UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química de São Carlos

**NOVAS TECNOLOGIAS PARA FABRICAÇÃO DE MICROSISTEMAS
ANALÍTICOS E DETECÇÃO ELETROQUÍMICA**

Evandro Piccin

Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Ciências (Química Analítica)

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2008

À DEUS, pela vida.

À minha mãe Cleusa e meu pai Carlos pelo amor, apoio incondicional e luta em oferecer a mim e minhas irmãs as oportunidades que não puderam ter.

Às minhas irmãs Andreza e Gabriela pelo apoio e carinho em todos os momentos da minha vida.

À minha Suelen pelo incentivo, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Prof. Dr Emanuel Carrilho. Muito obrigado pela orientação, amizade, incentivo e ter acreditado em meu potencial. Além dos ensinamentos científicos agradeço pelos valiosos exemplos em sabedoria e simplicidade.
- Ao Prof. Dr. Joseph Wang pela oportunidade em trabalhar em seu laboratório (Biodesign Institute – Arizona State University), orientação e por ter acreditado em meu potencial. Além dos ensinamentos na área científica, muito obrigado pelos incríveis ensinamentos em administração e liderança.
- Ao meu “co-orientador” Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo. Muito obrigado pela ajuda, ensinamentos em eletroanalítica e pelos admiráveis exemplos de simplicidade e humanidade.
- Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças pela oportunidade em trabalhar no CROMA.
- Ao meu grande amigo Marcelo Delmar Cantú, pessoa pela qual tenho grande admiração pela dedicação e habilidade organizacional. Posso dizer que aqui no IQSC encontrei uma grande amizade em que tenho bastante orgulho e plena confiança.
- Aos meus grandes amigos André Roberto Jacob (cunhado) e Márcio Freitas.
- Aos amigos do Grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações (BioMicS): Ana Paula, Carlos, Célia, Flávia, Gabriela, Jonatan, Juliana, Karina Fraige, Karina Lupetti, Leandro, Marcelo, Maribel, Nilson, Regiane, Renê, Rosilene, Sheila, Valéria e Wendell. Agradeço muito pelos momentos de trabalho, amizade e descontração.
- A todos os amigos do Biodesign Institute da Arizona State University. Em especial aos que trabalharam diretamente comigo: Nicolo Dossi (Itália), Rawiwan Laocharoensuk (Tailândia), Jared Burdick (USA) e Ralph Bash (USA, *in memorian*).
- Aos amigos (estudantes e funcionários) do CROMA pelos momentos de trabalho e descontração.
- Ao Dr. Salvador Claro Neto pelo trabalho em conjunto no desenvolvimento dos dispositivos em poliuretana.

- Agradecimento especial ao amigo Nicolo Dossi. Encontrei nos EUA essa grande pessoa que tive o prazer de trabalhar, sempre tentando me espelhar em seus ensinamentos, simplicidade e caráter.
- Aos amigos da minha república: Adriano, Eurico, Haruo e Luis Gustavo (Lafon), pelos momentos de amizade, confraternização, alegria e excelentes churrascos.
- Agradecimento especial ao Eurico que simplesmente imprimiu todos os exemplares dessa tese, enquanto eu ainda “lutava” para fazer as últimas formatações.
- Ao grande amigo Rodrigo (Escobar) pelos momentos de amizade e alegria em nossa república nos EUA.
- Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho pelo incentivo, amizade e exemplos de dedicação.
- Ao meu amigo Luiz Antônio Ramos, técnico do IQSC / USP.
- Aos pesquisadores do LMF / LNLS Ângelo Gobbi e Maria Helena pelo apoio no desenvolvimento de parte desse trabalho.
- A todos os funcionários do IQSC / USP. Em especial à Andréia e Silvia, da SPGR, pela grande ajuda nesses quatro anos.
- Ao CNPq pela bolsa de Doutorado aqui no Brasil e a CAPES pela bolsa nos EUA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv

<u>CAPÍTULO I - MINIATURIZAÇÃO EM QUÍMICA ANALÍTICA</u>	1
1.1 MINIATURIZAÇÃO	2
1.2 MICROFLUÍDICA.....	3
1.3 ELETROFORESE EM MICRODISPOSITIVOS	10
1.3.1 Aspectos gerais	10
1.3.2 Detecção em eletroforese em microdispositivos.....	12
1.3.2.1 Detecção no final do microcanal de separação (<i>“end-channel”</i>).....	15
1.3.2.2 Detecção no interior do microcanal de separação (<i>“in-channel”</i>).....	19
1.3.2.3 Detecção “fora” do microcanal de separação (<i>“off-channel”</i>).....	20
1.4 ELETROFORESE CAPILAR (CE).....	21
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

<u>CAPÍTULO II – MICRODISPOSITIVOS EM POLIURETANA</u>	31
1. INTRODUÇÃO	32
1.1 Polímeros em microfluídica.....	32
1.1.1 Moldagem polimérica e prototipagem rápida de moldes.....	36
1.1.2 Estampagem a quente (<i>“hot embossing”</i>).....	38
1.1.3 Moldagem por injeção (<i>“injection molding”</i>)	40
1.1.4 Ablação com laser (<i>“laser ablation”</i>).	42
1.1.5 Outras técnicas de microfabricação.....	43
1.2 Poliuretanas.....	45
2. RESUMO DO TRABALHO	47
3. EXPERIMENTAL	48
3.1 Reagentes e Soluções.....	48
3.2 Microfabricação	50

3.2.1 Prototipagem rápida de moldes	50
3.2.2 Moldagem e selagem dos microdispositivos em PU	53
3.3 Caracterização.....	55
3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	55
3.3.2 Compatibilidade química com solventes e extração de oligômeros.....	55
3.3.3 Medidas de ângulo de contato.....	56
3.3.4 Fluxo eletrosmótico (EOF)	56
3.4 Eletroforese em microdispositivos	57
3.4.1 Experimentos realizados no GMEME	58
3.4.2 Experimentos realizados no Biodesign Institute	59
3.5 Detecção eletroquímica na saída do canal de separação	60
3.5.1 Experimentos realizados no GMEME	60
3.5.2 Experimentos realizados no Biodesign Institute	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1 PU derivada do óleo de ricínio.....	64
4.2 Caracterização física dos microcanais moldados usando em poliuretana..	65
4.3 Compatibilidade química com solventes e extração de oligômeros.....	68
4.4 Medidas de ângulo de contato.....	73
4.5 Dissipação de calor e fluxo eletrosmótico (EOF)	77
4.6 Eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica.....	80
4.6.1 Experimentos realizados no GMEME	80
4.6.2 Experimentos realizados no Biodesign Institute	82
5. CONCLUSÕES	86
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
 <u>CAPÍTULO III - DETERMINAÇÃO DE AZO-CORANTES EM ALIMENTOS ...</u>	 94
1. INTRODUÇÃO	95
1.1 Aditivos em alimentos	95
1.2 Corantes em alimentos	97
1.3 Azo-corantes em alimentos	104
1.4 Métodos usados na determinação de corantes em alimentos	105
2. RESUMO DO TRABALHO.....	112
3. EXPERIMENTAL.....	114

3.1 Reagentes e soluções	114
3.2 Equipamentos	115
3.3 Procedimento eletroforético	118
3.4 Detecção Eletroquímica	118
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
4.1 Amostras reais	130
5. CONCLUSÕES	132
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
 <u>CAPÍTULO IV - DETECTOR ELETROQUÍMICO ADAPTATIVO</u>	 139
1. INTRODUÇÃO	140
1.1 Sistemas adaptativos em química analítica	140
1.2 Microfluídica e magnetismo	149
2. RESUMO DO TRABALHO	154
3. EXPERIMENTAL	156
3.1 Reagentes e Soluções	156
3.2 Equipamentos	157
3.3 Construção do contato elétrico	158
3.4 Síntese dos nanofios de níquel	161
3.5 Eletroforese em microdispositivos	162
3.6 Detecção eletroquímica	163
3.7 Posicionamento e orientação dos nanofios de níquel	163
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	165
5. CONCLUSÕES	176
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – MINIATURIZAÇÃO EM QUÍMICA ANALÍTICA

- Figura 1:** Diagrama esquemático do modelo de microdispositivo mais comumente usado em separações eletroforéticas. **(A)** Microcanais de injeção (I) e de separação (II) dispostos em cruz, com reservatórios para amostra, solução tampão, descarte da amostra e detecção por (1), (2), (3) e (4), respectivamente. **(B)** Intersecções entre os microcanais de injeção e separação na forma de simples-T e duplo-T. 11
- Figura 2:** Desenho esquemático das possíveis configurações de alinhamento do eletrodo de trabalho no microcanal de separação. **(A)** Eletrodo na saída do microcanal (*“end-channel”*) e integrado no próprio dispositivo (*“on-chip”*), **(B)** eletrodo na saída do microcanal (*“end-channel”*) e fora do dispositivo (*“off-chip”*), **(C)** eletrodo no interior do microcanal (*“in-channel”*) e **(D)** eletrodo no interior do microcanal mas fora do campo elétrico da separação eletroforética (*“off-channel”*). 15
- Figura 3:** Microdispositivo em vidro com eletrodos de detecção e eletroforese integrados construído usando as técnicas de fotolitografia, corrosão química *via* úmida, deposição metálica por *sputtering* e vedação térmica.. 18
- Figura 4:** Esquema representativo de um sistema CE..... 22
- Figura 5:** Representação do EOF em um capilar. O EOF é causado pelos grupos silanóis, negativamente carregados, presentes na parede interna do capilar. Essas espécies negativas atraem espécies positivamente carregadas formando uma camada fixa. Uma segunda camada positiva, móvel, também é formada e atraída em direção ao cátodo, carregando a solução tampão consigo..... 24

CAPÍTULO II – MICRODISPOSITIVOS EM POLIURETANA

- Figura 1:** Fabricação de moldes por prototipagem rápida em fotolitografia seguida da construção de microdispositivos através do processo de moldagem polimérica.^[6] 37
- Figura 2:** Equipamento usado para fabricação de microdispositivos através da técnica de estampagem a quente (*“hot embossing”*).^[5,13] 40

Figura 3: Seção transversal do equipamento comumente usado na técnica de moldagem por injeção de polímeros termoplásticos. ^[5]	41
Figura 4: Desenho esquemático das etapas envolvidas na fabricação de microcanais em um substrato polimérico através da técnica de ablação com laser. ^[17]	43
Figura 5. Reação de polimerização idealizada entre um diisocianato e um polioli para a formação da PU.	45
Figura 6: Desenho esquemático da máscara fotolitográfica positiva usada para a construção do microdispositivo. As linhas representam microcanais com 60 μ m de largura e as circunferências reservatórios com 2,5 mm de espessura. Os comprimentos dos microcanais de injeção e separação foram de 1,6 e 4,0 cm, respectivamente.	50
Figura 7: Etapas envolvidas na fabricação dos moldes usando prototipagem rápida em fotolitografia e eletrodeposição de níquel.	52
Figura 8. Diagrama esquemático das etapas envolvidas na construção dos microdispositivos em PU através da técnica de moldagem simples. (I) aplicação da resina polimérica sobre o molde de níquel, (II) polimerização da resina sobre o molde, (III) retirada das réplicas moldadas, (IV) selagem dos microcanais usando uma peça lisa do mesmo polímero e (V) microdispositivo com microcanais vedados.	54
Figura 9: Desenho esquemático do sistema usado no GEMEME para o acoplamento entre eletroforese em microdispositivos e detecção eletroquímica. (A) Partes do sistema: (a) suporte em acrílico com posicionador x-y, (b) microdispositivo fabricado em PU e (c) eletrodo de ouro planar fabricado usando CDs regraváveis. (B) Acoplamento do microdispositivo e do eletrodo de trabalho.	60
Figura 10: Desenho esquemático do sistema comumente usado no Biodesign Institute para o acoplamento entre eletroforese em microdispositivos de vidro e detecção eletroquímica.	62
Figura 11: Fotografia do sistema usado no Biodesign Institute para os experimentos de eletroforese com detecção amperométrica em microdispositivos fabricados em PU.	63

- Figura 12:** Estruturas moleculares do trigliceídio do ácido ricinoleico e do MDI, usados respectivamente, como o polioli e o isocianato na síntese da PU elastomérica. 64
- Figura 12:** Micrografias eletrônicas de varredura dos microcanais fabricados em PU usando moldes fabricados por prototipagem rápida em fotolitografia e eletrodeposição de níquel. (A) micrografia de topo do microcanal aberto e (B) micrografia da seção transversal do microcanal selado reversivelmente. 66
- Figura 13:** Micrografias eletrônicas de varredura dos microcanais fabricados em PU moldada usando moldes descartáveis em toner impressos em transparências de poliéster. (A) micrografia de topo do microcanal aberto e (B) micrografia da seção transversal do microcanal selado. 67
- Figura 14:** Determinação do grau de inchamento do polímero após contato de 24 h com o solvente hexano. Fotografias obtidas usando uma câmera CCD de uma pequena peça cilíndrica do polímero antes (A) e após 24h de imersão em hexano (B). As dimensões foram determinadas usando o software CorelDraw 11.0..... 69
- Figura 15.** Determinação da compatibilidade química do polímero com vários solventes e soluções aquosas de concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Intensidades de deformação expressas pelo grau de inchamento através da razão $I = E/E_0$, onde E é a espessuras da peça cilíndrica do polímero após 24h de imersão, e E_0 é a medida da espessuras da peça do polímero antes da imersão no solvente ou eletrólito. Os valores reportados são uma média de cinco experimentos com desvios padrões relativos tipicamente de $\pm 4\%$ ($n = 5$). 70
- Figura 16:** Imagens típicas obtidas usando uma câmera CCD das gotas de água aplicadas sobre a superfície dos polímeros durante os experimentos de determinação do ângulo de contato. (A) PDMS nativo, (B) PU nativa, (C) PDMS tratado a plasma, (D) PU tratada a plasma, (E) PDMS após 24h do tratamento a plasma, (F) PU após 24h do tratamento a plasma, (G) PDMS após 48h do tratamento a plasma e (H) PU após 24h do tratamento a plasma. Os ângulos foram determinados usando o software CorelDraw 11.0. 76
- Figura 17:** Curva de Ohm com monitoramento da corrente em função do campo elétrico aplicado em um microcanal fabricado em PU (1,6 cm comprimento $\times$ 60

μm largura $\times$ 28 μm de profundidade), preenchido com solução tampão fosfato (pH 7) de concentração 10 mmol L^{-1}	78
Figure 18. Efeito do pH sobre a mobilidade do EOF determinado usando o método do monitoramento de corrente com soluções tampão fosfato de pHs variando entre 4 e 12. Valores médios de quatro determinações.....	79
Figure 19. Eletroferogramas obtidos usando os microdispositivos construídos em PU para uma mistura contendo 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina (DA) e 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol (CA). (A) Eletroferograma original e (B) Eletroferograma com correção de linha de base e aplicação de filtro anti-ruído.....	81
Figura 20. Eletroferogramas obtidos para dez injeções consecutivas de uma mistura contendo (a) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de epinefrina e (b) 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de L-DOPA. Condições: eletrólito de corrida, solução tampão fosfato de concentração 20 mmol L^{-1}	84

CAPÍTULO III – DETERMINAÇÃO DE AZO-CORANTES

Figura 1: Corantes sintéticos mais comuns atualmente empregados na indústria alimentícia.....	101
Figura 2: Distribuição do mercado de corantes alimentícios de 940 milhões de dólares de acordo com as classes de corantes sintéticos, corantes naturais, pigmentos e caramelos. ^[1]	103
Figura 3: Ilustração da redução do azo-corante Preto Ácido 77 para formação do composto carcinogênico benzidina. ^[13]	105
Figura 4: Estruturas moleculares dos 5 azo-corantes estudados nesse trabalho através de eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica. ..	113
Figura 5: Fotografias do sistema usado para eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica no desenvolvimento do método para a determinação de azo-corantes em alimentos.....	116
Figura 6: Eletroferogramas obtidos nos experimentos de otimização do eletrólito de corrida na separação eletroforética dos cinco azo-compostos, com (a) Amarelo Sólido AB, (b) Vermelho 2G, (c) Amarelo Crepúsculo FCF, (d) Ponceu 4R e (e) Amaranto. (A) Solução tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 11), (B) solução tampão fosfato 5 mmol L^{-1} (pH 11), (C) solução tampão borato 10 mmol L^{-1} (pH 10,1) e (D) solução tampão borato 10 mmol L^{-1} (pH 9,2).....	122

- Figura 7:** Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos em condição eletroforética para (a) Amarelo Sólido AB, (b) Vermelho 2G, (c) Amarelo Crepúsculo FCF, (d) Ponceu 4R e (e) Amaranto em concentrações de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, obtido usando um eletrodo de carbono vítreo variando-se o potencial aplicado entre 0 e -1,2 V.
- Figura 8:** Efeito do potencial aplicado sobre a separação eletroforética e resposta amperométrica de uma mistura contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Amarelo Sólido AB (a), Vermelho 2G (b) e Amarelo Crepúsculo FCF (c), e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ Ponceu 4R (d) e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ Amaranto (e). Potenciais de separação, (A) 1750 V, (B) 2000 V, (C) 2250 V, (D) 2500 V, e (E) 2750 V. 126
- Figura 9:** Eletroferogramas para misturas contendo concentrações crescentes de (a) Vermelho 2G, (b) Amarelo Crepúsculo FCF e (c) Ponceu 4R, em incrementos de 20 (mol L^{-1} (A – E)). 127
- Figura 10:** Eletroferogramas para cinco injeções consecutivas de uma mistura contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Amarelo Sólido AB (a), Vermelho 2G (b) e Amarelo Crepúsculo FCF (c), e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Ponceu 4R. 129
- Figura 11:** Eletroferogramas obtidos na análise do (A) refrigerante fanta laranja, (B) pastilha “tic tac” sabor laranja e (C) pastilha “tic tac” sabor laranja fortificada com (a) Amarelo Sólido AB e (c) Ponceu 4R, usando o novo método de eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica. A Figura em destaque no canto superior direito representa uma ampliação da região dos picos. 131

CAPÍTULO IV – DETECTOR ELETROQUÍMICO ADAPTATIVO

- Figura 1:** Diagrama esquemático do primeiro biosensor adaptativo magneticamente modulável desenvolvido para determinação de glicose através de oxidação bioeletrocatalítica.^[4] O posicionamento ou remoção das partículas magnéticas contendo o mediador de elétrons (M) sobre a camada de ouro funcionalizada com a enzima GOx permitiu que operação do biosensor fosse interconvertida reversivelmente entre os estados (A) ativo (“ON”) e (B) passivo (“OFF”)..... 141
- Figura 2:** Respostas eletroquímicas obtidas no controle magnético reversível dos estados ativo (“ON”) e passivo (“OFF”) do biosensor eletroquímico.^[4] 143

- Figura 3:** (A) Diagrama esquemático da operação do sensor adaptativo com atividade eletrocatalítica magneticamente modulada através da orientação dos nanofios de níquel em diferentes ângulos. (B) Efeito da modulação magnética dos nanofios de níquel sobre a resposta eletrocatalítica do sensor frente à oxidação de metanol, em experimentos de amperometria e voltametria cíclica, com nanofios de níquel (a) fora da superfície, (b) orientados verticalmente e (c) orientados horizontalmente.^[3] 146
- Figura 4:** Diagrama esquemático do funcionamento do biosensor adaptativo magneticamente modulável para a oxidação bioeletrocatalítica de glicose.^[4] Os nanofios de GOx-Au-Ni foram orientados de maneira horizontal (“H”) e vertical (“V”) sobre a superfície em Au funcionalizada com ferroceno (Fc) usando o campo magnético de um ímã externo. A remoção completa dos nanofios da superfície de ouro causa o bloqueio completo da ativação da GOx mediada pelo Fc. À esquerda estão apresentados os voltamogramas cíclicos correspondentes a cada estado do biosensor..... 148
- Figura 5:** Microdispositivos com operações controladas externamente por forças magnéticas. (A) Bombeamento de solução através do movimento de ferrofluido,^[27] (B) agitação com barra magnética micrométrica,^[28] (C) agitação com micropartículas magnéticas,^[29] (D) eletrocromatografia com fase estacionária constituída por partículas magnéticas funcionalizadas,^[35] (E) reator enzimático com tripsina funcionalizada em partículas magnéticas.^[24] e (F) separação de partículas magnéticas.^[38] 153
- Figura 6:** Diagrama esquemático do detector eletroquímico adaptativo magneticamente modulável acoplado à eletroforese em microdispositivos. Um ímã externo foi usado para o controle magnético do posicionamento e orientação dos nanofios de níquel sobre uma camada de ouro depositada por *sputtering* na saída do microcanal de separação.. 155
- Figura 7:** Detecção amperométrica em microdispositivos usando como eletrodo de trabalho uma camada de ouro fina depositada por *sputtering* na saída do microcanal de separação.^[39] 159
- Figura 8:** Fotografias obtidas do final do microcanal de separação do microdispositivo durante a construção do contato elétrico do sensor eletroquímico magneticamente modulável. (A) Camada de ouro depositada por

