

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

LUÍS MARCOS CERDEIRA FERREIRA

Sistemas Microfluídicos Amperométricos
Utilizando Enzimas Imobilizadas

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

05/04/2011

LUÍS MARCOS CERDEIRA FERREIRA

**Sistemas Microfluídicos Amperométricos Utilizando
Enzimas Imobilizadas**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Química)*

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F383s Ferreira, Luís Marcos Cerdeira
Sistemas microfluídicos amperométricos utilizando enzimas
imobilizadas / Luís Marcos Cerdeira Ferreira. -- São Paulo,
2011.
87p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Angnes, Lúcio.

1. Análise instrumental : Química 2. Análise por injeção em
fluxo : Química 3. Química eletroanalítica I. T. II. Angnes,
Lúcio, orientador.

543.08 CDD

*Dedico ao meu pai, Expedito, exemplo de respeito
e hombridade e à minha mãe, Calmesina, por me
ensinar o quão alto é possível voar sem tirar os pés
do chão.*

Agradecimentos

Aos meus estimados irmãos Francisco e Júlio que compartilham comigo a mesma garra e determinação herdada dos nossos pais.

Ao professor Lúcio Angnes pela orientação, apoio, amizade e todos os ensinamentos ao longo do mestrado.

Ao professor Renato Camargo Matos pelo incentivo e amizade nos primeiros passos na vida científica e todos os amigos do NUPIS em Juiz de Fora.

Aos professores Ivano Gutz, Mauro Bertotti, Silva Serrano, Fábio Rocha e Jorge Masini, pelos ensinamentos em química eletroanalítica e análise em fluxo que contribuíram e muito para o desenvolvimento do projeto de mestrado.

Aos professores Claudimir L. do Lago, Jivaldo R. Matos e João Pedro S. Farah pelos ensinamentos “extraclasse” e pelos momentos de descontração.

A minha grande e querida amiga Pollyana, companheira incansável das intermináveis jornadas estudando termodinâmica, equilíbrio e cinética, química quântica e todas aquelas físicas e cálculos, desde graduação até as matérias da pós-graduação. Parceira nas baladas, nas risadas e nas conversas intelectuais que acabavam virando piada.

Ao Douglas e a Heloizy, pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer e fazer amizade. Que me ajudaram nas horas mais difíceis e que me fizeram rir nas horas mais inesperadas.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica, LAIA: Jhonny (Brutus), Fabiana (Fabs), Iranaldo (Ira), André, Ivan (Avogadrinho), Renatinha, Lúcia, Eric (Pop), Guilherme (Splinter), Marcelo (Padre), Marcelo (Belezma), Thiago (Baby), Thiago (Rei), Fernando (Ferds), Vinicius (Vinny), Kellinton, Denis (Pimenta), Mauro (Clapeyron), Carlos, Alexandre (Peixe), Minoru e Paolo. Eles são, simplesmente, sensacionais.

Aos amigos do Laboratório de Métodos Eletroanalíticos e Sensores Eletroquímicos e do Laboratório de Análise em Fluxo.

Ao CNPq pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro

Agradeço à necessidade na dose certa, a liberdade para errar, cair, levantar, fazer e sorrir.

“Nada acontece a menos que sonhemos antes”

Carl Sandburg

“Há ao menos duas maneiras básicas de conseguir sucesso na vida. Ou você possui um talento excepcional em alguma área de atividade e explora isso, ou você segue o caminho comum e correto de disciplina, estudo, esforço, humildade, privações e trabalho para conseguir o que deseja. Em qualquer uma delas, não existe sonhos se realizando da noite pro dia. Nenhuma árvore nasce, cresce e oferece frutos instantaneamente. Tudo demanda trabalho, paciência e dedicação. E também não existe sorte. O que existe é estar no lugar certo, na hora certa – mas não por coincidência, mas por estar ativo no jogo! Não existe essa estória de marcar um gol estando no banco de reservas. Você tem que estar em campo, chamando o jogo pra si, tomando a responsabilidade: a responsabilidade por si próprio, de quem faz a própria vida, e de quem não espera, mas faz acontecer.”

Augusto Branco

Resumo

Ferreira, L.M.C. **Sistemas Microfluídicos Amperométricos Utilizando Enzimas Imobilizadas**. 2011. 87p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um sistema microfluídico, contendo, como componente principal, um reator enzimático constituído de um microcanal fabricado em substrato de poli(metacrilato de metila) e um sistema amperométrico como detector. Para a construção de microcanais foi utilizando equipamento de usinagem a laser de CO₂ para escavar os microcanais, que a seguir foram selados termicamente. A superfície interna desse microcanal foi submetida à modificação química com poli(etilenoimina), que se mostrou eficiente para posterior imobilização da enzima glicose oxidase, utilizando glutaraldeído como agente de ligação covalente cruzada, gerando assim um microrreator para determinação amperométrica de glicose. O peróxido de hidrogênio gerado na reação enzimática foi detectado em uma célula eletroquímica em fluxo, localizada externamente ao reator, com eletrodo de platina como eletrodo de trabalho. Uma bomba peristáltica programável foi empregada para promover a injeção de amostra, utilizando tubulação de pequeno diâmetro (0,3 mm), permitindo alcançar reprodutibilidade para a injeção de pequenos volumes, tipicamente da ordem de 5 microlitros de solução. O sistema proposto foi utilizado para a determinação amperométrica diferencial de glicose presente em amostras de refrigerantes, apresentando boa repetibilidade (DPR = 1,72%, n = 50), limite de detecção apreciável ($1,40 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), elevada frequência de amostragem (345 amostras h⁻¹) e relativa estabilidade a longo prazo (420 determinações em mais de 20 dias com perda de atividade menor que 50%). As análises realizadas com o sistema proposto neste estudo levaram a resultados concordantes com os obtidos pelo método espectrofotométrico clássico, utilizado para análise de glicose em fluídos biológicos.

Palavras-chave: Sistemas microfluídicos; análise em fluxo; amperometria; Imobilização enzimática; glicose.

Abstract

Ferreira, L.M.C. **Amperometric Microfluidic Systems Using Immobilized Enzymes**. 2011. 87p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This work describes the development of a microfluidic system having as a main component an enzymatic reactor constituted by a microchannel assembled in poly(methyl methacrylate) substrate, connected to an amperometric detector. To manufacture the microchannels, a CO₂ laser ablation machine was utilized to engrave the channels, which in sequence were thermally sealed. The internal surfaces of the microchannels were chemically modified with poly(ethyleneimine) which showed good effectiveness for the immobilization of glucose oxidase enzymes using glutaraldehyde as crosslinking agent, producing in this way a microreactor effective for the amperometric detection of glucose. The hydrogen peroxide generated in the enzymatic reaction was detected in the electrochemical flow cell, localized outside of the reactor, using platinum as the working electrode. A programmable peristaltic pump was utilized to inject the samples, utilizing tubes with small diameter (0.3 mm), allowing attain reproducibility even for injections of small volumes, in the order of 5 microliters of solution. The proposed system was applied for differential amperometric determination of glucose content in soft drinks, showing good repeatability (DPR = 1.72%, n = 50) low detection limit ($1,40 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), high sample frequency (345 samples h⁻¹) and relatively good stability for long term (420 determinations along more than 20 days, with a decrease of activity lower than 50%). The analysis performed with the system proposed in this study lead to results which agree with those obtained by the classical spectrophotometric method, utilized to analyze glucose in biological fluids.

Keywords: Microfluidic systems; flow analysis; amperometry; enzymatic immobilization; glucose.

Lista de Figuras

<i>Figura 1: Configuração de um sistema de injeção em fluxo em linha única: A: amostra; C: Carreador; i: injetor; B: Bobina de reação; D: Detector; W: Descarte.....</i>	21
<i>Figura 2: Principais etapas do processo de microfabricação: A) escolha do substrato; B) construção de microestruturas sobre os substratos (canais, bombas, detectores, etc.); C) Inserção da cobertura (selagem do microdispositivo).....</i>	24
<i>Figura 3: Etapas gerais de um processo de microfabricação por fotolitografia: (A) substrato após deposição da camada metálica; (B) deposição de fotorresiste; (C) sensibilização do fotorresiste por radiação UV ou raios X; (D) revelação do fotorresiste; (E) remoção da camada do fotorresiste; (F) corrosão da camada do substrato; (G) remoção da camada metálica e (H) adição de cobertura.</i>	25
<i>Figura 4: Ilustração do processo de microfabricação por ablação a laser de CO₂ em um substrato polimérico adequado: A) Feixe de laser incidindo sobre a superfície; B) vaporização e condensação do material polimérico; C) Formação dos microcanais; D) Inserção de uma cobertura.....</i>	27
<i>Figura 5: Fórmulas estruturais do ácido acrílico (a) e do PMMA (b).....</i>	29
<i>Figura 6: Representação de funcionalização e imobilização de compostos bioativos por ligação covalente.....</i>	37
<i>Figura 7: Estrutura da poli(etilenoimina).....</i>	38
<i>Figura 8: Ilustração esquemática dos dois tipos de mecanismo de funcionalização da superfície de PMMA com PEI via adsorção eletrostática, em pH 7, ou por ligação covalente em pH 11. (Adaptada de BAY, Y. (2006) [71]).</i>	39
<i>Figura 9: Equipamento de gravação a laser de CO₂, modelo LS100 da Gravograph, utilizado nos experimentos.</i>	41
<i>Figura 10: Ilustração dos três modos de ablação da LS100. As figuras mostram como seriam as ablações nos modos: vetorial, raster e pontilhado em um modelo de corte em “T”.....</i>	42
<i>Figura 11: Parâmetros ajustáveis no equipamento de ablação a laser. Em destaque estão os principais ajustes das ablações para cada uma das cores na primeira coluna. As subsequentes, em destaque, indicam a porcentagem de potência do laser e a velocidade do suporte.</i>	43

<i>Figura 12: Representação esquemática da montagem da célula em fluxo utilizada nos experimentos.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 13: Configuração do reator com módulo de injeção: (I) conexão com o propulsor pneumático (entrada do fluxo carreador); (II) Conexão com o injetor (bomba peristáltica); (III) saída pra a célula de detecção.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 14: Configuração esquemática do sistema em fluxo proposto, empregado para a determinação de glicose: (a) propulsor pneumático; (b) regulador de vazão; (c) frasco contendo solução carreadora; (d) bomba peristáltica (injetor); (e) frasco contendo amostra ou solução padrão; (f) reator de PMMA com GOD imobilizada; (g) célula de detecção; (h) potenciostato; (i) microcomputador para aquisição de dados; (j) descarte. Em detalhe: fotografia do reator com as conexões para os componentes externos.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 15: Variação da corrente de oxidação de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em função da vazão de injeção em diferentes condições de vazão do eletrólito carreador (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$): (\square) $0,10$; (\circ) $0,25$ e (Δ) $0,50 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$, Tempo de injeção: $0,5 \text{ s}$.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 16: Sinais transientes obtidos para injeções de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrólito KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ 0: (A) vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; (B) vazão de injeção: $516 \mu\text{L min}^{-1}$; vazão do carreador: $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 17: Injeção de $2,9 \mu\text{L}$ azul de metileno: (A) antes e (B) durante a injeção; tempo de injeção: $0,5 \text{ s}$; vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; vazão do carreador: $0,35 \text{ mL min}^{-1}$.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 18: Variação da corrente de oxidação de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em função do volume injetado. Vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; Vazão do eletrólito carreador: (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$): $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$.</i>	<i>54</i>
<i>Figura 19: Resposta amperométrica para três injeções consecutivas de $8,0 \mu\text{L}$ ($1,4 \text{ s}$ a vazão de injeção de $344 \mu\text{L min}^{-1}$) de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ seguida de injeção em volume infinito. Vazão do carreador: $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 20: Resposta amperométrica para injeções sucessivas de $2,9 \mu\text{L}$ de $K_4[Fe(CN)_6]$ $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ diluído em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A) e em água (B). Tempo de injeção: $0,5 \text{ s}$; vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; vazão do carreador: $0,25 \mu\text{L min}^{-1}$. $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 21: Representação esquemática das etapas do processo de modificação da superfície interna no microcanal de PMMA e imobilização de GOD.</i>	<i>58</i>

<i>Figura 22: Efeito da concentração de PEI na resposta amperométrica de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de D-glicose em reator de $500 \mu\text{m}$ de largura tratado com GOD 500 U mL^{-1} em glutaraldeído 1 %.....</i>	59
<i>Figura 23: Injeções sucessivas de D-glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes reatores modificados com (\diamond) 1,0 %; (\circ) 1,5%; (\bullet) 2,0% (m/m) de solução aquosa de PEI.....</i>	60
<i>Figura 24: Imagem ampliada da superfície modificada do reator antes (A) e após (B) processo de lixiviação forçada em reator modificado com PEI 2 % (m/m).....</i>	61
<i>Figura 25: Efeito da concentração da enzima GOD na resposta amperométrica de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de D-glicose em reator de $500 \mu\text{m}$ de largura tratado com PEI 1,0 % (m/m).....</i>	62
<i>Figura 26: Imagem ampliada do reator antes (A) e após (B) o tratamento com as soluções de PEI 1% (m/m) e GOD 400 U mL^{-1} em tampão fosfato pH 7 em meio de glutaraldeído 1% (m/v).....</i>	63
<i>Figura 27: Imagem ampliada das seções transversais dos canais com largura interna de 304, 507, 710, 901 e $1005 \mu\text{m}$.</i>	64
<i>Figura 28: Resposta em sinais transientes de corrente normalizada, utilizando reatores produzidos com diferentes larguras: (A) Injeção de $2,9 \mu\text{L}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$; (B) Injeção de $2,9 \mu\text{L}$ de D-glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7; $E = 0,7 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$. Tempo de injeção: 0,5 s; vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; vazão do carreador: $350 \mu\text{L min}^{-1}$.....</i>	65
<i>Figura 29: Efeito do pH na resposta amperométrica de D-glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $E = 0,7 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$. Injeção de $2,9 \mu\text{L}$ (tempo de injeção: 0,5 s; vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$); vazão do carreador: $350 \mu\text{L min}^{-1}$.</i>	67
<i>Figura 30: Resposta amperométrica para 50 injeções de D-Glicose $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7; $E = 0,6 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$; Vazão do carreador: $250 \mu\text{L min}^{-1}$; volume injetado: $5,7 \mu\text{L}$ (vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; tempo de injeção: 1,0 s). Em detalhe, o perfil do sinal transiente de corrente da 10.^a injeção e o intervalo de tempo de limpeza (t_L).....</i>	70
<i>Figura 31: Resposta amperométrica inter-dias para injeção de D-Glicose $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7; $E = 0,6 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$; Vazão do carreador: $250 \mu\text{L min}^{-1}$; volume injetado: $5,7 \mu\text{L}$ (vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; tempo de injeção: 1,0 s).....</i>	71
<i>Figura 32: Resposta amperométrica para injeções em triplicata de D-glicose em concentrações crescentes: (i) $2,5 \times 10^{-6}$; (ii) $5,0 \times 10^{-6}$; (iii) $7,5 \times 10^{-6}$; (iv) $1,0 \times 10^{-5}$; (v) $2,5 \times 10^{-5}$;</i>	

(vi) $5,0 \times 10^{-5}$; (vii) $7,5 \times 10^{-5}$; (viii) $1,0 \times 10^{-4}$; (ix) $2,5 \times 10^{-4}$; (x) $5,0 \times 10^{-4}$; (xi) $1,0 \times 10^{-3}$; (xii) $2,5 \times 10^{-3}$; (xiii) $5,0 \times 10^{-3}$; (xiv) $7,5 \times 10^{-3}$; (xv); $1,0 \times 10^{-2}$ (xvi); $2,5 \times 10^{-2}$ (xvii) $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.
Condições: eletrólito tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7; $E = 0,6 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$; Vazão do carreador: $250 \mu\text{L min}^{-1}$; volume injetado: $5,7 \mu\text{L}$ (vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; tempo de injeção: $1,0 \text{ s}$)..... 72

Figura 33: Relação entre corrente e concentração de glicose. À direita, as duas curvas obtidas para as faixas lineares de concentração. 73

Figura 34: Resposta amperométrica para padrões de D-glicose $P_1: 2,5 \times 10^{-4}$; $P_2: 5,0 \times 10^{-4}$; $P_3: 1,0 \times 10^{-3}$; $P_4: 1,5 \times 10^{-3}$; $P_5: 2,0 \times 10^{-3}$; $P_6: 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e para as cinco amostras de refrigerante (A_1 a A_5); em detalhe a curva analítica obtida e as injeções de glicose com reator não modificado. Condições: eletrólito tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7; $E = 0,6 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$; Vazão do carreador: $250 \mu\text{L min}^{-1}$; volume injetado: $5,7 \mu\text{L}$ (vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; tempo de injeção: $1,0 \text{ s}$)..... 75

Lista de Siglas e Abreviaturas

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoadsorvente ligado à enzima)

FEO: Fluxo Eletrosmótico

FIA: Flow Injection Analysis (Análise por Injeção em Fluxo)

FNAB: 1-fluoro-2-nitro-azobenzeno

GOD: Glicose oxidase

IgG: Imunoglobulina G

IMER: Immobilized enzyme reactor (Reator com enzima imobilizada)

LOC: Lab-On-a-Chip

MMA: Metacrilato de metila

PC: Policarbonato

PDMS: Poli(dimetilsiloxano)

PE: Polietileno

PEI: Poli(etilenoimina)

PET: Poli(etilenotereftalato)

PMMA: Poli(metacrilato de metila)

PP: Polipropileno

PS: Poliestireno

PTFE: Poli(tetrafluor etileno)

μ -FIA: Micro Flow Injection Analysis

μ -TAS: Micro Total Analysis System (Microsistemas de Análises Totais)

Sumário

1. Introdução.....	17
2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo Principal	20
2.2. Objetivos Específicos	20
3. Revisão Bibliográfica	21
3.1. Sistemas de análise por injeção em fluxo miniaturizados	21
3.2. Métodos empregados na microfabricação	23
3.3. Utilização de polímeros orgânicos como substratos para confecção de microcanais	27
3.3.1. Poli(metacrilato de metila).....	29
3.4. Microrreatores	30
3.5. Modificação de superfícies poliméricas e imobilização enzimática	33
3.5.1. Poli(etilenoimina) como agente modificador da superfície de PMMA	37
4. Parte Experimental	40
4.1. Reagentes e Soluções	40
4.2. Instrumentação.....	40
4.3. Fabricação de microcanais em PMMA	41
4.3.1 Procedimento.....	43
4.4. Célula de Detecção:	44
4.5. Injeção de amostras de propulsão de fluidos.....	45
4.6. Modificação da superfície interna do canal.....	47
4.7. Procedimentos de análise	47
4.7.1. Análise amperométrica diferencial em fluxo	48
4.7.2. Espectrofotometria	48
5. Resultados e Discussões.....	49
5.1. Composição e avaliação do sistema em fluxo	49
5.2. Injeção de amostra	50

5.3. Modificação da superfície interna do canal e imobilização de glicose oxidase.....	57
5.4. Efeito da concentração de PEI.....	58
5.5. Efeito da concentração de GOD	62
5.6. Efeito das dimensões internas do canal.....	64
5.7. Otimização de metodologia analítica para quantificação de glicose	66
5.8. Estudo do Efeito do pH	67
5.8.1. Estudo dos parâmetros do sistema FIA	68
6. Conclusões e Perspectivas.....	77
7. Referências Bibliográficas	79
ANEXO: Súmula Curricular.....	87

1. Introdução

A partir da década de 1960, várias ramificações da ciência foram atingidas por uma tendência mundial que vem se consolidando nos últimos tempos: a miniaturização de sistemas, principalmente nos ramos de eletrônica e de informática. Na área de química analítica, esta tendência não é diferente e os benefícios dessa nova tendência têm produzido uma verdadeira revolução, assim como ocorreu com as outras vertentes da ciência e tecnologia [1].

O primeiro dispositivo analítico produzido em microescala surgiu em 1979 [2], com a construção de um cromatógrafo a gás miniaturizado, constituído basicamente de um injetor, coluna cromatográfica, escavada em espiral, em uma placa de silício de 5 cm de diâmetro, usado na separação de misturas de hidrocarbonetos. Entretanto, apesar da eficiência do dispositivo, o mesmo não teve grande repercussão na comunidade científica [3].

A pesquisa sobre os microdispositivos somente se intensificou na década de 1990, quando foram propostos os novos conceitos de μ -TAS (*Micro Total Analysis Systems*) e LOC (*Lab-on-a-Chip*), tornando possível a integração de várias etapas analíticas (injeção de amostra, separações, detecção, entre outros) em um único dispositivo, proporcionando vantagens como o aumento da eficiência analítica, expressiva redução do tempo de análise e consumo de reagentes, bem como a praticidade e portabilidade, oriundas do tamanho reduzido dos aparelhos [3].

Os μ -TAS vêm sendo utilizados de forma ampla em diversos tipos de análises como ambientais [4], diagnósticos clínicos [5] e até sequenciamento de DNA [6]. Dentre as várias técnicas analíticas que podem ser desenvolvidas em *microchips* destacam-se, além dos sistemas em fluxo em geral [7], a cromatografia em fase gasosa [8], cromatografia líquida de alta eficiência [9] e, principalmente, a eletroforese capilar [10] devido à relativa simplicidade de sua instrumentação e as facilidades em relação ao transporte dos fluidos. Unidos a essas

técnicas são encontrados os vários modos de detecção: ópticos [11-12], eletroquímicos [13-16] e os chamados modos de detecção acoplados (espectroscopia de massas, ressonância magnética nuclear, entre outros) [17-18].

As principais vantagens associadas à detecção eletroquímica estão no fato de que a resposta do detector deve-se, na maioria das técnicas, aos equilíbrios na superfície eletródica. Dessa forma, o sistema de detecção independe do volume interno da célula eletroquímica, diferentemente dos detectores ópticos de absorção, nos quais os limites de detecção são prejudicados devido à restrição do caminho óptico.

