. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 210–218, doi:10.1038/nrd1985.

34. Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Butte, M. J.; Whitesides, G. M. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1340–1342, doi:10.1002/ange.200603817.

35. Xia, Y.; Si, J.; Li, Z. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *77*, 774–789, doi:10.1016/j.bios.2015.10.032.

36. Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, 277, 1232–1237, doi:10.1126/science.277.5330.1232.

37. Decher, G.; Hong, J.-D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1991**, *46*, 321–327, doi:10.1002/masy.19910460145.

38. Godman, N. P.; DeLuca, J. L.; McCollum, S. R.; Schmidtke, D. W.; Glatzhofer, D. T. Electrochemical Characterization of Layer-By-Layer Assembled Ferrocene-Modified Linear Poly(ethylenimine)/Enzyme Bioanodes for Glucose Sensor and Biofuel Cell Applications. *Langmuir* **2016**, *32*, 3541–3551, doi:10.1021/acs.langmuir.5b04753.

39. Maximino, M. D.; Martin, C. S.; Paulovich, F. V.; Alessio, P. Layer-by-Layer Thin Film of Iron Phthalocyanine as a Simple and Fast Sensor for Polyphenol Determination in Tea Samples. *J. Food Sci.* **2016**, *81*, C2344–C2351, doi:10.1111/1750-3841.13394.

40. Graça, J. S.; de Oliveira, R. F.; de Moraes, M. L.; Ferreira, M. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer films of microperoxidase-11 and liposome-encapsulated glucose oxidase. *Bioelectrochemistry* **2014**, *96*, 37–42, doi:10.1016/j.bioelechem.2014.01.001.

41. Yang, M.; Yang, Y.; Yang, H.; Shen, G.; Yu, R. Layer-by-layer self-assembled multilayer films of carbon nanotubes and platinum nanoparticles with polyelectrolyte for the fabrication of biosensors. *Biomaterials* **2006**, *27*, 246–255, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.077.

42. Borato, C. E.; Leite, F. L.; Mattoso, L. H.; Goy, R. C.; Campana Filho, S. P.; de Vasconcelos, C. L.; da Trindade Neto, C. G.; Pereira, M. R.; Fonseca, J. L.; Oliveira, O. N. Layer-by-layer films of poly (o-ethoxyaniline), chitosan and chitosan-poly (methacrylic acid) nanoparticles and their application in an electronic tongue. *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.* **2006**, *13*, 1101–1109.

43. Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J. Adv. Res.* **2015**, *6*, 105–121, doi:10.1016/j.jare.2013.07.006.

44. Romero, M. R.; Wolfel, A.; Igarzabal, C. I. A. Smart valve: Polymer actuator to moisture soil control. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *234*, 53–62, doi:10.1016/j.snb.2016.04.104.

45. Bardajee, G. R.; Hooshyar, Z.; Farsi, M.; Mobini, A.; Sang, G. Synthesis of a novel thermo/pH sensitive nanogel based on salep modified graphene oxide for drug release. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *72*, 558–565, doi:10.1016/j.msec.2016.11.109.

46. Koutsopoulos, S. Self-assembling peptide nanofiber hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine: Progress, design guidelines, and applications: Self-Assembling Peptides in Tissue Engineering and Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2016**, *104*, 1002–1016, doi:10.1002/jbm.a.35638.

47. Zhang, C.; Losego, M. D.; Braun, P. V. Hydrogel-Based Glucose Sensors: Effects of Phenylboronic Acid Chemical Structure on Response. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 3239–3250, doi:10.1021/cm401738p.

48. Krishnan, S. T.; Son, K. H.; Kim, N.; Viswanath, B.; Kim, S.; An, J. H. Development of simple and sensitive hydrogel based colorimetric sensor array for the real-time quantification of gaseous ammonia. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *72*, 583–589, doi:10.1016/j.msec.2016.11.112.

49. Mac Kenna, N.; Calvert, P.; Morrin, A. Impedimetric transduction of swelling in pH-responsive hydrogels. *The Analyst* **2015**, *140*, 3003–3011, doi:10.1039/C4AN02252A.