- sputtering* no final do microcanal de separação e (B) contato elétrico com o isolante azul delimitando a área da camada de ouro somente em torno da saída do microcanal de separação..... 160
- Figura 9:** Diagrama esquemático das etapas envolvidas na síntese dos nanofios de níquel usando eletrodeposição em moldes de alumina. 162
- Figura 10:** Fotografias retiradas usando uma câmera convencional digital do reservatório de detecção durante a modulação dos nanofios de níquel no final do microcanal de separação nas orientações (A) vertical e (B) horizontal. 164
- Figura 11:** Eletroferogramas para injeções consecutivas de glicose usando o detector adaptativo nos estados ativo ("ON") e passivo ("OFF") durante múltiplos ciclos de atração e remoção dos nanofios de níquel sobre superfície da camada de ouro depositada no final do microcanal de separação..... 165
- Figura 12:** Efeito do reposicionamento não efetivo, indicado pela seta vermelha, dos nanofios de níquel na saída do microcanal de separação durante a volta ao estado ativo ("ON") do detector. A linha de base retornou apenas parcialmente ao nível da primeira análise no estado ativo ("ON") e a detecção dos picos de oxidação da glicose ficou comprometida. 167
- Figura 13:** Eletroferogramas obtidos para injeções consecutivas de glicose mostrando as diferenças nas larguras dos picos obtidos durante múltiplos ciclos "ON/OFF". As larguras dos picos de oxidação da glicose apresentaram o comportamento crescente $a, b < c, d < e, f$ para as injeções duplas realizadas a cada estado ativo ("ON") do detector..... 168
- Figura 14:** Influência da orientação dos nanofios de níquel na saída do microcanal de separação sobre a resposta da detecção em eletroferogramas obtidos para injeções consecutivas de glicose. Nanofios de níquel orientados (A) transversal e (B) longitudinalmente ao microcanal de separação. 169
- Figura 15:** Influência da orientação dos nanofios de níquel na saída do microcanal de separação sobre a resposta da detecção de uma mistura de aminoácidos. Eletroferogramas obtidos para uma mistura contendo 500 μM de (a) arginina, (b) histidina e (c) glicina, com os nanofios orientados de maneira (A) longitudinal, (B) 45° e (C) transversal com relação ao microcanal..... 170
- Figura 16:** Eletroferogramas obtidos para cinco injeções consecutivas de uma mistura contendo 500 μM de (a) arginina, (b) histidina e (c) glicina, com os

nanofios de níquel na posição “ON” e orientados longitudinalmente ao microcanal de separação.....	172
Figura 17: Eletroferogramas obtidos para dez injeções consecutivas de uma mistura contendo 500 μM de (a) arginina, (b) histidina e (c) glicina.	173
Figura 18: Eletroferogramas obtidos para dez injeções consecutivas de uma mistura contendo 500 μM de (a) arginina, (b) histidina e (c) glicina. Potenciais de injeção e separação, +800V.....	173
Figura 19: Eletroferogramas obtidos para concentrações crescentes de arginina, em incrementos de 100 μM , para o intervalo de concentrações entre 100 e 500 μM . Também apresentado acima está a curva de calibração resultante.....	175
Figura 20: Eletroferogramas obtidos para quatro injeções consecutivas de dopamina em uma concentração de 200 μM , usando como eletrodo de trabalho somente uma camada de ouro depositada por <i>sputtering</i> no final do microcanal de separação.	176

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – MICRODISPOSITIVOS EM POLIURETANA

Tabela 1: Propriedades fundamentais dos materiais poliméricos geralmente consideradas quando esses materiais são usados para fabricação de microdispositivos.	35
Tabela 2: Relação dos reagentes usados no desenvolvimento desse trabalho apresentados em ordem alfabética.....	49
Tabela 3: Compatibilidades químicas de vários polímeros com classes de solventes e eletrólitos, reportadas na literatura ^[43] , em comparação com as obtidas para a PU.....	71

CAPÍTULO II – DETERMINAÇÃO DE AZO-CORANTES EM ALIMENTOS

Tabela 1: Principais classes de aditivos alimentares, efeitos quando adicionados nos alimentos e exemplos dos mais usados.....	96
Tabela 2: Métodos mais relevantes encontrados na literatura para determinação de corantes sintéticos em alimentos.....	107
Tabela 3: Características e condições ótimas de análise do método desenvolvido na análise dos azo-corantes	112
Tabela 4: Relação dos reagentes usados no desenvolvimento desse trabalho....	114

CAPÍTULO IV – DETECTOR ADAPTATIVO

Tabela 1: Relação dos reagentes usados no desenvolvimento desse trabalho....	156
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

CE	<i>capillary eletrophoresis</i> (eletroforese capilar)
CL	quimiluminescência
CNTs	nanotubos de carbono
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CZE	<i>capillary zone electrophoresis</i> (eletroforese capilar de zona)
DAD	<i>diode array detector</i> (detector com arranjo de diodos)
DDB	diamante dopado com boro
DPP	<i>diferencial pulse polarography</i> (polarografia de pulso diferencial)
DPV	<i>diferencial pulse voltametry</i> (voltametria de pulso diferencial)
ECL	eletroquimiluminescência
ED	<i>electrochemical detection</i> (detecção eletroquímica)
EOF	fluxo eletrosmótico
ESI	<i>electrospray ionization</i> (ionização por eletrospray)
GC	<i>gas chromatography</i> (cromatografia gasosa)
GMEME	Grupo de materiais eletroquímicos e métodos eletroanalíticos
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
L-DOPA	3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine
LIF	<i>laser induced fluorescence</i> (fluorescência induzida a laser)
LIGA	<i>litografia eletroformação e moldagem</i>
LNLS	<i>Laboratório Nacional de Luz Síncrotron</i>
MECC	<i>cromatografia eletrocinética micelar</i>
MEMS	<i>microelectromechanical systems</i> (sistemas microeletromecânicos)
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PC	polycarbonato

PCOC	policiclolefina
PCR	polymerase chain reaction (reação em cadeia da polymerase)
PDMS	polidimetilsiloxano
Pd	paládio
PET	poli-(tereftalato de etileno)
PMMA	polimetilmetacrilato
PS	poliestireno
PU	poliuretana
Pt	platina
RP	reversed phase (fase reversa)
SWV	<i>square wave voltametry</i> (voltametria de onda quadrada)
μ-TAS	microsistemas de análises totais
UV/vis	ultravioleta e visível

RESUMO

O desenvolvimento de sistemas analíticos miniaturizados tem experimentado um grande crescimento nos últimos 15 anos. A eletroforese em microdispositivos é particularmente interessante devido suas capacidades atrativas na realização de separações rápidas e eficientes. Por outro lado, a detecção eletroquímica é bastante adequada em tais microdispositivos devido ao grande potencial para miniaturização e portabilidade, compatibilidade com tecnologias de microfabricação, alta sensibilidade e baixo custo.

Esta tese de doutorado apresenta o desenvolvimento de novas tecnologias para fabricação e detecção eletroquímica em microsistemas analíticos. Apresentada em quatro capítulos, o Capítulo I descreve os principais aspectos relacionados à miniaturização em química analítica e os modos de detecção eletroquímicos usados em eletroforese em microdispositivos. O Capítulo II apresenta a poliuretana (PU) elastomérica, derivada de uma fonte renovável, o óleo de mamona, como um novo e alternativo material para fabricação de microdispositivos. Foram avaliadas as características físicas dos microcanais formados por moldagem com MEV e perfilometria, a compatibilidade química com solventes e eletrólitos, as características de superfície através dos ângulos de contato da superfície nativa e tratada a plasma, o EOF em diferentes pHs e a performance analítica em experimentos de eletroforese com detecção eletroquímica.

O Capítulo III apresenta o desenvolvimento de um método para a determinação simultânea de azo-corantes comumente usados na indústria alimentícia. Amaranto, Amarelo Crepúsculo FCF, Amarelo Sólido AB, Ponceu 4R e Vermelho 2G, foram separados e quantificados através de eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica. Foram estudados e otimizados vários parâmetros que influenciaram a separação eletroforética e detecção eletroquímica, em experimentos realizados usando microdispositivos de vidro e eletrodo de trabalho de carbono vítreo. Em condições ótimas de análise foi possível separar e detectar os cinco azo-corantes em menos de 300 s, com picos

bastante repetitivos e ampla faixa linear de concentrações. As características analíticas do método permitiram que o mesmo fosse aplicado com sucesso na análise quantitativa de produtos alimentícios comerciais como refrigerantes e doces.

Finalmente, o Capítulo IV apresenta o uso das propriedades magnéticas e eletrocatalíticas de nanofios de níquel no desenvolvimento de um detector adaptativo magneticamente modulável para eletroforese em microdispositivos. O posicionamento e orientação desses nanofios sobre uma camada de ouro depositada por *sputtering* na saída do microcanal de separação foram realizados usando um ímã externo. Esse controle magnético permitiu a modulação e alternância reversível do detector em estados passivo (“OFF”) e estado ativo (“ON”). Separações eletroforéticas de carboidratos e aminoácidos mostraram que resolução dos picos de analitos detectados usando o novo sensor adaptativo é bastante influenciada pela orientação dos nanofios em relação ao microcanal de separação.

ABSTRACT

The development of microfluidic analytical systems has witnessed an explosive growth during the last 15 years. Particular attention has been given to microchip electrophoresis because of their fast and efficient separation capabilities. Electrochemistry detection offers considerable promise for such microfluidic systems, with features that include remarkable sensitivity, inherent miniaturization and portability, low cost, and high compatibility with microfabrication technologies.

This thesis shows the development of new fabrication technologies for miniaturized analytical systems with electrochemical detection and it is presented in four chapters, Chapter I shows an introductory view of the main aspects related to miniaturization of analytical systems and amperometric detection configurations commonly coupled to microchip electrophoresis. In Chapter II, the use of elastomeric polyurethane (PU), derived from castor oil (CO) biosource, as a new material for fabrication of microfluidic devices by rapid prototyping is presented. Including the irreversible sealing step, PU microchips were fabricated in less than 1 h by casting PU resin directly on the positive high-relief molds fabricated by standard photolithography and nickel electrodeposition. Physical characterization of microchannels was performed by scanning electron microscopy (SEM) and profilometry. Polymer surface was characterized using contact angle measurements and the results showed that the hydrophilicity of the PU surface increases after oxygen plasma treatment. The polymer surface demonstrated the capability of generating an electroosmotic flow (EOF) of $2.6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 7 in the cathode direction, which was characterized by current monitoring method at different pH values. The compatibility of PU with a wide range of solvents and electrolytes was tested by determining its degree of swelling over a 24 h period of contact. The performance of microfluidic systems fabricated using this new material was evaluated by fabricating miniaturized capillary electrophoresis systems. We used catecholamines as model analytes that were separated in aqueous solutions and detected with end-channel amperometric detection.

In Chapter III, a method based on microchip electrophoresis with electrochemical detection has been developed for the simultaneous determination of Yellow AB, Red 2G, Sunset Yellow, Ponceu 4R, and Amaranth which are azo-dyes frequently added to foodstuffs. Factors affecting both separation and detection processes were examined and optimized, with best performance achieved by using a 10 mM phosphate buffer (pH 11) as running buffer and applying a voltage of 2500 V both in the separation and in the electrokinetic injection (duration 4 s). Under these optimal conditions, the target dye analytes could be separated and detected within 300 s by applying a detection potential of -1,0 V (vs. Ag/AgCl) to the glassy carbon (GC) working electrode. The recorded peaks were characterized by a good repeatability (RSD = 1,8 – 3,2%), high sensitivity, and a wide linear range. Detection limits of 3.8, 3.4, 3.6, 9.1, 15.1 μM were obtained for Yellow AB, Red 2G, Sunset Yellow, Ponceu 4R, and Amaranth, respectively. Fast, sensitive, and selective response makes the new microchip protocol very attractive for the quantitative analysis of commercial soft drinks and candies

Finally, in Chapter IV, we demonstrate for the first time the use of adaptive functional nickel nanowires for switching on demand operation of microfluidic devices. Controlled reversible magnetic positioning and orientation of these nanowires at the microchannel outlet offers modulation of the detection and separation processes, respectively. The former facilitates switching between active and passive detection states to allow the microchip to be periodically activated to perform a measurement and reset it to the passive ("off") state between measurements. Fine magnetic tuning of the separation process (post channel broadening of the analyte zone) is achieved by reversibly modulating the nanowire orientation (i.e., detector alignment) at the channel outlet. The concept can be extended to other microchip functions and stimuli-responsive materials and holds great promise for regulating the operation of microfluidic devices in reaction to specific needs or unforeseen scenarios.

CAPÍTULO I

MINIATURIZAÇÃO EM QUÍMICA ANALÍTICA

1.1 MINIATURIZAÇÃO

A miniaturização de sistemas eletrônicos, mais notavelmente no mercado tecnológico digital, tem causado influências significativas em vários aspectos da sociedade. Desde a invenção e desenvolvimento dos transistores e circuitos integrados, a construção de dispositivos eletrônicos cada vez menores vem ganhado grandes impulsos, tornando-se atualmente uma obsessão principalmente na indústria de computadores. Em 1965, época em que as válvulas eletrônicas foram substituídas pelos transistores, Gordon Moore, co-fundador da Intel, comemorava os avanços de sua empresa sempre que o número de transistores instalados em um circuito integrado poderia ser aumentado, oferecendo melhores performances, sem que houvesse a necessidade de aumento nas dimensões do processador.^[1] Atualmente, computadores pessoais de alta performance e que ocupam pouco espaço, como *notebooks* e *palms* (computadores de bolso), são uma realidade e continuam revolucionando o mundo da informação. A Apple, por exemplo, lançou no início desse ano o *notebook* mais fino do mundo, com 1,9 centímetros de espessura e apenas 1,36 quilo.

As tendências atuais existentes no campo de pesquisa relacionado à instrumentação analítica indicam que os sistemas miniaturizados possuem um grande potencial para revolucionar a química analítica em proporções semelhantes a revolução ocorrida no mundo da computação.^[1,2] Nessa “revolução”, laboratórios repletos de equipamentos e com vários técnicos especializados deverão ser substituídos por poucos e pequenos dispositivos portáteis movidos à bateria, de fácil operação e que permitam a execução de análises químicas complexas por qualquer pessoa em sua própria casa.^[2]

1.2 MICROFLUÍDICA

A microfluídica pode ser definida como a ciência e tecnologia dos sistemas que processam e manipulam pequenas (10^{-9} a 10^{-18} litros) quantidades de fluidos, usando sistemas miniaturizados com canais de dimensões de dezenas a centenas de micrômetros. As principais aplicações de tecnologias desenvolvidas em microfluídica estão concentradas em química analítica, onde podem oferecer um grande número de capacidades, como a habilidade de manipular quantidades muito pequenas de amostras e reagentes, conduzir separações e detecções com grandes resoluções e sensibilidades, baixo custo, altas frequências analíticas e portabilidade. As tecnologias desenvolvidas em microfluídica exploram sua característica mais óbvia que é o tamanho reduzido, e sua característica menos óbvia, o comportamento laminar dos fluidos dentro de microcanais.^[3]

Como qualquer tecnologia em desenvolvimento, a microfluídica parece muito boa para ser verdade: oferecem muitas vantagens e poucas desvantagens (pelo menos em análise química onde está sua principal aplicação). Entretanto, ainda não se tornou amplamente utilizada. Mas, por que não? Por que todos os laboratórios bioquímicos ainda não foram miniaturizados em dispositivos portáteis? Por que pacientes não fazem o monitoramento de suas condições em suas próprias casas usando esses dispositivos analíticos (microfluídicos) portáteis? As respostas para essas perguntas ainda não estão claras. Entretanto, vários pesquisadores estão convencidos de que a miniaturização de sistemas analíticos se tornará o principal campo de pesquisa em análises químicas e bioquímicas, e talvez em síntese orgânica, pois são enormes as vantagens oferecidas e os avanços até agora alcançados. Assim, as respostas para questões relacionadas ao tempo e

circunstâncias necessárias para o desenvolvimento dos sistemas analíticos miniaturizados em uma nova e popular tecnologia são importantes não somente para seu próprio campo, mas também para outras novas tecnologias que vêm lutando para atingir o mesmos objetivos.^[3]

A microfluídica possui quatro áreas principais correlacionadas que serviram e continuam servindo de impulso para o desenvolvimento de novas tecnologias: análise molecular, biologia molecular, microeletrônica e bio-defesa. A primeira e principal delas é a análise molecular, pois a origem da microfluídica está nos métodos analíticos de separação – cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE) – que, desenvolvidos em microcanais, tem revolucionado a química analítica. Esses métodos de separação, combinados com o poder dos métodos de detecção, tornaram possível a obtenção de altas sensibilidades e resoluções em análises realizadas usando quantidades bastante pequenas de amostras e reagentes. Os grandes sucessos até agora alcançados no desenvolvimento e aplicação desses microdispositivos, servem de estímulo para a busca de microsistemas ainda mais compactos e versáteis, além de novas aplicações em métodos analíticos químicos e bioquímicos.^[3]

O segundo impulso à microfluídica teve origem no campo de pesquisa relacionado à biologia molecular. A grande “explosão” da genômica nos anos 1980s, seguida pelo desenvolvimento de áreas relacionadas a biologia molecular, como o sequenciamento de DNA, exigiram métodos analíticos com frequências de processamento de amostras, sensibilidades e resoluções melhores do que os métodos convencionais existentes. A microfluídica pode oferecer métodos capazes de superar todas essas expectativas.^[3]

A terceira força que impulsionou a microfluídica vem dos dispositivos microeletrônicos. A idéia original foi acreditar que a fotolitografia e outras técnicas relacionadas, que já haviam demonstrado eficiência em dispositivos microeletrônicos e em sistemas microeletromecânicos (MEMS), construídos usando materiais derivados do silício, seriam diretamente aplicadas à microfluídica. De fato, os primeiros trabalhos realizados na fabricação de dispositivos microfluídicos usaram vidro e silicatos, mas esses materiais tem sido gradualmente substituídos por polímeros. Para análises de amostras biológicas em meio aquoso, por exemplo, microdispositivos fabricados em vidro ou silicato são usualmente desnecessários ou inapropriados. Silicatos, em particular, possuem preços elevados, são opacos à luz ultravioleta e visível, de modo que não podem ser usados em métodos ópticos de detecção. A fabricação de componentes para dispositivos microfluídicos – especialmente bombas e válvulas – é bem mais fácil se realizada em polímeros elastoméricos e termoplásticos, do que em materiais rígidos como o vidro e silicatos. Além disso, esses materiais não possuem todas as propriedades (especialmente a permeabilidade a gás) exigidas no trabalho com células vivas. Assim, embora inicialmente impulsionada pelos dispositivos microeletrônicos, a microfluídica não teve seu desenvolvimento restrito aos materiais e às técnicas de microfabricação comuns a esse tipo de tecnologia.^[3]

A quarto e último fato que impulsionou o desenvolvimento da microfluídica foi o suporte oferecido, principalmente nos EUA, à pesquisa pelo desenvolvimento de instrumentos portáteis capazes de detectar agentes químicos e biológicos diretamente no campo de guerra. O imenso volume de incentivos financeiros fornecidos aos laboratórios de pesquisa, pelo Departamento de Defesa dos EUA, é

considerado um dos principais estímulos para o rápido crescimento da microfluídica no meio acadêmico.^[3]

O início do desenvolvimento da microfluídica ocorreu em 1979 com construção do primeiro sistema analítico miniaturizado: um cromatógrafo a gás de pequenas dimensões.^[4] Desenvolvido com a integração do injetor, coluna cromatográfica e detector, em uma placa circular de silício de apenas 5 cm de diâmetro, o dispositivo foi usado com sucesso na separação dos componentes de uma mistura de hidrocarbonetos. Entretanto, apesar da capacidade de realizar rápidas separações, esse primeiro microdispositivo não teve repercussão significativa na comunidade científica voltada à instrumentação analítica. A falta de experiência tecnológica para idealizar novos dispositivos miniaturizados, principalmente por parte dos cientistas em técnicas de separação, talvez tenha sido o fator determinante para o adiamento do desenvolvimento da miniaturização em química analítica. Assim, na década de 80, os trabalhos relacionados à miniaturização ficaram voltados apenas ao desenvolvendo de sensores químicos, micro-bombas e micro-válvulas.^[5]

Em 1990, com dois trabalhos considerados como o “renascimento” da miniaturização em química analítica, Manz e colaboradores^[6,7] apresentaram um cromatógrafo líquido miniaturizado construído em silicone (dimensões de 5 × 5 cm)^[6] e introduziram um novo conceito em dispositivos analíticos miniaturizados: os “Microsistemas de Análises Totais” ou μ -TAS.^[7] Os μ -TAS seriam dispositivos analíticos miniaturizados com capacidades de execução de todas as etapas de uma análise química, como amostragem, pré-tratamento da amostra, transporte da amostra e reagentes, reações químicas, separação e detecção.^[7]

Desde então, a incidência de trabalhos científicos que descrevem novas tecnologias de microfabricação e aplicações de sistemas analíticos miniaturizados cresceu de forma impressionante. Esse grande crescimento pode ser facilmente constatado nos artigos de revisão, publicados bianualmente pelo Prof. Manz no periódico *Analytical Chemistry*.^[8,9] No artigo publicado em 2004, referente aos avanços obtidos entre março de 2002 e fevereiro de 2004, foram citadas 289 referências em novas tecnologias em microfluídica.^[8] O artigo publicado em 2006, referente aos avanços obtidos entre março de 2004 e fevereiro de 2006, apresenta 538 referências em avanços nesse campo de pesquisa.^[9]

Além de microfluídica e μ -TAS, como os sistemas analíticos miniaturizados foram estudados por pesquisadores de várias áreas do conhecimento, outros termos foram surgindo ao longo dessas quase duas décadas de desenvolvimento. O principal deles é *Lab-on-a-Chip*, que também é usado em referência a qualquer tipo de pesquisa em que o objetivo principal seja o de miniaturizar processos químicos e biológicos. O termo microfabricação é usado em referência à fabricação de estruturas micrométricas em substratos sólidos como polímeros, vidros, silicatos, etc. Os métodos de microfabricação incluem fotolitografia, corrosão química *via* úmida, deposição de filmes (plasma, *sputtering*, etc.), moldagem, vedação, etc.^[10]

Para ilustrar o atual nível de desenvolvimento da microfluídica, a Figura 1 apresenta a fotografia de um microdispositivo capaz de integrar todas as etapas de uma análise genética. Easley e colaboradores^[11] relataram esse trabalho como um sistema de análises com capacidade para “*sample-in – answer-out*”, ou seja, “amostra-dentro – resposta-fora”. De fato, uma amostra de sangue de apenas 1 μ L pode ser injetada nesse verdadeiro μ -TAS e o perfil genético do indivíduo é gerado em menos de 30 min. A análise genética é feita através da extração, purificação,

amplificação, separação e detecção do DNA presente na amostra de sangue. Na figura, diferentes corantes foram adicionados nos microcanais do dispositivo para melhor visualização das diferentes seções responsáveis por cada etapa. As seções responsáveis pela extração e purificação do DNA, amplificação através de PCR, injeção e separação, estão representadas pelas cores amarelo, vermelho, verde e azul, respectivamente. Todas as seções são interligadas através de uma rede de microcanais e fazem interface através de válvulas que atuam na regulação dos fluidos bombeados por uma única bomba do tipo seringa.