Com o nascimento das pesquisas em microfabricação, surgiu o conceito de microrreação. Enzimas são um dos catalisadores mais utilizados em microrreatores por serem úteis em produzir um ambiente “quimicamente amigável” (ou seja, proporcionam uma eficiência catalítica sem necessidade de condições experimentais extremas de temperatura, pH ou pressão), e ao seu grande potencial para aplicações analíticas diversas, por apresentarem excelente estabilidade, tempo de resposta e seletividade [19].

Atualmente, poucos sistemas que envolvem processos enzimáticos são comercializados devido a dificuldades relacionadas à instabilidade e ao custo alto das enzimas purificadas. Assim sendo, cresce cada vez mais a demanda para inovações em processos analíticos enzimáticos.

Uma das enzimas mais utilizadas em análises é a glicose oxidase devido à importância biológica do seu substrato, a glicose, e devido a sua fácil manipulação e estabilidade, sendo muitas vezes empregadas como “enzima modelo” em métodos de imobilização em biossensores e reatores com enzima imobilizada (IMERs, do inglês, *Immobilized Enzyme Reactors*).

A GOD catalisa a oxidação da β -D-Glicose pelo oxigênio formando ácido glucônico e H_2O_2 . Essa enzima contém um grupo prostético, o dinucleotídeo flavina adenina (FAD), que confere à enzima a capacidade de catalisar reações de oxirredução.

A maioria das aplicações analíticas de IMERs que utilizam glicose oxidase visa à determinação de glicose através da detecção do peróxido de hidrogênio formado durante a reação enzimática, por ser uma espécie química facilmente detectável por diferentes métodos, tais como espectrofotométricos e amperométricos [20-21].

2. Objetivos

2.1. Objetivo Principal

Fabricação e avaliação de dispositivo microfluídico em substrato de poli(metacrilato de metila) compostos de microcanal quimicamente modificado com poli(etilenoimina) para imobilização de glicose oxidase.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Otimizar as condições de modificação da superfície interna do microcanal ao que se refere à concentração dos reagentes empregados.
- ✓ Avaliar os parâmetros de montagem e a configuração do sistema em fluxo, assim como o desempenho dos componentes injeção e detecção, bem como os parâmetros dimensionais do microrreator.
- ✓ Otimização dos parâmetros do sistema proposto para otimização de metodologia analítica para quantificação de glicose e aplicação deste sistema na determinação amperométrica diferencial de glicose em amostras de refrigerantes.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Sistemas de análise por injeção em fluxo miniaturizados

A análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês, *Flow Injection Analysis*) pode ser definida como um processo de automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução aquosa é introduzida em um fluido carreador que transporta a amostra até o detector.

Durante o transporte a amostra pode receber reagentes, sofrer reações químicas e passar por etapas de separação, concentração, entre outras. [22]. Um sistema FIA simples, em linha única, é ilustrado na *Figura 1*.

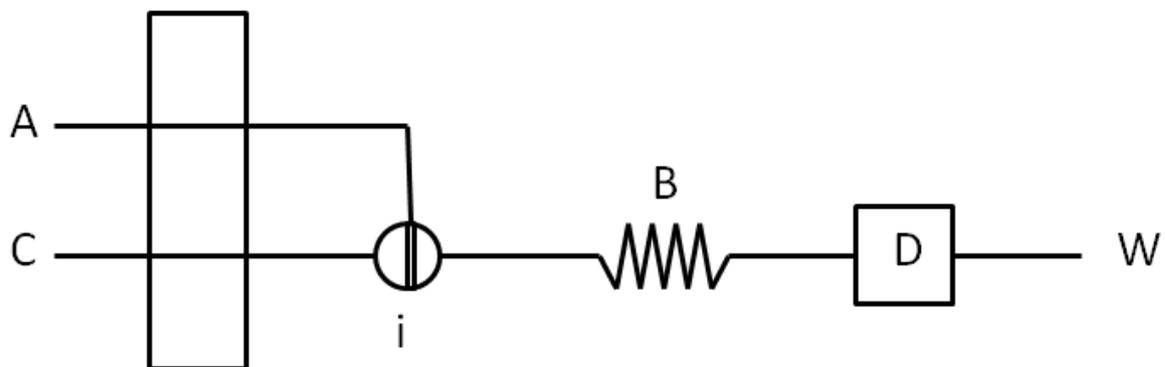


Figura 1: Configuração de um sistema de injeção em fluxo em linha única: A: amostra; C: Carreador; i: injetor; B: Bobina de reação; D: Detector; W: Descarte.

Um sistema FIA pode facilmente ser submetido à miniaturização. Com a redução das dimensões, algumas vantagens de um sistema “macro” são mantidas e até mesmo melhoradas. Um sistema μ -FIA, assim como outros sistemas miniaturizados, reduz o consumo de reagentes e a geração de resíduos, acelera o processamento das amostras e, geralmente, torna o sistema portátil. Porém, deve-se ressaltar que, apesar das inúmeras

vantagens aliadas à miniaturização, algumas desvantagens podem surgir. Microcanais são facilmente entupidos, devido ao seu pequeno diâmetro. Para a realização de análises envolvendo amostras reais, isso representa um problema em potencial. Por isso, devem ser tomadas medidas especiais como, por exemplo, a filtração.

A redução do volume de amostra em alguns casos pode acarretar uma significativa diminuição de sensibilidade. Nestes casos, o detector deve ser ajustado de forma a ter a mesma funcionalidade do seu equivalente “macro”. Este aspecto causa algumas restrições a determinadas formas de detecção, sobretudo as baseadas em espectroscopia de absorção, devido à redução do caminho óptico. Dessa forma, estas devem ser usadas com adaptações especiais ou com algumas restrições.

Por esta razão, os sistemas de detecção eletroquímicos são preferencialmente utilizados, pois a sua conveniente aplicabilidade em ambientes reduzidos permite que o módulo de detecção seja inteiramente integrado ao microchip durante processo de fabricação, já que este é um ponto importante a ser considerado, uma vez que é uma das ideias centrais dos μ -TAS [3]. Entretanto, ainda existem na literatura propostas de microdispositivos em que o sistema de detecção ocupa um volume maior que a parte microfluídica [23-24].

Um módulo de propulsão de fluidos convencionais pode ser utilizado, desde que seja apto a promover o controle de vazões de pequena magnitude. Existe a possibilidade de se trabalhar com bombas de pistão altamente precisas. Estas bombas podem gerar o fluxo que é necessário para um sistema miniaturizado.

Minibombas piezoelétricas ou mesmo peristálticas também são utilizadas pra reduzir o tamanho do sistema, aumentando sua portabilidade. Formas alternativas, como uso de propulsores pneumáticos com algumas adaptações, também podem ser utilizados gerando bom desempenho [25, 26].

Outra forma de impulsionar a solução é fazer uso do fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês, *Electroosmotic Flow*). Utilizado comumente em dispositivos eletroforéticos, o EOF também pode ser utilizado em um sistema μ -FIA mesmo não se almejando uma separação analítica. A geração de um EOF para o transporte os reagentes e das amostras através de um sistema μ -FIA, no entanto, está sujeito a certas limitações físico-químicas [27].

Atualmente, a disponibilidade de microválvulas e microbombas ainda é relativamente restrita. Embora muito progresso já tenha sido feito, ainda é difícil obter os itens para integrar todo o microssistema, como válvulas, bombas e detectores citados anteriormente. Por causa disso, formas alternativas para incorporação dos componentes vêm sendo utilizadas. Uma revisão detalhada das diferentes bombas disponíveis foi feita por Van Kuijk [28].

3.2. Métodos empregados na microfabricação

Geralmente, os microdispositivos são formados basicamente por dois substratos planos nos quais são usinados os microcanais. No interior destes microcanais é onde ocorre a maioria dos processos analíticos. Após a construção desses canais, vários aspectos ainda devem ser considerados, dentre os quais as estratégias para manipulação dos fluidos dentro dos microcanais, o tipo de injeção e a detecção, dentre outros.

Uma vez escolhidos estes parâmetros, é necessário realizar a otimização das condições de análise requeridas por cada tipo de determinação. Seguindo esses preceitos é possível configurar um microssistema analítico eficiente e versátil.

Mesmo existindo uma grande variedade de materiais e processos para a confecção de dispositivos microfluídicos, pode-se pensar na maioria dos processos de microfabricação contendo, basicamente, três etapas fundamentais: a escolha de uma base, que confere sustentação mecânica ao dispositivo, onde são usinados os canais e introduzidos a maioria

dos componentes e conexões em uma segunda etapa; e a inserção de uma cobertura, geralmente composta do mesmo material que a base, como mostrado na *Figura 2*.

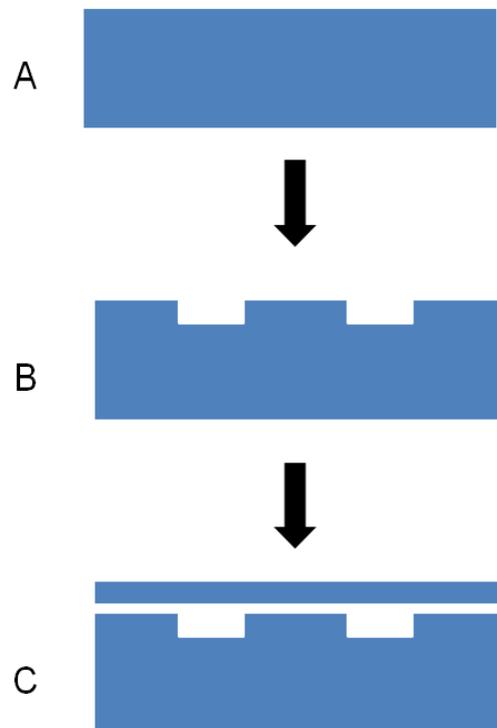


Figura 2: Principais etapas do processo de microfabricação: A) escolha do substrato; B) construção de microestruturas sobre os substratos (canais, bombas, detectores, etc.); C) Inserção da cobertura (selagem do microdispositivo).

Existem diversas metodologias para fabricação de dispositivos microfluídicos. Tipicamente, utiliza-se uma fonte energética para fazer a transferência da imagem dos microcanais para o substrato utilizado. Os mais utilizados são os processos fotolitográficos [29-30]. A fotolitografia foi a primeira técnica utilizada para construção de dispositivos microfluídicos, como uma adaptação das primeiras etapas de fabricação industrial de componentes eletrônicos micrométricos.

A técnica consiste na escolha do substrato (geralmente vidro, silício ou quartzo) fotografação dos microcanais em um polímero fotossensível (denominado fotorresiste) e

corrosão do substrato. Uma fina camada metálica (geralmente de cromo ou ouro) é depositada sobre o substrato, através da técnica de “*sputtering*” ou evaporação térmica, para atuar como uma máscara na etapa de corrosão do substrato, sendo que a camada do metal é depositada para aumentar a aderência da camada de ouro à superfície.

Para a etapa de fotogravação, inicialmente uma camada de fotorresiste é depositada sobre o filme metálico. A radiação UV ou raios X atinge seletivamente a superfície do fotorresiste após atravessar uma máscara, posicionada entre a fonte de radiação e o substrato.

As máscaras convencionais, com resolução da ordem de 1 μm , são fabricadas em uma placa de vidro recoberta por filme fino de cromo, no qual é gravado, também por fotolitografia, o padrão dos microcanais a serem transferidos para o substrato [3]. A *Figura 3* ilustra as etapas de microfabricação pelo método fotolitográfico.

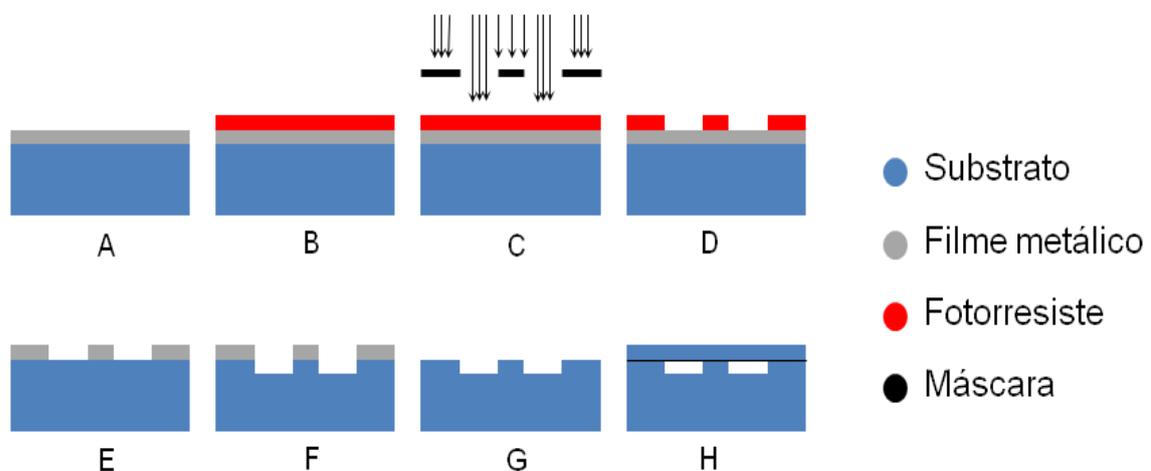


Figura 3: Etapas gerais de um processo de microfabricação por fotolitografia: (A) substrato após deposição da camada metálica; (B) deposição de fotorresiste; (C) sensibilização do fotorresiste por radiação UV ou raios X; (D) revelação do fotorresiste; (E) remoção da camada do fotorresiste; (F) corrosão da camada do substrato; (G) remoção da camada metálica e (H) adição de cobertura (selagem).

No entanto, o alto custo de implementação da técnica de fotolitografia propiciou o aparecimento de metodologias alternativas que têm ganhado força não só pelo baixo custo,

mas também pela grande eficiência mesmo quando comparado às técnicas convencionais de microfabricação. Das tecnologias alternativas destacam-se a fabricação por moldagem [31], impressão direta com o uso de toner [32] e ablação a laser [33].

Nas técnicas que utilizam ablação a laser, destaca-se o uso de pequenos lasers de radiação UV direcionados à superfície do substrato. A energia do laser é suficiente para quebrar ligações em uma área extremamente pequena no substrato, ocasionando pequenas explosões locais.

Uma solução menos dispendiosa é a substituição do laser UV por laser emissor de radiação infravermelha. O laser de dióxido de carbono emite radiação eletromagnética com comprimento de onda na região do infravermelho entre 9,4 e 10,6 μm . Esta é a região na qual ocorrem os estiramentos C-C, C-O e C-N, o que o torna apropriado para virtualmente todo tipo de material de natureza orgânica. A energia transferida pelo laser aquece localmente o substrato, provocando sua fusão, ebulição e vaporização (*Figura 4*).

A principal vantagem do uso de laser é a usinagem direta de microcanais, dispensando etapas intermediárias, como no caso da fotolitografia, com a (relativa) desvantagem de sua resolução ser menor. Da Costa [34] apresenta um estudo de um sistema de ablação a laser de CO_2 em diferentes materiais poliméricos.

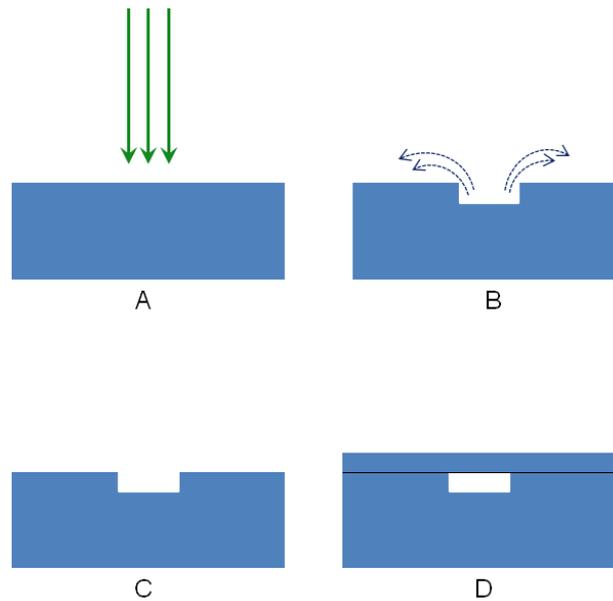


Figura 4: Ilustração do processo de microfabricação por ablação a laser de CO_2 em um substrato polimérico adequado: A) Feixe de laser incidindo sobre a superfície; B) vaporização e condensação do material polimérico; C) Formação dos microcanais; D) Inserção de uma cobertura.

3.3. Utilização de polímeros orgânicos como substratos para confecção de microcanais

A escolha do substrato depende, sobretudo, da função que o dispositivo irá exercer ou da necessidade analítica a qual ele é empregado. De maneira geral, as principais propriedades procuradas em um substrato englobam os aspectos: mecânicos (resistência, adequação ao processo de microfabricação); elétricos (isolante elétrico); ópticos (transparência a radiação UV abaixo de 300 nm e ausência de fluorescência); térmicos (baixa condutividade térmica e possibilidade de selagem a baixas temperaturas); químicos (inércia química perante os reagentes utilizados nos processo analíticos).

Dentre os principais substratos empregados nos processo de fabricação de microdispositivos analíticos destaca-se o uso de silício, vidro, quartzo, cerâmicas metais e uma grande e variada gama de polímeros sintéticos, tais como poli(metacrilato de metila) (PMMA) [35], polietilenotereftalato (PET) [36], polidimetil siloxano (PDMS) [37], entre outros.

Os substratos poliméricos assumiram o papel principal na microfabricação. A enorme quantidade de materiais disponíveis no mercado, que apresentam ampla variedade de propriedades químicas, mecânicas, elétricas e ópticas, bem como as diferentes possibilidades de métodos de microfabricação, permitem a seleção do material adequado para a maioria das aplicações.

Adicionalmente, existe um grande interesse industrial em microdispositivos poliméricos, devido ao seu baixo custo financeiro e sua fácil manipulação, quando comparados a outros materiais como vidro e quartzo, permitindo a fabricação em larga escala e a confecção de dispositivos descartáveis. Os polímeros mais utilizados para esse fim podem ser divididos em três grupos principais: polímeros elastômeros, termofixos e termoplásticos.

Elastômeros são polímeros formados por longas cadeias moleculares entrelaçadas. Quando submetidos a forças externas, estes polímeros permitem o estiramento de sua estrutura e retornam a forma original imediatamente após a força empregada ser removida. O mais empregado na microfabricação é o PDMS, devido, principalmente, a facilidade de replicar estruturas micrométricas através do processo de moldagem, transparência óptica, baixa temperatura de cura e baixa toxicidade.

O grupo dos termofixos é diferenciado pela estrutura inflexível e grande rigidez e, geralmente, quando expostos a altas temperaturas, estes polímeros sofrem decomposição térmica ao invés de fundir. Apesar disso, os polímeros termofixos são bastante utilizados para a fabricação de microdispositivos, sobretudo os poliésteres [38] como substratos e os fotorresistes, como o SU-8 [39].

O grupo dos termoplásticos engloba os polímeros que apresentam perda de rigidez em temperaturas próximas à temperatura de transição vítrea, característica essa que permite que o material seja remodelado diversas vezes através do aquecimento. Os exemplos mais comuns em microfabricação são o PMMA, policarbonato (PC), PET, polipropileno (PP) e poliestireno (PS).

3.3.1. Poli(metacrilato de metila)

Polímero acrílico é um nome genérico para os vários polímeros derivados do ácido acrílico (*Figura 5-a*), onde o grupo R representa um átomo de hidrogênio [40,41].

Embora, historicamente, o nome acrílico se refira a uma grande gama de materiais, hoje, ele se popularizou na indústria de plásticos com o nome comercial de poli(metacrilato de metila) (PMMA) (*Figura 5-b*), frente a outros inúmeros nomes comerciais.

O PMMA é um material termoplástico, rígido e incolor; também pode ser considerado um dos polímeros mais modernos dentre os existentes no mercado, por sua facilidade de adquirir formas, sua leveza e alta resistência mecânica. É também chamado vidro acrílico. Um dos fatos que contribuiu para a popularização do acrílico é o fato de ser um polímero termoplástico, o que viabiliza sua reciclagem, fator primordial em termos econômicos e ambientais.

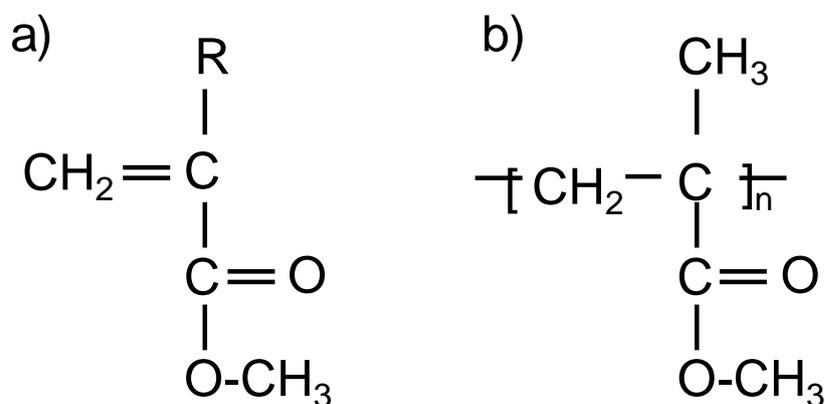


Figura 5: Fórmulas estruturais do ácido acrílico (a) e do PMMA (b).

Além das propriedades mecânicas, o PMMA apresenta características adicionais que contribuem para a sua utilização em microfabricação, tais como: baixa distorção óptica, baixo encolhimento sobre aquecimento; alta absorvidade na região do espectro infravermelho (característica essa que torna esse material altamente compatível com o processo de fabricação por ablação a laser de CO₂);, além de baixa reatividade.