50. Tierney, S.; Volden, S.; Stokke, B. T. Glucose sensors based on a responsive gel incorporated as a Fabry-Perot cavity on a fiber-optic readout platform. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2034–2039, doi:10.1016/j.bios.2008.10.014.

51. Kajisa, T.; Sakata, T. Glucose-responsive hydrogel electrode for biocompatible glucose transistor. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2017**, *18*, 26–33, doi:10.1080/14686996.2016.1257344.

52. Guan, Y.; Zhang, Y. Boronic acid-containing hydrogels: synthesis and their applications. *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, doi:10.1039/c3cs60152h.

53. Lacina, K.; Skládal, P.; James, T. D. Boronic acids for sensing and other applications - a mini-review of papers published in 2013. *Chem. Cent. J.* **2014**, *8*, 60, doi:10.1186/s13065-014-0060-5.

54. Ma, Y.; Yang, X. One saccharide sensor based on the complex of the boronic acid and the monosaccharide using electrochemical impedance spectroscopy. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *580*, 348–352, doi:10.1016/j.jelechem.2005.03.027.

55. klimant, I., Z., G. Fluorescent acrylamide nanoparticles for boronic acid based sugar sensing.

56. Daikuzono, C. M.; Delaney, C.; Tesfay, H.; Florea, L.; Oliveira, O. N.; Morrin, A.; Diamond, D. Impedance spectroscopy for monosaccharides detection using responsive hydrogel modified paper-based electrodes. *The Analyst* **2017**, *142*, 1133–1139, doi:10.1039/C6AN02571D.

57. Wieser, H. Chemistry of gluten proteins. Food Microbiol. 2007, 24, 115-119,

doi:10.1016/j.fm.2006.07.004.

58. Green, P. H. R.; Jabri, B. Celiac Disease. *Annu. Rev. Med.* **2006**, *57*, 207–221, doi:10.1146/annurev.med.57.051804.122404.

59. Czaja-Bulsa, G. Non coeliac gluten sensitivity–A new disease with gluten intolerance. *Clin. Nutr.* **2015**, *34*, 189–194.

60. Pinto, A.; Polo, P. N.; Henry, O.; Redondo, M. C. B.; Svobodova, M.; O'Sullivan, C.
K. Label-free detection of gliadin food allergen mediated by real-time apta-PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 515–524, doi:10.1007/s00216-013-7475-z.

61. Barsoukov, E.; Macdonald, J. R. *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*; John Wiley & Sons, 2005; ISBN 978-0-471-71622-8.

62. Hanley, J. A. Appropriate uses of Multivariate Analysis. *Annu. Rev. Public Health*1983, 4, 155–180, doi:10.1146/annurev.pu.04.050183.001103.

63. Riul, A.; de Sousa, H. C.; Malmegrim, R. R.; dos Santos, D. S.; Carvalho, A. C. P. L. F.; Fonseca, F. J.; Oliveira, O. N.; Mattoso, L. H. C. Wine classification by taste sensors made from ultra-thin films and using neural networks. *Sens. Actuators B Chem.* **2004**, *98*, 77–82, doi:10.1016/j.snb.2003.09.025.

64. Liu, M.; Wang, J.; Li, D.; Wang, M. Electronic Tongue Coupled with Physicochemical Analysis for the Recognition of Orange Beverages. *J. Food Qual.* **2012**, *35*, 429–441, doi:10.1111/jfq.12004.

65. Polshin, E.; Rudnitskaya, A.; Kirsanov, D.; Legin, A.; Saison, D.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R.; Nicolaï, B. M.; Lammertyn, J. Electronic tongue as a screening tool for rapid analysis of beer. *Talanta* **2010**, *81*, 88–94, doi:10.1016/j.talanta.2009.11.041.

66. Campos, I.; Alcañiz, M.; Aguado, D.; Barat, R.; Ferrer, J.; Gil, L.; Marrakchi, M.; Martínez-Mañez, R.; Soto, J.; Vivancos, J.-L. A voltammetric electronic tongue as tool for water quality monitoring in wastewater treatment plants. *Water Res.* **2012**, *46*, 2605–2614, doi:10.1016/j.watres.2012.02.029.

67. Da Silva, J.; Prudencio, S.; Carrão-Panizzi, M.; Gregorut, C.; Fonseca, F.; Mattoso, L. Study on the flavour of soybean cultivars by sensory analysis and electronic tongue. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2012**, *47*, 1630–1638, doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03013.x.