Figura 1: Fotografias do microdispositivo capaz de integrar todas as etapas de uma análise genética desenvolvido por Easley e colaboradores.^[11] **(A)** Imagem de todo o microdispositivo com diferentes corantes representando as diferentes etapas da análise. Os reservatórios estão representados por (a) amostra, (b) descarte da amostra, (c) solução auxiliar para “resuspender” em outra fase o DNA extraído, (d) reagentes da PCR, (e) padrão de DNA (marcador), (f) eletrólito de separação, (g) descarte de amostra e (h) descarte do tampão. Os microcanais e câmaras de reação estão representados por (1) extração em fase sólida, (2) reação da PCR, (3) separação do DNA e (4) alinhamento do laser usado na detecção. **(B)** Controle de válvulas usado para interfacear as seções de tratamento e análise. **(C)** Fotografia do microdispositivo acoplado a suporte em acrílico e os microtubos da bomba que movimenta os fluidos.

1.3 ELETROFORESE EM MICRODISPOSITIVOS

1.3.1 Aspectos gerais

Entre as técnicas analíticas de separação, a eletroforese capilar (CE) é a principal técnica desenvolvida em microdispositivos devido à simplicidade de sua instrumentação. O controle eletrocinético dos fluidos, que requer somente eletrodos para aplicação de campo elétrico, elimina a necessidade do uso de válvulas e bombas que são de difícil construção e interface com sistemas miniaturizados. Além disso, a eletroforese em microdispositivos permite o uso de elevados potenciais de separação, pois os materiais tipicamente usados em microfabricação possibilitam a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule) através do eletrólito de separação^[1,12].

A Figura 2A apresenta o diagrama esquemático do modelo de microdispositivo mais comumente usado em separações eletroforéticas. Como observado, trata-se de um microdispositivo com microcanais de injeção (I) e de separação (II) dispostos em cruz. Nas extremidades do microcanal de injeção há reservatórios para amostra (1) e descarte da amostra (3), enquanto que o microcanal de separação está delimitado pelos reservatórios da solução tampão (2) e de detecção (4). Como mostrado na Figura 2B, a intersecção entre os microcanais de injeção e separação pode ser na forma de “simples-T” ou “duplo-T”, que se diferenciam pelo volume de amostra injetado.^[1]

Figura 2: Diagrama esquemático do modelo de microdispositivo mais comumente usado em separações eletroforéticas. **(A)** Microcanais de injeção (I) e de separação (II) dispostos em cruz, com reservatórios para amostra, solução tampão, descarte da amostra e detecção por (1), (2), (3) e (4), respectivamente. **(B)** Intersecções entre os microcanais de injeção e separação na forma de simples-T e duplo-T.

As formas com que as amostras são introduzidas em sistemas de eletroforese em microdispositivos foram intensamente estudadas.^[13] Embora alguns trabalhos apresentem o uso da injeção hidrodinâmica, atualmente, a injeção eletrocinética é a mais usada. Existem basicamente três modos de injeção eletrocinética em microdispositivos: “*unpinched*”,^[13] “*pinched*”^[14] e “*gated*”.^[15] Entre eles, o mais simples e comum é o modo “*unpinched*”. Nesse modo de injeção, uma diferença de potencial é aplicada entre os reservatórios (1) e (3) (Figura 2A) durante 1-10 s, de maneira que a amostra preencha o microcanal de injeção e defina o *plug* de amostra na intersecção entre os microcanais. Em seguida, para que a etapa de separação eletroforética seja iniciada, uma diferença de potencial deve ser aplicada

entre os reservatórios (1) e (3) (canal de separação). Os canais de um microdispositivo usado em eletroforese possuem larguras e profundidades que podem variar entre 10 e 200 μm , e comprimentos entre 3 e 10 cm. Microcanais em estruturas semi-circulares e em formas de serpentinas também podem ser implementados com o objetivo de aumentar seu comprimento, garantindo as pequenas dimensões do microchip^[16].

Entre as possíveis aplicações da eletroforese em microdispositivos podem-se citar todas aquelas executadas em sistemas convencionais: separação de biomoléculas como proteínas e peptídeos, seqüenciamento de DNA, ensaios enzimáticos, imunoensaios, separação de aminoácidos, aminas biogênicas, carboidratos, etc. Além disso, a versatilidade inerente à construção dos microdispositivos permite a execução de experimentos baseados em imobilização de biomoléculas e análises integrando reações químicas em várias etapas.^[8,9]

1.3.2 Detecção em eletroforese em microdispositivos

As dimensões diminutas de um microdispositivo resultam em separações de pequenos volumes de amostras (da ordem de pL / nL), que requerem detectores extremamente sensíveis. A maioria dos trabalhos envolvendo eletroforese em microdispositivos utiliza como unidade de detecção a fluorescência induzida a laser (LIF).^[17-19] Esse modo de detecção, embora bastante sensível e de fácil acoplamento ao microcanal do dispositivo, apresenta duas grandes limitações: requer a derivação dos analitos e uma instrumentação *off-chip* que compromete a miniaturização e a portabilidade do sistema.^[19-21] Outros métodos de detecção como absorção na região do UV/vis,^[22,23] espectrometria de massas (MS),^[24,25]

quimiluminescência (CL)^[26,27] e eletroquimiluminescência (ECL),^[28,29] que também têm sido usados com sucesso em microdispositivos, apresentam a mesmo problema relacionado a portabilidade. A espectrometria de massas, por exemplo, embora ofereça melhores informações químicas das espécies analisadas, além de não ter potencial para a portabilidade, tem maior custo e é menos sensível que a LIF. Outros modos de detecção menos comuns como medidas de índice de refração^[30] e raman,^[31] também já foram usados em microdispositivos analíticos.

A detecção eletroquímica é bastante atrativa para aplicação em microdispositivos devido, principalmente, à alta compatibilidade com a tecnologia de microfabricação. As técnicas fotolitográficas empregadas na fabricação dos microdispositivos podem ser usadas na fabricação de microeletrodos de forma reprodutível e com baixo custo. Os eletrodos podem, assim, serem fabricados diretamente no microdispositivo permitindo a fabricação de um sistema totalmente integrado. Embora os sinais de corrente gerados em microeletrodos sejam bastante pequenos, as correntes de fundo podem ser reduzidas em patamares ainda menores, aumentando a relação entre sinal/ruído e oferecendo baixos limites de detecção. Adicionalmente, a grande maioria das classes de compostos podem ser detectadas sem derivação, com sensibilidades que podem chegar na faixa de até nanomolar. Como é possível a miniaturização de fontes de energia e potenciostatos,^[32] a detecção eletroquímica é a que mais tem potencial para construção de um verdadeiro microdispositivo analítico.^[21,32-34]

Entre os métodos eletroquímicos de detecção, basicamente três técnicas tem sido apresentadas no acoplamento com microdispositivos: condutometria (com e sem contato),^[35-38] potenciometria^[39] e amperometria.^[21,32-34] A amperometria é, sem dúvidas, a mais amplamente utilizada desde a origem do desenvolvimento da

eletroforese em microdispositivos. Esse modo de detecção é executado através da medida de corrente, em função do tempo, resultante da aplicação de um potencial constante no eletrodo de trabalho de uma célula eletroquímica acoplada ao microdispositivo. Essa célula eletroquímica pode ter a configuração convencional de três eletrodos, com a presença dos eletrodos de referência e auxiliar, ou dois eletrodos quando somente o de trabalho e o auxiliar a compõe.^[40] A aplicação do potencial no eletrodo de trabalho promove a oxidação ou redução das espécies químicas, com as respostas de corrente obtidas nesses processos redox sendo proporcionais à concentração do analito.^[33]

Um dos grandes problemas relacionados ao uso da detecção amperométrica em microdispositivos está na interferência causada pelo acoplamento entre o campo elétrico originário do potencial aplicado na separação eletroforética com o potencial aplicado na detecção. Para contornar esse problema, várias configurações de célula foram propostas para esse tipo de detecção. Assim, o posicionamento do eletrodo de trabalho pode ser feito de três maneiras diferentes: na saída do microcanal de separação (*“end-channel”*), no interior do microcanal de separação (*“in-channel”*) e no interior do microcanal mas fora do campo elétrico da separação eletroforética (*“off-channel”*). No posicionamento na saída do microcanal de separação (*“end-channel”*) existem ainda dois modos: com o eletrodo integrado no microdispositivo (*“on-chip”*) e fora do microdispositivo (*off-chip*).^[21,33] A Figura 3 apresenta o desenho esquemático de cada uma dessas configurações de alinhamento do eletrodo de trabalho no microcanal de separação.

Figura 3: Desenho esquemático das possíveis configurações de alinhamento do eletrodo de trabalho no microcanal de separação. **(A)** Eletrodo na saída do microcanal (*"end-channel"*) e integrado no próprio dispositivo (*"on-chip"*), **(B)** eletrodo na saída do microcanal (*"end-channel"*) e fora do dispositivo (*"off-chip"*), **(C)** eletrodo no interior do microcanal (*"in-channel"*) e **(D)** eletrodo no interior do microcanal mas fora do campo elétrico da separação eletroforética (*"off-channel"*).

1.3.2.1 Detecção no final do microcanal de separação (*"end-channel"*)

Entre as possíveis configurações da detecção amperométrica em microdispositivos, a configuração com o posicionamento do eletrodo no final do

microcanal de separação (*“end-channel”*) é a mais usada.^[21,33,34] Nesse modo, o eletrodo de trabalho é posicionado a 10-20 µm de distância do final do microcanal de separação, ficando quase que efetivamente isolado do potencial aplicado na separação eletroforética. Entretanto, como o aterramento da fonte de alta tensão usada para a eletroforese é feito no reservatório de detecção, o eletrodo de trabalho ainda sofre interferências do campo elétrico, causando um pequeno, mas significativo, deslocamento no potencial aplicado no eletrodo de trabalho. Em consequência, para determinar o potencial de detecção ótimo para um determinado analito, é sempre necessário obter seu voltamograma hidrodinâmico em condições eletroforéticas.^[21,41]

Em função da difusão dos analitos no espaço aberto existente entre o microcanal de separação e o eletrodo de trabalho, quando comparada às outras configurações, a detecção no final do microcanal de separação (*“end-channel”*) oferece limites de detecção maiores e separações menos eficientes. Além disso, se o eletrodo de trabalho for posicionado muito perto do final do microcanal de separação, flutuações pequenas no potencial de separação podem causar grandes ruídos na detecção, acarretando a perdas de sensibilidade. No pior dos cenários, a fonte de alta tensão pode fazer o aterramento através do eletrodo de trabalho, causando sérios danos no potenciostato.^[22,33]

O primeiro trabalho envolvendo a eletroforese em microdispositivos usando o modo *“end-channel* de detecção amperométrica foi desenvolvido por Woolley e colaboradores.^[42] Nesse trabalho, microdispositivos de vidro com eletrodos de trabalho integrados (*“on-chip”*) (Figura 3A), microfabricados em ouro, foram usados na separação e detecção de neurotransmissores. Além desse, outros microdispositivos foram desenvolvidos pelo mesmo grupo (Prof. Mathies), sempre

usando a mesma configuração.^[43] Sistemas semelhantes, mas com microdispositivos construídos em polidimetilsiloxano (PDMS) foram bastante estudados pelo grupo do Prof. Henry usando o modo amperométrico pulsado de detecção. Nesse trabalhos, ao invés de microfabricados, os eletrodos de trabalho foram posicionados manualmente (*“on-chip”*) na saída do microcanal de separação.^[44,45]

Baldwin e colaboradores,^[46] além da integração dos eletrodos de detecção no microdispositivo, desenvolveram trabalhos com a integração de todos os eletrodos, inclusive de aplicação do campo eletroforético. A Figura 4 apresenta o desenho esquemático (A) e fotografias (B) desse microdispositivo em vidro com eletrodos de detecção e eletroforese integrados construído usando as técnicas de fotolitografia, corrosão química *via* úmida, deposição metálica por *sputtering* e vedação térmica. Esse sistema, aplicado com sucesso na separação e detecção de aminoácidos, é bem mais compacto, pois não necessita de suportes comumente empregados para acoplamento de eletrodos externos.

Figura 4: Microdispositivo em vidro com eletrodos de detecção e eletroforese integrados construído usando as técnicas de fotolitografia, corrosão química *via* úmida, deposição metálica por *sputtering* e vedação térmica. **(A)** Desenho esquemático: (1) “tampa” de vidro com microcanais, (2) base de vidro com eletrodos integrados, (3) contatos elétricos, (4) reservatório de tampão, (5) reservatório da amostra, (6) reservatório de descarte da amostra e (7) reservatório de detecção. **(B)** Fotografia do microdispositivo. **(C)** Fotografia do reservatório de detecção: (a) saída do microcanal de separação, (b) eletrodo de trabalho microfabricado (Pt), (c) eletrodo de referência (Pt) e (d) borda do reservatório.

Como discutido anteriormente, a detecção amperométrica “*end-channel*” também pode ser feita “*off-chip*”, isto é, com o eletrodo de trabalho apenas alinhado e não integrado ao microdispositivo (Figura 3B). Esse tipo de configuração foi extensamente estudado por Wang e colaboradores,^[47-55] usando principalmente eletrodos de carbono *screen-printed*,^[47-51] na determinação de explosivos nitroaromáticos,^[47] aminoácidos aromáticos,^[48] selênio-aminoácidos,^[49] fenóis,^[50] entre outros. Quando comparado a integração do eletrodo no próprio dispositivo “*on-chip*”, o modo “*off-chip*” oferece a vantagem de possibilitar a rápida troca do eletrodo sem que o microdispositivo seja danificado.

Além dos eletrodos *screen-printed*, Wang e colaboradores^[51-54] também mostraram o uso de eletrodos de diamante dopados com boro (DDB)^[51,52] e

eletrodos contruídos com nanotubos de carbono (CNTs),^[53,54] na detecção “*end-channel*” de microdispositivos. Ambos mostraram melhores estabilidades e sensibilidades, quando comparados aos eletrodos de carbono *screen-printed*. Propriedades como a adsorção desprezível de compostos orgânicos, faixa de potencial de trabalho ampla, correntes de fundo baixas e estáveis e sensibilidade a oxigênio baixa, ofereceram aos DDB as melhores performances no acoplamento “*end-channel*” com microdispositivos.

1.3.2.2 Detecção no interior do microcanal de separação (“*in-channel*”)

Como discutido anteriormente, o modo “*end-channel*” de detecção amperométrica oferece separações pouco eficientes devido ao alargamento de banda sofrido pelos analitos ao deixar o microcanal de separação do dispositivo. Com o objetivo de eliminar esse problemas, Martin e colaboradores^[55] desenvolveram um microdispositivo com o eletrodo de trabalho posicionado no interior do microcanal de separação (“*in-channel*”) (Figura 3C). Como os analitos separados por eletroforese permanecem confinados no interior do microcanal de separação no momento em que atingem o eletrodo de trabalho, os problemas de alargamento de banda são minimizados nessa configuração. Entretanto, o posicionamento do eletrodo de trabalho no interior do microcanal de separação só foi possível com o desenvolvimento de um potenciostato totalmente isolado, isto é, com aterramento “flutuante”.

A performance analítica em experimentos de eletroforese em microdispositivos usando a detecção amperométrica “*in-channel*” foi comparada com a performance usando a configuração “*end-channel*”. O modo de detecção “*in-*

channel” apresentou eficiências de separação 4,6 vezes (cálculo usando altura de prato) melhores do que a configuração *end-channel*.^[55]

1.3.2.3 Detecção “fora” do microcanal de separação (“*off-channel*”)

O modo de detecção “*off-channel*” também foi desenvolvido para superar os problemas relacionados ao alargamento de banda observado no modo “*end-channel*”.^[56,57] O posicionamento do eletrodo no modo “*off-channel*”, na realidade, também é feito no interior do microcanal de separação, mas o campo originário do potencial de separação é isolado de sua corrente amperométrica através do uso de um desacoplador (por isso o nome “*off-channel*”) (Figura 3D). O desacoplador faz o aterramento efetivo do potencial aplicado na separação eletroforética, criando uma região livre de campo elétrico que é justamente onde os analitos são “empurrados” sobre o eletrodo de trabalho pelo EOF gerado antes do desacoplador.^[21,33]

Lacher e colaboradores^[57] recentemente descreveram a fabricação e otimização de um desacoplador em Pd totalmente integrado a um microdispositivo híbrido construído usando vidro e PDMS. Além do isolamento do eletrodo de trabalho do campo elétrico originário do potencial de separação, o desacoplador fabricado em Pd absorve o hidrogênio mais eficientemente que a Pt, evitando a formação de bolhas no interior do microcanal de separação.

1.4 ELETROFORESE CAPILAR (CE)

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, sob a influência de um campo elétrico.^[57,58]

Em eletroforese capilar (CE), a separação é conduzida em “tubos” com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno e 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico. O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre outros meios usados para eletroforese (por exemplo, placas de gel). Devido a fatores geométricos (elevada área superficial interna em relação ao volume), um capilar possibilita a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem de corrente elétrica (efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V cm^{-1}), resultando em separações com alta eficiência (em casos favoráveis, aproximadamente 1 milhão de pratos podem ser obtidos), resolução inigualável e tempos de análise relativamente curtos. A CE oferece diversas outras vantagens sobre os métodos eletroforéticos convencionais, como o consumo de volumes bastante reduzidos de amostra, completa automação das análises com possibilidade de injeção e detecção em fluxo e a compatibilidade com uma ampla variedade de sistemas de detecção disponíveis para cromatografia líquida, como a absorção no UV-vis, fluorescência e espectrometria de massas.^[57,59]

Outro aspecto inerente à CE é a simplicidade da instrumentação (Figura 5). O equipamento consiste de uma fonte de alta tensão, coluna capilar (sílica fundida é o material mais comumente usado), eletrodos (geralmente platina) e um detector apropriado. A fonte é conectada, por meio de eletrodos de platina, a dois

reservatórios contendo uma solução de um eletrólito apropriado (tampão). O capilar é então preenchido com a solução tampão, servindo como o canal de migração iônica. As extremidades do capilar são imersas nos reservatórios das soluções tampão para completar o circuito elétrico. Para minimizar efeitos térmicos, o capilar deve ser mantido a temperatura constante. Há várias possibilidades para termostatização do sistema, incluindo circulação de um líquido ou ar dentro de um cartucho contendo o capilar, além de uso de fornos e ventiladores.^[57]

Figura 5: Esquema representativo de um sistema CE.

A CE pode ser classificada de acordo com seu modo de operação. A eletroforese capilar de zona (CZE) é o modo mais comum de operação em CE. Trata-se de um método de separação em solução que ocorre como resultado de duas estratégias: maximizar as diferenças entre as mobilidades eletroforéticas efetivas dos analitos e minimizar as causas de alargamento das zonas. A

mobilidade eletroforética prediz que sob influência de um campo elétrico, uma espécie eletricamente carregada irá migrar através do capilar em direção ao polo de carga oposta. A velocidade de migração eletroforética (V_{EP}) é determinada pela seguinte equação:

$$V_{EP} = \mu_{EP} E = \frac{q}{6\pi\eta r} E$$

Onde:

μ_{EP} é a mobilidade eletroforética da espécie

E é o campo elétrico aplicado

q é a carga do íon

η é a viscosidade do meio

r é o raio do íon solvatado

Em CE, além dos solutos, a solução tampão também move-se através do capilar sob a influência do campo elétrico gerando o fluxo eletrosmótico (EOF). Esse fluxo origina-se da ionização dos grupos silanóis da superfície da coluna capilar de sílica fundida (ácido fraco : $pK_a \approx 3$) e tem direção catódica (Figura 6). Os grupos silanóis negativamente carregados atraem espécies positivamente carregadas formando uma dupla camada positiva na parede do capilar. A segunda camada positiva, sendo móvel, é atraída em direção ao cátodo, carregando a solução tampão consigo.

Figura 6: Representação do EOF em um capilar. O EOF é causado pelos grupos silanóis, negativamente carregados, presentes na parede interna do capilar. Essas espécies negativas atraem espécies positivamente carregadas formando uma camada fixa. Uma segunda camada positiva, móvel, também é formada e atraída em direção ao cátodo, carregando a solução tampão consigo.

Dentro do tubo capilar, o EOF é caracterizado por um perfil planar de velocidade, não contribuindo, portanto, para o alargamento de bandas. Esta peculiaridade distingue a eletroforese capilar dos métodos cromatográficos em fase líquida, que apresentam perfil parabólico de velocidade dentro da coluna, característico do fluxo induzido por pressão.^[60] O EOF promove alguns benefícios, tais como: torna possível analisar cátions e ânions na mesma corrida e permite que a análise de espécies com pequena razão q/r ocorra em tempos substancialmente menores, uma vez que ele é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, na direção do detector.^[57,59]

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GAWRON, A. J.; MARTIN, S.; LUNTE, S. M. Microchip electrophoretic separation systems for biomedical and pharmaceutical analysis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 1, p 1-12, 2001.

- [2] BURNS, M. A. Analytical chemistry: Everyone's a (future) chemist. **Science**, v. 296, n. 5574, p. 1818-1819, 2002.
- [3] WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368-373, 2006.
- [4] TERRY, S. C.; JERMAN, J. H.; ANGELL, J. B. Gas-chromatographic air analyzer fabricated on a silicon-wafer. **IEEE Transactions on Electron Devices**, v. 26, n. 12, p. 1880-1886, 1979.
- [5] REYES, D. R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P.; MANZ, A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2623-2636, 2002.
- [6] 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 Actuator B – Chemical**, v. 1, n. 1-6, p. 249-255, 1990.
- [7] MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical-analysis systems – a novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuator B – Chemical**, v. 1, n. 1-6, p. 244-248, 1990.
- [8] VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Recent developments. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 12, p. 3373-3385, 2004.
- [9] DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 3887-3907, 2006.
- [10] DITTRICH, P.S.; MANZ, A. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 210-218, 2006.
- [11] EASLEY, C. J.; KARLINSEY, J. M.; BIENVENUE, J. M.; LEGENDRE, L. A.; ROPER, M. G.; FELDMAN, S. H.; HUGHES, M. A.; HEWLETT, E. L.; MERKEL, T. J.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 132, n. 51, p. 19272-19277, 2006.