O processo de ablação do PMMA por radiação laser no infravermelho é puramente térmico, ou seja, o feixe do laser aquece localmente, de forma intensa e rápida a superfície do PMMA. Quando o feixe transfere parte de sua energia radiante para o substrato, o PMMA sofre etapas de transição vítrea, seguido de liquefação e, posteriormente, degradação térmica por despolimerização radicalar gerando, majoritariamente, o seu monômero, metilmetacrilato (MMA) [42-47].

3.4. Microrreatores

Um microrreator é normalmente definido como um sistema de reação em miniatura. Este termo é proposto para uma ampla gama de dispositivos de dimensões pequenas, ou seja, dispositivos que possuem tamanho na escala nano, micro e até mesmo milimétrica [48].

O uso desses microdispositivos permite a manipulação de volumes muito pequenos, da ordem de micro e nanolitros e garante, além da diminuição da quantidade de reagentes, uma alta eficiência de reação, seja em processos simples ou biocatalíticos.

Os microrreatores encontram grande aplicabilidade em síntese orgânica [49], na indústria química [50] e farmacêutica [51] e, principalmente, em aplicações envolvendo química analítica [52].

Sistemas analíticos que utilizam reatores miniaturizados são caracterizados pela excelente repetibilidade e reprodutibilidade, principalmente se integrados a sistemas de injeção em fluxo ou a outros sistemas automatizados de análise [53]. Outras vantagens do

uso de microrreatores em química analítica é que eles podem ser acoplados a diferentes técnicas de detecção [54].

Os processos reacionais no interior de um microrreator dependem, sobretudo, dos fenômenos de transferência de massa, ou seja, a mistura em microescala é dependente do tipo de fluxo no qual os reagentes são submetidos e também dos processos de difusão e de convecção.

O número de Reynolds (Re) é um parâmetro adimensional que relaciona as forças inerciais e as forças viscosas da vazão de um fluido (considerado incompressível) e determina se o regime de escoamento desse fluxo através de um canal é laminar ou turbulento.

O número de Reynolds pode ser calculado com a seguinte equação:

$$\text{Re} = \rho v D_h / \mu \quad (\text{I})$$

Onde os parâmetros ρ , v e μ , representam a densidade do fluido, velocidade e viscosidade, respectivamente. D_h é o diâmetro hidráulico. Com $\text{Re} < 2300$, o fluxo pode ser considerado como fluxo laminar. Devido ao seu tamanho reduzido, o fluxo de microcanais é quase sempre laminar.

A difusão é, por definição, o movimento de um fluido de uma zona de maior potencial químico para uma área onde o potencial é menor, ou seja, é o transporte de massa de uma zona de maior concentração para uma de menor concentração [55]. A difusão resulta das propriedades cinéticas das partículas da matéria e pode ser modelada pela equação II:

$$L = 2 (Dt)^{1/2} \quad (\text{II})$$

Onde L é a distância que uma espécie química viaja no tempo t , e D é o coeficiente de difusão da partícula. Como pode ser visto na equação acima, o tempo de movimento para uma partícula é proporcional ao quadrado da escala. Quanto menor a escala, menor o tempo de transporte da partícula.

A difusão entre os dois fluxos laminares em um microdispositivo tem sido utilizada para produzir uma série de diluições diferentes [56].

A mistura é um processo muito importante para a maioria das análises químicas. Uma boa mistura pode ser um fator decisivo para garantir uma análise eficiente. Para uma reação homogênea é facilmente realizada em um macrossistema com agitação mecânica. Contudo, como discutido anteriormente, o fluxo laminar em micro sistema faz da difusão o fator predominante para uma reação, sobretudo se ela for uma reação heterogênea. A difusão, em si, é um processo lento e, em alguns casos, não pode satisfazer a exigência de análises específicas.

Portanto, a incorporação de um microrreator em um dispositivo microfluídico é essencialmente importante em algum momento do ensaio que requer uma reação química. Uma maneira alternativa e simples é diminuir a área sobre a qual a difusão ocorre ou, melhor ainda, alterar a geometria dos canais a fim de gerar turbulência, favorecendo o transporte de massa.

Mudanças bruscas na direção do fluxo aumentam o transporte de massa na direção ortogonal à direção do fluxo, esse efeito é amplificado aumentando-se a vazão. Em um canal reto, sob o regime de fluxo laminar, esse transporte ortogonal é apenas dependente da difusão, podendo ocorrer em um intervalo de tempo muito elevado se as dimensões internas do canal forem muito grandes. Canais com geometrias em “zig-zag”, espirais ou mesmo reatores empacotados favorecem essas alterações na direção do fluxo.

3.5. Modificação de superfícies poliméricas e imobilização enzimática

Polímeros sintéticos, devido às suas características estruturais possuem propriedades físicas e químicas que permitem a modificação da sua superfície para a incorporação de biomoléculas que podem auxiliar em etapas analíticas, muitas vezes operando como bioanalísadores, atuando principalmente nas áreas de biotecnologia, análises clínicas, ambientais e de alimentos.

Além disso, outras características, como baixo custo, alta resistência mecânica, reciclabilidade e potencial para produção em massa, também têm atraído a atenção dos pesquisadores que atuam nessa área. Entretanto os métodos de modificação de superfícies desses polímeros ainda não são bem estabelecidos [57].

O desafio mais importante é encontrar uma metodologia geral para a confecção de superfícies que apresentem propriedades específicas, tais como reatividade e biocompatibilidade.

Dispositivos microfluídicos estão se tornando ferramentas poderosas para realizar análises químicas ou biológicas devido ao aumento da velocidade de análise, com reduzido consumo de amostra e de reagentes. Entretanto, o contínuo avanço das análises bioquímicas em microchip depende do desenvolvimento de tecnologias de modificação de superfícies de maneira simplificada e confiável.

A funcionalização química da superfície dentro dos microcanais deve ser eficiente para a imobilização de compostos bioativos importantes, dentre os quais, muitos com atividade específica, como enzimas e anticorpos.

A imobilização de enzimas em suportes sólidos apresenta, em muitos casos, uma série de vantagens sobre a utilização do composto livre em solução, dentre as quais se destacam o aumento do seu tempo de vida útil e estabilidade em relação à temperatura, aos solventes e à variação da concentração hidrogeniônica sem perda considerável de atividade

catalítica, reutilização e pequeno manuseio da amostra, evitando contaminações e promovendo a fácil separação da enzima dos produtos de reação.

Em química analítica, as principais utilizações de enzimas imobilizadas estão aliadas aos chamados biossensores e aos IMERs. O primeiro consiste em um sensor biológico com atividade catalítica em contato com um transdutor (eletroquímico, óptico, etc.). Este, por sua vez, converte o sinal químico em um sinal elétrico. No segundo, utilizam-se as reações enzimáticas para obter um produto de interesse, ou ainda, para transformar um analito de natureza complexa em uma espécie mais facilmente detectável.

Enzimas imobilizadas em microcanais são mais resistentes e estáveis a trocas de ambiente, e promovem interações em nível molecular mesmo sob a atuação de sistemas em fluxo.

A heterogeneidade dos sistemas com enzimas imobilizadas permite múltiplas reutilizações das mesmas, contínua operação do processo enzimático e grande variabilidade de configurações para os biorreatores.

Vários tipos de abordagens tais como, adsorção física (interações hidrofóbicas, de Van der Waals ou eletrostáticas), encapsulamento sol-gel, emparelhamento receptor-ligante e ligação covalente, têm sido explorados para imobilizar enzimas nas paredes internas dos microcanais [57]. Alguns dos diferentes métodos de modificação de superfícies poliméricas estão listados na *Tabela 1*.

Tabela 1: Aplicação e formas de imobilização de biomoléculas em diferentes superfícies poliméricas.

Substrato	Biomolécula imobilizada	Forma de modificação / imobilização	Referência
	anti-Imunglobulina G	Ligação covalente	58
PMMA	DNA	Ligação covalente	59
	Glicose oxidase	Ligação covalente	60
PP e PE	Peroxidase e Glicose oxidase	Ligação covalente (modificação com FNAB) / Adsorção (imobilização)	61
PS	Peroxidase e Glicose oxidase	Emparelhamento receptor-ligante (biotina-avidina)	62
PDMS	Fosfatase alcalina	Adsorção de fibrinogênio/cross-linking (3-aminopropil-siloxano/glutaraldeído)	63
PET	Tripsina	Adsorção eletrostática / encapsulamento	64
PTFE	Alinase e L-Lactato desidrogenase	Ligação covalente	65

Devido à razão área superficial / volume, as interações interfaciais tornam-se o fator dominante do controle de desempenho do dispositivo analítico, resultando em aumento da taxa reacional. Dessa forma, em poucos segundos pode-se promover uma biotransformação essencialmente total.

As interações entre a superfície do microcanal com a amostra exercem um papel fundamental no desempenho dos microdispositivos. A camada de interface pode ser pouco complexa como um polímero simples, sem tratamento químico, ou tão complexo como uma camada de vários componentes químicos e biológicos.

Como as modificações dos canais representam apenas alterações de superfície, as propriedades mecânicas do dispositivo são mantidas praticamente as mesmas, porém, a biocompatibilidade e a biofuncionalidade são significativamente aumentadas.

Modificar quimicamente a superfície de polímeros sólidos é a forma mais adequada para obter um canal uniformemente ativo. A reação entre polímero e o agente funcionalizante é geralmente irreversível e pode produzir uma superfície significativamente estável.

Imobilizar uma enzima, ou composto bioativo, a um substrato sólido por ligação covalente é feito, geralmente, através da incorporação de grupos funcionais reativos convenientes no substrato, seguido pela inclusão de um agente de ligação cruzada (“*crosslinker*”) que pode atuar como molécula espaçadora.

O “*crosslinker*” é responsável pela ligação entre o composto bioativo e o substrato e também pode melhorar a bioatividade, reduzindo os efeitos estéricos, protegendo o composto (principalmente enzimas) da desnaturação induzida, provocada por interações diretas com a superfície na qual ele é imobilizado. Na *Figura 6* está representado o diagrama geral de modificação de superfícies para biofuncionalização.

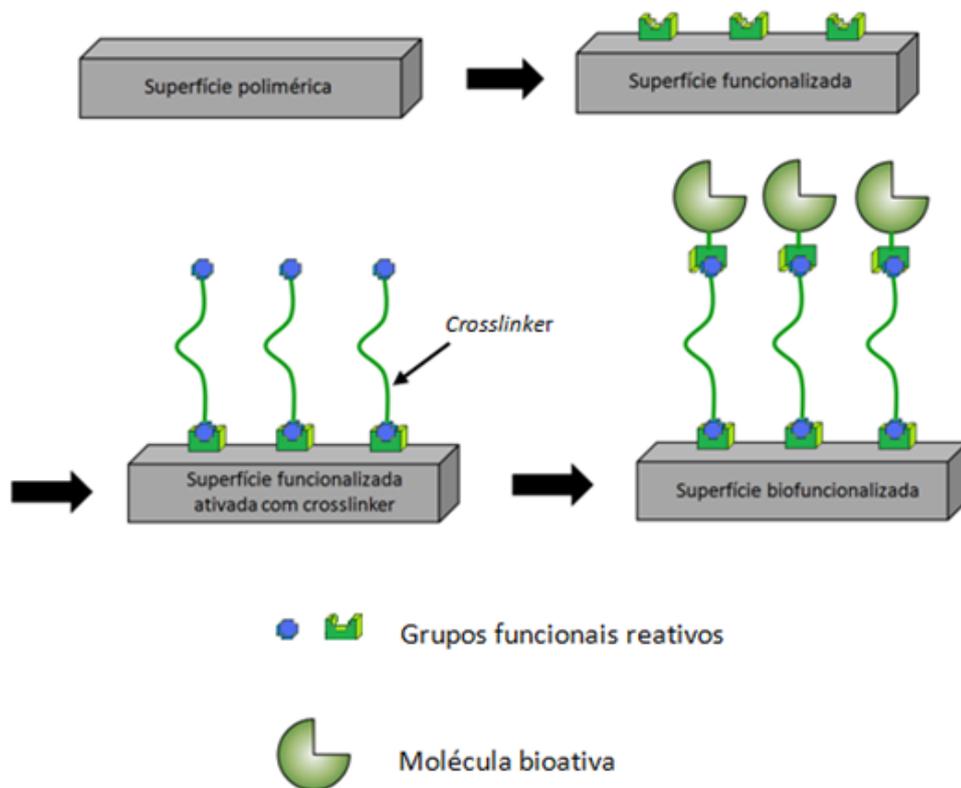


Figura 6: Representação de funcionalização e imobilização de compostos bioativos por ligação covalente

3.5.1. Poli(etilenoimina) como agente modificador da superfície de PMMA

A poli(etilenoimina) (PEI) é um polímero catiônico de cadeia ramificada, possuindo em sua estrutura grupos amino primários (25%), secundários (50%) e terciários (25%) (Figura 7). Devido às suas propriedades eletrostáticas, esse composto tem sido amplamente utilizado na condensação de DNA e proteínas em ensaios biológicos [66]. Em química analítica, ela é empregada para modificação do interior de capilares de sílica fundida e até mesmo em microdispositivos de PMMA para separação eficiente de proteínas catiônicas em eletroforese capilar [67].

Devido ao seu grande número de grupos amino e uma grande carga líquida positiva (que se mantém em uma ampla faixa de pH), a adsorção dessas proteínas é reduzida em virtude da repulsão eletrostática gerada entre a PEI e os analitos.

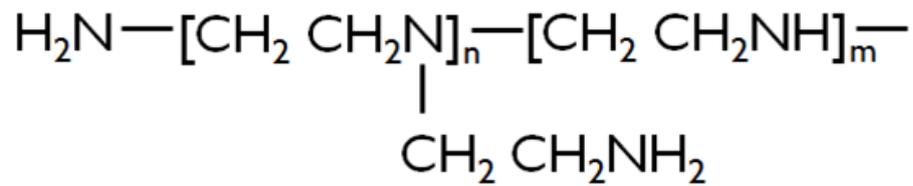


Figura 7: Estrutura da poli(etilenoimina)

Muitos trabalhos na literatura relatam as interações entre PEI e PMMA em diferentes aplicações, tanto biológicas, analíticas ou em química de materiais [67-70]. A ligação entre os dois polímeros pode decorrer da reação entre PEI e o monômero MMA com posterior polimerização.

Outra maneira é a reação de adição-eliminação dos grupos amino primários e secundários presentes na PEI com a carbonila de éster do PMMA, ou seja, por formação de ligações covalentes, ocorrendo efetivamente em pH igual ou maior que 11. O mecanismo pelo qual PEI e PMMA se unem é dependente do pH, como mostrado na *Figura 8*. Devido a esse fato, esse parâmetro deve ser prontamente controlado.

Em valores de pH iguais ou menores que 7, esse processo se dá majoritariamente por ação de adsorção eletrostática devido à natureza catiônica da PEI. Nesse caso, a superfície do PMMA deve ser negativamente carregada, o que pode ser obtido simplesmente por hidrólise básica de seus grupos ésteres.

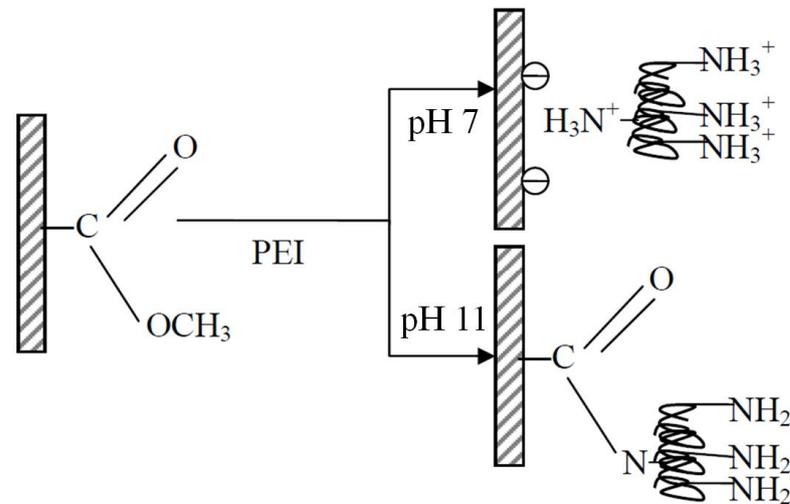


Figura 8: Ilustração esquemática dos dois tipos de mecanismo de funcionalização da superfície de PMMA com PEI via adsorção eletrostática, em pH 7, ou por ligação covalente em pH 11. (Adaptada de BAY, Y. (2006) [71]).

Bay, Y. [71] avaliou a influência das condições de modificação de superfície PMMA com diferentes reagentes portadores de grupamentos amino-terminais para a imobilização de anti-Imunglobulina G em ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), utilizando glutaraldeído como agente de ligação cruzada.

Devido ao grande tamanho das moléculas de PEI, ela pode exercer, além da funcionalização da superfície de PMMA, uma função de molécula espaçadora, assim como o glutaraldeído, preservando a atividade enzimática, impedindo que os sítios ativos da enzima sejam bloqueados.

4. Parte Experimental

4.1. Reagentes e Soluções

Os reagentes de grau analítico utilizados nos experimentos foram ácido bórico, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico e fenol, (Synth). Cloreto de potássio, hidróxido de sódio (MERCK), ácido clorídrico 37% (m/m) (Quimex), ferrocianeto de potássio (QM). Também foram utilizados 4-aminoantipirina e Poli(etilenoimina) (PM 750000) 50% (m/m) em água (Sigma-Aldrich), glutaraldeído 25% (v/v) para síntese e D(+)Glicose (MERCK). Glicose oxidase 124 U mg⁻¹ (Toyobo) e Peroxidase 115 U mg⁻¹ (SEPPIM). Para a dissolução e diluição dos reagentes utilizou-se água deionizada em sistema NANOpure da Barnstead (Resistividade $\geq 18,2$ M Ω cm). Para testes visuais foi utilizada uma solução comercial de azul de metileno (Fiber Art).

4.2. Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostado μ -AUTOLAB type III interfaceado a um computador AMD sepron™ com sistema operacional Windows 2000. As medidas de pH necessárias foram feitas com eletrodo de vidro Metrohm acoplado a um pHmetro Metrohm modelo 827.

As medições espectrofotométricas foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro modelo 600 Plus da Femto, utilizando em todas as medições uma cubeta de acrílico com caminho óptico de 1,00 cm.

Para fazer as imagens de seções transversais e das superfícies internas dos microcanais foi utilizado um microscópio da marca Panasonic modelo GP-KR222. As medidas de comprimento e escala dessas imagens foram averiguadas por meio do software ImageJ 1.44p (*National Institutes of Health - USA*) que possibilita converter o número de

pixels selecionados da imagem em unidades de comprimento através da comparação com uma ponta de referência de 50 μm .

4.3. Fabricação de microcanais em PMMA

O equipamento utilizado para promover as ablações foi um dispositivo laser de CO_2 (*Gravograph Industrie International* modelo L - *Solution 100*) semelhante ao da *Figura 9*, com até 30 W de potência. Ele emite radiação eletromagnética em um comprimento de onda de 10,6 μm e possui uma área utilizável de 460 x 305 mm.

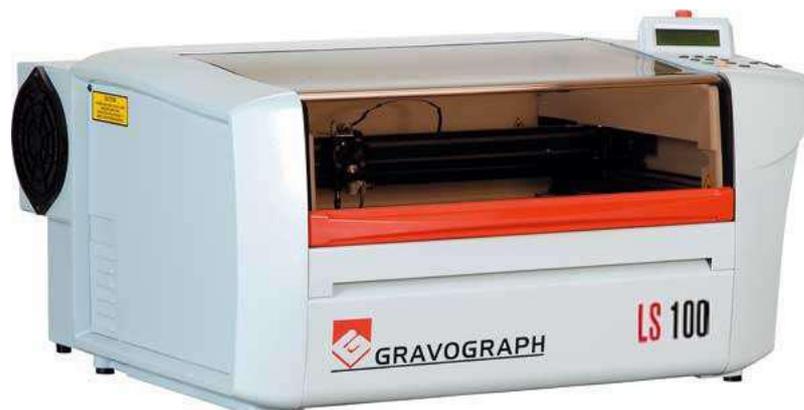


Figura 9: Equipamento de gravação a laser de CO_2 , modelo LS100 da Gravograph, utilizado nos experimentos.

Internamente este sistema laser possui um tubo de plasma acoplado a um gerador de radio frequência e uma base móvel XY, que define a área de atuação do laser. A LS100 possui três modos de fazer as ablações: o modo vetorial, o modo *raster* e o modo pontilhado. A *Figura 10* ilustra como seria a ablação de um “T” nos três diferentes modos. No modo vetorial, o fino feixe de laser faz apenas movimentos em um único sentido. No modo *raster*, o laser hachura a área do desenho fazendo movimentos de ida e volta. O modo pontilhado é semelhante ao modo vetorial, porém o laser é pulsado.

Em todos os dispositivos confeccionados neste trabalho, foi utilizado o modo vetorial para o corte lateral das peças e o modo *raster* para a confecção dos canais. Este modo de corte confere um aumento da rugosidade do microcanal, o que pode favorecer o processo de imobilização enzimática devido ao aumento da área superficial.

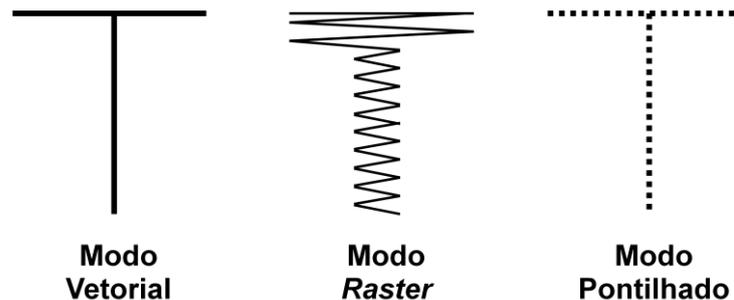


Figura 10: Ilustração dos três modos de ablação da LS100. As figuras mostram como seriam as ablações nos modos: vetorial, raster e pontilhado em um modelo de corte em “T”.