68. Guhmann, M.; Preis, M.; Gerber, F.; Pöllinger, N.; Breitkreutz, J.; Weitschies, W. Development of oral taste masked diclofenac formulations using a taste sensing system. *Int. J. Pharm.* **2012**, *438*, 81–90, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.08.047.

69. Jokerst, J. C.; Emory, J. M.; Henry, C. S. Advances in microfluidics for environmental analysis. *The Analyst* **2012**, *137*, 24, doi:10.1039/c1an15368d.

70. Khandurina, J.; Guttman, A. Bioanalysis in microfluidic devices. J. Chromatogr. A
2002, 943, 159–183, doi:10.1016/S0021-9673(01)01451-0.

71. Marle, L.; Greenway, G. M. Microfluidic devices for environmental monitoring. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 795–802, doi:10.1016/j.trac.2005.08.003.

72. Kim, H.-J.; Lee, K.; Kumar, S.; Kim, J. Dynamic sequential layer-by-layer deposition method for fast and region-selective multilayer thin film fabrication. *Langmuir* **2005**, *21*, 8532–8538.

73. DeRocher, J. P.; Mao, P.; Han, J.; Rubner, M. F.; Cohen, R. E. Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolytes in Nanofluidic Devices. *Macromolecules* **2010**, *43*, 2430–2437, doi:10.1021/ma902451s.

Alessio, P.; Leopoldo Constantino, C. J.; Daikuzono, C. M.; Riul, A.; de Oliveira, O.
N. Analysis of Coffees Using Electronic Tongues. In *Electronic Noses and Tongues in Food Science*; Elsevier, 2016; pp. 171–177 ISBN 978-0-12-800243-8.

75. Zucolotto, V.; Ferreira, M.; Cordeiro, M. R.; Constantino, C. J. L.; Balogh, D. T.; Zanatta, A. R.; Moreira, W. C.; Oliveira, O. N. Unusual Interactions Binding Iron Tetrasulfonated Phthalocyanine and Poly(allylamine hydrochloride) in Layer-by-Layer Films. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 3733–3737, doi:10.1021/jp027573d.

Smith, R. R.; Smith, A. P.; Stricker, J. T.; Taylor, B. E.; Durstock, M. F. Layer-by-layer assembly of poly(3,4-ethylenedioxythiophene): Poly(3,4-ethylenedioxythiophene): poly(styrenesulfonate). *Macromolecules* 2006, *39*, 6071–6074, doi:10.1021/ma060775d.

77. Zheng, S.; Tao, C.; He, Q.; Zhu, H.; Li, J. Self-assembly and Characterization of Polypyrrole and Polyallylamine Multilayer Films and Hollow Shells. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3677–3681, doi:10.1021/cm0493546.

78. DAIKUZONO, C.M.; SHIMIZU, F.M.; MANZOLI, A.; RIUL Jr., A.; PIAZZETTA, M.H.O.; GOBBI, A.L.; CORRÊA, D.S.; PAULOVICH, F.V.; OLIVEIRA Jr., O. Information visualization and feature selection methods applied to detect gliadin in gluten-containing foodstuff with a microfluidic electronic tongue. ACS Applied Materials and Interfaces, **2017**, 9 (23), 19646-19652.

79. Mahajan, A.; Kumar, A.; Singh, M.; Pathak, D.; Bedi, R. K. Structural, optical and electrical characterization of water soluble Copper phthalocyanine based films. *Optoelectron. Adv. Mater.-Rapid Commun.* **2012**, *6*, 755–760.

80. STORTI, F.C Estudo da Arquitetura Molecular de filmes Layer-by-Layer de Ftalocianina Tetrasulfonada de Cobre, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita

filho": Presidente Prudente, 2008.

81. Farah, A. A.; Rutledge, S. A.; Schaarschmidt, A.; Lai, R.; Freedman, J. P.; Helmy, A.
S. Conductivity enhancement of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate)
films post-spincasting. *J. Appl. Phys.* 2012, *112*, 113709-113709–8,
doi:doi:10.1063/1.4768265.