- [12] DUFFY, D. C.; MCDONALD, J. C.; SCHUELLER, J. A.; WHITESIDES, G. M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 4974-4984, 1998.
- [13] RODDY, E. S.; XU, H.; EWING, A. G. Sample introduction techniques for microfabricated separation devices. **Electrophoresis**, v. 25, n. 2, p. 229-242, 2004.
- [14] ALARIE, J. P.; JACOBSON, J. C.; RAMSEY, J. M. Electrophoretic injection bias in a microchip valving scheme. **Electrophoresis**, v. 22, n. 2, p. 312-317, 2001.
- [15] JACOBSON, S. C.; RAMSEY, J. M. Microchip electrophoresis with sample stacking. **Electrophoresis**, v. 16, n. 4, p. 481-486, 1995.
- [16] JACOBSON, S. C.; HERGENRÖDER, 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**, v. 66, n. , p. 1107-1113, 1993.
- [17] JACOBSON, S. C.; KOUTNY, L. B.; HERGENRODER, R.; MOORE, A. W.; RAMSEY, J. M. Microchip capillary electrophoresis with an integrated postcolumn reactor. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 20, p. 3472-3476, 1994.
- [18] LI, H. F.; LIN, J. M.; SU R. G.; UCHIYAMA, K.; HOBBO, T. A compactly integrated laser-induced fluorescence detector for microchip electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 12, p. 1907-1915, 2004.
- [19] GOTZ, S.; KARST, U. Recent developments in optical detection methods for microchip separations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 1, p. 183-192, 2007.
- [20] UCHIYAMA, K.; NAKAJIMA, H.; HOBBO, T. Detection methods for microchip separations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, n. 3, p. 375-382, 2004.
- [21] VANDAVEER, W. R.; PASAS, S. A.; MARTIN, R. S.; LUNTE, S. M. Recent developments in amperometric detection for microchip capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 23, n. 21, p. 3667-3677, 2002.
- [22] NAKANISHI, H.; NISHIMOTO, T.; ARAI, A.; ABE, H.; KANAI, M.; FUJIYAMA, Y.; YOSHIDA, T. Fabrication of quartz microchips with optical slit and development of a linear imaging UV detector for microchip electrophoresis systems. **Electrophoresis**, v. 22, n. 2, p. 230-234, 2001.

- [23] PETERSEN, N. J.; MOGENSEN, K. B.; KUTTER, J. P. Performance of an in-plane detection cell with integrated waveguides for UV/Vis absorbance measurements on microfluidic separation devices. **Electrophoresis**, v. 23, n. 20, p. 3528-3536, 2002.
- [24] HOFFMANN, P.; HAUSIG, U.; SCHULZE, P.; BELDER, D. Microfluidic glass chips with an integrated nanospray emitter for coupling to a mass spectrometer. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 26, p. 4913-4916, 2007.
- [25] FORET, F.; KUSY, P. Microdevices in mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 13, n. 1, p. 41-44, 2007.
- [26] AMATATONGCHAI, M.; HOFMANN, O.; NACAPRICHA, D.; CHAILAPAKUL, O.; DE MELLO A. J. A microfluidic system for evaluation of antioxidant capacity based on a peroxyoxalate chemiluminescence assay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 1, p. 277-285, 2007.
- [27] LIU, B. F.; OZAKI, M.; UTSUMI, Y.; HATTORI, T.; TERABE, S. Chemiluminescence detection for a microchip capillary electrophoresis system fabricated in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 1, p. 36-41, 2003.
- [28] DING, S. N.; XU, J. J.; CHEN, H. Y. Microchip capillary electrophoresis coupled with end-column electrochemiluminescence detection. **Talanta**, v. 70, n. 2, p. 403-407, 2006.
- [29] ARORA, A.; EIJKEL, J. C. T.; MORF, W. E.; MANZ, A. A wireless electrochemiluminescence detector applied to direct and indirect detection for electrophoresis on a microfabricated glass device. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 14, p. 3282-3288, 2001.
- [30] LLOBERA, A.; WILKE, R.; BUTTGENBACH, S. Poly(dimethylsiloxane) hollow Abbe prism with microlenses for detection based on absorption and refractive index shift. **Lab on a Chip**, v. 4, n. 1, p. 24-27, 2004.
- [31] STREHLE, K. R.; CIALLA, D.; ROSCH, P.; HENKEL, T.; KOHLER, M.; POPP, J. A reproducible surface-enhanced Raman spectroscopy approach. Online SERS measurements in a segmented microfluidic system. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 1542-1547, 2007.
- [32] JACKSON, D. J.; NABER, J. F.; ROUSSEL, T. J.; CRAIN, M. M.; WALSH, K. M.; KEYNTON, R. S.; BALDWIN, R. P. Portable high-voltage power supply and electrochemical detection circuits for microchip electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 14, p. 3643-3649, 2003.

- [33] VANDAVEER, W. R.; PASAS-FARMER, S. A.; FISCHER, D. J.; FRANKENFELD, C. N.; LUNTE, S. M. Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3528-3549, 2004.
- [34] WANG, J. Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review. **Talanta**, v. 56, n. 2, p. 223-231, 2002.
- [35] SHADPOUR, H.; HUPERT, M. L.; PATTERSON, D.; LIU, C. G.; GALLOWAY, M.; STRYJEWSKI, W.; GOETTERT, J.; SOPER, S. A. Multichannel Microchip Electrophoresis Device Fabricated in Polycarbonate with an Integrated Contact Conductivity Sensor Array. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 870-878, 2007.
- [36] 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**, v. 17, n. 13, p. 1198-1206, 2005.
- [37] 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 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1207-1214, 2005.
- [38] TANYANYIWA, J.; HAUSER, P. C. High-voltage capacitively coupled contactless conductivity detection for microchip capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 24, p. 6378-6382, 2002.
- [39] LIAO, W. Y.; WENG, C. H.; LEE, G. B.; CHOU, T. C. Development and characterization of an all-solid-state potentiometric biosensor array microfluidic device for multiple ion analysis. **Lab on a Chip**, v. 6, n. 10, p. 1362-1368, 2006.
- [40] SCHWARZ, M. A.; GALLIKER, B.; FLURI, K.; KAPPES, T.; HAUSER, P. C. A two-electrode configuration for simplified amperometric detection in a microfabricated electrophoretic separation device. **Analyst**, v. 126, n. 2, p. 147-151, 2001.
- [41] WALLENBORG, S. R.; NYHOLM, L.; LUNTE, C. E. End-column amperometric detection in capillary electrophoresis: Influence of separation-related parameters on the observed half-wave potential for dopamine and catechol. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 3, p. 544-549, 2007.

- [42] WOOLLEY, A. T.; LAO, K. Q.; GLAZER, A. N.; MATHIES, R. A. Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 684-688, 1998.
- [43] ERTL, P.; EMRICH, C. A.; SINGHAL, P.; MATHIES, R. A. Capillary electrophoresis chips with a sheath-flow supported electrochemical detection system. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 13, p. 3749-3755, 2004.
- [44] HOMPESCH, R. W.; GARCIA, C. D.; WEISS, D. J.; VIVANCO, J. M.; HENRY, C. S. Analysis of natural flavonoids by microchip-micellar electrokinetic chromatography with pulsed amperometric detection. **Analyst**, v. 130, n. 5, p. 694-700, 2005.
- [45] GARCIA, C. D.; HENRY, C. S. Direct determination of carbohydrates, amino acids, and antibiotics by microchip electrophoresis with pulsed amperometric detection. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 18, p. 4778-4783, 2003.
- [46] BALDWIN, R. P.; ROUSSEL, T. J.; CRAIN, M. M.; BATHLAGUNDA, V.; JACKSON, D. J.; GULLAPALLI, J.; CONKLIN, J. A.; PAI, R.; NABER, J. F.; WALSH, K. M.; KEYNTON, R. S. Fully integrated on-chip electrochemical detection for capillary electrophoresis in a microfabricated device. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 15, p. 3690-3697, 2002.
- [47] WANG, J.; TIAN, B.; SAHLIN, E. Micromachined electrophoresis chips with thick-film electrochemical detectors. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 23, p. 5436-5440, 1999.
- [48] WANG, J.; CHEM, G. Microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection for fast measurements of aromatic amino acids. **Talanta**, v. 60, n. 6, p. 1239-1244, 2003.
- [49] WANG, J.; MANNINO, S.; CAMERA, C.; CHATRATHI, M. P.; SCAMPICCHIO, ZIMA, J. Microchip electrophoresis with amperometric detection for rapid separation and detection of seleno amino acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1091, n. 1-2, p. 177-182, 2005.
- [50] SCAMPICCHIO, M.; WANG, J.; MANNINO, S.; CHATRATHI, M. P. Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for rapid separation and detection of phenolic acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, n. 1-2, p. 189-194, 2004.
- [51] WANG, J.; CHEN, G.; CHATRATHI, M. P.; FUJISHIMA, A.; TRYK, D. A.; SHIN, D. Microchip capillary electrophoresis coupled with a boron-doped diamond electrode-based electrochemical detector. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 935-939, 2003.

- [52] WANG, J.; CHEN, G.; MUCK, A.; SHIN, D.; FUJISHIMA, A. Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrode for rapid separation and detection of purines. **Journal of Chromatography A**, v. 1022, n. 1-2, p. 207-212, 2004.
- [53] WANG, J.; CHEN, G.; CHATRATHI, M. P.; MUSAMEH, M. Capillary electrophoresis microchip with carbon nanotube-modified electrochemical detector. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 298-302, 2004.
- [54] WANG, J.; CHEN, G.; WANG, M.; CHATRATHI, M. P. Carbon-nanotube/copper composite electrodes for capillary electrophoresis microchip detection of carbohydrates. **Analyst**, v. 129, n. 6, p. 512-515, 2004.
- [55] MARTIN, R.S.; RATZLAFF, K. L.; HUYNH, B. H.; LUNTE, S. M. In-channel electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis using an electrically isolated potentiostat. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 1136-1143, 2002.
- [56] ROSSIER, J. S.; FERRIGNO, R.; GIRAULT, H. H. Electrophoresis with electrochemical detection in a polymer microdevice. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 492, n. 1, p. 15-22, 2000.
- [57] LACHER, N. A.; LUNTE, S. M.; MARTIN, R. S. Development of a microfabricated palladium decoupler/electrochemical detector for microchip capillary electrophoresis using a hybrid glass/ poly(dimethylsiloxane) device. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 9, p. 2482-2491, 2004.
- [57] CANTÚ, M. D. **Validação e aplicação de novos métodos analíticos para análise de antidepressivos tricíclicos em amostras de plasma e formulações farmacêuticas**. 2004. 140 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- [58] TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Química Nova*, v. 19, n. 2, p. 172-181, 1996.
- [59] TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.
- [60] BAKER, D. R. **Capillary electrophoresis**. New York: John Wiley, 1995. 244 p.

CAPÍTULO II

***POLIURETANA ELASTOMÉRICA DERIVADA DO ÓLEO DE
MAMONA COMO UM NOVO MATERIAL PARA A CONTRUÇÃO DE
MICRODISPOSITIVOS ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE
PROTOTIPAGEM RÁPIDA E MOLDAGEM***

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da instrumentação analítica para fabricação de microdispositivos usados em análises químicas e bioquímicas tem sofrido um enorme crescimento nos últimos 15 anos. A incidência de trabalhos científicos que descrevem novas tecnologias para microfabricação tem crescido de forma impressionante.^[1]

Embora os protótipos construídos em vidro sejam de excelente qualidade, as técnicas de microfabricação envolvidas na construção e selagem dos microcanais são geralmente de difícil acesso e dependem de grandes investimentos para implementação. Além disso, a produção em massa fica bastante comprometida quando técnicas de microfabricação são usadas para produção de dispositivos em vidro.^[2,3]

1.1 Polímeros em microfluídica

Recentemente, os substratos poliméricos assumiram o papel principal na fabricação de microdispositivos usados em aplicações analíticas e bioanalíticas. A enorme quantidade de materiais disponíveis no mercado, a ampla variedade de propriedades químicas, mecânicas, elétricas e ópticas, bem como as várias possibilidades em métodos de microfabricação, permitem a seleção do material ótimo para a grande maioria das aplicações. Adicionalmente, existe um grande interesse industrial em microdispositivos poliméricos, pois são mais baratos e de fácil manipulação quando comparados ao vidro, além de permitirem a fabricação em massa. Os polímeros comumente usados para tal finalidade podem ser divididos em

três classes principais de acordo com suas propriedades físicas: polímeros elastoméricos, polímeros termoplásticos e polímeros termofixos.^[4,5]

Polímeros elastoméricos são formados por cadeias moleculares bastante longas entrelaçadas de maneira mais física do que química. Se submetidos à determinada força externa, os polímeros elastoméricos permitem o estiramento de sua estrutura e imediatamente retornam à forma original se a força for retirada. Entre os polímeros elastoméricos mais comumente usados na fabricação de microdispositivos destaca-se o polidimetilsiloxano (PDMS).^[2,3,6-10] Várias características, como principalmente a facilidade em replicar estruturas em escalas micrométricas através de simples moldagem, baixa temperatura de cura, excelente transparência ótica, elasticidade e não toxicidade, faz do PDMS o material mais popular e mais utilizado na fabricação de microdispositivos para aplicações analíticas e bioanalíticas.^[6]

Os polímeros termoplásticos são caracterizados por apresentar um certo grau de “amolecimento” em temperaturas próximas à de transição vítrea. Essa característica permite que esses materiais sejam remodelados diversas vezes através de reaquecimento, mesmo depois de curados através do processo de polimerização, que geralmente ocorre em temperaturas não elevadas. O polimetilmetacrilato (PMMA)^[11-18] e o policarbonato (PC)^[19,20] são exemplos típicos dessa classe de polímeros usados na fabricação de microdispositivos e estão entre os primeiros materiais usados para essa finalidade. Outro polímero termoplástico, a poliolefin (POC, com o nome comercial de Topas ou Zeonix/Zeonor), também foi recentemente usado na fabricação de microdispositivos.^[21,22]

A classe dos polímeros termofixos é caracterizada pela estrutura inflexível e alta rigidez. Uma vez curados através do processo de polimerização, geralmente a

altas temperaturas ou exposição a altas doses de radiação, os polímeros termofixos não podem ser remodelados. Se aquecidos depois de curados, sofrem decomposição ao invés de fundir. Exemplos típicos de polímeros termofixos geralmente usados para fabricação de microdispositivos são os poliésteres^[23] e os fotoresistes comumente empregados em fotolitografia, como por exemplo o SU-8 que pode servir como substrato tanto na fabricação de moldes^[24] como na fabricação de todos os componentes do microdispositivo.^[25,26]

Atualmente, observa-se um aspecto potencialmente crítico relacionado ao desenvolvimento de microdispositivos usando materiais poliméricos: A ocorrência de uma crescente distância entre os materiais e métodos comumente usados no meio acadêmico (principalmente a moldagem simples de PDMS em moldes construídos usando o fotoresiste SU-8) e os materiais e métodos usados na indústria de produtos poliméricos comerciais (principalmente a moldagem por injeção de polímeros termoplásticos). Essa tendência aparece como uma ameaça na futura comercialização de métodos e dispositivos provenientes do meio acadêmico, uma vez que grande parte de seus resultados não pode ser diretamente relacionada aos dispositivos comerciais, pois as diferenças em propriedades químicas e mecânicas envolvidas são consideráveis.^[4]

A Tabela 1 apresenta um breve resumo das propriedades fundamentais dos materiais poliméricos geralmente consideradas quando são usados para fabricação de microdispositivos. Essas propriedades são comparadas com o silício e o vidro, originalmente usados para tal finalidade.

Tabela 1: Propriedades fundamentais dos materiais poliméricos geralmente consideradas quando esses materiais são usados para fabricação de microdispositivos.

	Silício	Vidro	Elastômeros (PDMS)	Termoplásticos (PMMA, PC)	Termofixos
Microfabricação	Médio	Médio	Fácil	Fácil	Médio
Processo de Estruturação	Litografia, Corrosão via úmida ou seca	Litografia, Corrosão via úmida ou seca	Moldagem Simples	Estampagem a quente (<i>“hot embossing”</i>), Moldagem por Injeção	Moldagem Simples, Litografia, Corrosão
Geometrias Possíveis	Limitada, 2D	Limitada, 2D	Principalmente 2D, 3D possível	Várias, 2D, 3D	Principalmente 2D, 3D possível
Montagem (Vedação)	Média	Médio / Difícil	Fácil	Fácil	Médio
Interconexões	Difícil	Difícil	Fácil / Médio	Fácil	Fácil
Estabilidade Mecânica	Alta	Alta	Muito baixa	Baixa / Média	Alta
Estabilidade Térmica	Alta	Alta	Baixa	Baixa / Média	Média
Estabilidade Ácida	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Estabilidade Alcalina	Limitada	Média / Alta	Alta	Alta	Alta
Estabilidade em Solventes Orgânicos	Alta	Alta	Baixa	Baixa / Média	Média / Alta
Transparência Óptica	Não	Alta	Alta	Principalmente Alta	Parcial
Preço do Material	Médio	Médio / Alto	Baixo	Baixo / Médio	Médio

Os microdispositivos poliméricos tem sido fabricados usando principalmente quatro técnicas distintas, aplicadas de acordo com a natureza do polímero: (1) moldagem simples em moldes construídos por prototipagem rápida em fotolitografia,^[2,3,6,7,10,11,23] (2) estampagem a quente (*“hot embossing”*),^[12-14,21,22] (3) moldagem por injeção^[15,16] e (4) ablação com laser (*“laser ablation”*).^[17,18] A seguir, os princípios básicos de cada uma dessas técnicas são discutidos resumidamente.

1.1.1 Moldagem polimérica e prototipagem rápida de moldes

O processo de moldagem através da aplicação de resinas poliméricas sobre moldes microfabricados por prototipagem rápida em fotolitografia é o método mais usado para construção de microdispositivos poliméricos. A prototipagem rápida em fotolitografia é bastante conveniente em microfabricação, pois tem como princípio a rapidez na execução do projeto, construção e ensaio do dispositivo.^[6]

Quando comparada a fotolitografia convencional, a maior vantagem da prototipagem rápida de moldes está no uso de máscaras fotolitográficas, conhecidas como fotolitos, construídas pela impressão direta em transparências usando impressoras de alta resolução. Além da rapidez na produção, máscaras fabricadas usando transparências custam bem menos que as máscaras convencionais fabricadas em cromo.^[3,6] Entretanto, cabe observar que as máscaras fabricadas em cromo possibilitam a fabricação de microcanais bem menores ($< 1 \mu\text{m}$) do que os fabricados pelas máscaras em fotolitos ($> 20 \mu\text{m}$). Como mostra a Figura 1, a construção de microdispositivos através do processo de moldagem é iniciada pela construção de um molde através de prototipagem rápida em fotolitografia. Para isso,

uma camada de fotoresiste depositada sobre uma placa de silício é irradiada com uma fonte de luz UV, usando como anteparo a fotomáscara contendo o desenho do microdispositivo. Como o fotoresiste é uma resina que sofre polimerização quando irradiada por luz UV, a parte protegida pela fotomáscara é retirada em um processo denominado revelação. O fotoresiste polimerizado sobre a placa de silício, remanescente do processo de revelação, constitui o alto relevo do molde.

Uma resina contendo os constituintes monoméricos do polímero e um agente de cura são misturados e aplicados sobre o molde e deixada em repouso até que ocorra a total polimerização. Após cura completa, as réplicas moldadas são retiradas do molde e os microcanais formados no polímero são selados usando uma peça lisa do mesmo polímero ou de outro material (Figura 1).

Figura 1: Fabricação de moldes por prototipagem rápida em fotolitografia seguida da construção de microdispositivos através do processo de moldagem polimérica.^[6]

Microdispositivos em PDMS são comumente construídos usando o processo de moldagem polimérica em moldes construídos por prototipagem rápida em fotolitografia.^[2,3,6-10] Microdispositivos em poliéster termofixo^[23], copolímeros derivados do metacrilato (PGMAMMA e PEGMMA)^[27-29] e polimetilmetacrilato (PMMA)^[11] também podem ser fabricados usando o processo de moldagem, embora a estampagem a quente (*“hot embossing”*) seja a técnica mais comum para o PMMA.

Embora a prototipagem rápida em fotolitografia seja a técnica mais comum para a construção de moldes, vários grupos de pesquisa têm apresentado progressos no desenvolvimento de tecnologias alternativas. Entre essas tecnologias destacam-se a construção de moldes usando placas de circuito impresso,^[30] impressão direta sobre transparências usando impressoras convencionais a laser^[31] e impressoras capazes de criar objetos tridimensionais.^[9] Além disso, a fotolitografia convencional combinada à corrosão química via úmida também pode ser usada para fabricação de moldes com substratos derivados do silício.^[32]

1.1.2 Estampagem a quente (*“hot embossing”*)

O processo de microfabricação por estampagem a quente (*“hot embossing”*) é usado para fabricação de microdispositivos em polímeros termoplásticos. Essa técnica também exige a utilização de um molde que geralmente é microfabricado através das técnicas de fotolitografia e eletrodeposição de níquel. Para isso, o modelo do microdispositivo é definido pelo fotoresiste litografado sobre uma superfície metálica que, em seguida, é eletrodepositada em um banho galvanostático de níquel. Com a retirada do fotoresiste, o níquel eletrodepositado

gera o alto relevo do molde que será usado para a estampagem a quente (*mais detalhes na seção 2.2.1*). Alternativamente, moldes comumente usados em estampagem a quente podem ser fabricados em silício usando fotolitografia convencional combinada à corrosão química via úmida ou fabricados pela técnica LIGA. De acordo com o método usado na fabricação do molde, microcanais com escalas até nanométricas podem ser fabricados usando a técnica de estampagem a quente.^[5]

Uma vez microfabricado, o molde é acoplado ao equipamento de estampagem a quente. Como mostra a Figura 2, o equipamento consiste em um módulo móvel em que o molde é acoplado e um módulo fixo que serve de base para o substrato planar polimérico. Ambos os módulos formam uma câmara que é mantida a vácuo ($\sim 10^{-1}$ mbar) para evitar a formação de bolhas e eliminar vapores de água eventualmente contidos no substrato. Para a gravação dos microcanais sobre o substrato, os módulos do equipamento são aquecidos separadamente a uma temperatura pouco acima da transição vítrea do substrato polimérico. Para a grande maioria dos polímeros termoplásticos usados em microfluídica, essa temperatura gira em torno de 100 – 180 °C (106 °C para o PMMA e 150 °C para o policarbonato (PC)). O módulo móvel é então pressionado sobre o módulo fixo em pressões controladas por um sensor de *feedback*, tipicamente da ordem de 20 – 30 kN. Ainda sob vácuo e pressão, os módulos são resfriados a uma temperatura pouco abaixo da transição vítrea do polímero para que sua estrutura cristalina se estabilize novamente. Finalmente, o módulo móvel é removido à posição original fora do contato com o substrato que, após o processo, contém os microcanais gravados.^[6,11]

Figura 2: Equipamento usado para fabricação de microdispositivos através da técnica de estampagem a quente (*“hot embossing”*).^[5,13]

Microdispositivos em PMMA,^[12-14] policarbonato (PC)^[19,20] e poliolefinas (PCOC/Topas ou Zeonix/Zeonor),^[21,22] todos polímeros termoplásticos, são comumente fabricados usando a técnica de estampagem a quente. Com exceção à etapa de construção do molde, o ciclo completo para a construção de um microdispositivo em PMMA, por exemplo, tem duração de 5 – 7 minutos.