Nota: A representação do modo “*raster*” está ampliada para destacar a forma com que ele é efetuado. Este modo permite ablações com dimensões similares aos demais.

A *Figura 11* mostra a janela do *driver* (programa que viabilizam a comunicação com outros hardwares, como impressoras) da LS100. Esta contém vários parâmetros ajustáveis, (alguns específicos do equipamento e outros para as aplicações comerciais da máquina), e a do ajuste dos cortes. O restante dos parâmetros ajustáveis são configurações secundárias para outros tipos de utilização do laser.

O laser é capaz de processar oito tipos distintos de cores em uma representação gráfica. Para cada uma dessas cores é possível ajustar, independentemente, diferentes parâmetros como: potência de corte, velocidade da base de entrega de laser, distância focal e modo de ablação.

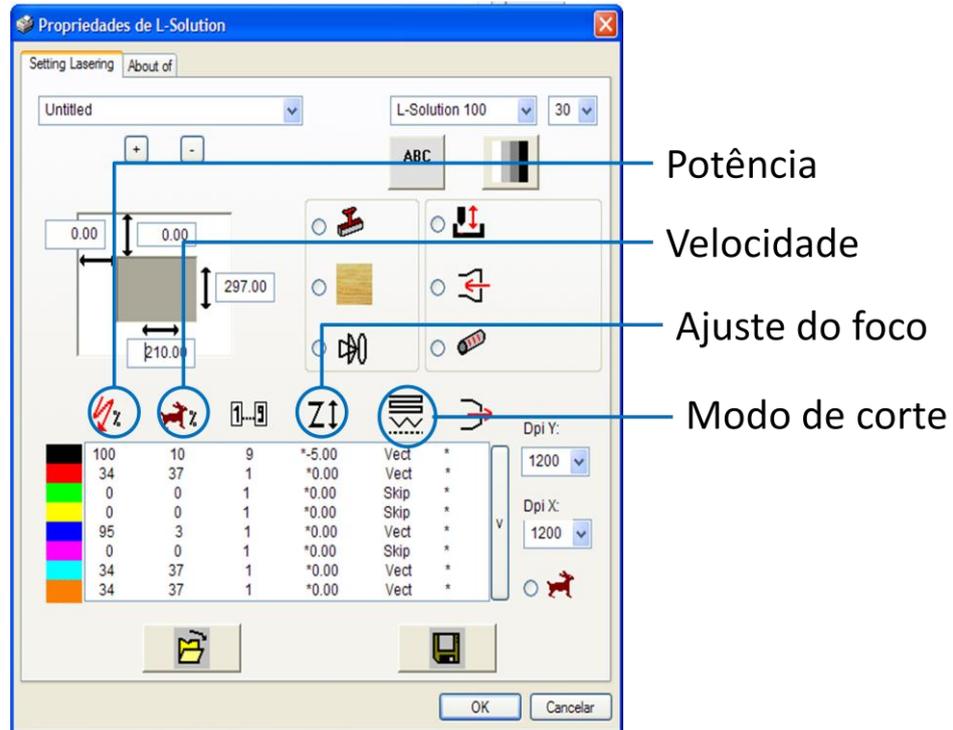


Figura 11: Parâmetros ajustáveis no equipamento de ablação a laser. Em destaque estão os principais ajustes das ablações para cada uma das cores na primeira coluna. As subsequentes, em destaque, indicam a percentagem de potência do laser e a velocidade do suporte.

Os microdispositivos foram planejados em Corel Draw 12 (Corel Corporation - versão 12.0.0.458 - 2003). Este software é favorável a esse tipo de planejamento, pois permite idealizar ablações com resolução de 0,01 mm, além de ser compatível com as definições da impressora LS100.

4.3.1 Procedimento

Foram utilizadas placas de PMMA de 4 mm de espessura (substrato), nos quais eram projetadas as microestruturas e as conexões com o meio externo. Placas de 1 mm de espessura foram utilizadas como cobertura. As dimensões das placas utilizadas como substrato e cobertura possuíam dimensões de 5,5 cm x 8,5 cm.

Para os experimentos de resposta dos reatores modificados, em virtude de suas dimensões internas, foram projetados canais com 12,0 cm de comprimento com larguras de 0,30; 0,50; 0,70; 0,90 e 1,00 mm. A profundidade desses canais foi definida pela potência do laser utilizado, que foi constante em todos os experimentos, com magnitude de 10 % da potência total (cerca de 3,0 W). As dimensões foram averiguadas posteriormente por microscopia óptica.

Após o procedimento de ablação do microcanais, as placas foram lavadas e secas para, posteriormente, serem submetidas ao processo de selagem em prensa térmica (modelo HT3020) a pressão aproximada de 6 kgf cm⁻² e temperatura próxima à transição vítrea do PMMA, cerca de 110 °C, durante 30 minutos. O resfriamento sob pressão correu de forma natural, garantido a eficácia do processo de selagem.

4.4. Célula de Detecção

Durante o desenvolvimento do trabalho foi utilizado um sistema convencional de três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar. Este sistema foi ajustado para ser utilizado em uma pequena célula de camada delgada.

O eletrodo de referência utilizado foi o de Ag/AgCl_(KCl sat.) construído no próprio laboratório adaptado no interior de uma ponteira de micropipeta. O uso desse tipo de eletrodo facilita a miniaturização do sistema por ser facilmente disposto em pequenas dimensões.

Os outros dois eletrodos são constituídos de uma adaptação de uma célula em fluxo comercial composta por dois eletrodos de platina (*Figura 12*), com funções distintas de eletrodo de trabalho e eletrodo auxiliar. A esses dois eletrodos, foi sobreposto um espaçador de polipropileno de 0,2 mm de espessura. Para completar a montagem da célula, uma cobertura de acrílico (2,0 cm x 2,0 cm x 0,5 cm) com orifícios para entrada e saída de líquido

e para a inserção do eletrodo de referência. As três partes foram unidas por quatro parafusos (não mostrados na *Figura 12*) fixados nas extremidades da célula.

A escolha do eletrodo de platina como eletrodo de trabalho está associada à resposta de oxidação eletrocatalítica para peróxido de hidrogênio que pode ser monitorado após a sua produção no microrreator enzimático, podendo a corrente gerada ser usada como resposta analítica para quantificação de glicose [72].

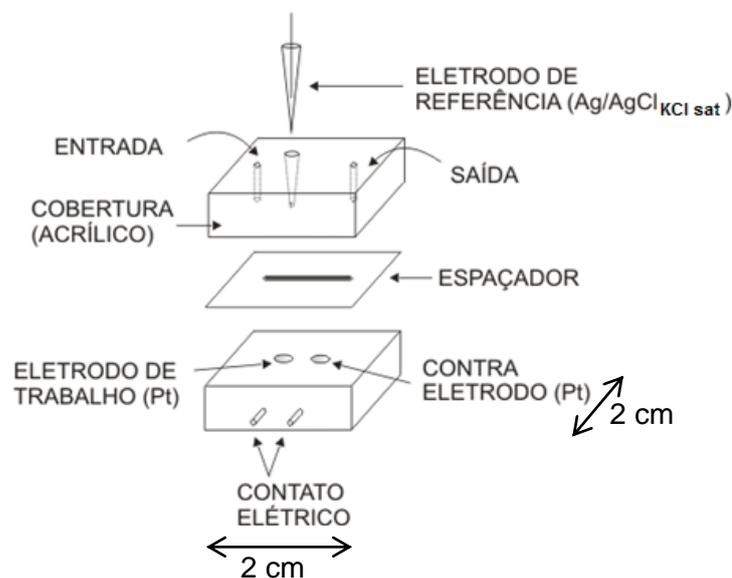


Figura 12: Representação esquemática da montagem da célula em fluxo utilizada nos experimentos

4.5. Injeção de amostras de propulsão de fluidos

Como alternativa de introduzir volumes discretos, reproduzíveis e compatíveis com as dimensões dos canais optou-se por empregar um sistema de injeção temporizado. Para tal, utilizou-se uma bomba peristáltica temporizável Ismatec (modelo *REGLO MS DIGITAL*) de quatro vias. A configuração do reator com o módulo de injeção (*Figura 13*) é baseada num canal conectado à bomba peristáltica, em confluência com a região inicial do reator. Dessa forma, o volume de solução introduzido no sistema em fluxo é definido pela vazão e pelo

intervalo de tempo em que a bomba dispensa o líquido. A geometria do canal de amostragem, na região de confluência é baseada numa angulação aguda para diminuir a possibilidade de entrada do eletrólito carreador no canal de amostragem.

Com o objetivo de diminuir a contribuição negativa na reprodutibilidade do volume injetado, inerente à rotatividade dos roletes da bomba peristáltica, foram empregados tubos de *Tygon* com 0,3 mm de diâmetro interno, de forma que a vazão de injeção seja suficientemente reduzida (máximo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$). Deste modo, é possível utilizar intervalos de tempos de dispensa maiores, o que aumenta a reprodutibilidade das injeções.

A propulsão do fluxo carreador na entrada do canal foi promovida por uma bomba de aquário (propulsor pneumático) de uma via da marca Friska e vazão controlada por um estrangulador (do tipo pinça), posicionado logo após a saída do propulsor.

Para o estudo do componente de injeção no sistema em fluxo proposto foram feitas diversas injeções de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando como solução carreadora KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Foram avaliadas diferentes condições de vazão e tempo de injeção, na presença de um reator não modificado.

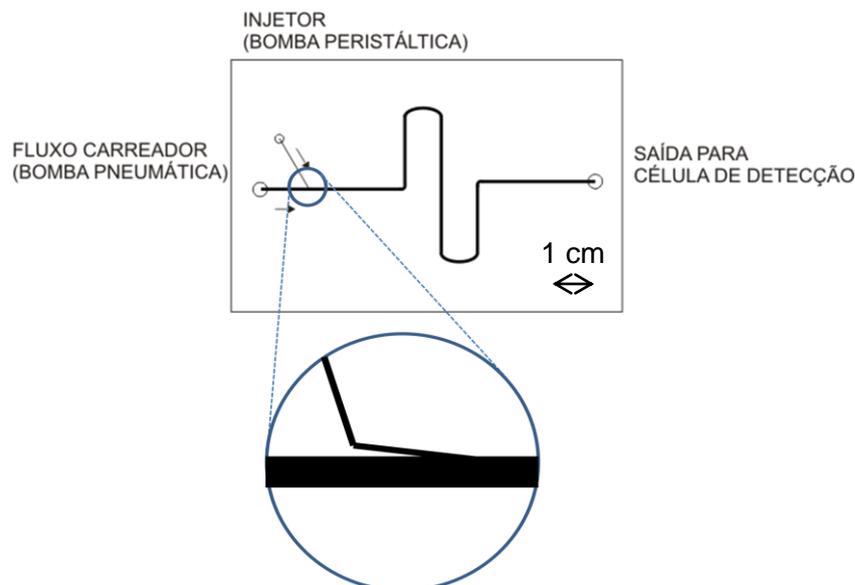


Figura 13: Configuração do reator com módulo de injeção: (I) conexão com o propulsor pneumático (entrada do fluxo carreador); (II) Conexão com o injetor (bomba peristáltica); (III) saída para a célula de detecção. No detalhe a geometria do canal na região de confluência.

4.6. Modificação da superfície interna do canal

Como pré-tratamento, os canais foram condicionados com solução aquosa de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ a, aproximadamente, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, em seguida, foram lavados com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e água destilada por um minuto. Depois de secos, os canais foram tratados com solução de PEI em tampão borato pH 11,5, à temperatura ambiente, durante uma hora. Estas duas etapas foram realizadas em fluxo com vazão de $15 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ utilizando bomba peristáltica. Em seguida, o canal foi preenchido com solução de glicose oxidase em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 em meio de glutaraldeído 1% (m/v) por 2 horas, também a temperatura ambiente, e novamente lavadas em fluxo de água deionizada por um minuto e secos com fluxo de ar durante cinco minutos.

As concentrações de GOD e PEI utilizadas durante o procedimento de modificação foram otimizadas durante os estudos. Avaliou-se a resposta amperométrica empregando-se o reator no sistema em fluxo utilizando solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de D-glicose e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 como solução carreadora com eletrodo de trabalho polarizado em $0,7 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$.

4.7. Procedimentos de análise

Para avaliar o desempenho dos reatores construídos, foram feitos estudos preliminares com padrão de D-glicose, a seguir, visando demonstrar esse desempenho, passou-se a analisar a glicose contida em amostras de refrigerantes. As amostras, do tipo refrigerante de cola, empregadas nas análises foram adquiridas comercialmente em supermercados locais, totalizando cinco amostras.

4.7.1. Análise amperométrica diferencial em fluxo

Antes da injeção no sistema, cada uma das cinco amostras foi desgaseificada em banho ultrassônico durante 30 minutos. Alíquotas de 25 μL foram diluídas em 50 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7. Em seguida, a amostra é injetada no sistema em fluxo miniaturizado, passando pelo reator enzimático e, em seguida, o mesmo volume de amostra é injetado no sistema com um pseudorreator não modificado. O sinal analítico resultante foi obtido pela diferença entre o sinal de corrente gerado pela amostra que passou pelo reator enzimático e o sinal de corrente quando ela passa pelo pseudorreator.

4.7.2. Espectrofotometria

Para efeito de comparação, a glicose presente nas amostras foi determinada pelo método enzimático colorimétrico [73] recomendado para determinação em fluidos biológicos. Para tanto, as amostras foram desgaseificadas em banho ultrassônico durante 30 minutos e diluídas na proporção de 1:25 (v/v) em água deionizada. Uma alíquota de 250 μL dessa solução diluída foi adicionada a 5,0 mL do reagente colorimétrico (fenol $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , 4-amino-antipirina $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , glicose oxidase 15,0 U mL^{-1} e peroxidase 2,0 U mL^{-1} , em tampão fosfato 0,5 mol L^{-1} pH 7) e aferido o volume final de 10 mL com tampão pH 7. Posteriormente, as amostras foram encubadas em banho termostatizado a 37 °C por 5 minutos e, em seguida, submetidas à análise espectrofotométrica de absorção na região do visível em 500 nm.

5. Resultados e Discussões

Como já mencionado, a proposta inicial deste trabalho se baseia na confecção de um sistema em fluxo miniaturizado composto de um microcanal quimicamente modificado e sua aplicação na determinação de glicose em amostras reais. Dessa forma, para um melhor entendimento, a apresentação dos resultados é subdividida em três partes: Composição e avaliação do sistema em fluxo; Modificação da superfície interna do canal e imobilização de GOD e; Otimização de metodologia analítica para quantificação de glicose.

5.1. Composição e avaliação do sistema em fluxo

Nesta seção são apresentados os resultados relativos à composição do sistema em fluxo proposto. A avaliação dos parâmetros relacionados à dispersão dentro do sistema foram feitas utilizando solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrólito carreador KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A montagem e configuração do sistema em fluxo utilizado são esquematizadas na *Figura 14*, onde são apresentados os componentes de propulsão do eletrólito carreador, injeção de amostra, o reator com suas conexões e a célula de detecção.

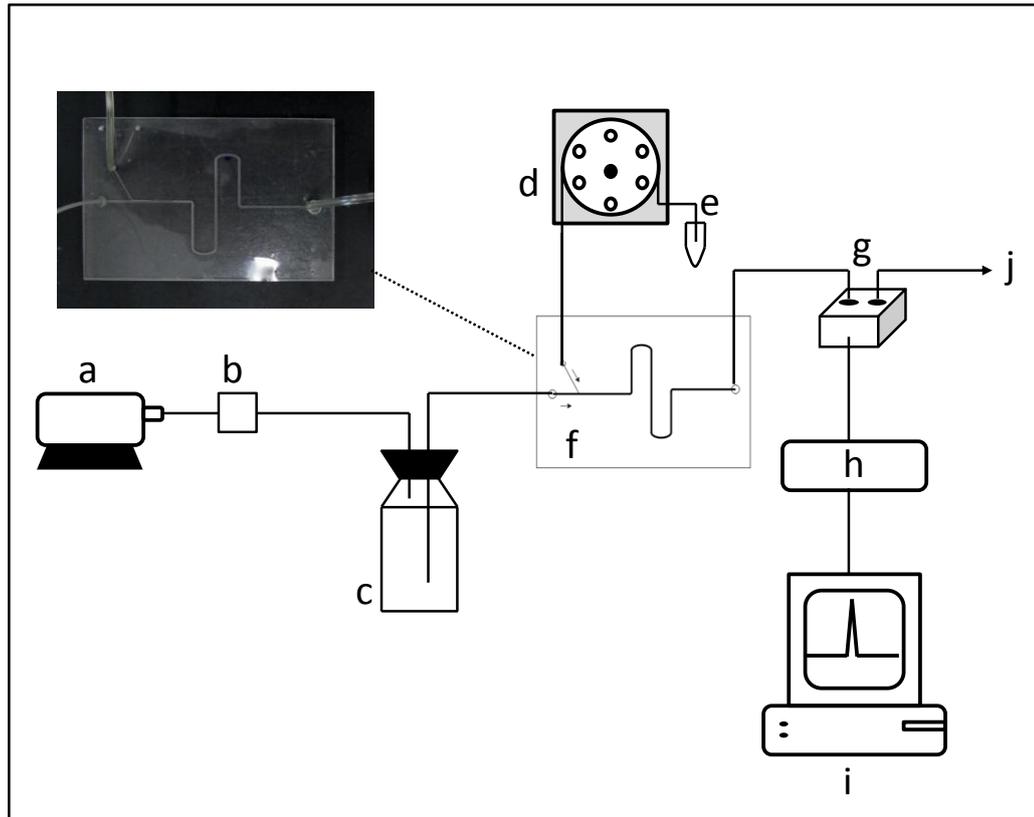


Figura 14: Configuração esquemática do sistema em fluxo proposto, empregado para a determinação de glicose: (a) propulsor pneumático; (b) regulador de vazão; (c) frasco contendo solução carreadora; (d) bomba peristáltica (injetor); (e) frasco contendo amostra ou solução padrão; (f) reator de PMMA com GOD imobilizada; (g) célula de detecção; (h) potenciostato; (i) microcomputador para aquisição de dados; (j) descarte. Em detalhe: fotografia do reator com as conexões para os componentes externos.

5.2. Injeção de amostra

O volume da amostra com de injeção temporizada é dependente de dois parâmetros: o tempo de dispensa de líquido e a vazão de injeção. O primeiro está relacionado principalmente com a precisão do volume injetado, ou seja, presume-se que quanto maior o tempo de injeção, melhor será a precisão. Entretanto, para volumes da ordem de poucos microlitros, a utilização de intervalos de tempo maiores requer uma diminuição da vazão de injeção.

A vazão de injeção está relacionada com o fato de que a injeção ocorre em uma região de confluência, a dispersão inerente à injeção é dependente tanto da vazão de injeção quanto da vazão do carreador.

A fim de avaliar a influência das duas vazões, foram feitos experimentos injetando-se solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ aplicando potencial fixo de $0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$, variando-se a vazão de injeção e, conseqüentemente, o volume injetado. O tempo de injeção foi fixado em $0,5 \text{ s}$ e a resposta amperométrica foi medida em três condições de vazão do eletrólito carreador: $0,1$; $0,25$ e $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Os resultados obtidos para este experimento são mostrados na *Figura 15*.

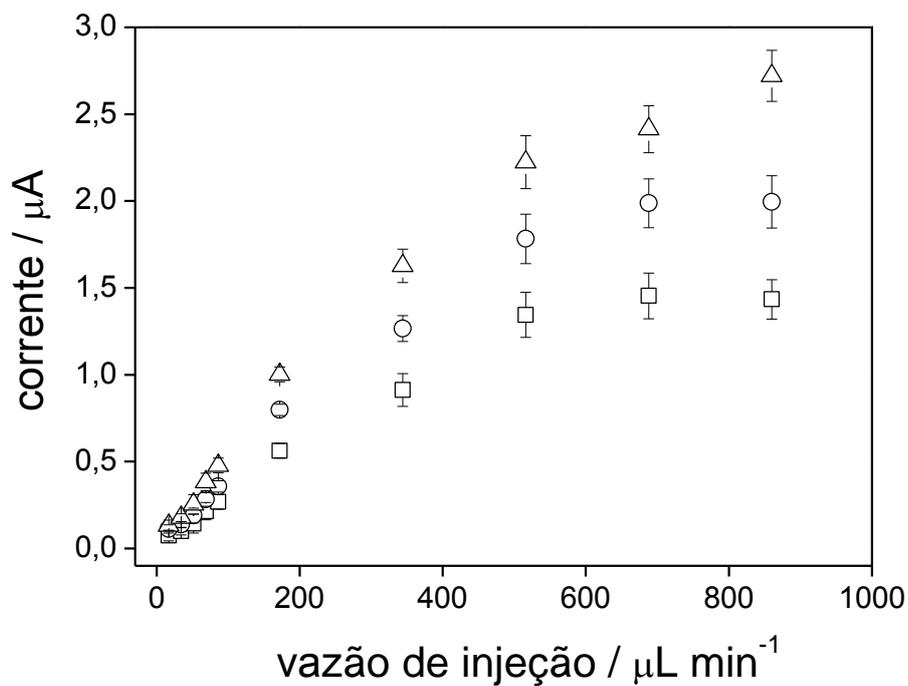


Figura 15: Variação da corrente de oxidação de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em função da vazão de injeção em diferentes condições de vazão do eletrólito carreador (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$): (□) $0,1$; (○) $0,25$ e (Δ) $0,50 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$, Tempo de injeção: $0,5 \text{ s}$.