82. Garreau, S.; Louarn, G.; Buisson, J. P.; Froyer, G.; Lefrant, S. In Situ Spectroelectrochemical Raman Studies of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDT). *Macromolecules* **1999**, *32*, 6807–6812, doi:10.1021/ma9905674.

83. Li, M.; Wei, Z.; Jiang, L. Polypyrrole nanofiber arrays synthesized by a biphasic electrochemical strategy. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 2276, doi:10.1039/b800289d.

84. Hou, Y.; Zhang, L.; Chen, L. Y.; Liu, P.; Hirata, A.; Chen, M. W. Raman characterization of pseudocapacitive behavior of polypyrrole on nanoporous gold. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 3523, doi:10.1039/c3cp54497d.

Moraes, M. L.; Petri, L.; Oliveira, V.; Olivati, C. A.; de Oliveira, M. C. F.; Paulovich,
F. V.; Oliveira, O. N.; Ferreira, M. Detection of glucose and triglycerides using information visualization methods to process impedance spectroscopy data. *Sens. Actuators B Chem.*2012, *166–167*, 231–238, doi:10.1016/j.snb.2012.02.046.

86. Schubert-Ullrich, P.; Rudolf, J.; Ansari, P.; Galler, B.; Führer, M.; Molinelli, A.; Baumgartner, S. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 69–81, doi:10.1007/s00216-009-2715-y.

87. Haraszi, R.; Chassaigne, H.; Maquet, A.; Ulberth, F. Analytical methods for detection of gluten in food—method developments in support of food labeling legislation. *risk* 2011, *10*, 22.

88. Bertoncello, P. An investigation on the self-aggregation properties of sulfonated copper(II) phthalocyanine (CuTsPc) thin films. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *321*, 106–112, doi:10.1016/j.colsurfa.2008.01.054.

89. Kumar, A.; Singh, A.; Debnath, A. K.; Samanta, S.; Aswal, D. K.; Gupta, S. K.; Yakhmi, J. V. Room temperature ppb level Cl2 sensing using sulphonated copper phthalocyanine films. *Talanta* **2010**, *82*, 1485–1489, doi:10.1016/j.talanta.2010.07.026.

90. Popineau, Y.; Bonenfant, S.; Cornec, M.; Pezolet, M. A study by infrared Spectroscopy of the conformations of gluten proteins differing in their gliadin and glutenin compositions. **1994**, *20*, 15–22.

91. Kretschmer, C. B. Spectroscopy and optical rotatory dispersion of zein, wheat gluten
and gliadin. 1957, 61, 1627–1631.

92. Mangavel, C.; Barbot, J.; Popineau, Y.; Guégen, J. Evolution of Wheat Gliadins Conformation during Film Formation: A Fourier Transform Infrared Study.

93. Zhu, Z.; Song, H.; Xu, J.; Liu, C.; Jiang, Q.; Shi, H. Significant conductivity enhancement of PEDOT:PSS films treated with lithium salt solutions. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2015**, *26*, 429–434, doi:10.1007/s10854-014-2417-x.

94. Lee, J.; Choi, W. Surface Modification of Sulfur Cathodes with PEDOT: PSS Conducting Polymer in Lithium-Sulfur Batteries. *J. Electrochem. Soc.* **2015**, *162*, A935–A939.

95. Martin, D. C.; Wu, J.; Shaw, C. M.; King, Z.; Spanninga, S. A.; Richardson-Burns, S.; Hendricks, J.; Yang, J. The Morphology of Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene). *Polym. Rev.*2010, *50*, 340–384, doi:10.1080/15583724.2010.495440.

96. Tintula, K. K.; Pitchumani, S.; Sridhar, P.; Shukla, A. K. A solid-polymer-electrolyte direct methanol fuel cell (DMFC) with Pt-Ru nanoparticles supported onto poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and polystyrene sulphonic acid polymer composite as anode. *J. Chem. Sci.* **2010**, *122*, 381–389, doi:10.1007/s12039-010-0043-6.

97. Molina, J.; Zille, A.; Fernández, J.; Souto, A. P.; Bonastre, J.; Cases, F. Conducting fabrics of polyester coated with polypyrrole and doped with graphene oxide. *Synth. Met.* **2015**, *204*, 110–121, doi:10.1016/j.synthmet.2015.03.014.