1.1.3 Moldagem por injeção (*“injection molding”*)

No mundo macroscópico, a moldagem por injeção é uma técnica bastante difundida e considerada como padrão para fabricação de objetos usando polímeros termoplásticos. Quaisquer geometrias com dimensões nas escalas entre milímetros e centímetros podem ser facilmente fabricadas em polímeros termoplásticos usando essa tecnologia.^[5] Conseqüentemente, não é surpreendente observar que alguns grupos de pesquisa têm dispensado esforços na aplicação dessa tecnologia na fabricação de microdispositivos.^[5,15,16]

A Figura 3 apresenta uma seção transversal do equipamento comumente usado para a moldagem por injeção de polímeros termoplásticos. O processo tem início com a adição do material polimérico na forma granular. Esses grãos são fundidos quando entram em contato com um parafuso aquecido e em movimento. Esse material é então transportado em direção à porta de injeção. Nessa região do equipamento as temperaturas operacionais variam entre 200 °C para polímeros como o PMMA e poliestireno (PS) e 280 °C para policarbonato (PC). O material fundido é então injetado sob alta pressão, tipicamente 600 – 1000 bar, na câmara que contém o molde projetado na estrutura do microdispositivo. Essa câmara é mantida sob vácuo para evitar a formação de bolhas e a uma temperatura pouco abaixo da temperatura de solidificação do polímero. Finalmente, a câmara é resfriada para que ocorra a expulsão do substrato moldado. O ciclo completo para a construção de um microdispositivo tem duração de 1 – 3 minutos.

Figura 3: Seção transversal do equipamento comumente usado na técnica de moldagem por injeção de polímeros termoplásticos.^[5]

As mudanças de dimensões ocasionadas pelo gradiente de temperatura existentes nos processos de injeção e ejeção do polímero devem ser levados em

conta durante a fabricação do molde. Microcanais com escalas micrométricas ($> 10 \mu\text{m}$) são facilmente construídos usando a técnica de moldagem por injeção.^[5] Os moldes geralmente usados nessa técnica também são fabricados através de fotolitografia convencional e eletrodeposição de níquel, e os polímeros PMMA e PC são os substratos mais comumente usados para fabricação de microdispositivos.^[15,16]

1.1.4 Ablação com laser ("*laser ablation*").

Em contraste às técnicas de replicação acima mencionadas, onde a produção repetitiva de vários microdispositivos poliméricos é feita a partir de moldes, a técnica de ablação a laser permite apenas a fabricação de cada microdispositivo individualmente. Deste modo, se por um lado a etapa de fabricação do molde é eliminada do processo, a velocidade de prototipagem fica limitada pelo tempo de fabricação individual de cada microdispositivo.^[5]

Polímeros como o PMMA, poliestireno (PS) e poli-(tereftalato de etileno) (PET) e poli(tetrafluoretileno) (Teflon), alguns comumente usados como substrato para fabricação de microdispositivos, são suscetíveis a ablação através de radiação a laser na região do UV.^[17] A Figura 4 apresenta o desenho esquemático das etapas envolvidas na fabricação de microcanais em um substrato polimérico através dessa técnica. O processo envolve uma etapa de incidência do laser sobre o substrato, através de pulsos com pequenos intervalos de duração na região do UV. Essa exposição ao laser é feita através de uma fotomáscara contendo o desenho do microdispositivo e acarreta a quebra das ligações químicas da cadeia polimérica. Com a ejeção dos fragmentos do polímero, que ocorre pela "pressão" causada pelo

polímero remanescente, há a formação dos microcanais (Figura 4). O material ejetado é constituído basicamente por gases (C_2 , CO_2 , CO) e oligômeros desprendidos da cadeia polimérica.^[5]

Figura 4: Desenho esquemático das etapas envolvidas na fabricação de microcanais em um substrato polimérico através da técnica de ablação com laser.^[17]

A configuração típica de um equipamento usado na fabricação de microdispositivos através da técnica de ablação a laser consiste em uma fonte de incidência de laser, capaz de incidir pulsos nos comprimentos de onda de 193 nm (ArF) ou 248 nm (KrF), com frequências de pulso de 10-100 Hz (ArF) ou vários kHz (KrF), uma máscara que define a região microfabricada e uma mesa equipada com um alinhador x-y para alinhamento do substrato. Microcanais com dimensões micrométricas são geralmente fabricados usando essa técnica.^[5]

1.1.5 Outras técnicas de microfabricação

Várias outras técnicas tem sido propostas para a fabricação de microdispositivos poliméricos. Essas técnicas são menos comuns, mas foram

igualmente importantes no desenvolvimento de novas tecnologias de microfabricação.^[4,5]

Entre as técnicas de microfabricação descritas anteriormente, algumas são dependentes de técnicas fotolitográficas pelo menos para a construção do molde. Como mencionado anteriormente, a fotolitografia em polímeros fotossensíveis também pode ser usada para a fabricação direta de microcanais comumente sobre substratos como vidro ou silício, além de vários outros componentes de um microdispositivo.^[25,26] Após o desenvolvimento do SU-8, uma resina epóxi comumente usada em tecnologias de microfabricação UV-LIGA, sua aplicação na fabricação microdispositivos foi logo desenvolvida. Em contraste a outros fotoresistes, que quando aplicados sobre um determinado substrato apresentam espessuras de 0,5 – 3 μm , o SU-8 permite a fabricação de estruturas mais espessas, com alturas que podem chegar a várias centenas de micrômetros, usando um único processo de aplicação através de *spin-coating*. Conseqüentemente, microcanais com alturas tipicamente variando entre 10 – 30 μm tem sido fabricados usando esse material para aplicações em microfluídica.^[5]

Um método alternativo rápido e de baixo foi desenvolvido por do Lago e colaboradores^[33], para a fabricação de microdispositivos usando o toner de impressoras a laser. O primeiro passo para a fabricação desses microdispositivos envolve o desenho de seu modelo utilizando *softwares* como o CorelDraw. Esse desenho é então transferido para um filme de poliéster (transparência) através de impressão direta usando impressoras convencionais a laser. Os microcanais formados pelo toner impresso sobre a transparência são vedados através de uma etapa de laminação térmica a 80 °C, usando outra transparência impressa com a imagem especular do desenho impresso anteriormente. A resolução da impressora

é o fator determinante na resolução dos microcanais fabricados em toner. Usando uma impressora com resolução máxima de 600 dpi, microcanais com até 150 – 200 μm podem ser fabricados.

1.2 Poliuretanas

A química das poliuretanas (PU) foi descoberta e patenteada por Otto Bayer e colaboradores no final da década de 30.^[34] Desde então, esse material tem se destacado entre os mais importantes polímeros usados em aplicações tecnológicas, como adesivos, tintas, elastômeros, couros sintéticos, polímeros de construção e automóveis, próteses médicas, etc.^[35-37]

Essa classe de polímeros tem presente em sua estrutura o grupo uretano, que é resultante da reação química entre um grupo hidroxila e um isocianato. A reação de polimerização ocorre quando um composto com dois ou mais grupos isocianatos reage com um álcool polifuncional (poliol).^[34] A Figura 5 representa a reação de polimerização genérica para a formação de uma poliuretana.

Figura 5. Reação de polimerização idealizada entre um diisocianato e um poliol para a formação da PU.

A versatilidade é uma das características que fazem das PUs um dos polímeros mais utilizados atualmente. Esse material pode ser sintetizado nas mais variadas propriedades, usando diferentes monômeros e/ou aditivos, para que se

obtenha a melhor performance de acordo com a aplicação desejada. Os vários protocolos de preparação das PUs são diferenciados de acordo com o meio de síntese (sem solvente, em solução, em água), com a sequência de adição dos reagentes (processo “*one-shot*”, método do pré-polímero) e de acordo com o tipo de cura (sistema de um componente, sistema de dois componentes).^[34]

Embora as propriedades das PUs sejam determinadas principalmente pela escolha do poliol, o diisocianato também pode exercer alguma influência. A velocidade de cura é determinada sobretudo pela quantidade e reatividade dos grupos funcionais isocianato presentes no sistema. Propriedades mecânicas também podem ser influenciadas pela estrutura e funcionalidade molecular do isocianato. Além disso, a escolha desse componente também afeta a estabilidade da PU quando exposta à luz. Com relação ao poliol, as PUs pouco rígidas, flexíveis e elásticas são geralmente sintetizadas quando segmentos bifuncionais de polietileno glicóis, também chamados de polióis poliésteres, são usados para formação da ligação uretana. PUs mais rígidas são resultantes do uso de polióis polifuncionais, caracterizados por facilmente formar estruturas tridimensionais entrecruzadas.^[34]

As PUs elastoméricas são caracterizadas pela alta elasticidade, força mecânica e boa resistência à abrasão. Os constituintes essenciais para a síntese de PUs elastoméricas são um poliol oligomérico de cadeia longa, um diisocianato e um diol de baixa massa molecular que atua como extensor de cadeia. Os polióis são geralmente derivados de processos industriais do petróleo como matéria prima e podem ser de duas classes diferentes: poliéster ou poliéter. A substituição dos polióis sintéticos por polióis derivados de óleos vegetais, na produção de PUs, tem sido objeto de estudo em vários grupos de pesquisa principalmente pelo menor

custo.^[38] Além disso, a utilização de fontes renováveis na síntese de polímeros é bastante interessante devido às propriedades biodegradáveis e potencial substituição dos derivados petroquímicos. Entre os óleos vegetais mais utilizados para essa finalidade destaca-se o “*castor oil*” (óleo de ricínio) ou óleo de mamona.^[40]

Em microfabricação, existem poucos trabalhos na literatura em que esse material foi usado, sendo que em nenhum deles observa-se a aplicação em microfluídica. Por exemplo, Whitesides e colaboradores^[40,41] usaram PUs rígidas para avaliar o processo de micromoldagem capilar, do inglês “*micromolding in capillaries*” (MIMIC), usando moldes construídos em PDMS^[40] e em silicone único-cristalino fraturado.^[41] Entretanto, em ambos os casos, as estruturas moldadas em PU não foram usadas como substratos para construção de microdispositivos para aplicações em microfluídica.

2. RESUMO DO TRABALHO

Este trabalho apresenta a PU elastomérica derivada de uma fonte renovável, o óleo de mamona, como um material novo e alternativo para fabricação de microdispositivos. Usando a técnica de moldagem simples em moldes construídos através de prototipagem rápida em fotolitografia, incluindo a selagem irreversível dos microcanais, foi possível construir os microdispositivos em menos de uma hora. A caracterização física dos microcanais foi feita através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e perfilometria. A superfície do polímero foi caracterizada através de medidas de ângulo de contato e fluxo eletrosmótico (EOF). Os resultados das medidas de ângulo de contato mostraram que a superfície do polímero torna-se mais hidrofílica após tratamento com plasma de oxigênio. Além disso, a superfície

do polímero mostrou a capacidade de gerar um EOF de $2,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7) na direção catódica, caracterizado em diferentes pHs usando o método de monitoramento de corrente. Estudos de compatibilidade química entre a PU e uma ampla variedade de solventes e eletrólitos foram realizados através de medidas do grau de deformação do polímero, após imersão por 24 h no solvente ou eletrólito. A performance analítica dos microdispostivos foi avaliada através de experimentos de separações eletroforéticas de compostos modelos, como a dopamina, epinefrina, L-DOPA e catecol, usando detecção amperométrica na saída do microcanal de separação.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas usando água purificada por um sistema Milli-Q[®] da Millipore, com resistividade de 18,2 MΩ.cm e carbono orgânico total, eliminado por fotoxidação com luz UV a 254 e 185 nm, abaixo de 10 ppb. Os reagentes, apresentados em ordem alfabética na Tabela 2, foram usados como recebidos do respectivo fabricante, sem prévio tratamento ou purificação.

Tabela 2: Relação dos reagentes usados no desenvolvimento desse trabalho apresentados em ordem alfabética.

Reagente	Fórmula	MM g / mol	Fabricante	Pureza
Catecol	$C_6H_6O_2$	110,11	Sigma	≥ 99%
Dopamina	$C_8H_{12}NO_2 \cdot HCl$	189,64	Sigma	≥ 98%
Epinefrina	$C_9H_{13}NO_3$	183,20	Sigma	≥ 98%
Fosfato de potássio monobásico	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	268,07	Sigma / Mallinckrodt	≥ 99%
Fosfato de potássio dibásico	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	137,99	Aldrich / Mallinckrodt	≥ 98%
Hidróxido de Sódio	NaOH	40,00	Sigma / Mallinckrodt	≥ 98%
L-DOPA (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine)	$C_9H_{13}NO_4$	197,19	Sigma	≥ 98%

Os eletrólitos utilizados nos estudos de mobilidade de fluxo eletrosmótico e separações eletroforéticas, basicamente soluções tampão fosfato em diferentes pHs, foram preparados dissolvendo-se massas equivalentes as concentrações desejadas dos respectivos sais. Os pHs desejados foram ajustados usando solução de NaOH 1 mol L⁻¹ ou solução de ácido fosfórico 1 mol L⁻¹.

As soluções estoque dos padrões das catecolaminas usadas nas separações eletroforéticas foram preparadas diariamente em concentrações de 10 mmol L⁻¹, dissolvendo-se massas exatamente pesadas de cada composto em 10 mL de água. As soluções de referência usadas nos estudos de separações eletroforéticas, contendo misturas dos compostos em concentrações entre 25 e 150 µmol L⁻¹, foram preparadas por diluições das soluções estoque no eletrólito de separação.

3.2 Microfabricação

3.2.1 Prototipagem rápida de moldes

A fabricação do moldes através das técnicas de prototipagem rápida em fotolitografia e eletrodeposição de níquel foi realizada no Laboratório de Microfabricação (LM) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). O modelo do microdispositivo foi primeiramente desenhado usando o *software* CorelDraw 11.0 (Corel Corporation, Ottawa, Canada). As máscaras fotolitográficas positivas foram obtidas através de impressão direta em fotolitos usando uma impressora de alta resolução (3000 dpi). A Figura 6 apresenta o modelo de microdispositivo usado nesse trabalho representado pela máscara fotolitográfica positiva. As linhas representam os microcanais com 60 μm de espessura em um fundo transparente. Como pode ser observado trata-se de um microdispositivo com microcanais de injeção e separação dispostos em cruz. Os comprimentos dos microcanais foram de 1,6 e 4,0 cm, respectivamente.

Figura 6: Desenho esquemático da máscara fotolitográfica positiva usada para a construção do microdispositivo. As linhas representam microcanais com 60 μm de largura e as circunferências reservatórios com 2,5 mm de espessura. Os comprimentos dos microcanais de injeção e separação foram de 1,6 e 4,0 cm, respectivamente.

Os moldes foram construídos usando técnicas de prototipagem rápida em fotolitografia e eletrodeposição de níquel. A Figura 7 apresenta esquematicamente as etapas envolvidas na construção dos moldes. Substratos em alumina com dimensões de 3×3 polegadas (Figura 7I) foram usados como suporte para o molde. Primeiramente, uma película de 100 Å de ouro foi depositada sobre a alumina através da técnica de *sputtering* (Figura 7II). Em seguida, o fotoresiste negativo SU-8 (Microchem Corp., Newton, MA) foi aplicado sobre a superfície da camada de ouro através de *spin-coating* em uma frequência de 3800 rpm durante 30 s (Figura 7III). Com essa frequência de rotação, de acordo com a curva de calibração obtida para espessura do filme *versus* velocidade de rotação do *spinner*, a espessura da camada de SU-8 obtida gira em torno de 50 µm. Após aquecimento prévio, “*prebake*”, de 65 °C durante 5 min seguido de 95 °C durante 15 min, a camada de fotoresiste foi exposta à luz UV (10 mW cm^{-2}) durante 40 s, através da máscara fotolitográfica (Figura 7IV). Após isso, aquecimentos pós-exposição de 65 e 95 °C durante 5 e 15 min foram realizados, respectivamente. O fotoresiste foi então revelado através do contato com a solução do revelador específico SU-8 XP, sob agitação magnética durante 90 s. O fotoresiste protegido pela máscara, conseqüentemente não polimerizado, foi lavado com o solvente orgânico 2-propanol por 10 s. Dessa maneira, a parte não polimerizada do fotoresiste foi definida como microcanais sobre a superfície de ouro, com a espessura da máscara fotolitográfica usada na fotogração (Figura 7V). O “*wafer*” foi em seguida aquecido a 95 °C por 15 min, em um processo conhecido por “*hardbake*”.

Os microcanais definidos pelo fotoresiste sobre o ouro foram preenchidos com níquel metálico através de eletrodeposição. Nesse processo, usando um banho galvanostático adequado, os parâmetros de eletrodeposição foram ajustados para

uma taxa de deposição de níquel de $1 \mu\text{m min}^{-1}$. A eletrodeposição foi realizada durante 30 minutos, com monitoramento através de medidas perfilométricas, obtendo-se uma espessura final de níquel eletrodepositado de $\sim 33 \mu\text{m}$ (Figura 7VI). Finalmente, o fotoresiste foi retirado do molde através de dissolução com n-metil pirrolidona, gerando o molde com níquel em alto relevo (Figura 7VII).

Figura 7: Etapas envolvidas na fabricação dos moldes usando prototipagem rápida em fotolitografia e eletrodeposição de níquel. (I) Substrato de alumina 3×3 polegadas, (II) alumina após deposição com 100 Å de ouro por *sputtering*, (III) 50 μm de fotoresiste negativo SU-8 aplicado através de *spinning* sobre a camada de ouro, (IV) polimerização do fotoresiste através de exposição à luz UV usando máscara fotolitográfica para definir os microcanais, (V) microcanais definidos sobre a superfície de ouro pelo SU-8 não polimerizado, (VI) $\sim 33 \mu\text{m}$ de níquel eletrodepositado nos microcanais definidos pelo SU-8 sobre o ouro e (V) molde com níquel em alto relevo.

3.2.2 Moldagem e selagem dos microdispositivos em PU

Os moldes fabricados usando a técnica de prototipagem rápida em fotolitografia e eletrodeposição de níquel foram usados para fabricar os microdispositivos em PU. A Figura 8 apresenta um diagrama esquemático das etapas envolvidas na construção dos microdispositivos através da técnica de moldagem. A resina do polímero foi preparada, de acordo com as instruções do fabricante (Poliquil, Araraquara, SP, Brasil), através da mistura de 1 parte do pré-polímero (E-249) e 2,5 partes do poliol (P-16020). Essa mistura foi agitada vigorosamente, desgaseificada usando vácuo e, em seguida, aplicada sobre o molde de níquel (Figura 8I). A completa polimerização da resina sobre o molde foi obtida em 40 minutos a uma temperatura de 75 °C (Figura 8II). Quando trabalhando em temperatura ambiente, a polimerização completa da resina é obtida em 3,5 horas. Em seguida, as réplicas moldadas em poliuretana foram retiradas do molde (Figura 8III). Simultaneamente, peças lisas do mesmo polímero com as mesmas dimensões daquelas obtidas com microcanaís, com ~2 mm de altura, foram moldadas sobre a superfície de uma peça em acrílico, para que fossem utilizadas no processo de selagem dos microcanaís do dispositivo (Figura 8IV). Antes da selagem, as extremidades das estruturas foram cortadas de forma regular e os reservatórios foram perfurados com 3 mm de diâmetro. Os microdispositivos foram obtidos com microcanaís selados de maneira reversível ou irreversível (Figura 8V).

O simples contato através de interações de van der Waals permitiu a selagem reversível entre as peças moldadas com microcanaís e lisa do polímero. Para selagem irreversível, as peças moldadas com microcanaís e lisa também foram colocadas em contato mas, desta vez, ambas no estágio de semi-cura, obtido em 30

minutos a 75 °C. Após isso, o microdispositivo foi aquecido novamente a 75 °C durante 15 min e então deixado em resfriamento a temperatura ambiente, com os microcanais vedados irreversivelmente.

Figura 8. Diagrama esquemático das etapas envolvidas na construção dos microdispositivos em PU através da técnica de moldagem simples. (I) aplicação da resina polimérica sobre o molde de níquel, (II) polimerização da resina sobre o molde, (III) retirada das réplicas moldadas, (IV) selagem dos microcanais usando uma peça lisa do mesmo polímero e (V) microdispositivo com microcanais vedados.

3.3 Caracterização

3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens dos microcanais obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram registradas usando um microscópio eletrônico modelo LEO 440 (Zeiss-Leica), com uma voltagem de aceleração de 18 kV. Para os experimentos, as amostras foram recobertas com uma camada de ouro de 100 Å usando deposição por *sputtering*.

3.3.2 Compatibilidade química com solventes e extração de oligômeros

A compatibilidade química entre o polímero e uma ampla variedade de solventes e eletrólitos foi determinada com medidas do grau de deformação ou inchamento, em procedimento similar ao usado por Lee e colaboradores.^[42] Nesse procedimento, as dimensões de pequenas peças cilíndricas do polímero (5 mm em diâmetro e 2 mm de espessura), moldadas em uma superfície lisa de acrílico, foram comparadas antes e depois de serem imersas durante 24 horas em 10 mL do solvente ou eletrólito. Para isso, as provas de teste do polímero foram fotografadas enquanto imersas usando uma câmera CCD (Sony, DXC-390P). Através da imagem fotografada, a altura da peça do polímero foi calculada usando o software CorelDraw 11.0, e comparada com a altura original antes da imersão, determinada usando o mesmo procedimento.