Através da *Figura 15*, é possível observar um aumento gradativo da corrente de oxidação com o aumento da vazão de injeção. Isso se torna evidente, já que o aumento da mesma acarreta no aumento do volume amostrado. Entretanto, também é possível observar um acréscimo do desvio padrão das medidas com o aumento da vazão decorrente da deformação do sinal transiente de corrente, o que dificulta a leitura precisa do máximo do pico de corrente. Essa alteração no perfil do sinal transiente é atribuída à intensificação da turbulência na região de confluência quando a vazão de injeção torna-se muito alta ($\geq 516 \mu\text{L min}^{-1}$). A *Figura 16* apresenta os perfis dos sinais transientes em duas condições de vazão de injeção.

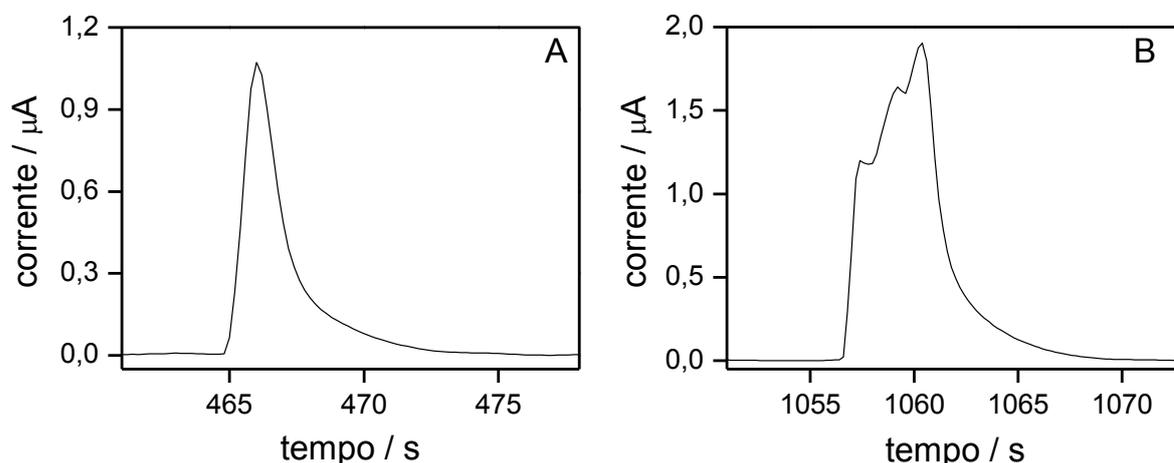


Figura 16: Sinais transientes obtidos para injeções de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrólito $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$: (A) vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; (B) vazão de injeção: $516 \mu\text{L min}^{-1}$; vazão do carreador: $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$.

Para padronizar a vazão de injeção nos experimentos subsequentes, o valor de $344 \mu\text{L min}^{-1}$ foi selecionado por apresentar melhor definição de sinal transiente. Em valores abaixo deste, a diluição devido à confluência torna-se mais pronunciável. Deste modo, as variações de volume injetado são definidas variando-se o tempo de dispensa da bomba peristáltica.

Para ilustrar como ocorre a injeção temporizada, foram feitas imagens da região de confluência com solução de azul de metileno antes e durante a injeção. Essas imagens são apresentadas na *Figura 17*.

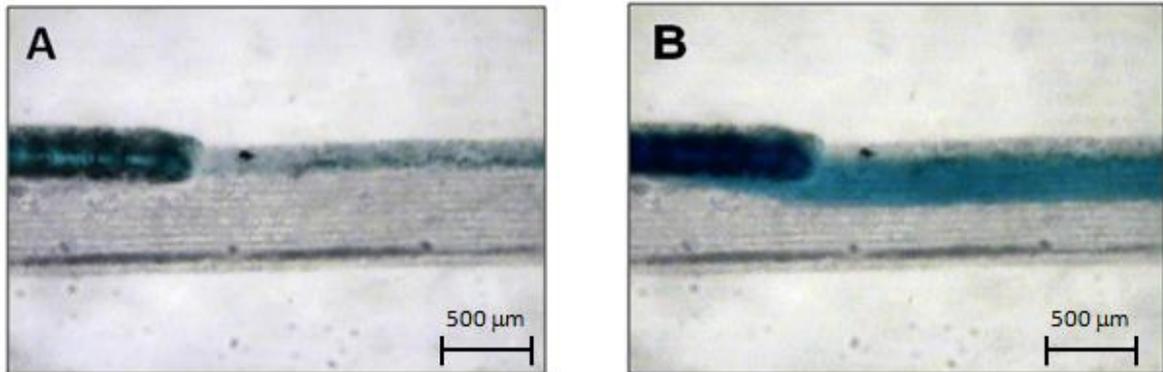


Figura 17: Injeção de 2,9 μL azul de metileno: (A) antes e (B) durante a injeção; tempo de injeção: 0,5 s; vazão de injeção: 344 $\mu\text{L min}^{-1}$; vazão do carreador: 0,35 mL min^{-1} .

Nota: Na figura A, injeções prévias já haviam sido realizadas e a imagem mostra o canal de injeção já preenchido.

Com o objetivo de avaliar a influência da diluição na região de injeção inerente à confluência, foram feitas injeções de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em volumes crescentes de amostragem (0,6 a 11,5 μL). Os resultados obtidos são mostrados na *Figura 18*.

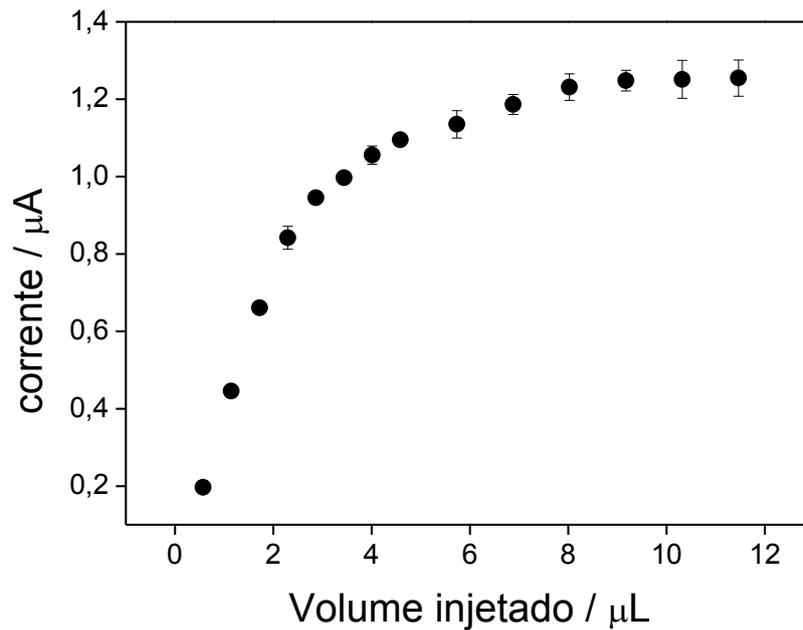


Figura 18: Variação da corrente de oxidação de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em função do volume injetado. Vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; Vazão do eletrólito carreador: ($\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$): $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$.

É possível observar que a partir de $8,0 \mu\text{L}$ a resposta amperométrica tende a um comportamento constante. Como a dispersão longitudinal torna-se desprezível a esse volume de injeção, a dispersão observada é somente resultante da diluição inerente ao ponto de confluência onde ocorre a injeção. Dessa forma, pode-se estimar a diluição no ponto de injeção. Para tanto, foram feitas três injeções sucessivas de $8,0 \mu\text{L}$ da solução $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, seguida da injeção em volume infinito. O resultado para este experimento é mostrado na *Figura 19* e a diluição é estimada pela seguinte relação:

$$D = C^0 / C^i = I^0 / I^i$$

Onde:

D é o coeficiente de dispersão;

C^0 é a concentração da solução $K_4[Fe(CN)_6]$ injetada antes de sofrer diluição ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$);

C' é a concentração da solução $K_4[Fe(CN)_6]$ injetada após sofrer diluição;

i^0 é a corrente em injeção com volume infinito;

i' é a corrente correspondente à injeção de $8,0 \mu\text{L } K_4[Fe(CN)_6]$;

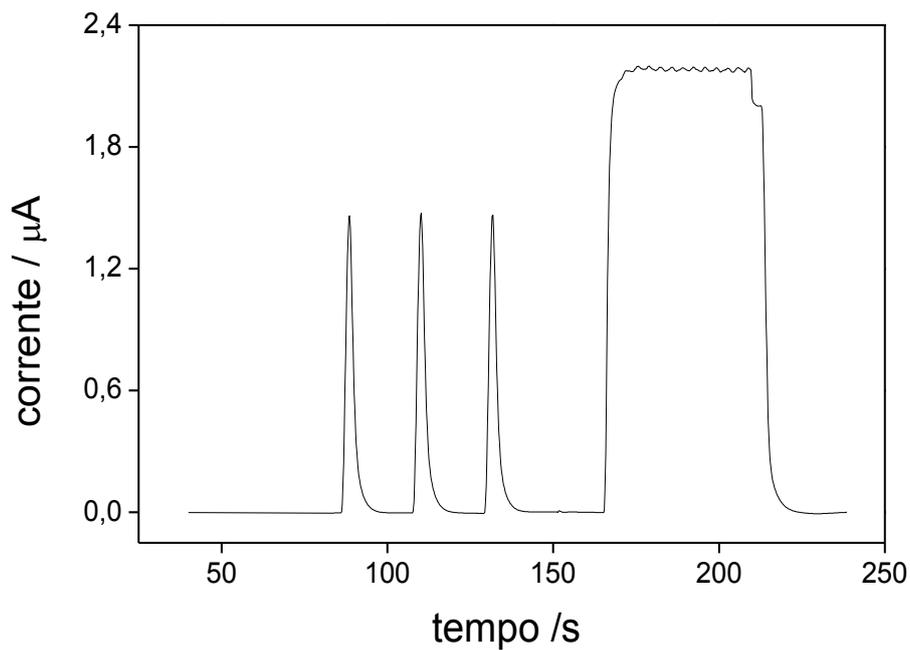


Figura 19: Resposta amperométrica para três injeções consecutivas de $8,0 \mu\text{L}$ ($1,4 \text{ s}$ a vazão de injeção de $344 \mu\text{L min}^{-1}$) de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ seguida de injeção em volume infinito. Vazão do carreador: $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$.

Para o experimento realizado o valor de D foi de 1,47. Isso significa que a solução inicial foi diluída num fator de 1,47 vezes, ou seja, a solução que chega à célula de detecção tem valor de concentração igual a $6,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Uma abordagem interessante, proveniente dos resultados obtidos para este experimento, é a possibilidade da injeção da amostra ser realizada sem prévia diluição em eletrólito de corrida, já que a solução injetada sofre diluição no próprio carreador. Para comprovar essa suposição, foram realizados testes injetando-se solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ diluído em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e outra, de mesma concentração, diluída em água deionizada. A resposta amperométrica para 10 replicatas em cada uma das condições é apresentada na *Figura 20*.

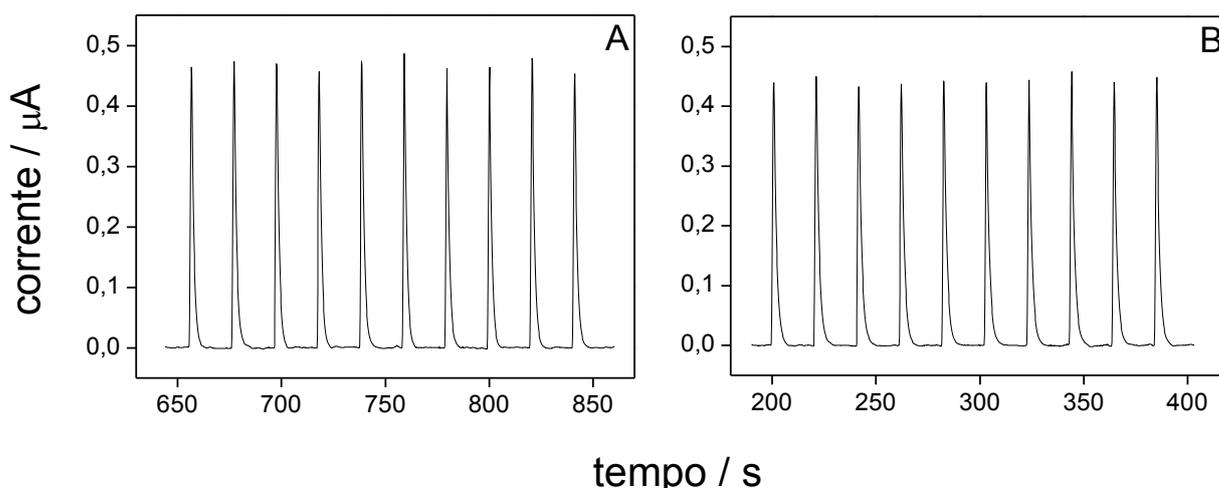


Figura 20: Resposta amperométrica para injeções sucessivas de $2,9 \mu\text{L}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ diluído em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A) e em água (B). Tempo de injeção: $0,5 \text{ s}$; vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; vazão do carreador: $0,25 \mu\text{L min}^{-1}$. $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$.

Através dos resultados, foi possível comparar as correntes médias dos dois conjuntos de injeções, obtendo-se um valor de $0,465 \mu\text{A}$, com DPR de 3,1%, para solução previamente diluída em eletrólito, e $0,445 \mu\text{A}$, com DPR de 2,8% para a solução diluída em

água. Comparando os valores de desvios padrão para as duas situações através do teste F ($F_{\text{EXPERIMENTAL}} = S_1^2 / S_2^2 = 1,34 < F_{\text{TABELADO}} = 3,18; n = 10$), observa-se que não há diferenças significativas entre esses valores, sendo assim, as soluções de amostra e padrões podem ser injetadas no sistema sem que sejam previamente diluídas em eletrólito carreador.

5.3. Modificação da superfície interna do canal e imobilização de glicose oxidase.

A *Figura 21* é uma representação esquemática simplificada de todo o processo de modificação da superfície de PMMA e imobilização de GOD. Na primeira etapa o pré-tratamento com NaOH é fundamental, pois favorece a hidrólise dos grupos ésteres presentes na superfície do PMMA, aumentando a probabilidade de ataque nucleofílico por moléculas de PEI. O breve tratamento com HCl favorece a protonação das carboxilas.

Após o pré-tratamento com NaOH e HCl, a próxima etapa envolve a ligação de PEI às carboxilas geradas na superfície do PMMA. De forma subsequente, a superfície do canal é colocada em contato com a solução contendo enzima. Como essa solução consiste em GOD na presença de glutaraldeído 1%, uma rede intermolecular de ligações cruzadas com a enzima é formada [74] e a ligação com os grupos amino presentes na superfície modificada ocorre com os sítios livres (carbolinas) do glutaraldeído.

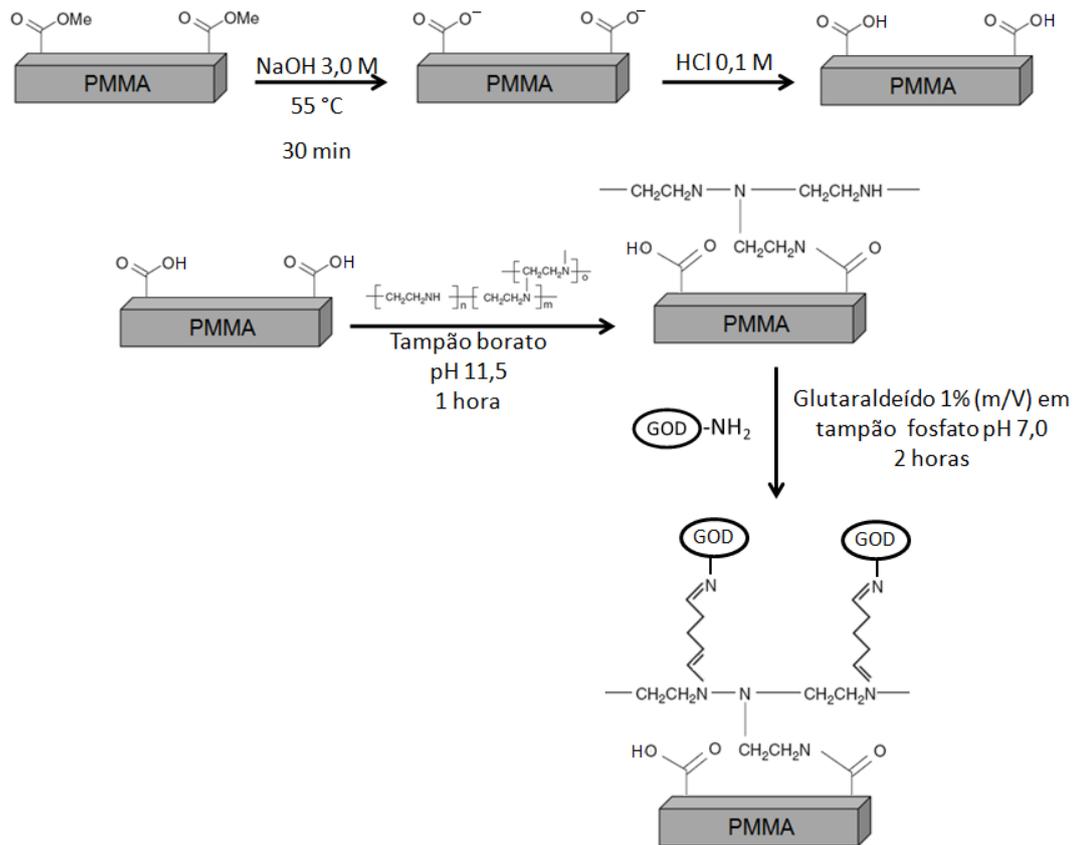


Figura 21: Representação esquemática das etapas do processo de modificação da superfície interna no microcanal de PMMA e imobilização de GOD.

5.4. Efeito da concentração de PEI

Com o objetivo de otimizar as condições de tratamento da superfície de PMMA, foram estudados os efeitos das concentrações dos reagentes utilizados no processo. A resposta em função da variação de concentração de PEI foi avaliada com base no sinal de corrente de pico quando uma solução de D-glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi injetada no sistema em fluxo contendo o reator modificado.

O tratamento com PEI favorece a geração de grupos amino na superfície de PMMA e a densidade superficial desses grupos tende a aumentar com a concentração do agente modificador [71], ou seja, o número de sítios potencialmente ligantes ao glutaraldeído (e

consequentemente com a enzima) aumenta e favorece um incremento da atividade do reator. A resposta da atividade enzimática é dada pelo produto de reação, H_2O_2 , monitorado na célula de detecção.

A concentração de PEI foi estudada entre a faixa de 0,5% a 2,0% (m/m), e a resposta amperométrica do reator em função da mesma é apresentada na *Figura 22* para injeções de 2,9 μL de D-glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. De antemão, vale ressaltar que a faixa estreita de concentração de PEI estudada deve-se ao fato de que, em concentrações menores que 0,5 % não houve resposta de corrente apreciável para fins comparativos. Já em todos os casos que foram utilizadas concentrações maiores que 2%, houve obstrução dos canais, tornando-os inaptos para utilização.

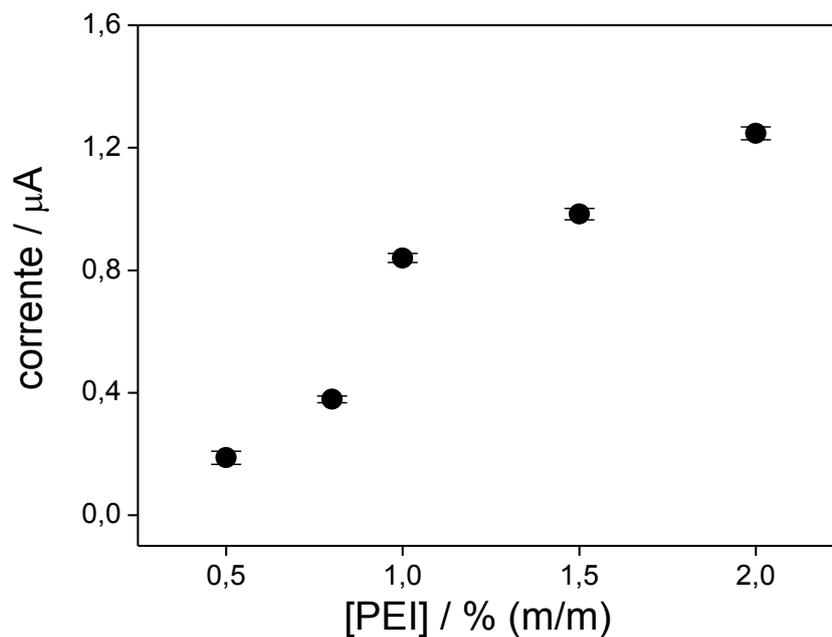


Figura 22: Efeito da concentração de PEI na resposta amperométrica de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de D-glicose em reator de $500 \mu\text{m}$ de largura tratado com GOD 500 U mL^{-1} em glutaraldeído 1 %.

Na tentativa de realizar ensaios preliminares de repetibilidade do reator no sistema em fluxo, foram feitas injeções sucessivas de 2,9 μL solução de D-glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a

0,7 V vs Ag/AgCl_(KCl sat). No entanto, foi observado que empregando-se o reator enzimático modificado com PEI 2% (m/m), a partir da 37ª injeção inicia-se um decaimento de corrente, como mostrado na *Figura 23*. O mesmo comportamento é observado quando utilizado o reator modificado com PEI 1,5% (m/m), porém, o decaimento de corrente inicia-se a partir da 50ª injeção. Entretanto, esse comportamento não é observado quando utilizado o reator modificado com PEI 1% (m/m), através do qual foi possível fazer mais de 80 injeções sem que ocorresse decréscimo significativo do sinal de corrente.