98. Cetiner, S.; Kalaoglu, F.; Karakas, H.; Sarac, A. S. Dielectric, FTIR Spectroscopic and Atomic Force Microscopic Studies on Polypyrrole-poly(acrylonitrile-co-vinyl acetate) Composites. *Polym. Compos.* **2011**, *32*, 546–557, doi:10.1002/pc.21075.

99. Qiao, Y. S.; Shen, L. Z.; Guo, Y.; Liu, J. H.; Meng, S. M. Polypyrrole films prepared on self-assembled silane monolayers and applications. *Mater. Technol.* **2015**, *30*, 182–188, doi:10.1179/1753555714Y.000000245.

100. Costa, M. B. G.; Juárez, J. M.; Martínez, M. L.; Beltramone, A. R.; Cussa, J.; Anunziata, O. A. Synthesis and characterization of conducting polypyrrole/SBA-3 and polypyrrole/Na–AlSBA-3 composites. *Mater. Res. Bull.* **2013**, *48*, 661–667, doi:10.1016/j.materresbull.2012.11.030.

101. Rawal, I.; Sehrawat, K.; Kaur, A. Vibrational spectroscopic investigations of ammonia gas sensing mechanism in polypyrrole nanostructures. *Vib. Spectrosc.* **2014**, *74*, 64–74, doi:10.1016/j.vibspec.2014.07.012.

102. Huang, X.; Leduc, C.; Ravussin, Y.; Li, S.; Davis, E.; Song, B.; Li, D.; Xu, K.; Accili,

D.; Wang, Q.; Leibel, R.; Lin, Q. A differential dielectric affinity glucose sensor. *Lab Chip* **2014**, *14*, 294–301.

103. Chung, J.; So, H.; Choi; Wong, T. K. S. Recent advances in noninvasive glucose monitoring. *Med. Devices Evid. Res.* **2012**, *5*, 45–52, doi:10.2147/MDER.S28134.

104. Gao, W.; Emaminejad, S.; Nyein, H. Y. Y.; Challa, S.; Chen, K.; Peck, A.; Fahad, H. M.; Ota, H.; Shiraki, H.; Kiriya, D.; Lien, D.-H.; Brooks, G. A.; Davis, R. W.; Javey, A. Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis. *Nature* **2016**, *529*, 509–514, doi:10.1038/nature16521.

105. Olarte, O.; Chilo, J.; Pelegri-Sebastia, J.; Barbé, K.; Moer, W. V. Glucose detection in human sweat using an electronic nose. In *2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*; 2013; pp. 1462–1465.

106. Badugu, R.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. A glucose sensing contact lens: a noninvasive technique for continuous physiological glucose monitoring. *J. Fluoresc.* **2003**, *13*, 371–374.

107. Malik, S.; Khadgawat, R.; Anand, S.; Gupta, S. Non-invasive detection of fasting blood glucose level via electrochemical measurement of saliva. *SpringerPlus* **2016**, 1–12.

108. Rodbard, D. Continuous Glucose Monitoring: A Review of Successes, Challenges, and Opportunities. *Diabetes Technol. Ther.* **2016**, *18*, 3–13, doi:10.1089/dia.2015.0417.

109. Mickelsen, O.; Keys, A. The Composition of Sweat, with Special Reference to the Vitamins. *J. Biol. Chem.* **1943**, *149*, 479–490.

110. Wang, J. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 814–825, doi:10.1021/cr068123a.

111. Anzai, J. Recent progress in electrochemical biosensors based on phenylboronic acid and derivatives. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *67*, 737–746, doi:10.1016/j.msec.2016.05.079.

112. Kim, Y.; Jang, G.; Kim, D.; Kim, J.; Lee, T. S. Fluorescence sensing of glucose using glucose oxidase incorporated into a fluorophore-containing PNIPAM hydrogel. *Polym Chem* **2016**, *7*, 1907–1912, doi:10.1039/C5PY02026C.

113. Wang, H.; Yi, J.; Velado, D.; Yu, Y.; Zhou, S. Immobilization of Carbon Dots in Molecularly Imprinted Microgels for Optical Sensing of Glucose at Physiological pH. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 15735–15745, doi:10.1021/acsami.5b04744.