A quantidade de oligômeros não ligados à cadeia principal entrecruzada do polímero também foi determinada através de extração com vários solventes e

eletrólitos. Para isso, pequenas peças de PU, novamente com 5 mm em diâmetro e 2 mm de espessura, foram imersas em 30 mL do solvente ou eletrólito durante 24 h a 25 °C. O percentual de extração (m/m) foi determinado pela divisão entre a diferença de massas da peça do polímero antes e depois da extração dos oligômeros, e a massa original da mesma peça do polímero, em cada solvente e eletrólito.

3.3.3 Medidas de ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas em gotas de 1 µL de água aplicadas sobre a superfície do polímero. As imagens foram obtidas usando uma câmera CCD (Sony, DXC-390P) e os ângulos foram determinados usando o software CorelDraw 11.0. Todas as medidas foram feitas em temperatura ambiente e os valores reportados são uma média de quatro experimentos. Os ângulos de contato obtidos para a PU foram comparados com aqueles obtidos para o PDMS nas mesmas condições de análise. As medidas foram também realizadas após tratamento das superfícies dos polímeros com plasma de oxigênio durante 5 min, a uma potência de 30 W e 0,3 mbar de pressão.

3.3.4 Fluxo eletrosmótico (EOF)

O EOF nos microcanais construídos em PU foi estudado usando o método de monitoramento de corrente, em procedimento similar ao descrito por Huang e colaboradores.^[43] Os eletrólitos usados nos experimentos consistiram em soluções tampão fosfato com pH variando entre 4 e 12. As medidas foram feitas em

microcanais com dimensões de 3,3 cm de comprimento, 60 μm de largura e 28 μm de profundidade. As medidas foram feitas através do preenchimento dos reservatórios de entrada e saída do microcanal com a solução tampão de concentração 20 mM. Após estabilização da corrente eletroforética com a aplicação de um campo elétrico de 450 V cm^{-1} no microcanal, a solução contida em um dos reservatórios foi substituída por outra de menor concentração contendo 10 mM de tampão fosfato. O decréscimo na corrente eletroforética no microcanal devido ao preenchimento com a solução de menor força iônica foi monitorado com a aplicação do mesmo campo elétrico (450 V cm^{-1}). O tempo requerido para que a corrente decrescesse e estabilizasse foi determinado através do gráfico corrente eletroforética *versus* tempo, usando o software Origin 5.0. A velocidade do EOF (v_{EOF}) foi calculada dividindo-se o comprimento do microcanal pelo tempo requerido para a substituição das soluções tampão no microcanal. A mobilidade do EOF (μ_{EOF}) foi finalmente calculada através da divisão entre a v_{EOF} e o campo elétrico aplicado no microcanal ($\mu_{EOF} = v_{EOF} / E$).

3.4 Eletroforese em microdispositivos

Os experimentos de eletroforese em microdispositivos foram realizados no Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), com a colaboração do Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo, e no Biodesign Institute da Arizona State University (ASU), em colaboração com o Prof. Dr. Joseph Wang.

Todos os microdispositivos usados em separações eletroforéticas foram construídos no modelo convencional, com microcanais de injeção e separação

dispostos em cruz. O reservatório de descarte do microcanal de separação foi eliminado do dispositivo, deixando a saída conveniente para acoplamento com a detecção amperométrica.^[44-46]

3.4.1 Experimentos realizados no GMEME

Nos experimentos realizados no GMEME, os microdispositivos foram construídos usando os moldes fabricados no LNLS (*seção 2.2.1, Figura 7*). As dimensões do microcanal de separação e injeção, vedados reversivelmente, foram de 4,0 e 1,6 cm, respectivamente. O comprimento efetivo do microcanal de separação foi de 3,6 cm. As largura e profundidade dos microcanais, determinados por perfilometria, foram de 60 e 30 μm , respectivamente.

Antes dos experimentos, os microcanais foram tratados com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ durante 10 minutos, seguido de água deionizada em tempo equivalente.

O procedimento de injeção foi feito aplicando-se um potencial de +900 V no reservatório da amostra por 3 s, com o reservatório de descarte da amostra aterrado e os demais reservatórios livres. Com a formação do *plug* de amostra na intersecção dos canais de injeção e separação, a separação eletroforética foi iniciada com a aplicação do mesmo potencial (+900 V) no reservatório de tampão, mantendo o reservatório de detecção aterrado e os demais reservatórios livres. Os potenciais foram aplicados usando eletrodos de Pt inseridos nos reservatórios do microdispositivos, usando uma fonte de alta tensão CZE 100R (Spellman, Hauppauge, NY).

3.4.2 Experimentos realizados no Biodesign Institute

Nesse caso, os microdispositivos foram construídos usando moldes fabricados no mesmo laboratório através da técnica de prototipagem rápida em fotolitografia, sem a etapa de eletrodeposição de níquel. Ou seja, o alto relevo que define as dimensões dos microcanais foi formado pelo SU-8 fotolitografado sobre placas de silício (*seção 1.1.1, Figura 1*). Os comprimentos dos microcanais de separação e injeção, vedados irreversivelmente desta vez, foram de 5,5 e 1,5 cm, respectivamente. O comprimento efetivo do microcanal de separação foi de 5,0 cm. Os moldes utilizados possuíam o alto relevo em SU-8 com 20 μm de profundidade e 60 μm de largura.

Quando os microdispositivos eram usados pela primeira vez, os microcanais vedados irreversivelmente foram tratados com solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} durante 1 h, seguido de 15 minutos com água deionizada. Tratamento similar ao realizado no GMEME foi feito em experimentos subseqüentes.

O procedimento de injeção foi realizado aplicando-se um potencial de +500 V no reservatório de amostra, mantendo o reservatório de detecção aterrado e os demais reservatórios livres. Com a formação do plug de amostra, a separação eletroforética foi realizada aplicando-se um potencial de +1500 V no reservatório de tampão, com o reservatório de detecção aterrado e demais reservatórios livres. Os potenciais também foram aplicados usando eletrodos de Pt inseridos nos reservatórios do microdispositivos, usando uma fonte de alta tensão *home-made* capaz de aplicar potenciais de 0 a +5000 V.

3.5 Detecção eletroquímica na saída do canal de separação

3.5.1 Experimentos realizados no GMEME

A Figura 9 apresenta o desenho esquemático do sistema usado no GMEME para o acoplamento entre eletroforese em microdispositivos e detecção eletroquímica, com os componentes (A) separados e (B) acoplados.

Figura 9: Desenho esquemático do sistema usado no GEMEME para o acoplamento entre eletroforese em microdispositivos e detecção eletroquímica. **(A)** Partes do sistema: (a) suporte em acrílico com posicionador x-y, (b) microdispositivo fabricado em PU e (c) eletrodo de ouro planar fabricado usando CDs regraváveis. **(B)** Acoplamento do microdispositivo e do eletrodo de trabalho.

Como observado, um suporte em acrílico com posicionador x-y foi construído para o melhor alinhamento entre o final do microcanal de separação do microdispositivo e o eletrodo de trabalho planar construído em ouro através de CDs regraváveis. Nesse sistema, o reservatório de detecção tem capacidade para 4 mL de solução. Os demais eletrodos da célula eletroquímica, auxiliar e de referência, bem como o eletrodo de aterramento da fonte usado para eletroforese, foram posicionados em lados opostos do reservatório de detecção.

A detecção amperométrica foi realizada usando um potenciostato EG&G / PAR modelo 400 (Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN) com configuração para três eletrodos. O eletrodo de trabalho foi construído em ouro usando CDs regraváveis segundo procedimento descrito por Richter e colaboradores.^[46] As dimensões desses eletrodos planares foram de 200 µm de largura e 5 mm de comprimento. Um fio de Pt foi usado como eletrodo auxiliar e um mini-eletrodo Ag/AgCl (KCl sat.), construído usando uma ponteira de micropipeta, foi usado como eletrodo de referência. A aquisição de dados foi feita usando um *software* desenvolvido pelo grupo do Prof. Mazo em Visual Basic, chamado Avolm. Os eletroferogramas foram registrados com resolução temporal de 0,1 s, após estabilização da linha de base, com aplicação de um potencial fixo de +0,65 V no eletrodo de trabalho.

3.5.2 Experimentos realizados no Biodesign Institute

A Figura 10 apresenta o desenho esquemático do sistema comumente usado no Biodesign Institute para o acoplamento entre eletroforese em microdispositivos de vidro e detecção eletroquímica, visto em dois ângulos: (I) vista superficial e (II) vista tridimensional.

Figura 10: Desenho esquemático do sistema comumente usado no Biodesign Institute para o acoplamento entre eletroforese em microdispositivos de vidro e detecção eletroquímica. **(I)** Vista superficial: (a) microdispositivo em vidro, (b) microcanal de separação, (c) microcanal de separação, (d) suporte em acrílico para reservatórios, (e) reservatório de amostra, (f) reservatório de descarte da amostra, (g) reservatório de tampão, (h) suporte em Teflon com reservatório de detecção eletroquímica, (i) eletrodo de trabalho disco de ouro de 2 mm de diâmetro, (j) parafuso acoplado ao eletrodo de trabalho, (k) contato elétrico em cobre, (l) eletrodo auxiliar em Pt, (m) eletrodo de referência: fio de Ag/AgCl e (n) eletrodo de Pt para aterramento da fonte para eletroforese. **(II)** Vista tridimensional: (A) microdispositivo de vidro, (B) microcanal de separação, (C) microcanal de injeção, (D) ponta de pipeta acoplada ao reservatório da amostra, (E) ponta de pipeta acoplada ao reservatório do descarte da amostra, (F) ponta de pipeta acoplada ao reservatório do tampão, (G) saída do microcanal de separação, (H) sistema em acrílico para reservatórios, (I) reservatório de descarte da amostra, (J) reservatório do tampão, (K) reservatório da amostra, (L) suporte em Teflon para reservatório de detecção, (M) contra eletrodo de Pt, (N) fio de Ag recoberto com AgCl como eletrodo de referência, (O) eletrodo de trabalho, (P) reservatório de detecção e (Q) fios de platina para contato elétrico com a fonte de alta tensão.

Como observado, o sistema é composto pelo microdispositivo em vidro, por um suporte em acrílico responsável por condicionar os reservatórios de tampão, amostra e descarte da amostra, e por outro suporte em Teflon que contém todos os componentes do reservatório de detecção. O eletrodo de trabalho é formado por um disco de ouro de 3 mm de diâmetro acoplado na ponta de um parafuso. Esse

parafuso, rosqueado no suporte em acrílico, é usado para controlar a distância entre o disco de ouro e o final do microcanal de separação.

Esse mesmo sistema foi usado para os experimentos em eletroforese nos microdispositivos em PU. Porém, não houve a necessidade do acoplamento das ponteiros de pipeta (Figura 10II - E, D e F) no microdispositivo, nem do uso do suporte em acrílico contendo os reservatórios de tampão, amostra e descarte de amostra (Figura 10II – H). A Figura 11 apresenta uma fotografia do sistema usado para eletroforese em microdispositivos fabricados em PU com detecção amperométrica.

Figura 11: Fotografia do sistema usado no Biodesign Institute para os experimentos de eletroforese com detecção amperométrica em microdispositivos fabricados em PU.

A detecção amperométrica foi conduzida usando um potenciostato modelo 621A da CH Instruments (CH Instruments Inc., Austin, TX), com configuração para três eletrodos, operando no modo “*amperometric i-t curve*”. As injeções dos analitos no microdispositivo foram feitas somente após a completa estabilização da linha de

base. Os eletroferogramas foram registrados com uma resolução temporal de 0,1 s. Em todos os experimentos, o potencial de detecção aplicado foi de +0,8 V (vs fio Ag/AgCl).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PU derivada do óleo de ricínio

Como discutido anteriormente, a reação de polimerização para síntese de uma PU basicamente ocorre quando um composto com dois ou mais grupos isocianatos reage com um álcool polifuncional (poliol). Nesse trabalho, a PU elastomérica sintetizada para fabricação de microdispositivos teve o óleo de ricínio como fonte de poliol e o 4,4-difenilmetano diisocianato (MDI) como isocianato. O óleo de ricínio é um óleo vegetal derivado da mamona (*ricinus communis*), que contém em torno de 90% de ácido 1,2-hidroxioleico, que é um poliol também chamado de ácido ricinoleico. O MDI, por sua vez, é um diisocianato aromático bastante usado na síntese de poliuretanas. A Figura 12 representa as estruturas moleculares do ácido ricinoleico e do MDI.

Triglicerídeo do ácido ricinoleico

4,4-difenilmetano diisocianato (MDI)

Figura 12: Estruturas moleculares do trigliceídio do ácido ricinoleico e do MDI, usados respectivamente, como o poliol e o isocianato na síntese da PU elastomérica.

As PUs elastoméricas podem ser formuladas para cobrir uma ampla gama de dureza, variando entre 30 A e 85 D na escala Shore. A escala D é usada para medir durezas maiores que 95 Shore A. A maioria dos elastômeros possuem durezas entre 30 e 80 na escala A e plásticos estruturados começam em 55 na escala D. A dureza da poliuretana elastomérica usada nesse trabalho, determinada usando a escala Shore, foi de 54 Shore A. Para o PDMS, preparado usando uma proporção de 10:1 entre resina polimérica e catalisador (Sylgard 184), foi encontrada uma dureza 43 Shore A.

Cabe observar que a PU usada nesse trabalho não possui propriedades ópticas adequadas para aplicações usando métodos ópticos de detecção, como a fluorescência induzida a laser (LIF) e a espectrofotometria na região do UV-vis. A possibilidade da síntese de PUs transparentes para uso em microdispositivos é uma oportunidade em aberto para trabalhos futuros.

4.2 Caracterização física dos microcanais moldados usando em poliuretana

A caracterização física dos microcanais fabricados em PU foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura e perfilometria. A Figura 12 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura do microcanal aberto (A) e da seção transversal do microcanal selado (B), fabricados usando moldes construídos por prototipagem rápida em fotolitografia e eletrodeposição de níquel.

Figura 12: Micrografias eletrônicas de varredura dos microcanais fabricados em PU usando moldes fabricados por prototipagem rápida em fotolitografia e eletrodeposição de níquel. (A) micrografia de topo do microcanal aberto e (B) micrografia da seção transversal do microcanal selado reversivelmente.

A rugosidade observada na parede lateral do microcanal (Figura 12A) pode ser atribuída à baixa resolução das mascaras fotolitográficas usadas no processo de microfabricação. Além disso, esperava-se que os microcanais replicados na PU usando esse tipo de molde fossem essencialmente retangulares mas, como pode ser observado na Figura 12B, um perfil semi-circular foi obtido no topo do microcanal moldado. Esse comportamento pode ser resultado da sobre-eletrodeposição de níquel no molde, ultrapassando a espessura da camada de SU-8 usada para definir os microcanais guia da eletrodeposição.

A caracterização perfilométrica também demonstrou o perfil semi-circular em ambos, no molde de níquel e na réplica em poliuretano. Essas medidas revelaram que a altura do níquel eletrodepositado no molde ($\sim 33 \mu\text{m}$) e a profundidade dos microcanais nas réplicas em PU ($\sim 30 \mu\text{m}$) possuíam essencialmente as mesmas dimensões, sendo que o mesmo comportamento foi observado para as larguras do topo e do fundo do microcanal. Estudos perfilométricos de profundidade de microcanais, realizados em três diferentes réplicas moldadas usando o mesmo

molde de níquel, apresentaram baixos desvios padrões relativos ($< 3.0\%$), mostrando a reprodutibilidade no desmolde do substrato em poliuretana.

Moldes construídos por impressão direta sobre transparências de poliéster, usando uma impressora convencional a laser, também foram testados na moldagem da PU. Esse tipo de molde é particularmente interessante pois é descartável e oferece a possibilidade de prototipagem de um determinado microdispositivo em tempo bastante reduzido.^[31,48] A Figura 13 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura do microcanal aberto (A) e da seção transversal do microcanal selado (B) fabricados em PU usando esse tipo de molde. Como observado, as definições das paredes laterais dos microcanais são bastante desfavoráveis quando comparadas com aquelas obtidas para as réplicas moldadas usando os moldes construídos com a técnica fotolitográfica.

Figura 13: Micrografias eletrônicas de varredura dos microcanais fabricados em PU moldada usando moldes descartáveis em toner impressos em transparências de poliéster. (A) micrografia de topo do microcanal aberto e (B) micrografia da seção transversal do microcanal selado.

A espessura da camada de toner impressa sobre a transparência em poliéster, avaliada por perfilometria foi de $\sim 9,0 \mu\text{m}$. Obviamente, a resolução da impressora é o fator determinante na resolução das linhas de toner impressas sobre a transparência. Usando uma impressora com resolução máxima de 600 dpi, a

menor largura de linha impressa com boa qualidade foi estimada em 150 μm . Cabe ressaltar que os microdispositivos construídos usando moldes fabricados por impressão direta não foram testados em separações eletroforéticas.

4.3 Compatibilidade química com solventes e extração de oligômeros

A compatibilidade química entre o polímero e uma ampla variedade de solventes e eletrólitos foi determinada através de medidas de deformação, ou inchamento, do material, em procedimento similar ao usado por Lee e colaboradores.^[42] Esse tipo de estudo é muito importante quando um novo material está sendo avaliado, pois várias aplicações, incluindo até síntese orgânica, estão atualmente sendo realizadas em microfluídica.^[1,6,23,42]

A intensidade de deformação foi expressa pelo grau de inchamento através da razão $I = E/E_0$, onde E é a espessura da peça cilíndrica do polímero após 24 h de imersão no solvente ou eletrólito, e E_0 é a medida da espessura da peça do polímero antes da imersão no solvente ou eletrólito. A Figura 14 apresenta imagens tipicamente obtidas para uma peça do polímero antes (A) e após 24h de imersão em hexano (B), usando uma câmera CCD. Como pode ser observado, para cada experimento, a espessura do polímero foi determinada em três regiões distintas do polímero. A média aritmética dessas determinações correspondem aos valores de E_0 , antes do contato (A), e E , após 24 h de contato (B). Cabe ressaltar que para determinar E , as peças do polímero foram fotografadas ainda imersas, pois quando retiradas do solvente ou eletrólito suas dimensões decresciam em segundos pela evaporação dos mesmos.

Figura 14: Determinação do grau de inchamento do polímero após contato de 24 h com o solvente hexano. Fotografias obtidas usando uma câmera CCD de uma pequena peça cilíndrica do polímero antes (A) e após 24h de imersão em hexano (B). As dimensões foram determinadas usando o software CorelDraw 11.0.

Todos os experimentos foram feitos em temperatura ambiente e os valores obtidos para o grau de inchamento, I , são uma média de três experimentos para cada solvente e eletrólito, com desvios padrões relativos tipicamente de $\pm 4\%$ ($n = 3$). A Figura 15 apresenta as razões de inchamento do polímero determinadas em vários solventes orgânicos e soluções aquosas de concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 15. Determinação da compatibilidade química do polímero com vários solventes e soluções aquosas de concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Intensidades de deformação expressas pelo grau de inchamento através da razão $I = E/E_0$, onde E é a espessuras da peça cilíndrica do polímero após 24h de imersão, e E_0 é a medida da espessuras da peça do polímero antes da imersão no solvente ou eletrólito. Os valores reportados são uma média de cinco experimentos com desvios padrões relativos tipicamente de $\pm 4\%$ ($n = 5$).

Logicamente, o polímero sofre deformação através de seu inchamento pela solubilidade do solvente ou eletrólito em sua estrutura. Lee e colaboradores,^[41] em procedimento similar aplicado ao PDMS, consideraram deformações toleráveis para o polímero quando os graus de inchamento foram menores ou iguais a 1,1. Analogamente, como pode ser observado na Figura 15, considerando $I \leq 1,1$ como tolerável, a poliuretana apresentou boa compatibilidade com água, acetonitrila, vários álcoois e todas as soluções aquosas de concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ estudadas. Solventes como a acetona, tolueno, xileno e clorados (clorofórmio e diclorometano), com $I \geq 1,2$ causaram deformações no polímero que podem ser consideradas de

nível alto, e o THF, com $I > 2$, de nível extremo. Hexano e dimetilsulfóxido, com $1,1 < I < 1,2$, causaram deformações que podem ser consideradas de grau moderado. Em todos os experimentos observou-se que uma vez retirado do contato com o solvente ou eletrólito, o polímero voltou para seu estado original com as mesmas dimensões anteriores. Além disso, nenhum solvente (nem mesmo o THF), causou a dissolução ou quebra do material. A boa compatibilidade com a acetonitrila, álcoois e todos os eletrólitos é um resultado bastante interessante para aplicações em eletroforese em microdispositivos construídos usando a PU, especialmente se acoplados com espectrometria de massas.

A Tabela 3 apresenta um resumo das compatibilidades químicas de vários polímeros com diversas classes de solventes e eletrólitos, reportadas na literatura^[48], em comparação com as obtidas para a PU nesse trabalho.

Tabela 3: Compatibilidades químicas de vários polímeros com classes de solventes e eletrólitos, reportadas na literatura^[43], em comparação com as obtidas para a PU.

	PDMS	PMMA	PC	PS	PVC	PU
Ácidos Minerais Fracos	++	++	+++	+++	+++	+++
Ácidos Minerais Fortes	+	+	+	+++	+++	+++
Ácidos Oxidantes	-	-	+	-	++	//
Bases Fracas	+	+	-	+++	+++	+++
Bases Fortes	-	-	-	+++	++	+++
Alcoóis	-	-	-	+++	+++	++
Cetonas	-	--	-	--	-	-
Hidrocarbonetos Alifáticos	+	++	-	-	+++	+
Hidrocarbonetos Aromáticos	-	-	-	--	-	-
Óleos Vegetais ou Minerais	++	++	-	+++	+++	//

(+++), Excelente, (++) Boa, (+) Razoável, (-) Baixa, (--) Dissolve, (//) Não avaliado

Como observado, os polímeros termofixos PS e PVC são os que apresentam as melhores resistências químicas, quando comparados com os elastômeros PDMS e PU, e os termoplásticos PMMA e PC. Entretanto, na literatura, poucos trabalhos apresentam o uso do PS e PVC na fabricação de microdispositivos. O PC é bastante conhecido por apresentar baixa resistência química a quase todos os solventes orgânicos e grande parte dos eletrólitos, como ácidos e bases fortes. Em comparação com o PDMS e o PMMA, dois polímeros bastante comuns em microfluídica, a PU mostrou-se mais resistente a ácidos fortes, bases fortes e álcoois, e menos resistente a hidrocarbonetos.