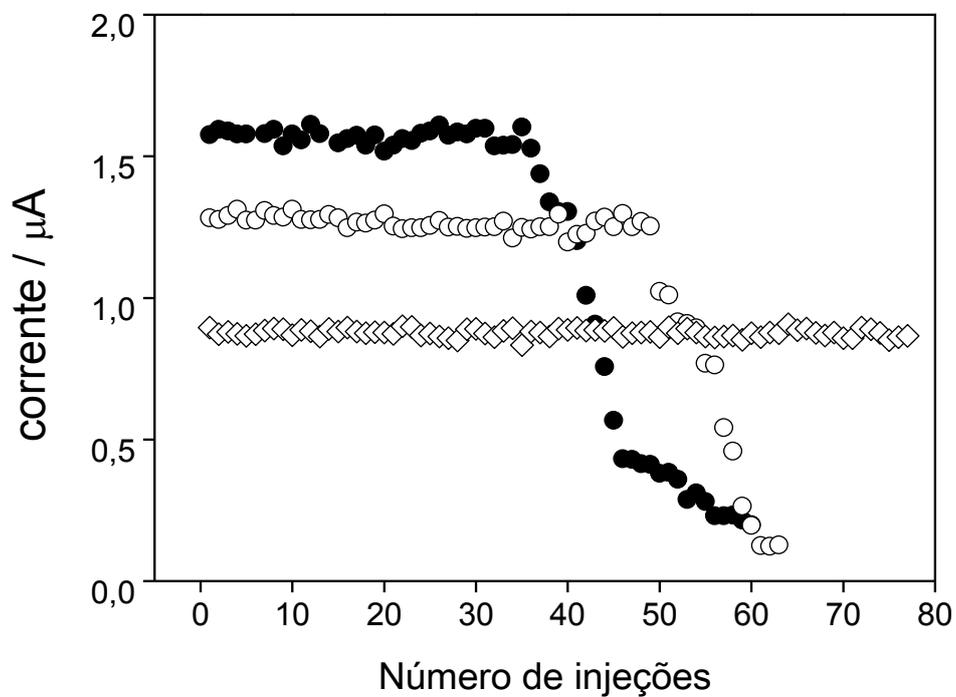


Figura 23: Injeções sucessivas de *D*-glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes reatores modificados com (\diamond) 1,0 %; (\circ) 1,5%; (\bullet) 2,0% (m/m) de solução aquosa de PEI.

O comportamento de reatores modificados com solução de PEI em concentração maior ou igual a 1,5% (m/m), foi atribuído a processos de lixiviação da camada de PEI pelo eletrólito carreador. Sugere-se que, em altas concentrações de agente modificador ($[\text{PEI}] \geq 1,5\%$), formam-se camadas adicionais do mesmo, unidas entre si por interações de

natureza não covalente, provavelmente adsorção eletrostática, sendo que, somente a camada mais interna une-se ao PMMA por ligação covalente. Dessa forma, essas camadas adicionais são removidas pela solução carreadora, levando consigo quantidade significativa de massa enzimática que, por sua vez, ocupa as regiões mais externas da superfície modificada. Por consequência, a reatividade do canal diminui consideravelmente, levando ao decréscimo de corrente observado.

A *Figura 24* mostra o aspecto de uma mesma região de um reator modificado com PEI 2,0 %, antes e após o processo de lixiviação forçada, passando solução de eletrólito carreador durante 30 minutos. É possível perceber claramente a remoção de material anteriormente fixado na parede interna do canal. Este comportamento repete-se aos reatores com as superfícies tratadas com PEI 1,5 %, porém, não é detectável com os modificados com solução 1,0 %. Presume-se, então, que a esta concentração, a modificação ocorre sem a formação de camadas adicionais de PEI suscetíveis à lixiviação.

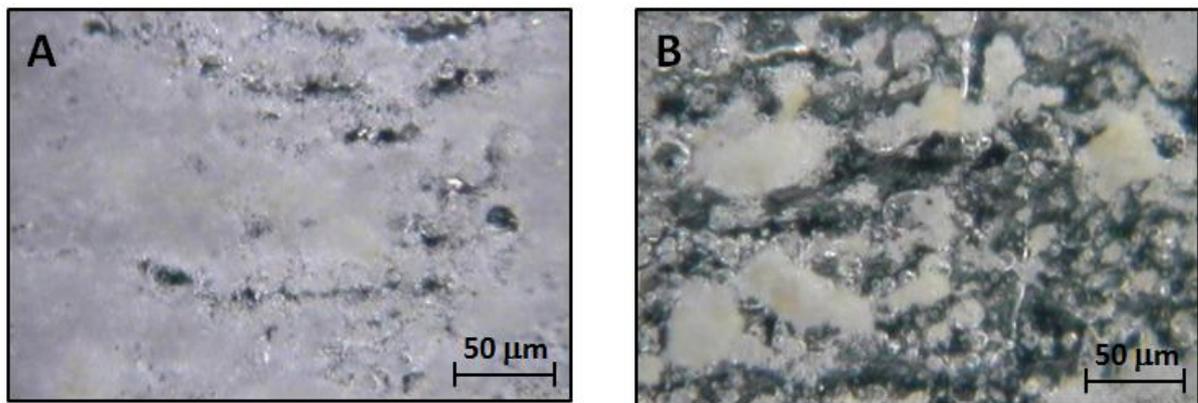


Figura 24: Imagem ampliada da superfície modificada do reator antes (A) e após (B) processo de lixiviação forçada em reator modificado com PEI 2 % (m/m).

5.5. Efeito da concentração de GOD

A atividade catalítica de uma reação enzimática é condicionada, dentre outros fatores, à concentração da enzima. No caso de enzimas imobilizadas em substratos sólidos, sua atividade dependerá, analogamente, da massa enzimática total. A *Figura 25* ilustra o efeito da concentração enzimática sobre o sinal de corrente de oxidação de H_2O_2 .

Estudou-se a variação do sinal de corrente em função da concentração de GOD no intervalo de 100 a 600 U mL^{-1} , após injeções de 2,9 μL de D-glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A melhor resposta obtida ocorreu quando a concentração de GOD atingiu 400 U mL^{-1} . A partir desse ponto, a resposta amperométrica tende a um comportamento constante. Esse comportamento pode ser atribuído à saturação dos sítios ligantes ($-\text{NH}_2$ e $-\text{NH}-$) na superfície previamente funcionalizada com PEI.

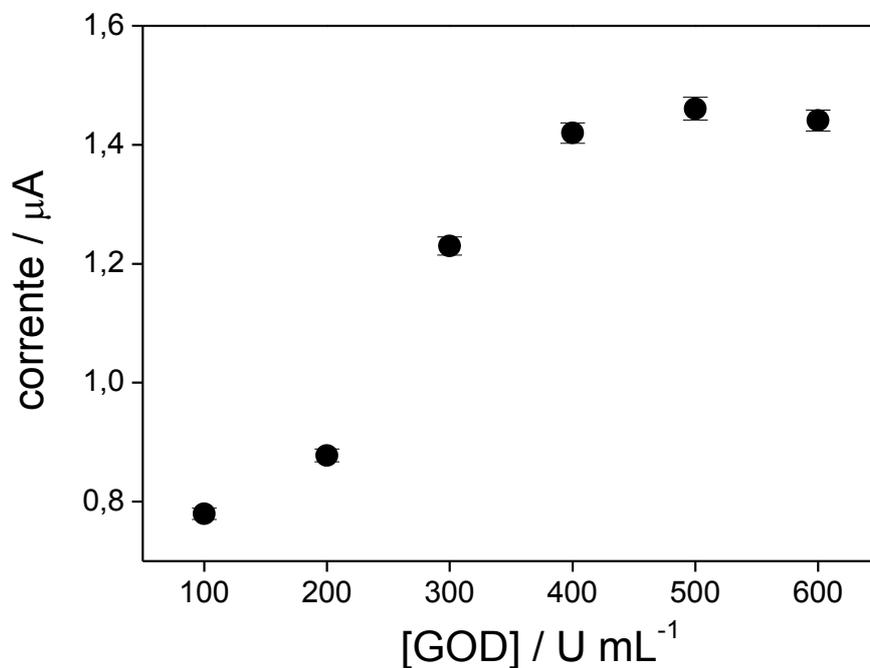


Figura 25: Efeito da concentração da enzima GOD na resposta amperométrica de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de D-glicose em reator de 500 μm de largura tratado com PEI 1,0 % (m/m).

A *Figura 26 A* mostra a superfície de PMMA antes do processo de modificação e imobilização, onde se observa grande rugosidade do substrato polimérico, consequência do processo de condensação de material polimérico na superfície da peça após as ablações com o laser de CO₂. Presume-se que essa configuração rugosa auxilia na imobilização e favorece o aumento da superfície de contato possibilitando um maior acúmulo da enzima.

Após o tratamento de modificação (*Figura 26 B*), é observada uma nítida deposição de material cujo aspecto amarelado sugere a presença da enzima que também possui coloração amarelada, na forma de um filme irregular recobrendo a superfície de PMMA. Uma análise visual mais detalhada foi realizada por toda a extensão do canal. Foi possível encontrar pequenas regiões onde não ocorreu formação desse filme, no entanto, a modificação no canal é predominantemente homogênea em toda sua extensão, não apresentando regiões de lacunas de dimensões expressivas.

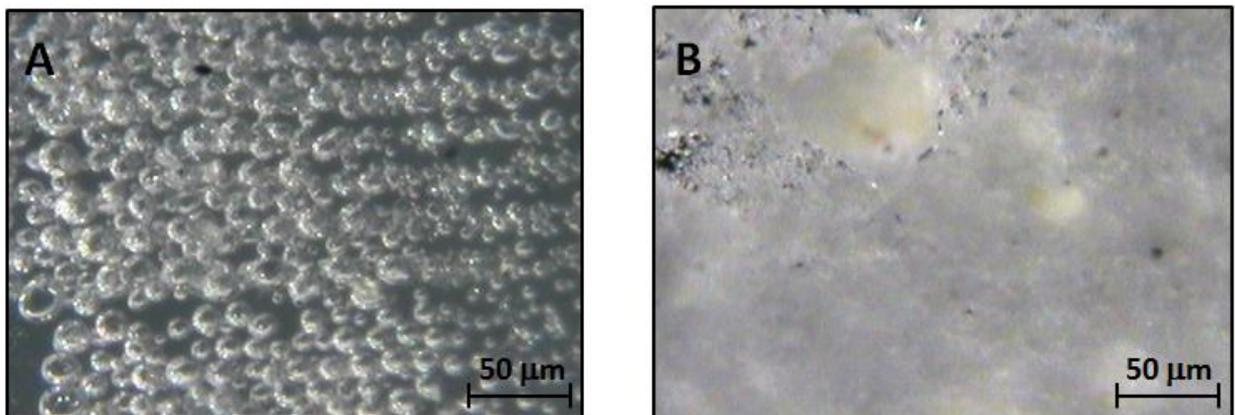


Figura 26: Imagem ampliada do reator antes (A) e após (B) o tratamento com as soluções de PEI 1% (m/m) e GOD 400 U mL⁻¹ em tampão fosfato pH 7 em meio de glutaraldeído 1% (m/v).

5.6. Efeito das dimensões internas do canal

De maneira geral, a sensibilidade inerente ao reator é dependente da atividade total da enzima imobilizada na sua superfície. Como é essa superfície que interage com a glicose presente em solução, o desempenho do reator depende do transporte de massa de glicose até as paredes internas do canal.

Em distâncias de extensão micrométrica e na ausência de turbulência, esse transporte é, majoritariamente, controlado por difusão. Por este motivo, a razão entre área de superfície e volume, definida pelas dimensões internas do canal, é um parâmetro fundamental a ser avaliado. A *Figura 27* mostra as imagens das seções transversais de canais com diferentes tamanhos antes do processo de modificação. Assim, as respostas amperométricas para reatores modificados de diferentes larguras foram analisadas em duas circunstâncias:

A) Injeção de 2,9 μL de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$.

B) Injeção de 2,9 μL de D-glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7; $E = 0,7 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$.

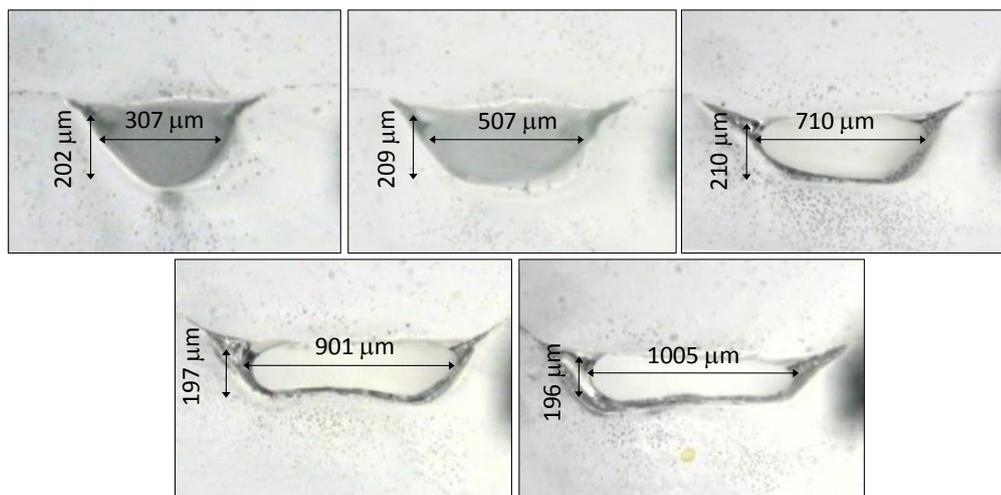


Figura 27: Imagem ampliada das seções transversais dos canais com largura interna de 307, 507, 710, 901 e 1005 μm .

O $K_4[Fe(CN)_6]$ foi utilizado como espécie química de referência, já que sua resposta amperométrica é dependente das condições físicas do sistema e não da atividade enzimática.

A Figura 28 exibe os sinais transientes referentes às injeções, utilizando cada um dos diferentes reatores, para $K_4[Fe(CN)_6]$ (A) e glicose (B). Com finalidade de comparação entre os gráficos, o sinal de corrente foi normalizado em função do pico de maior magnitude para os dois grupos de experimentos, no caso, o correspondente a resposta obtida para o reator de 307 μm .

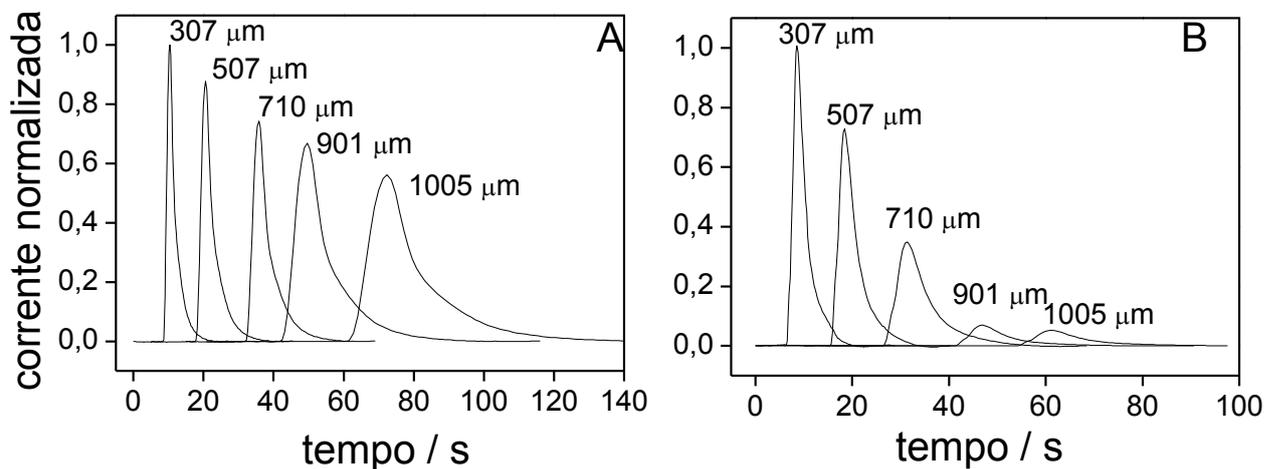


Figura 28: Resposta em sinais transientes de corrente normalizada, utilizando reatores produzidos com diferentes larguras: (A) Injeção de 2,9 μL de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$; (B) Injeção de 2,9 μL de D-glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH } 7$; $E = 0,7 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$. Tempo de injeção: 0,5 s; vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; vazão do carreador: $350 \mu\text{L min}^{-1}$.

Em ambos os casos, é observada uma diminuição do sinal de corrente em função do aumento da largura do canal, entretanto, esse comportamento é muito mais proeminente quando se injeta D-glicose no sistema. Enquanto a diminuição do sinal (em relação ao de

maior magnitude) não chega a 50% para as injeções com $K_4[Fe(CN)_6]$, para a glicose a redução atinge mais de 90% quando utilizado o reator de 1005 μm . Esse comportamento é explicado quando consideramos dois fatores:

- i) A dispersão no ponto de injeção aumenta com a largura no canal. Portanto, o sinal resultante tende a diminuir com o aumento da largura. Nos dois casos, a contribuição dessa dispersão é a mesma, sendo que, para o $K_4[Fe(CN)_6]$, essa é a única causa do decréscimo de corrente observado.
- ii) A resposta amperométrica para glicose é dada em função da oxidação de H_2O_2 , portanto, está relacionada com a eficiência da reação enzimática. Como essa eficiência é dependente do transporte de massa de glicose até parede interna do canal, aumentar a largura significa aumentar a trajetória de difusão da glicose, o que torna o processo reacional mais lento.

5.7. Otimização de metodologia analítica para quantificação de glicose

Nesta seção são discutidos os estudos das condições experimentais do sistema em fluxo proposto empregando um reator modificado com GOD (490 μm de largura interna). Foram avaliados os valores ótimos para: pH e vazão do eletrólito carreador, volume de amostragem e potencial aplicado na célula eletroquímica. Foram também averiguadas repetibilidade, frequência analítica, linearidade, além da estabilidade do reator. Dessa forma, as amostras de refrigerante foram submetidas à análise e os resultados obtidos comparados com o método espectrofotométrico.

5.8. Estudo do Efeito do pH

Para avaliar a dependência desse parâmetro, foram feitas medidas amperométricas no sistema em tampão fosfato variando-se o pH do mesmo. Os resultados obtidos são mostrados na *Figura 29* por meio do gráfico de variação de corrente em 0,7 V (vs $Ag/AgCl_{(KCl\ sat)}$) versus o pH do meio.

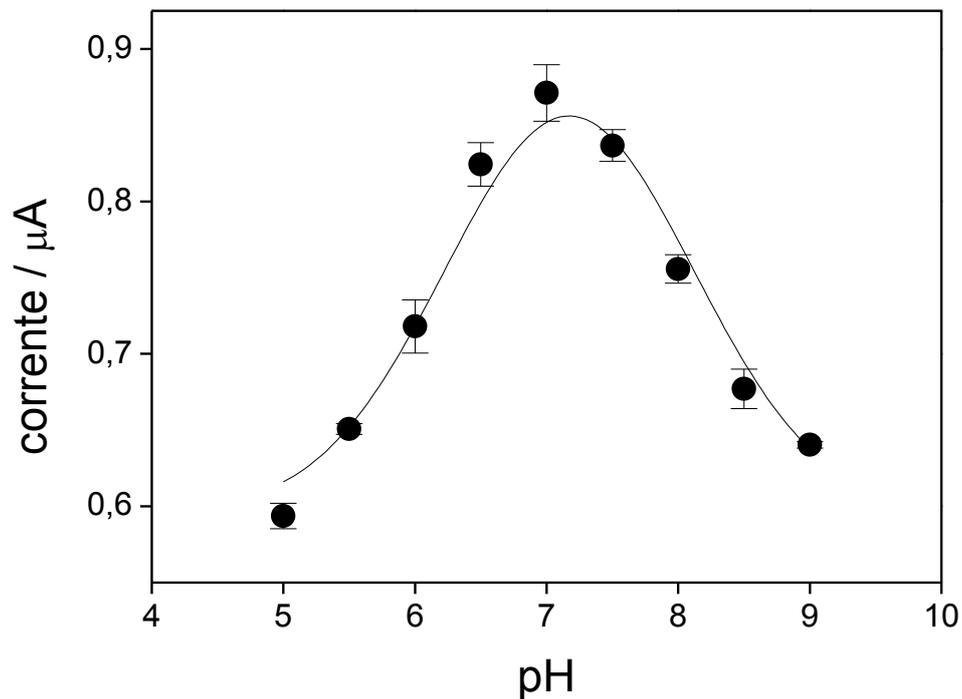


Figura 29: Efeito do pH na resposta amperométrica de D -glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $E = 0,7 \text{ V vs } Ag/AgCl_{(KCl\ sat)}$. Injeção de $2,9 \mu L$ (tempo de injeção: $0,5 \text{ s}$; vazão de injeção: $344 \mu L \text{ min}^{-1}$); vazão do carreador: $350 \mu L \text{ min}^{-1}$.

De acordo com a *Figura 29* no intervalo de pH de 5 a 7, a corrente de pico aumenta e em valores de pH maiores que 7, a corrente diminui. Este comportamento pode ser explicado por duas contribuições distintas:

i) O processo de imobilização enzimática pode alterar algumas propriedades das enzimas. Um parâmetro importante que pode ser alterado é o pH em que sua atividade é máxima, de forma que as condições de pH do meio são diferentes em relação à enzima livre em solução. A glicose oxidase tem como faixa ótima de atividade catalítica em pH entre 6,0 e 7,5 [75-76].

O resultado obtido em nossas imobilizações mostra que não existe divergência significativa em relação ao pH de máxima atividade da enzima livre, o que é um indicador que o processo de imobilização não acarreta em variações no estado de ionização nas proximidades dos sítios ativos da enzima .

ii) A oxidação de H_2O_2 em superfície eletródica de platina também é dependente da concentração hidrogeniônica do meio; no intervalo de pH entre 6,5 e 7,0 esse processo de oxidação tem valor máximo [77]. Indicando que a resposta amperométrica não é puramente dependente da atividade enzimática.