114. Tura, A.; Sbrignadello, S.; Barison, S.; Conti, S.; Pacini, G. Impedance spectroscopy of solutions at physiological glucose concentrations. *Biophys. Chem.* **2007**, *129*, 235–241, doi:10.1016/j.bpc.2007.06.001.

115. Badugu, R.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. Noninvasive Continuous Monitoring of

Physiological Glucose Using a Monosaccharide-Sensing Contact Lens. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 610–618, doi:10.1021/ac0303721.

116. Fang, H.; Kaur, G.; Wang, B. Progress in Boronic Acid-Based Fluorescent Glucose Sensors. J. Fluoresc. 2014, 14, 481–489, doi:10.1023/B:JOFL.0000039336.51399.3b.

117. Lerner, M. B.; Kybert, N.; Mendoza, R.; Villechenon, R.; Bonilla Lopez, M. A.; Charlie Johnson, A. T. Scalable, non-invasive glucose sensor based on boronic acid functionalized carbon nanotube transistors. *Appl. Phys. Lett.* **2013**, *102*, 183113, doi:10.1063/1.4804438.

118. Wang, Q., Kaminska, I., Niedziolka-Jonsson, J., Boukherroub, R., Szunerits, S. *Biosensors and Bioelectronics*, **2013**, 50, 331.

119. Ma,Y., Yang, X. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2005, 580, 348-352.

120. Kim, A.; Mujumdar, S. K.; Siegel, R. A. Swelling Properties of Hydrogels Containing Phenylboronic Acids. *Chemosensors* **2013**, *2*, 1–12.

121. Tierney, S., Volden, S., Stokke, T.B. Biosensors and bioelectronics, 2009,24, 2034.

122. Zhang, C., Losego, D.M., Braun, V.P. Chemistry of Materials, 2013, 25, 3239.

123. Shang, J.; Yan, J.; Zhang, Z.; Huang, X.; Maturavongsadit, P.; Song, B.; Jia, Y.; Ma, T.; Li, D.; Xu, K.; Wang, Q.; Lin, Q. A hydrogel-based glucose affinity microsensor. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *237*, 992–998.

124. Peres, A. M.; Dias, L. G.; Veloso, A. C. A.; Meirinho, S. G.; Morais, J. S.; Machado, A. A. S. C. An electronic tongue for gliadins semi-quantitative detection in foodstuffs. *Talanta* 2011, *83*, 857–864, doi:10.1016/j.talanta.2010.10.032.

125. Yuan, J.; Mecerreyes, D.; Antonietti, M. Poly(ionic liquid)s: An update. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 1009–1036, doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.04.002.

126. Yuan, J.; Antonietti, M. Poly(ionic liquid)s: Polymers expanding classical property profiles. *Polymer* **2011**, *52*, 1469–1482, doi:10.1016/j.polymer.2011.01.043.

127. Kim, T. Y.; Lee, H. W.; Stoller, M.; Dreyer, D. R.; Bielawski, C. W.; Ruoff, R. S.; Suh,
K. S. High-Performance Supercapacitors Based on Poly(ionic liquid)-Modified Graphene
Electrodes. *ACS Nano* 2011, *5*, 436–442, doi:10.1021/nn101968p.

Cetó, X.; González-Calabuig, A.; Crespo, N.; Pérez, S.; Capdevila, J.; Puig-Pujol, A.;
 Valle, M. de. Electronic tongues to assess wine sensory descriptors. *Talanta* 2017, *162*, 218–224, doi:10.1016/j.talanta.2016.09.055.

129. Dias, L. A.; Peres, A. M.; Veloso, A. C. A.; Reis, F. S.; Vilas-Boas, M.; Machado, A. A.S. C. An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with

bovine milk. Sens. Actuators B Chem. 2009, 136, 209–217, doi:10.1016/j.snb.2008.09.025.

130. Nery, E. W.; Kubota, L. T. Integrated, paper-based potentiometric electronic tongue for the analysis of beer and wine. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *918*, 60–68, doi:10.1016/j.aca.2016.03.004.

131. Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Whitesides, G. M.; Carrilho, E. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Anal. Chem.* 2010, *82*, 3–10.