Quando um polímero é entrecruzado no processo de polimerização, nem todos os oligômeros são incorporados em sua estrutura principal. Assim, quando o polímero entra em contato com um solvente, esses oligômeros não entrecruzados podem ser extraídos da estrutura principal.^[42] Para aplicações em microfluídica, é bastante importante determinar a extensão dessa extração, pois esses oligômeros podem contaminar amostras e eletrólitos de corrida usados, por exemplo, em experimentos de eletroforese.

A quantidade de oligômeros não ligados à cadeia principal entrecruzada do polímero foi determinada através de extração com vários solventes e eletrólitos. O percentual de extração (m/m) foi determinado após 24 horas de imersão em 30 mL de solvente ou eletrólito a 25 °C. Os experimentos mostraram que a quantidade de oligômeros extraídos pelos solventes e eletrólitos foi diretamente proporcional ao grau de deformação, ou inchamento, que os mesmos causaram no polímero. Os solventes THF e clorofórmio, que causaram deformações consideradas extrema e alta, extraíram 8,5 e 7,9 % de oligômeros não entrecruzados, respectivamente. Acetona, hexano, metanol e acetonitrila extraíram 4,3, 3,8, 3,7 e 2,2 %,

respectivamente. Etileno glicol, água e todas as soluções aquosas de concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, como causadores de deformações toleráveis, extraíram menos de 1 % de oligômeros da cadeia principal do polímero. Uma vez que a maioria das separações eletroforéticas é realizada em soluções aquosas, esses resultados mostram que a poliuretana pode ser usada como substrato para fabricação de microdispositivos para eletroforese sem problemas de contaminação de amostras e tampões de corrida.

4.4 Medidas de ângulo de contato

Como discutido anteriormente (seção 1.1), várias características fazem do PDMS o material mais popular e mais utilizado na fabricação de dispositivos em microfluídica. Entretanto, como discutido por Fiorini e colaboradores,^[23] apesar de todas as vantagens, existem também algumas limitações que comprometem seu uso em certas aplicações. A principal delas está relacionada à alta hidrofobicidade da superfície desse material que, embora possa se tornar mais hidrofílica após tratamento com plasma de oxigênio, é revertida à forma hidrofóbica original e mais estável dentro de horas.

Entre as consequências dessa característica hidrofóbica observada no PDMS, destaca-se a dificuldade prática em preencher microcanais construídos com esse material com o eletrólito de corrida e a constante formação de bolhas durante a aplicação do campo elétrico para eletroforese. Além disso, a tendência em absorver e dissolver moléculas hidrofóbicas limita o uso em determinadas aplicações pois o contato com solventes apolares causam sua deformação através do inchamento. Outro problema comum ao uso do PDMS como substrato para microdispositivos

está relacionado à adsorção de biomoléculas, como peptídeos e proteínas, nas paredes dos microcanais construídos com esse material.^[23]

Vickers e colaboradores^[50] mostraram que a superfície hidrofílica do PDMS oxidado a plasma se torna mais estável após a extração de oligômeros não polimerizados de sua superfície. Embora a estabilidade seja aumentada de 3-4 horas para 7 dias, o processo de extração de oligômeros envolve procedimentos morosos de extração em vários solventes. Dessa maneira, no campo da microfluídica, o trabalho de identificação e implementação de novos materiais que sejam complementares e/ou alternativas ao PDMS é de grande importância. Conseqüentemente, sempre que um novo material polimérico está sendo desenvolvido para aplicações em microfluídica, é imprescindível que sua superfície seja avaliada em termos de hidrofiliabilidade. Essa avaliação é geralmente feita através de medidas de ângulo de contato e comparada com os resultados obtidos com o PDMS que é o polímero mais usado em microfluídica.

Para a PU, os ângulos de contato, determinados em gotas de 1 μL de água deionizada aplicadas sobre a superfície do material, foram de $71 \pm 3^\circ$ na superfície nativa e $49 \pm 3^\circ$ na superfície tratada a plasma de oxigênio (5 minutos a 30 W e 0,3 mbar). Esses valores indicam um aumento na polarizabilidade da superfície do polímero, após o tratamento com plasma de oxigênio. Esse aumento no caráter hidrofílico da superfície foi monitorado após períodos de 24 e 48 h, com novas medidas de ângulo de contato sobre a superfície da PU tratada a plasma. Foram determinados valores de $55 \pm 3^\circ$ após 24 h e $57 \pm 3^\circ$ após 48 h, o que indica que a superfície do polímero sofre uma pequena regeneração da hidrofobicidade com o tempo.

Para o PDMS, os ângulos de contato obtidos nas mesmas condições de análise aplicadas à PU, foram de $106 \pm 2^\circ$ para a superfície nativa do material e $38 \pm 3^\circ$ para a superfície oxidada a plasma de oxigênio. As determinações após períodos de 24 e 48h resultaram em ângulos de contato de $103 \pm 2^\circ$ e $101 \pm 3^\circ$, respectivamente. Esses valores obtidos para o PDMS são similares aos obtidos por outros autores.^[23,41] Fiorini e colaboradores^[23] reportaram ângulos de contato de $\sim 108^\circ$ e $\sim 30^\circ$ para a superfície do PDMS nativa e tratada a plasma, respectivamente. Lee e colaboradores^[42] encontraram ângulos de contato de $98 \pm 2^\circ$ para a superfície nativa do PDMS e $42 \pm 3^\circ$ para a superfície tratada a plasma.

A Figura 16 apresenta imagens típicas obtidas das gotas de água aplicadas sobre a superfície dos polímeros PDMS e PU, durante os experimentos de determinação de ângulo de contato. As imagens foram obtidas usando uma câmera CCD e os ângulos foram determinados usando o software CorelDraw 11.0. As imagens (A), (C), (E) e (G) correspondem ao PDMS, com determinações sobre a superfície nativa, tratada a plasma, após 24h e 48h do tratamento, respectivamente. As imagens (B), (D), (F) e (H) correspondem a PU, com determinações sobre a superfície nativa, tratada a plasma, após 24h e 48h do tratamento, respectivamente.

Figura 16: Imagens típicas obtidas usando uma câmera CCD das gotas de água aplicadas sobre a superfície dos polímeros durante os experimentos de determinação do ângulo de contato. **(A)** PDMS nativo, **(B)** PU nativa, **(C)** PDMS tratado a plasma, **(D)** PU tratada a plasma, **(E)** PDMS após 24h do tratamento a plasma, **(F)** PU após 24h do tratamento a plasma, **(G)** PDMS após 48h do tratamento a plasma e **(H)** PU após 24h do tratamento a plasma. Os ângulos foram determinados usando o software CorelDraw 11.0.

Diante dos resultados, cabe observar que as propriedades de superfície da PU são mais adequadas às aplicações mais comuns da microfluídica (ex. eletroforese em microdispositivos) do que as propriedades de superfície do PDMS. Além da superfície nativa da PU ser mais hidrofílica do que a superfície nativa do PDMS, a superfície tratada a plasma da PU mantém sua forma hidrofílica por períodos mais longos do que a superfície tratada a plasma do PDMS. Como discutido anteriormente, se a superfície do PDMS oxidado a plasma não tiver passado por prévio tratamento de extração de oligômeros não polimerizados, a superfície hidrofílica é regenerada à superfície hidrofóbica em apenas 3-4 horas.^[50]

4.5 Dissipação de calor e fluxo eletrosmótico (EOF)

A capacidade da poliuretana em dissipar o aquecimento Joule foi investigada pelo monitoramento da corrente elétrica em função do campo elétrico (curva de Ohm) aplicado entre os reservatórios de um microcanal de 1,6 cm de comprimento, 60 μm de largura e 30 μm de profundidade, preenchido com solução tampão fosfato de concentração 10 mmol L^{-1} e pH 7. Como observado na Figura 17, a corrente elétrica ficou estável até a aplicação de um campo elétrico de 500 V cm^{-1} , acima do qual houve um desvio positivo. Esse comportamento indica que o calor gerado no interior do microcanal pela aplicação de campos elétricos superiores a 500 V cm^{-1} não está sendo suficientemente dissipado, o que pode comprometer a eficiência de uma separação eletroforética. Entretanto, o comportamento linear observado entre os campos elétricos de 0 a 500 V cm^{-1} , da curva de Ohm, é bastante conveniente para a maior parte das aplicações usando eletroforese em microdispositivos.

Figura 17: Curva de Ohm com monitoramento da corrente em função do campo elétrico aplicado em um microcanal fabricado em PU (1,6 cm comprimento $\times$ 60 μ m largura $\times$ 28 μ m de profundidade), preenchido com solução tampão fosfato (pH 7) de concentração 10 mmol L⁻¹.

As propriedades do EOF nos microcanais construídos em PU foram estudadas usando o método de monitoramento de corrente, como descrito por Huang e colaboradores.^[43] A capacidade em gerar um EOF na direção catódica indica que os microcanais construídos em PU possuem cargas negativas em sua superfície quando preenchidos com solução aquosa do eletrólito de corrida. A magnitude do EOF em microcanais com superfícies nativas do polímero foi de $2,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7. Essa mobilidade de EOF determinada para a poliuretana é maior do que aquela apresentada para o poliéster termofixo ($1,3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[23] e para o PMMA fabricado através de moldagem por injeção ($1,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[51] comparável a apresentada para o PMMA fabricado através de moldagem a pressão atmosférica ($\sim 2,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[11] e menor que aquela obtida para o PDMS oxidado a plasma ($6,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[50]. Durante os experimentos observou-se que a mobilidade do EOF nos microcanais construídos

em PU aumentou para $3,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7, após tratamento alcalino com solução aquosa de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A mobilidade do EOF foi também avaliada em diferentes pHs usando soluções tampão fosfato com pH variando entre 4 e 12. Como observado na Figura 18, a mobilidade do EOF é dependente do pH da solução tampão usada como eletrólito de corrida. Em todos os casos a direção do EOF foi catódica e o comportamento crescente da curva sugere que o aumento do pH ocasiona o aumento na densidade de cargas negativas na superfície do polímero. Em pH 2, a mobilidade do EOF apresentou instabilidade, com resultados pouco reprodutíveis e não conclusivos. Cada ponto apresentado no gráfico é a média de quatro determinações.

Figure 18. Efeito do pH sobre a mobilidade do EOF determinado usando o método do monitoramento de corrente com soluções tampão fosfato de pHs variando entre 4 e 12. Valores médios de quatro determinações.

A dependência do EOF com o pH da solução tampão não apresentou a curva sigmoidal típica e aguda comumente observada para outros substratos como os

materiais derivados de silício (vidro, silicone, siloxanos, etc.). O perfil assintótico da curva indica estabilização em $\text{pH} > 10$ mas a pequena variação do EOF na região de pH neutro confere ao material uma vantagem analítica sobre outros substratos, uma vez que pequenas variações de pH não causariam grandes variações no EOF. Essa característica pode prover melhores repetibilidades em ensaios analíticos comumente realizados em pH fisiológico, como as medidas de afinidade e atividade enzimática.^[52]

4.6 Eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica

Catecolaminas são comumente usadas em experimentos de separações eletroforéticas para avaliar a performance de microdispositivos construídos usando novos substratos.^[11,53-56] A performance analítica dos microdispositivos fabricados em PU foi avaliada através da separação eletroforética de catecol, dopamina, epinefrina e L-DOPA, acoplada com a detecção amperométrica no final do canal de separação, em experimentos realizados no GMEME e no Biodesign Institute.

4.6.1 Experimentos realizados no GMEME

Os experimentos preliminares de eletroforese em microdispositivos foram realizados no laboratório GMEME, usando as condições e sistema descrito nas seções 2.4.1 e 2.5.1, respectivamente. A Figura 19 apresenta o eletroferograma original (a) e com correção de linha de base (b), obtido na separação de uma mistura contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina (DA) e $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol (CA), usando o microdispositivo fabricado em PU e detecção amperométrica com

eletrodos planares de ouro (200 μm de largura e 5 mm de comprimento) provenientes de CDs regraváveis. Como observado, os dois compostos foram separados em aproximadamente 100 s, com tempos de migração de $54,2 \pm 0,9$ (n = 3) para a DA e $81,0 \pm 1,6$ (n = 3) para o CA. As repetibilidades para áreas de pico foram de 1,7% (n = 3) para a DA e 3,0% (n = 3) para o CA.

Figure 19. Eletroferogramas obtidos usando os microdispositivos construídos em PU para uma mistura contendo 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina (DA) e 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol (CA). **(A)** Eletroferograma original e **(B)** Eletroferograma com correção de linha de base e aplicação de filtro anti-ruído. A detecção amperométrica foi realizada usando eletrodos planares de ouro com 200 $\mu\text{m} \times 5$ mm. Outras condições: eletrólito de corrida, solução tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 7); tempo de injeção, 3 s; potenciais de injeção e separação, +900 V; potencial de detecção, +0,65 V (vs Ag/AgCl (KCl sat.)).

Cabe ressaltar que, embora as performances analíticas em termos de repetibilidade tenham sido satisfatórias, eficiências de separação baixas foram obtidas nos eletroferogramas (Figura 19A), com picos não muito bem definidos,

principalmente para o catecol. Além disso, a linha de base apresentou baixa estabilidade durante a execução da maioria dos experimentos. Vários fatores podem ter contribuído para a baixa qualidade desses resultados preliminares obtidos no GMEME. Um número elevado de parâmetros devem ser controlados em experimentos de eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica, o que exige longos períodos de treinamento.

4.6.2 Experimentos realizados no Biodesign Institute

Resultados mais satisfatórios foram obtidos mais tarde no Biodesign Institute usando os microdispositivos fabricados em PU. Entre os fatores que contribuíram para a melhora nas eficiências de separação e estabilidade de linha de base, estão a vedação irreversível dos microcanais, a utilização de macroeletrodos na detecção amperométrica e a injeção dos analitos dissolvidos no próprio eletrólito de corrida.

A vedação irreversível dos microcanais permite que o microdispositivo seja usado por longos períodos sem que ocorram certos problemas comuns aos microdispositivos vedados reversivelmente. O principal deles é a ocorrência de pequenas aberturas durante o processo de eletroforese, o que contribui bastante para a ineficiência de separação. Além disso, microcanais vedados de maneira reversível não suportam condicionamentos com bases fortes concentradas (ex. 1 mol L^{-1}), o que na PU mostrou-se fundamental.

O uso de macroeletrodos, apesar de não contribuir com a miniaturização do sistema, oferece grande estabilidade à detecção amperométrica e facilita o alinhamento na saída do microcanal de separação. Além disso, sua área de trabalho

não sofre danos devido ao uso excessivo, como acontece com eletrodos fabricados usando CDs regraváveis.

As injeções eletrocinéticas das amostras dissolvidas no próprio eletrólito de corrida, ao invés de dissolvidas em água, apresentaram melhoras significativas nas eficiências dos picos de analitos que possuem tempos de migração semelhantes aos do EOF, como é o caso do catecol e L-DOPA. Essa observação foi feita não somente em microdispostivos fabricados em PU, mas também em microdispositivos fabricados em vidro e PDMS.

Como pode ser visto na Figura 20, picos bem definidos, resolvidos e repetitivos foram obtidos em 10 injeções consecutivas de (a) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de epinefrina e (b) $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de L-DOPA, usando os microdispositivos construídos em PU e macroeletrodos em disco de ouro com 3 mm de diâmetros. As repetibilidades avaliadas através dos desvios padrões relativos das dez injeções consecutivas foram de 3,2 % para a epinefrina e 3,9 % para a L-DOPA nas áreas de pico, e 0,7% para epinefrina e 0,9% para L-DOPA nos tempos de migração.

Figura 20. Eletroferogramas obtidos para dez injeções consecutivas de uma mistura contendo (a) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de epinefrina e (b) $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de L-DOPA. Condições: eletrólito de corrida, solução tampão fosfato de concentração 20 mmol L^{-1} (pH 6,5); tempo de injeção, 3 s; potencial de injeção, + 500 V; potencial de separação, + 1500 V; potencial de detecção, +0,80 V (vs fio de Ag/AgCl).

Além de proporcionar picos bem resolvidos e definidos, uma boa correlação entre concentrações analíticas e as áreas de pico foi obtida para ambos os analitos nos experimentos realizados usando os microdispositivos construídos em PU. A Figura 21 apresenta eletroferogramas obtidos para misturas contendo níveis de concentrações crescentes de (a) epinefrina e (b) L-DOPA, em incrementos de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a faixa de concentrações entre 25 e $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A – F). Os coeficientes de correlação linear obtidos para as curvas de calibração, também apresentadas na Figura 21, foram 0,998 e 0,996 para epinefrina e L-DOPA, respectivamente. As sensibilidades foram de $515,4 \text{ nA / mM}$ para a epinefrina e

211,3 nA / mM para a L-DOPA, com limites de detecção de 2,3 e 4,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (S / N = 3), respectivamente.

Figura 21: Eletroferogramas obtidos para misturas contendo concentrações crescentes de (a) epinefrina e (b) L-DOPA, em incrementos de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. No detalhe estão apresentadas as curvas de calibração no intervalo de concentrações entre 25 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

As eficiências de separação obtidas para uma mistura contendo 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada analito foram de ~1850 pratos para epinefrina e ~3400 pratos para L-DOPA (ou ~37000 e 67000 pratos/m, respectivamente). As eficiências obtidas experimentalmente nos microdispositivos em PU, usando catecolaminas, são comparáveis às obtidas para o PMMA,^[11] PDMS^[53] e vidro,^[45] com detecção eletroquímica no final do canal de separação, e menores que as obtidas usando PDMS e vidro com detecção eletroquímica no interior do canal de separação.^[53-56] Essa deterioração na eficiência de separação observado no esquema de detecção no final do canal de separação reflete o alargamento de pico causado pela

considerável difusão do analito no espaço entre o final do canal de separação e o eletrodo de trabalho.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho apresentou o uso da PU elastomérica derivada do óleo de mamona como um novo material para a fabricação de microdispositivos. Através do processo de moldagem simples em moldes fabricados usando prototipagem rápida em fotolitografia e eletrodeposição de níquel, os microdispositivos em PU foram fabricados e selados em menos de 1h. Vários estudos comumente realizados sempre que um novo material polimérico está sendo desenvolvido para aplicações em microfluídica foram executados nos microdispositivos construídos em PU. Foram avaliadas as características físicas dos microcanais através de MEV, a compatibilidade química com solventes e eletrólitos, as características de superfície através dos ângulos de contato da superfície nativa e tratada a plasma, o EOF em diferentes pHs e a performance analítica em experimentos de eletroforese com detecção eletroquímica de analitos modelos.

As micrografias eletrônicas de varredura dos microcanais moldados em PU mostraram que esse material tem a capacidade de replicar estruturas micrométricas de forma satisfatória. Embora a replicação tenha sido realizada em microcanais de 60 µm de largura, as experiências realizadas em nosso grupo, inclusive com outros materiais como o PDMS, indicam que essa eficiência de moldagem pode provavelmente ser obtida em estruturas com resoluções ainda menores.

Nos estudos de resistência química com solventes e eletrólitos, a PU apresentou boa compatibilidade com água, acetonitrila, vários álcoois e todas as

soluções aquosas de concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ estudadas. Resistências menores foram observadas em solventes como o THF, acetona, tolueno, xileno e clorados (clorofórmio e diclorometano), e resistências moderadas foram observadas quando em contato com o hexano e dimetilsulfóxido. Quando comparada ao PC, a PU apresentou um melhor desempenho frente a todos os solventes e eletrólitos. Em comparação como PDMS e PMMA, a PU apresentou inércia química maior à ácidos fortes, bases fortes e álcoois, e piores à hidrocarbonetos.

A avaliação das características de superfície através de medidas de ângulo de contato mostrou que a superfície nativa da PU é mais hidrofílica do que a superfície nativa do PDMS. Além disso, a superfície tratada a plasma da PU mantém sua forma hidrofílica por períodos mais longos do que a superfície tratada a plasma do PDMS. Dessa maneira, as dificuldades práticas em preencher microcanais e a constante formação de bolhas são minimizadas quando a PU é usada em certas aplicações, como a eletroforese em microdispositivos.

A PU apresentou a capacidade em gerar um EOF na direção catódica, de magnitude comparável ao demonstrado para o PMMA fabricado através de moldagem por injeção. Em diferentes pHs, as magnitudes do EOF na PU apresentaram pequenas variações em pHs próximos a 7, o que confere a esse material uma vantagem analítica sobre substratos como o vidro e PDMS.

A performance analítica em experimentos de eletroforese em microdispositivos, avaliada usando analitos simples, foi satisfatória e comparável com outros materiais comumente usados como substratos para fabricação de microdispositivos. Entretanto, a separação de biomoléculas, como proteínas e peptídeos, seria muito mais conveniente nesse tipo de avaliação, pois atualmente existe um grande interesse no uso de microdispositivos na análise dessas espécies.

A utilização desse polímero proveniente de uma fonte renovável é bastante interessante uma vez que possui baixo custo e é biodegradável. Adicionalmente, devido a versatilidade dos polímeros poliuretanos, esses materiais podem oferecer outras oportunidades de aplicações com características adequadas a cada uma delas, através de modificações nos protocolos de síntese. Essas possibilidades, como por exemplo a pesquisa no desenvolvimento de uma PU transparente que seja adequada para detecção óptica, serão objetivos de futuros estudos em nosso grupo de pesquisa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 3887-3907, 2006.
- [2] DUFFY, D. C.; MCDONALD, J. C.; SCHUELLER, J. A.; WHITESIDES, G. M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 4974-4984, 1998.
- [3] MCDONALD, J. C.; DUFFY, D. C.; ANDERSON, J. R.; CHIU, D. T.; WU, H.; SCHUELLER, O. J. A.; WHITESIDES, G. M. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Electrophoresis**, v. 21, n. 1, p. 27-40, 2000.
- [4] BECKER, H.; GARTNER, C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 1, p. 89-111, 2008.
- [5] BECKER, H.; GARTNER, C. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. **Electrophoresis**, v. 21, n. 1, p. 12-26, 2000.
- [6] MCDONALD, J. C.; WHITESIDES, G. M. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 7, p. 491-499, 2002.
- [7] ANDERSON, J. R.; CHIU, D. T.; JACKMAN, R. J.; CHERNIAVSKAYA, O.; MCDONALD, J. C.; WU, H.; WHITESIDES, S. H.; WHITESIDES, G. M. Fabrication of topologically

complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 14, p. 3158-3164, 2000.