Como o máximo de corrente foi observado em pH 7, este foi selecionado para os estudos posteriores dos parâmetros para otimização.

5.8.1. Estudo dos parâmetros do sistema FIA

Na *Tabela 2*, encontram-se resumidos os parâmetros estudados e selecionados do sistema de injeção em fluxo. A partir da adoção dos valores indicados na tabela, voltou-se a atenção para os demais aspectos de importância e para a construção da curva analítica.

Tabela 2: Parâmetros avaliados e condições de trabalho selecionadas.

Parâmetros avaliados do sistema FIA		
Parâmetro	Faixa estudada	Valor selecionado
Potencial (V) vs Ag/AgCl _(KCl sat)	0,3 – 0,9	0,6
Vazão ($\mu\text{L} / \text{min}^{-1}$)	100 – 500	250
Volume injetado (μL)	0,6 – 17	5,7

a) Repetibilidade e Frequência de amostragem:

Para o estudo da repetibilidade foram realizadas medidas amperométricas através de cinquenta injeções de D-glicose $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 50$). A corrente média para estas injeções foi de $3,19 \times 10^{-6} \text{ A}$ e desvio padrão relativo (DPR) obtido foi de 1,72 %.

A *Figura 30* apresenta a resposta amperométrica para as injeções e o perfil do sinal transiente utilizado para determinação da frequência de amostragem (f), que foi avaliada através do inverso do tempo de limpeza (t_L) que, de acordo com a *Figura 30* corresponde ao intervalo de 10,5 s. Dessa forma, estima-se uma frequência de 345 amostras por hora.

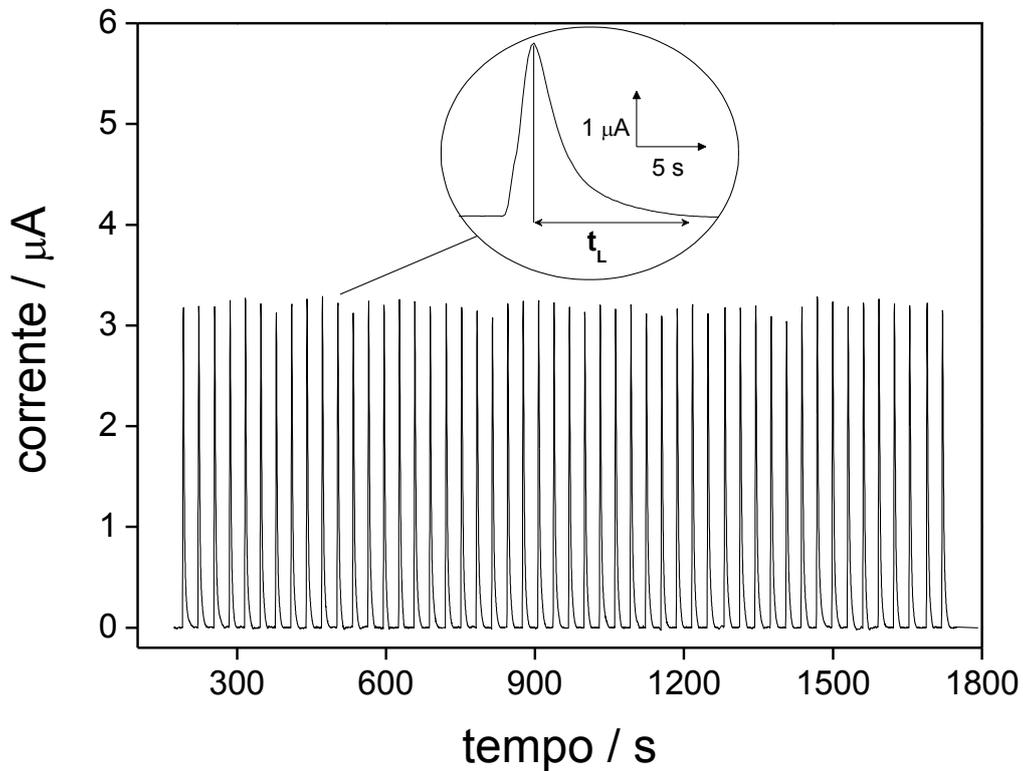


Figura 30: Resposta amperométrica para 50 injeções de D-Glicose $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7; $E = 0,6 \text{ V}$ vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{KCl sat})}$; Vazão do carreador: $250 \mu\text{L min}^{-1}$; volume injetado: $5,7 \mu\text{L}$ (vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; tempo de injeção: $1,0 \text{ s}$). Em detalhe, o perfil do sinal transiente de corrente da 10.^a injeção e o intervalo de tempo de limpeza (t_L).

b) Estudo da estabilidade inter-dias

Para este estudo foram feitos experimentos com intervalos de, aproximadamente, 24 horas entre eles, injetando-se solução de D-Glicose $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As medidas foram feitas com 20 replicatas e os valores de corrente em função do tempo, em dias, é apresentado na *Figura 31*. No intervalo entre as medidas, o reator foi preenchido com o eletrólito de corrida estocado e armazenado a temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

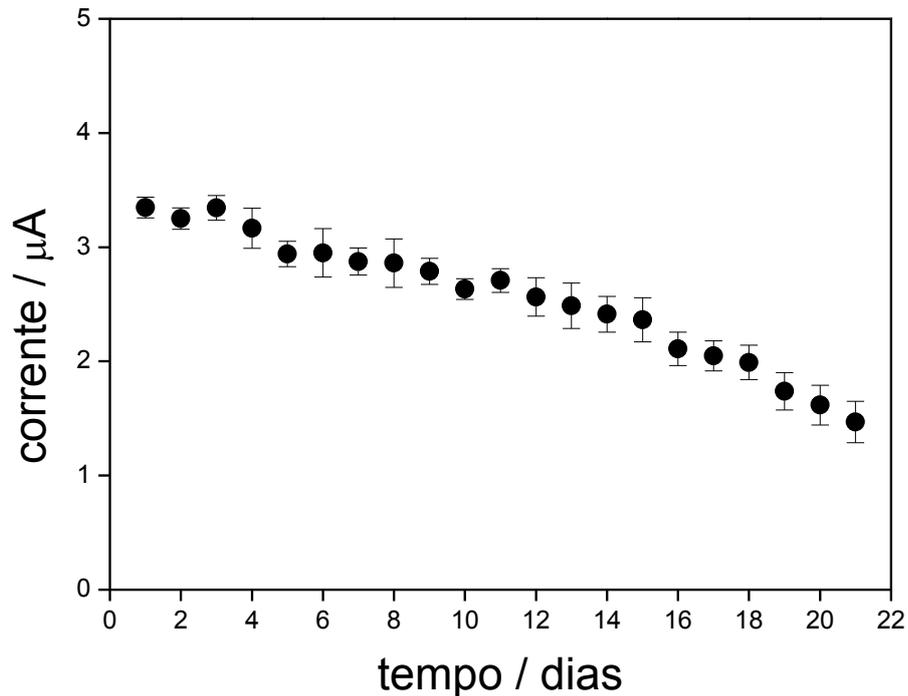


Figura 31: Resposta amperométrica inter-dias para injeção de D-Glicose $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7; $E = 0,6 \text{ V}$ vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{KCl sat})}$; Vazão do carreador: $250 \mu\text{L min}^{-1}$; volume injetado: $5,7 \mu\text{L}$ (vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; tempo de injeção: $1,0 \text{ s}$)

Pela *Figura 31*, é possível observar que as medidas de corrente não variaram significativamente nos quatro primeiros dias. A partir do 5.º dia, é observada uma diminuição do sinal analítico que se estende até o 21.º dia, em que a corrente média corresponde a, aproximadamente, 50% da observada no 1.º dia. Diversos fatores podem contribuir para esse decréscimo de sinal analítico, dentre os quais, à perda de atividade catalítica da enzima imobilizada, processos de lixiviação e reações secundárias da enzima com a superfície do canal.

Embora se possa verificar uma perda da atividade enzimática de até 50%, o dispositivo ainda mantém utilidade prática uma vez que a sua atividade não é reduzida totalmente, o que permite a utilização do reator por até três semanas, se respeitadas as

condições de utilização, estocagem e calibração. Entretanto, alguns parâmetros, como sensibilidade e limite de detecção, tendem a ser seriamente prejudicados.

c) Estudo de Linearidade

Para avaliação do intervalo linear de concentração, uma série de injeções em triplicatas foi realizada e a resposta amperométrica obtida para este experimento é apresentada na *Figura 32*.

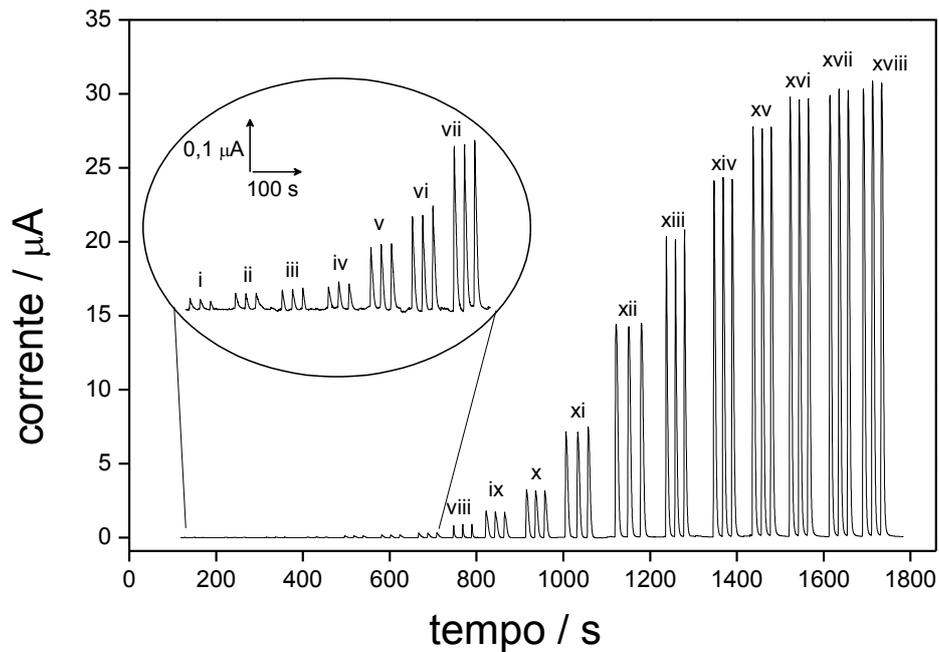


Figura 32: Resposta amperométrica para injeções em triplicata de D-glicose em concentrações crescentes: (i) $2,5 \times 10^{-6}$; (ii) $5,0 \times 10^{-6}$; (iii) $7,5 \times 10^{-6}$; (iv) $1,0 \times 10^{-5}$; (v) $2,5 \times 10^{-5}$; (vi) $5,0 \times 10^{-5}$; (vii) $7,5 \times 10^{-5}$; (viii) $1,0 \times 10^{-4}$; (ix) $2,5 \times 10^{-4}$; (x) $5,0 \times 10^{-4}$; (xi) $1,0 \times 10^{-3}$; (xii) $2,5 \times 10^{-3}$; (xiii) $5,0 \times 10^{-3}$; (xiv) $7,5 \times 10^{-3}$; (xv); $1,0 \times 10^{-2}$ (xvi); $2,5 \times 10^2$ (xvii) $5,0 \times 10^2 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: eletrólito tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7; $E = 0,6 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$; Vazão do carreador: $250 \mu\text{L min}^{-1}$; volume injetado: $5,7 \mu\text{L}$ (vazão de injeção: $344 \mu\text{L min}^{-1}$; tempo de injeção: 1,0 s).

A relação linear entre corrente e concentração de glicose foi constatada em dois intervalos distintos. Conforme mostrado na *Figura 33*, o primeiro intervalo abrange a faixa de $2,5 \times 10^{-6}$ a $7,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, apresentando inclinação de $(4,12 \pm 0,03) \times 10^{-3}$ $\mu\text{A}/\mu\text{M}$, intercepto de $(0,009 \pm 0,002)$ μM e coeficiente de correlação, R, de 0,999. O segundo intervalo, compreende a faixa de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com inclinação de $(2,49 \pm 0,01)$ $\mu\text{A}/\text{mM}$, intercepto de $(0,67 \pm 0,04)$ μA e valor de R igual a 0,997.

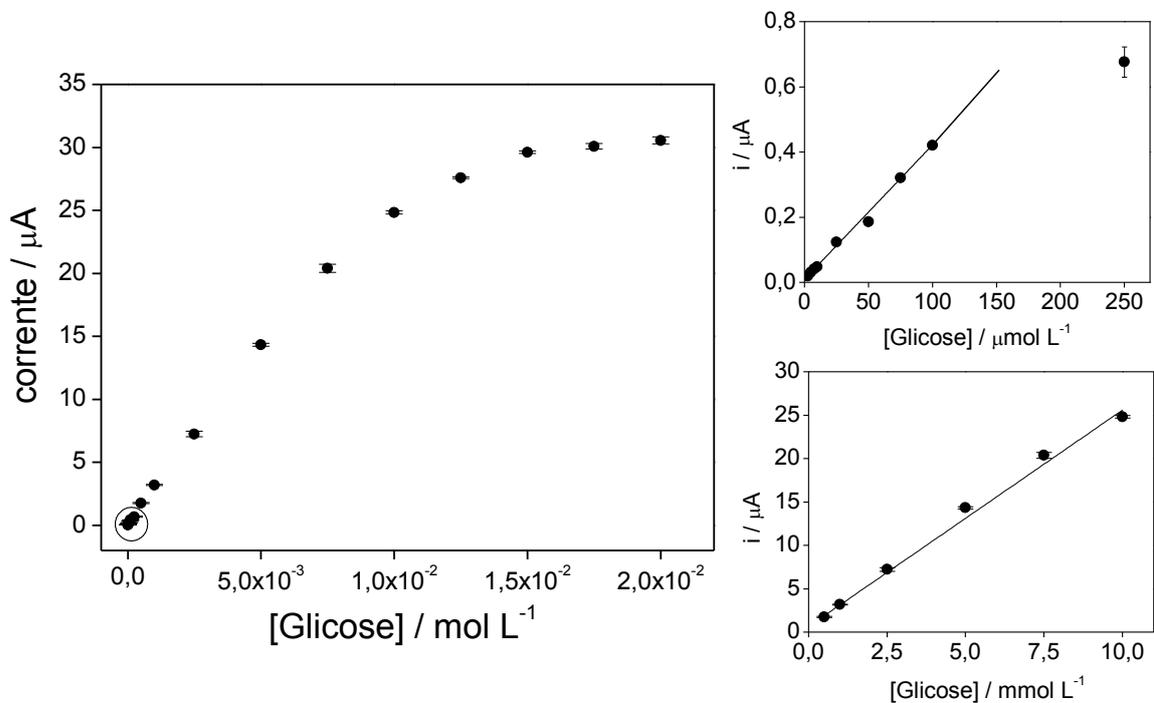
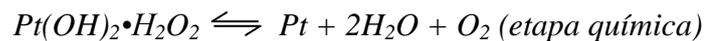
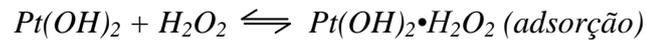


Figura 33: Relação entre corrente e concentração de glicose. À direita, as duas curvas obtidas para as faixas lineares de concentração.

Em valores de concentração superiores a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, ocorre um desvio do comportamento linear e a resposta eletrodica tende a atingir um patamar a partir de $1,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Este comportamento pode ser originado tanto pelo esgotamento da capacidade de biotransformação da enzima (pela elevada concentração de glicose), como também por

processos de passivação do eletrodo de platina quando a concentração de H_2O_2 torna-se elevada. A oxidação catalítica de H_2O_2 é representada pelas equações químicas a seguir:



Com o aumento da concentração dos produtos de reação, O_2 e H^+ , estes por sua vez, podem adsorver na superfície eletródica competindo com o H_2O_2 pelos sítios catalíticos de $Pt(OH)_2$ dificultando sua oxidação. O conjunto desses processos adsorptivos é conhecido como inibição competitiva [72], e é representado nas equações a seguir:



d) Determinação do teor de glicose em amostras de refrigerante

Para avaliar a aplicabilidade do sistema em fluxo proposto utilizando o reator modificado com GOD, cinco diferentes amostras de refrigerante foram analisadas utilizando amperometria diferencial. A *Figura 34* apresenta as respostas amperométricas obtidas para as amostras (A_1 a A_5) e para soluções padrão de D-glicose em diferentes concentrações (P_1 a P_6), variando de $2,5 \times 10^{-4}$ a $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, utilizadas para a construção da curva analítica, mostrada no detalhe da *Figura 34*. A regressão linear dos sinais registrados para os padrões de D-glicose levou a equação de reta: $I/A = (2,36 \pm 0,02) \times 10^{-3} * [\text{Glicose}]/\text{mol L}^{-1} - (2,87 \pm 0,04) \times 10^{-7}$ e coeficiente de correlação, $R = 0,9998$. O limite de detecção foi estimado em $1,40 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (três vezes o desvio padrão referente ao sinal de corrente de menor concentração / inclinação da reta).

Também é apresentada, no detalhe da *Figura 34*, a resposta amperométrica para as injeções das amostras na presença do pseudorreator não modificado, que foram utilizadas para a determinação amperométrica diferencial das amostras.

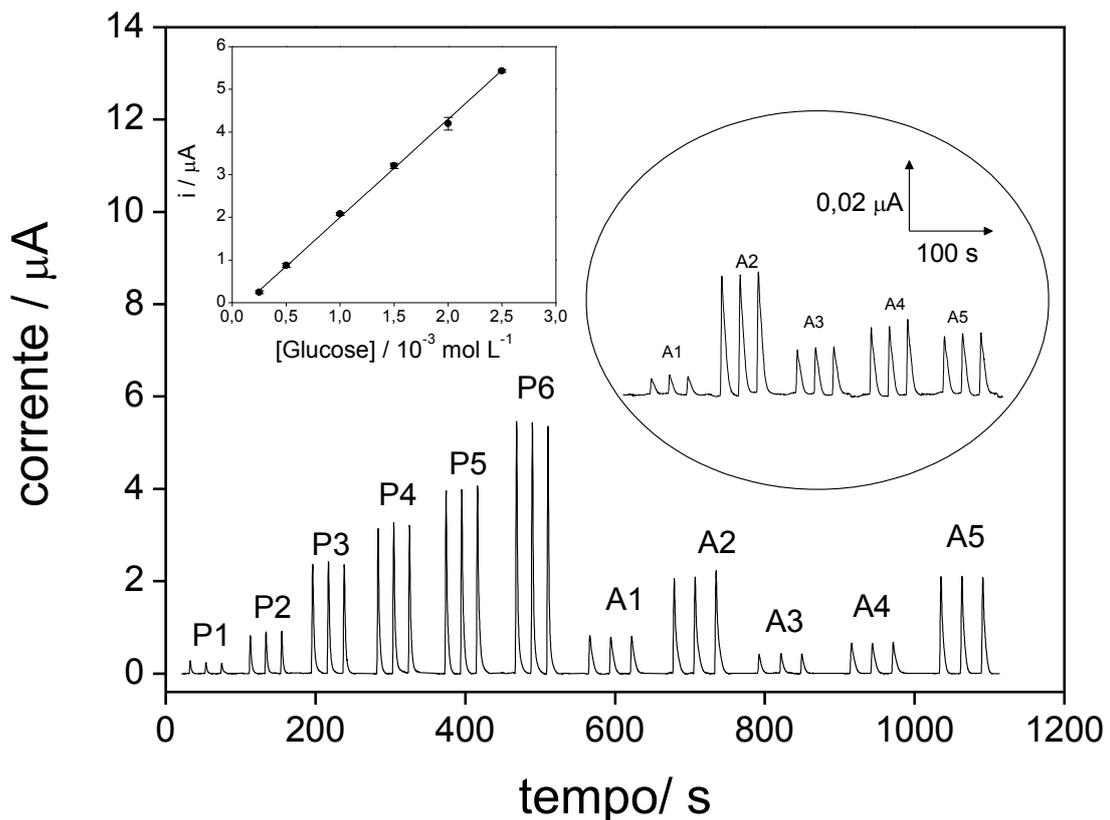


Figura 34: Resposta amperométrica para padrões de D-glicose P_1 : $2,5 \times 10^{-4}$; P_2 : $5,0 \times 10^{-4}$; P_3 : $1,0 \times 10^{-3}$; P_4 : $1,5 \times 10^{-3}$; P_5 : $2,0 \times 10^{-3}$; P_6 : $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e para as cinco amostras de refrigerante (A_1 a A_5); em detalhe a curva analítica obtida e as injeções de glicose com reator não modificado. Condições: eletrólito tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7; $E = 0,6$ V vs Ag/AgCl_(KCl sat); Vazão do carreador: 250 μ L min⁻¹; volume injetado: 5,7 μ L (vazão de injeção: 344 μ L min⁻¹; tempo de injeção: 1,0 s).

Os resultados da análise de todas as amostras estão sumarizados na *Tabela 3*, pela qual é possível comparar os valores obtidos empregando-se os métodos amperométrico e

espectrofotométrico. Nesta tabela constam os valores das médias obtidas, os respectivos valores de desvio padrão (*DP*) e os valores de d_i , que é diferença entre os valores médios obtidos pelos dois métodos empregados.

Tabela 3: Resultados obtidos para as análises de glicose nas cinco amostras através dos métodos espectrofotométrico e amperométrico.

Amostra	Espectrofotometria		Amperometria		Diferença (d_i)
	$C / \text{mg mL}^{-1}$	$DP / \text{mg mL}^{-1}$	$C / \text{mg mL}^{-1}$	$DP / \text{mg mL}^{-1}$	
A₁	130,8	0,9	128,1	1,2	-2,7
A₂	331,5	1,7	322,8	2,8	-8,7
A₃	69,9	0,7	67,0	0,9	-3,0
A₄	105,2	0,6	102,9	0,9	-2,3
A₅	334,8	2,4	328,2	2,7	-6,6

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste *t* pareado, ($t_{\text{EXPERIMENTAL}} = 3,700$ e $t_{\text{TABELADO}} = 4,303$). Como os valores de $t_{\text{EXPERIMENTAL}}$ obtidos são menores que o t_{TABELADO} , pode-se concluir que os resultados obtidos na determinação de glicose pelo método proposto e por espectrofotometria não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%.

Cabe destacar os bons resultados obtidos utilizando o sistema que associa microcanais com detecção amperométrica. Os resultados obtidos com o sistema proposto apresentam maior precisão que o clássico método espectrofotométrico para determinação de glicose.

6. Conclusões e Perspectivas

A modificação da superfície interna de PMMA utilizando PEI mostrou-se eficaz para a imobilização da glicose oxidase, sendo potencialmente aplicável para a imobilização de outras enzimas de interesse analítico. Além disso, apresentou apreciável estabilidade a longo prazo, sendo possível ser utilizado por mais de três semanas se respeitadas as condições de estocagem.

A metodologia para a determinação de glicose utilizando o reator modificado apresentou limite de detecção apreciável ($1,40 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), boa sensibilidade ($2,36 \pm 0,02 \mu\text{A/mM}$) e alta frequência de amostragem ($345 \text{ determinações h}^{-1}$), podendo ser utilizado para quantificação de glicose em diversas matrizes.

O sistema de injeção proposto permite a introdução da amostra no sistema sem sua prévia diluição em eletrólito carreador, podendo ela ser diluída somente em água deionizada. O sistema de injeção possui um volume morto inerente ao preenchimento com amostra de toda a extensão da tubulação de *Tygon* utilizado na bomba peristáltica. Mesmo esse volume morto sendo pequeno ($\sim 1,4 \mu\text{L} / \text{cm}$ de tubulação), ele deve ser considerado. Dessa forma, maneiras de diminuir esse volume morto devem ser analisadas.

Os componentes de propulsão e de injeção (bomba pneumática e peristáltica) ocupam um volume muito grande quando comparado com as dimensões do reator, o que descaracteriza o conjunto como sistema portátil, que é uma das características desejadas na pesquisa em μ -TAS. A utilização de minibombas de pistão e minibombas piezelétricas seriam uma maneira de diminuir o espaço ocupado pelo sistema, aumentando sua portabilidade.

O módulo de detecção é anexo à parte microfluídica, conectado a ela por tubulação de *Tygon*, sendo que o uso de conexões aumenta os processos de dispersão.

Procedimentos de incorporação dos componentes de detecção no final do próprio reator podem ser avaliados pela utilização de eletrodos de pequenas dimensões ou até mesmo microeletrodos. Uma maneira alternativa seria a utilização de eletrodos de CD-R, pela facilidade de confecção e versatilidade para detecção miniaturizada *in line*.

Uma dificuldade para a incorporação de eletrodos no final do reator seria relativo a inserção do eletrodo de referência (Ag/AgCl), já que este requer que a parte metálica do eletrodo esteja mergulhada em solução de KCl, sendo difícil sua miniaturização em níveis milimétrico e micrométrico. Uma alternativa viável para contornar este problema seria a utilização de eletrodos sólidos de quasi-referência.

7. Referências Bibliográficas

- [1] Coltro, W. K. T.; Fabricação e avaliação de microdispositivos para eletroforese com detecção eletroquímica, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, **2004**.
- [2] Terry, S. C.; Jerman, J.; Angell, J.; A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon-wafer; *IEEE Trans. on Electron Devices*, ED-26, **1979**, 12, 1880-1886.
- [3] Coltro, W. K. T.; Piccin, E.; Carrilho, E.; De Jesus, D. P., Da Silva, J. A. F., Da Silva, H. D. T.; Do Lago, C. L., *Microssistemas de análises químicas. Introdução, Tecnologias de Fabricação, Instrumentação e Aplicações*, Química Nova, **2007**, 30, (8), 1986-2000.
- [4] Chen, G; Lin, Y.; Wang, J.; Monitoring environmental pollutants by microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Talanta*, **2006**, 68, (2), 497-503.
- [5] Verpoorte, E., *Microfluidics chips for clinical and forensic analysis*, *Electrophoresis*, **2002**, 23, (5), 677-712.
- [6] Effenhauser, C. S. et al., High-speed separation of antisense oligonucleotides on a micromachined capillary electrophoresis device, *Analytical Chemistry*, **1994**, 66, (18), 2949-2953.
- [7] Miró, M., Hansen, E. H., Miniaturization of environmental chemical assays in flowing systems: The lab-on-a-valve approach vis-a-vis lab-on-a-chip microfluidic devices, *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 600 (1-2), 46-57.
- [8] Reidy, S., Lambertus, G., Reece, J., Sacks, R., High-Performance, Static-Coated Silicon Microfabricated Columns for Gas Chromatography, *Analytical Chemistry*, **2006**, 78 (8), 2623–2630.

- [9] Manz, A.; Miyahara, Y.; Miura, J.; Watanabe, Y.; Miyagi, H.; Sato, K., Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology, *Sensors and Actuators B*, **1990**, 1, (1-6), 249-255.
- [10] Taniyaniwa, J.; Hauser, P. C., High-voltage capacitively coupled contactless conductivity detection for microchip capillary electrophoresis, *Analytical Chemistry*, **2002**, 74, (24), 6378-6382.
- [11] Greenway, G.M.; Haswell, S.J.; Petsul, P.H.; Characterisation of a micro-total analytical system for the determination of nitrite with spectrophotometric detection, *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 387, (1), 1-10.
- [12] <http://www.chem.agilent.com/Scripts/PDS.ASP?IPage=51>, acessado em 28 de dezembro de 2010.
- [13] Wang, J., Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review, *Talanta*, **2002**, 56, (2), 223-231.
- [14] Lacher, N. A.; Garrisson, K. E. R.; Martin, S.; Lunte, S. M., Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry, *Electrophoresis*, **2001**, 22, (12), 2526-2536
- [15] Vandaveer, W. R.; Fischer, D. J.; Franckenfeld, C. N.; Lunte S. M., Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2004**, 25, (21-22), 3528-3549.
- [16] Brito-Neto, J. G. A.; Da Silva, J. A. F., Blanes, L. Do Lago, C. L, Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals, *Electroanalysis*, **2005**, 17, (13), 1198-1206.
- [17] Vilckner, T.; Janasek, D.; Manz, A., Micro total analysis systems. Recent developments, *Analytical Chemistry*, **2004**, 76, (12), 3373-3386.

- [18] Dittrich, P. S.; Tachikawa, K.; Manz, A., Micro total analysis systems. Latest advancements and trends, *Analytical Chemistry*, **2006**, 78, (12), 3887-3908.
- [19] Miyazaki, M. Maeda, H., Microchannel Enzyme reactors and their applications for processing, *Trends in Biotechnology*, **2008**, 24, (10), 463-470.
- [20] Oliveira, A. C. A.; Assis, V. C.; Matos, M. A. C.; Matos, R. C. Flow-injection system with glucose oxidase immobilized on a tubular reactor for determination of glucose in blood samples. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 535, (1-2), 213-217.
- [21] Blanes, L.; Mora, M. F.; Do Lago, C. L.; Ayon, A.; Garcia, C. D. Lab-on-a-chip biosensor for glucose based on a packed immobilized enzyme reactor. *Electroanalysis*, **2007**, 19, (23), 2451-2456.
- [22] Reis, B. F.; Giné, M. F.; Kronka, E. A. M., A Análise química por injeção em fluxo contínuo, *Química Nova*, **1989**, 12, (1), 82-91.
- [23] Xue, Q. et al., Multichannel Microchip Electrospray Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1997**, 69, (3), 426-430.
- [24] He, B.; Tait, N.; Regnier, F., Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, (18), 3790-3797.
- [25] Wang, C. H., Lee G. B., The applications of integrated micro fluidic chips on automatic diagnosis systems, *IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics*, **2005**.
- [26] Gorkin III, R., Clime, L.; Madou, M.; Kido, H., Pneumatic pumping in centrifugal microfluidic platforms, *Microfluidics and nanofluidics*, **2010**, 9, (2-3), 541-549.
- [27] Haswell, S.J., Development and operating characteristics of micro flow injection based on electroosmotic flow - A review, *Analyst*, **1997**, 122, 1R-10R.

- [28] Van Kuijk, J., Numerical modelling of flows in micro mechanical devices, Tese de Doutorado, University of Twente, **1997**.
- [29] Jacobson, S. C.; Hergenroder, R.; Koutny, L. B.; Warmack, R. J.; Ramsey, J. M., Effects of injection schemes and column geometry on the performance of microchip Electrophoresis Devices. *Analytical Chemistry*, **1994**, 66, (7), 1107-1113.
- [30] Vladislavljević, G. T., Kobayashi, I., Nakajima, M., Generation of highly uniform droplets using asymmetric microchannels fabricated on a single crystal silicon plate: Effect of emulsifier and oil types. *Powder Technology*, **2008**, 183, (1), 37-45.
- [31] Martynova, L.; Locascio, L. E.; Gaintan, M.; Kramer, G. W.; Christensen, R. G.; MacCrehan, W. A., Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. *Analytical Chemistry*, **1997**, 69, (23), 4783-4789.
- [32] Do Lago, C. L.; Da Silva, H. D. T.; Neves, C. A.; Brito-Neto, J. G. A.; Da Silva, J. A. F., A dry process for production of microfluidic devices based on the lamination of laser-printed polyester films. *Analytical Chemistry*. **2003**, 75, (15), 3853-3858.
- [33] Cheng, J. Y.; Cheng, W. W.; Hsu, K. H.; Young, T. H., Direct-write laser micromachining and universal surface modification of PMMA for device development. *Sensors and Actuators B*, **2004**, 99, (1), 186-196.
- [34] Da Costa, E. T., Processo de fabricação de mini e microdispositivos por ablação a Laser de dióxido de carbono, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química – USP, **2009**.
- [35] Cheng, J. Y.; Cheng, W. W.; Hsu, K. H.; Young, T. H., Direct-write laser micromachining and universal surface modification of PMMA for device development. *Sensors and Actuators B*, **2004**, 99, (1), 186-196.

- [36] Liu, Y.; Lu, H.; Zhong, W.; Song, P.; Kong, J.; Yang, P.; Girault, H. H.; Liu B., Multilayer-assembled microchip for enzyme immobilization as reactor toward low-level protein identification, *Analytical Chemistry*, **2006**, 78, (3), 801-808.
- [37] McDonald, J. C., Whitesides, G. M., Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of Chemical Research*, **2002**, 35, (7), 491-499.
- [38] Verpoorte, E., Beads and chips: new recipes for analysis. *Lab on a Chip*, **2003**, 3, 60N-68N.
- [39] Li, Y.; Xu, X.; Yan, B.; Deng, C.; Yu, W.; Yang, P.; Zhang, X., Microchip reactor packed with metal-ion chelated magnetic silica microspheres for highly efficient proteolysis. *Journal of Proteome Research*, **2007**, 6, (6), 2367-2375.
- [40] Kricheldorf, H.R.; Nuyken, O.; Swift, G., *Handbook of polymer synthesis*, Marcel Dekker, **1992**.
- [41] Brydson, J.A., *Plastics materials*, Butterworth-Heinemann, **1999**.
- [42] Sun, Y.; Kwok, Y.C.; Nguyen, N., Low-pressure, high-temperature thermal bonding of polymeric microfluidic devices and their applications for electrophoretic separation, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **2006**, 16, (8), 1681-1688.
- [43] Ferriol, M. et al., Thermal degradation of poly(methyl methacrylate) (PMMA): modelling of DTG and TG curves, *Polymer Degradation and Stability*, 79, **2003**, (2), 271-281.
- [44] Chiantore, O.; Luda di Cortemiglia, M.P.; Guaita, M., Changes of degree of polymerisation in the thermal degradation of poly(methyl methacrylate), *Polymer Degradation and Stability*, 24, **1989**, (24), 113-126.
- [45] Dakka, S., TG/DTA/MS OF poly(methyl methacrylate) - The effect of particle size, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **2003**, 74, (3), 729-734.

- [46] Dakka, S., TG/DTA/MS of poly(methyl methacrylate) - The role of the oxidative environment, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* , **2003**, 73, (1) 17-24.
- [47] Dakka, S., TG/MS of poly(methyl metracrylate) - The effect of heating rate on the rate of production of evolved gases, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **2004**, 75, (3), 765-882.
- [48] Urban, P. L., Goodall, D. M., Bruce, N. C. Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies. *Biotechnology Advances*, **2006**, 24, (1), 42-57.
- [49] Haswell, S. J., Watts, P. Green chemistry: synthesis in micro reactors. *Green Chemistry*, **2003**, 5, 240-249.
- [50] Mello, A., Wootton, R. But what is it good for? Applications of microreactor technology for the fine chemical industry. *Lab on a Chip*, **2002**, 2, 7N-13N.
- [51] Roberge, D. M., Zimmermann, B., Rainone, F., Gottsponer, M., Eyholzer, M., Kockmann, N. Microreactor technology and continuous processes in the fine chemical and pharmaceutical industry: Is the revolution underway? *Organic Process Research & Development*, **2008**, 12, (5), 905-910.
- [52] Posthuma-Trumpie, G. A., Venema, K., Van Berkel, W. J. H., Korf, J., A low perfusion rate microreactor for continuous monitoring of enzyme characteristics: application to glucose oxidase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2007**, 389, (6), 2029-2033.
- [53] Pfohl, T., Mugele, F., Seemann, R., Herminghaus, S., Trends in microfluidics with complex fluids, *Chemphyschem*, **2003**, 4, (12), 1291-1298.
- [54] Schwarz, M. A., Hauser, P. C., Recent developments in detection methods for microfabricated analytical devices, *Lab on a Chip*, **2001**, 1, (1), 1-6.

- [55] Kamholz, A. E.; Yager, P., Theoretical analysis of molecular diffusion in pressure-driven laminar flow in microfluidic channels, *Biophysical Journal*, **2001**, 80, (1), 155-60.
- [56] Nguyen, N. T. e Wu, Z., Micromixers - a review, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **2005**, 15, (5), R1-R16.
- [57] Goddard, J.M.; Hotchkiss, J.H., Polymer surface modification for attachment of bioactive compounds, *Progress in Polymer Science*, **2007**, 32, (7), 698-.725.
- [58] Bai, Y.; Koh, C. G.; Boreman, M; Juang, Y. J.; Tang, I. C.; Lee, L. J.; Yang, S. T., Surface modification for enhancing antibody binding on polymer-Based microfluidic device for enzyme-linked immunosorbent assay; *Langmuir*, **2006**, 22, (22), 9458-9467.
- [59] Fixe, F.; Dufva, M.; Telleman, P.; Christensen, C. B. V., One-step immobilization of aminated and thiolated DNA onto poly(methylmethacrylate) (PMMA) substrates, *Lab on a Chip*, **2004**, 4, (3), 191-195.
- [60] Bulmus, V.; Ayhan, H.; Pipkin, E., Modified PMMA monosize microbeads for glucose oxidase immobilization, *The Chemical Engineering Journal*, **1997**, 65, (3), 71-76.
- [61] Naqvi, A.; Nahar, P.; Gandhi, R.P., Introduction of functional groups onto polypropylene and polyethylene surfaces for immobilization of enzymes, *Analytical Biochemistry*, **2002**, 306, (1), 74-78.
- [62] Seong, G.H.; Crooks, R.M., Efficient mixing and reactions within microfluidic channels using microbead-supported catalysts. *Journal of America Chemical Society*, **2002** 124, (45), 13360-13361.
- [63] Holden, M.A.; Jung, S. Y.; Cremer, P. S., Patterning enzymes inside microfluidic channels via photoattachment chemistry. *Analytical Chemistry*, **2004**, 76, (7), 1838-1843.

- [64] Liu, Y.; Lu, H.; Zhong, W.; Song, P.; Kong, J.; Yang, P.; Girault, H. H.; Liu, B., Multilayer-assembled microchip for enzyme immobilization as reactor toward low-level protein identification, *Analytical Chemistry*, **2006**, 78, (3), 801-808.
- [65] Glodek, J.; Mika, P.; Krest, I.; Keusgen, M., Derivatization of fluorinated polymers and their potential use for the construction of biosensors, *Sensors and Actuators B*, **2002**, 83, (1-3), 82-89.
- [66] Lei, Y.G.; Segura, T., DNA delivery from matrix metal lop proteinase degradable poly(ethylene glycol) hydrogels to mouse cloned mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, **2009**, 30, (2), 254-265.
- [67] Kitagawa, F. Kubota, K.; Sueyonshi, K.; Otsuka, K., One-step immobilization of cationic polymer onto a poly(methyl methacrylate) microchip for high-performance electrophoretic analysis of proteins, *Science and Tecnology of Advanced Materials*, **2006**, 7, (6), 558-565.
- [68] Feng, M.; Lee, D.; Li, P., Intracellular uptake and release of poly(ethyleneimine)-co-poly(methyl methacrylate) nanoparticle/pDNA complexes for gene delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, **2006**, 311, (1,2), 209-214.
- [69] Chen, J.; Zenf, F.; Wu, S.; Su, J.; Zhao, J.; Thong, Z., A facile approach for cupric ion detection in aqueous media using polyethyleneimine/PMMA core-shell fluorescent nanoparticles, *Nanotechtonoly*, **2009**, 20, (26), 365502-365508.
- [70] He, H.; Yuan, Y.; Wang, W.; Chiou, N. R.; Epstein, A. J.; Lee, J., Design and testing of a microfluidic biochip for cytokine enzyme-linked immunosorbent assay. *Biomicrofluidics*, **2009**, 3, (2), 022401-022016.

- [71] Bai, Y., Surface Modification for Enhanced Immobilization of Biomolecules: Applications in biocatalysis and immuno-biosensor, Tese de Doutorado, The Ohio State University, **2006**.
- [72] Hall, S. B.; Khudaish, E. A.; Hart, A. L., Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part I: An adsorption-controlled mechanism, *Electrochimica Acta*, **1998**, 43, (5-6), 579-588.
- [73] Beach, E. F. e Turner, J. J., An enzymatic method for glucose determination in body fluids. *Clinical Chemistry*, **1958**, 4, (6), 462-475.
- [74] Baucia, A. B., Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído empregado na confecção de válvulas cardíacas: Comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos, Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Tecnológicas – Universidade de São Paulo, **2005**.
- [75] Brights, H.J.; Appleyby, M. The pH dependence of the individual steps in the glucose oxidase Reaction, *The Journal of Biological Chemistry*, **1969**, 244, (13), 3625-3634.
- [76] Weibel, M.K; Brights, H. J., The Glucose oxidase mechanism: Interpretation of the pH dependence, *The Journal of Biological Chemistry*, **1971**, 246, (9), 2734-2744.
- [77] Hall, S. B.; Khudaish, E. A.; Hart, A. L., Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part IV: phosphate buffer dependence, *Electrochimica Acta*, **1999**, 44, 4573-4582.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Luís Marcos Cerdeira Ferreira

e-mail: cerdeira@iq.usp.br

Local e data de nascimento: Juiz de Fora, 28 de agosto de 1984.

EDUCAÇÃO

Colégio Tiradentes da Polícia Militar de Minas Gerais, Juiz de Fora – MG, 2002.

Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG, 2008.

Bacharelado e Licenciatura em Química

Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2011.

Mestrado em Química Analítica

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, CNPq, vigência da bolsa, março/2009 – fevereiro/2011.

Bolsista de Iniciação Científica, CNPq - PIBIC, - agosto/2008 – dezembro/2008.

Bolsista de Iniciação Científica, UFJF - BIC, agosto/2007 – julho/2008.

PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS

1. Ferreira, L.M.C.; Angnes, L., *Determinação de glicose em refrigerantes utilizando sistema em fluxo miniaturizado como reator de PMMA modificado com glicose oxidase.*

IV Congresso Iberoamericano de Química Analítica. X Encuentro Nacional de Química Analítica y Ambiental, 2010, Concón, Chile, 2010.

2. Ferreira, L.M.C.; Angnes, L., *Imobilização enzimática em superfície funcionalizada de PMMA em microrreator acoplado a FIA para o monitoramento de glicose.*

33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo, 2010.

3. Freitas, K.H.G.; Ferreira, L.M.C.; Fatibello-Filho, O., *determinação de Quercetina em Chás por SWV utilizando um eletrodo compósito de carbono modificado com $Cu_3(PO_4)_2$* .
33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo, 2010.

4. Ferreira, L.M.C; Sperandio, G.H. ; Matos, M.A.C ; Matos, R.C., *Quantificação de cobre e chumbo por redissolução potenciométrica a corrente constante em leite usando eletrodos de filme de Hg*.

15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3o. Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador, BA, 2009.

5. Ferreira, L.M.C; Delage, D.T.; Matos, R.C., *Desenvolvimento e aplicação de metodologia analítica para monitoramento de espécies químicas em água de chuva na cidade de Juiz de Fora*.

XIV Seminário de Iniciação Científica e o IV Seminário de Iniciação Científica Júnior, Juiz de Fora, MG, 2008.

6. Delage, D.T. ; Ferreira, L.M.C.; Castro P.S ; M Matos, R.C., *Avaliação dos níveis de Cu, Pb e Cd por redissolução potenciométrica (PSA) em amostras de mel*.

31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia-SP, 2008.

7. Valentim, R.G.A.; Delage, D.T. ; Ferreira, L.M.C. ; Araujo, M.T.S ; Matos, M.A.C ; Matos, R. C., *Análise de cátions em gel clareador (H_2O_2 35 %) usando eletroforese capilar em zona após clareamento dental: um estudo in vitro*.

14º. Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa-PB, 2007.