[8] ROMAN, G. T.; HLAUS, T.; BASS, K. J.; SEELHAMMER, T. G.; CULBERSTON, C. T. Sol-gel modified poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices with high electroosmotic mobilities and hydrophilic channel wall characteristics. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 1414-1422, 2005.

[9] MCDONALD, J. C.; CHABINYC, M. L.; METALLO, S. J.; ANDERSON, J. R.; STROOCK, A. D.; WHITESIDES, G.M. Prototyping of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) using solid-object printing. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 1537-1545, 2002.

[10] LI, M. W.; HUYNH, B. H.; HULVEY, M. K.; LUNTE, S. M.; MARTIN, R. S. Design and characterization of poly(dimethylsiloxane)-based valves for interfacing continuous-flow sampling to microchip electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 1042-1051, 2006.

[11] MUCK, A.; WANG, J.; JACOBS, M.; CHEN, G.; CHATRATHI, M. P.; JURKA, V.; VÝBORNÝ, Z.; SPILLMAN, S.D.; SRIDHARAN, G.; SCHONING, M. J. Fabrication of poly(methyl methacrylate) microfluidic chips by atmospheric molding. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 8, p. 2290-2297, 2004.

[12] MARTYNOVA, L.; LOCASCIO, L. E.; GAITAN, M.; KRAMER, G. W.; CHRISTENSEN, R. G.; MACCREHAN, W.A. Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 23, p. 4783-4789, 1997.

[13] BECKER, H.; HEIM, U. Hot embossing as a method for the fabrication of polymer high aspect ratio structures. **Sensors and Actuators A-Physical**, v. 83, n. 1-3, p. 130-135, 2000.

[14] XU, J.; LOCASCIO, L.; GAITAN, M.; LEE, C. S. Room-temperature imprinting method for plastic microchannel fabrication. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1930-1933, 2000.

[15] MCCORMICK, R. M.; NELSON, R. J.; ALONSO-AMIGO, M. G.; BENVENU, D. J.; HOOPER, H. H. Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 14, p. 2626-2630, 1997.

[16] DANG, F. Q.; TABATA, O.; KUROKAWA, M.; EWIS, A. A.; ZHANG, L. H.; YAMAOKA, Y.; SHINOHARA, Y.; ISHIKAWA, M.; BABA, Y. High-performance genetic analysis on microfabricated capillary array electrophoresis plastic chips fabricated by injection molding. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 7, p. 2140-2146, 2005.

- [17] ROBERTS, M. A.; ROSSIER, J. S.; BERCIER, P.; GIRAULT, H. UV laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 11, p. 2035-2042, 1997.
- [18] CHUNG, C. K.; LIN, Y. C.; HUANG, G. R. J. Bulge formation and improvement of the polymer in CO₂ laser micromachining. **Journal of Micromechanics Microengineering**, v. 15, n. 10, p. 1878-1884, 2005.
- [19] LIU, Y.; SCHNEIDER, A.; LIU, R.; GRODZINSKI, P.; KROUTCHININA, N. Microfabricated polycarbonate CE devices for DNA analysis. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 17, p. 4196-4201, 2001.
- [20] SHADPOUR, H.; MUSYIMI, H.; CHEN, J. F.; SOPER, S. A. Physiochemical properties of various polymer substrates and their effects on microchip electrophoresis performance. **Journal of Chromatography A**, v. 1111, n. 2, p. 238-251, 2006.
- [21] CASTAÑO-ÁLVAREZ, M.; FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T.; COSTA-GARCÍA, A. Poly(methylmethacrylate) and Topas capillary electrophoresis microchip performance with electrochemical detection, **Electrophoresis**, v. 26, n. 16, p. 3160-3168, 2005.
- [22] KAMEOKA, J.; CRAIGHEAD, H. G.; ZHANG, H.; HENION, J. A polymeric microfluidic chip for CE/MS determination of small molecules. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 9, p. 1935-1941, 2001.
- [23] FIORINI, G. S.; LORENZ, R. M.; KUO, J. S.; CHIU, D. T. Rapid prototyping of thermoset polyester microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 16, p. 4697-4704, 2004.
- [24] ZHANG, J.; TAN K. L.; HONG, G. D.; YANG, L. J.; GONG, H. Q. Polymerization optimization of SU-8 photoresist and its applications in microfluidic systems and MEMS. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 11, n. 1, p. 20-26, 2001.
- [25] SATO, H.; MATSUMURA, H.; KEINO, S.; SHOJI, S. An all SU-8 microfluidic chip with built-in 3D fine microstructures. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 16, n. 11, p. 2318-2322, 2006.
- [26] SIKANEN, T.; HEIKKILA, L.; TUORNIKOSKI, S.; KETOLA, R. A.; KOSTIAINEN, R.; FRANSSILA, S.; KOTIAHO, T. Performance of SU-8 microchips as separation devices and comparison with glass microchips. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 16, p. 6255-6263, 2007.
- [27] LIU, J.; SUN, X.; LEE, M. L. Surface-reactive acrylic copolymer for fabrication of microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 19, p. 6280-6287, 2005.

- [28] KIM, P.; JEONG, H. F.; KHADEMHOSEINIB, A.; SUH, K. Y. Fabrication of non-biofouling polyethylene glycol micro- and nanochannels by ultraviolet-assisted irreversible sealing. **Lab on a Chip**, v. 6, n. 11, p. 1432-1437, 2006.
- [29] LIU, J.; SUN, X.; LEE, M. L. Adsorption-resistant acrylic copolymer for prototyping of microfluidic devices for proteins and peptides. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 5, p. 1926-1931, 2007.
- [30] SUDARSAN A. P.; UGAZ, V. M. Printed circuit technology for fabrication of plastic-based microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 11, p. 3229-3235, 2004.
- [31] BAO, N.; ZHANG, Q.; XU, J. J.; CHEN, H. Y. Fabrication of poly(dimethylsiloxane) microfluidic system based on masters directly printed with an office laser printer **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1-2, p. 270-275, 2005.
- [32] EFFENHAUSER, C. S.; BRUIN, G. J. M.; PAULUS, A.; EHRAT, M. Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices: Analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 17, p. 3451-3457, 1997.
- [33] do LAGO, C. L.; SILVA, H. T. D.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; FRACASSI DA SILVA, J. A. A dry process for production of microfluidic devices based on the lamination of laser-printed polyester films. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3853-3858, 2003.
- [34] OERTEL, G. **Polyurethane handbook**. Munich: Hanser Publishers, 1985. 373 p.
- [35] BARROS, V. M. R.; ROSA, A. L.; BELOTI, M. M.; CHIERICE, G. O. J. In vivo biocompatibility of three different chemical compositions of Ricinus communis polyurethane. **Journal of Biomedical Material Research Part A**, v. 67A, n. 1, p. 235-239, 2003.
- [36] SÁNCHEZ-ADSUAR, M. S.; PAPON, E.; VILLENAVE, J. J. Influence of the prepolymerization on the properties of thermoplastic polyurethane elastomers. Part II. Relationship between the prepolymer and polyurethane properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 76, n. 10, p. 1602-1607, 2000.
- [37] GUNATILLAKE, P. A.; MEIJS, G. F.; RIZZARDO, E.; CHATELIER, R. C.; MCCARTHY, S. J.; BRANDWOOD, A.; SCHINDHELM, K. Polyurethane elastomers based on novel polyether macrodiols and MDI: Synthesis, mechanical properties, and resistance to hydrolysis and oxidation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 46, n. 2, p. 319-328, 1992.

- [38] SAXENA, P. K.; SRINIVASAN, S. R.; HROUZ, J.; ILAVSKY, M. The effect of castor oil on the structure and properties of polyurethane elastomers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 44, n. 8, p. 1343-1347, 1992.
- [39] CUNHA, F. O. V.; MELO, D. H. R.; VERONESE, V. B.; FORTE, M. M. C. Study of castor oil polyurethane - poly(methyl methacrylate) semi-interpenetrating polymer network (SIPN) reaction parameters using a 23 factorial experimental design. **Materials Research**, v. 7, n. 4, p. 539-543, 2004.
- [40] XIA, Y.; KIM, E.; WHITESIDES, G. M. Micromolding of polymers in capillaries: Applications in microfabrication. **Chemistry of Materials**, v. 8, n. 7, p. 1558-1567, 1996.
- [41] XU, Q.; MAYERS, B. T.; LAHAV, M.; VEZENOV, D. V.; WHITESIDES, G. M. Approaching zero: Using fractured crystals in metrology for replica molding. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 3, p. 854-855, 2005.
- [42] LEE, J. N.; PARK, C.; WHITESIDES, G. M. Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 23, p. 6544-6554, 2003.
- [43] HUANG, X.; GORDON, M. J.; ZARE, R. N. Current-monitoring method for measuring the electroosmotic flow rate in capillary zone electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 17, p. 1837-1838, 1988.
- [44] COLTRO, W. K. T.; FRACASSI DA SILVA, J. A.; SILVA, H. T. D.; RICHTER, E. M.; FURLAN, R.; ANGNES, L.; do LAGO, C. L.; MAZO, L. H.; CARRILHO, E. Electrophoresis microchip fabricated by a direct-printing process with end-channel amperometric detection. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3832-3839, 2004.
- [45] WANG, J.; TIAN, B.; SAHLIN, E. Micromachined electrophoresis chips with thick-film electrochemical detectors. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 23, p. 5436-5440, 1999.
- [46] WANG, J.; CHEN, G.; CHATRATHI, M. P.; MUSAMEH, M. Capillary electrophoresis microchip with a carbon nanotube-modified electrochemical detector. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 298-302, 2004.
- [47] RICHTER, E. M.; FRACASSI DA SILVA, J. A.; GUTZ, I. G. R.; do LAGO, C. L.; ANGNES, L. Disposable twin gold electrodes for amperometric detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 17, p. 2965-2969, 2004.

- [48] TAN, A.; RODGERS, K.; MURRIHY, J.P.; O'MATHUNA, C.; GLENNON, J.D. Rapid fabrication of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) by photocopying **Lab on a Chip**, v. 1, n. 1, p. 7-9, 2001.
- [49] BECKER, H.; LOCASCIO, L. E. Polymer microfluidic devices. **Talanta**, v. 56, n. 2, p. 267-287, 2002.
- [50] VICKERS, J. A.; CAULUM, M. M.; HENRY, C. S. Generation of hydrophilic poly(dimethylsiloxane) for high-performance microchip electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 21, p. 7446-7452, 2006.
- [51] SOPER, S. A.; FORD, S. M.; QI, S.; MCCARLEY, R. L.; KELLY, K.; MURPHY, M. C. Polymeric microelectromechanical systems. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 19, p. 643A-651A, 2000.
- [52] HILLEBRAND, S.; GARCIA, W.; CANTÚ, M. D.; ARAÚJO, A. P. U.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R. C.; CARRILHO, E. In vitro monitoring of GTPase activity and enzyme kinetics studies using capillary electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 1, p. 92-97, 2005.
- [53] MARTIN, R. S.; RATZLAFF, K. L.; HUYNH, B. H.; LUNTE, S. M. In-channel electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis using an electrically isolated potentiostat. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 1136-1143, 2002.
- [54] BALDWIN, R. P.; ROUSSEL, T. J.; CRAIN, M. M.; BATHLAGUNDA, V.; JACKSON, D. J.; GULLAPALLI, J.; CONKLIN, J. A.; PAI, R.; NABER, J. F.; WALSH, K. M.; KEYNTON, R. S. Fully integrated on-chip electrochemical detection for capillary electrophoresis in a microfabricated device. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3690-3697, 2002.
- [55] WOOLLEY, A. T.; LAO, K.; GLAZER, A. N.; MATHIES, R. A. Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 684-688, 1998.
- [56] SCHWARZ, M. A.; GALLIKER, B.; FLURI, K.; KAPPES, T.; HAUSER, P. C. A two-electrode configuration for simplified amperometric detection in a microfabricated electrophoretic separation device. **Analyst**, v. 126, n. 2, p. 147-151, 2001.

CAPÍTULO III

***DETERMINAÇÃO DE AZO-CORANTES EM ALIMENTOS USANDO
ELETROFORESE EM MICRODISPOSITIVOS COM DETECÇÃO
ELETROQUÍMICA***

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aditivos em alimentos

A ciência dos alimentos envolve uma matéria interdisciplinar interessada em todos os aspectos técnicos dos alimentos, iniciando no cultivo, desenvolvimento e processamento, e finalizando na avaliação de aspectos nutricionais, controle de qualidade, embalagem e consumo.^[1,2]

Os aditivos alimentares constituem uma sub-área da ciência dos alimentos que envolve as substâncias naturais ou sintéticas usadas para manter ou modificar o sabor, melhorar a aparência ou preservar a qualidade dos alimentos. Alguns aditivos alimentares podem também ser usados para aumentar o valor nutritivo ou mudar as características físicas dos alimentos.^[3]

Atualmente, a indústria dos aditivos alimentares vem ganhando atenção especial pois há uma crescente demanda na produção de alimentos de baixa caloria, principalmente nas substâncias que substituem açúcares e gorduras. Estima-se que mais de 2.500 substâncias são usadas mundialmente como aditivos alimentares. Como a grande maioria é de origem sintética, para conformidades regulatórias, antes de ser adicionada a qualquer alimento, cada substância deve demonstrar não somente a eficiência no propósito que será utilizada, mas também ter bom desempenho em análises toxicológicas bastante rigorosas.^[3,4]

A Tabela 1 apresenta as principais classes de aditivos alimentares, os efeitos quando adicionados nos alimentos e alguns exemplos dos mais usados.

Tabela 1: Principais classes de aditivos alimentares, efeitos quando adicionados nos alimentos e exemplos dos mais usados.

Aditivo	Efeito	Exemplos
Acidulantes	Conferem ou intensificam o gosto ácido dos alimentos	Ácidos adípico, cítrico, fumárico, glicólico, tartárico, láctico, etc.
Adoçantes	Usados para adoçar alimentos de baixa caloria	Acesulfame-K, aspartame, ciclamato, sacarina, etc.
Antioxidantes	Evitam o aparecimento de alterações oxidativas nos alimentos	Ácido ascórbico, ácido cítrico, butil-hidroxianizol (BHA), palmitato de ascorbila, lecitinas, etc.
Antiumectantes	Reduzem as características higroscópicas dos alimentos	Carbonato de cálcio, carbonato de magnésio, silicato de sódio, ferrocianeto de sódio, etc.
Aromatizantes	Conferem ou intensificam o aroma e sabor dos alimentos	Artificiais: propionato de amila (abacaxi), acetato de amila (banana), butirato de amila (pera), etc. Naturais: pimenta, cravo, louro, etc.
Conservantes	Impedem ou retardam a ação de microorganismos e enzimas nos alimentos	Ácido benzoico (benzoatos), ácido sórbico (sorbatos), nitratos, nitritos, propionatos, etc.
Corantes	Conferem ou intensificam a cor dos alimentos	Artificiais: amaranço, amarelo crepúsculo, ponceau, tartrazina, etc. Naturais: antocianina, índigo, etc.
Espessantes	Aumentam a viscosidade de soluções, emulsões e suspensões alimentícias	Agar-agar, carboximetilcelulose, goma adragante, goma arábica, goma guar, celulose, etc.
Estabilizantes	Mantêm as características físicas das emulsões e suspensões	Fosfolipídios, amidos modificados, citrato de sódio, goma xantana, etc.
Umectantes	Evitam a perda de umidade dos alimentos.	Glicerol, sorbitol, propilenoglicol, lactato de sódio, etc.

Todos os aditivos permitidos são controlados por lei através de órgãos reguladores presentes em cada país. O conceito de segurança toxicológica relacionada a cada aditivo alimentar é bastante variável de país para país. Dessa

maneira, várias substâncias utilizadas como aditivos alimentares em determinados países são de uso proibido em outros.^[1,4]

No Brasil, o uso de aditivos em alimentos é regulamentado e fiscalizado pelo Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância (ANVISA). O Decreto nº 50.040 de 24 de janeiro de 1961 foi a primeira norma técnica de regulamentação do emprego dos aditivos químicos em alimentos. Desde então, foram feitas várias atualizações nesse decreto, com inclusões, extensões e proibições no uso de aditivos.^[5] Nos Estados Unidos, a FDA, “*Food and Drug Administration*”, é responsável pelo mesmo tipo de controle^[6] e, nos países da União Européia, a Comissão Européia (EC, “*European Commission*”) é o órgão que regulamenta o uso de aditivos alimentares.^[7]

Os órgãos reguladores são responsáveis por estabelecer normas para o tipo de alimento que um determinado aditivo pode ser usado, a quantidade máxima do aditivo que pode ser adicionada em cada alimento e a informação relacionada ao aditivo que deve constar nos rótulos. Além disso, o consumo máximo aceitável e seguro dessas substâncias também é constantemente avaliado pelos mesmos órgãos reguladores. A FDA, por exemplo, estabelece que a quantidade máxima de um aditivo adicionada a um alimento não deve ultrapassar 1% do nível de concentração em que há evidências de efeitos adversos em testes realizados em animais. Ou seja, existe uma margem de segurança de no mínimo 100 vezes.^[4]

1.2 Corantes em alimentos

Uma refeição sempre ocorre em um contexto ambiental que pode influenciar na escolha e consumo dos alimentos. Vários fatores externos, físicos ou sociais,

presentes nos arredores, incluindo a presença de pessoas, som, temperatura, cheiro e cor, causam influência sobre as pessoas enquanto se alimentam.^[8,9]

As características dos alimentos também influenciam a escolha e a quantidade consumida durante uma refeição. Além do cheiro e temperatura, consumidores são bastante sensíveis às cores dos alimentos. Uma vez que a visão é a primeira atividade sensorial que avalia a qualidade de um alimento, os consumidores sempre os associam a cores específicas e os rejeitam se não estiverem de acordo com o esperado. A qualidade e aroma de um alimento estão geralmente associados com sua cor. Estudos mostram que o apetite pode ser estimulado ou retraído de acordo com a reação de um consumidor ao ver a coloração de um determinado alimento.^[1,8,9]

Corantes sintéticos ou naturais são atualmente usados como aditivos na indústria alimentícia para melhorar a qualidade estética dos alimentos. São considerados cruciais em alimentos de conveniência como sobremesas, snacks e bebidas, pois seriam simplesmente sem cor (e conseqüentemente sem graça!) se não os tivessem como ingrediente.^[1]

A adição de corantes em alimentos não é recente. Estima-se que tenha ocorrido pela primeira vez no Egito, por volta de 1.500 a.C., com a adição de extratos naturais coloridos em doces e vinhos de fabricação caseira, com o objetivo de melhorar a aparência estética. Seguindo essa tendência, até meados do século XIX, produtos naturais cultivados localmente sempre foram adicionados a alimentos, também para efeitos decorativos.^[1]

Alavancada pela revolução industrial, a indústria alimentícia, principalmente a dos “alimentos processados”, teve um desenvolvimento crescente e rápido. A adição de corantes tornou-se prática freqüente com objetivo de “mascarar”

alimentos de baixa qualidade ou adulterados. Essa prática resultou, pela falta de conhecimento científico, na adição de substâncias tóxicas gerando registros históricos de contaminações levadas até as últimas conseqüências. Por exemplo, o óxido de chumbo (Pb_3O_4), característico por sua cor laranja intensa, era rotineiramente adicionado a queijos e produtos de confeitaria para manter a boa aparência. Arsenato de cobre, por sua vez, era usado para re-colorir folhas usadas de chás que seriam posteriormente revendidas.^[1]

O primeiro corante orgânico sintético, a mauvina, foi desenvolvida em 1856, por Perkin, iniciando, principalmente na virada do século, a prática do uso desordenado de uma ampla variedade de corantes artificiais não controlados em alimentos populares como geléias, vinhos, mostarda, ketchup, entre outros. À época, mais de 80 corantes artificiais, alguns vindos da indústria têxtil, eram encontrados no mercado como aditivos alimentares. A grande maioria nunca testados em ensaios de toxicidade ou outros efeitos adversos.^[1]

No início dos anos 1900s, o uso de corantes naturais derivados de plantas e minerais ainda era uma prática comum na indústria alimentícia. Entretanto, as companhias tinham fortes razões e incentivos, principalmente econômicos, para deixar de usá-los e substituí-los pelos corantes sintéticos. Corantes sintéticos apresentam várias vantagens quando comparados aos corantes naturais. São facilmente produzidos, mais baratos e possuem propriedades corantes superiores aos corantes naturais. São necessárias quantidades mínimas para colorir uma grande quantidade de alimento. Além disso, os corantes sintéticos são quimicamente estáveis, facilmente misturados e não deixam sabores indesejáveis nos alimentos.^[1]

Devido ao grande crescimento do uso dos corantes sintéticos nos alimentos, as preocupações relacionadas a segurança do consumo regular dessas substâncias tornaram-se igualmente crescentes. Essa preocupação incentivou a criação de várias leis regulamentares que levaram a uma redução significativa na lista de corantes sintéticos permitidos. Nos EUA, por exemplo, somente sete corantes sintéticos são atualmente permitidos de uma lista original de mais de 700 usados antes de 1906.^[1]

Assim como para os demais aditivos alimentares, nos Estados Unidos, o FDA é o órgão responsável por regulamentar o uso de corantes em alimentos, caracterizando-os pelo número “*FD&C- number*”. A Comissão Européia, EC, que faz a regulamentação nos países da União Européia, caracterizam os corantes pelo “*E-number*” e, no Brasil, a ANVISA utiliza o “*INS-number*” (“*International Numbering System*”) para essa finalidade. O “*C.I.-number*” (“*Color Index*”) é outro sistema de codificação usado internacionalmente. A Figura 1 apresenta os corantes sintéticos mais comuns atualmente empregados na indústria alimentícia com as nomenclaturas no mercado brasileiro, estruturas moleculares, nomenclaturas internacionais, “*FD&C-numbers*”, “*E-numbers*”, “*C.I.-numbers*” e as colorações visuais. Cabe ressaltar que o código numérico do “*INS-number*” é o mesmo do “*E-number*” e, por esse motivo, não está representado na Figura 1.

<div><div> </div><div>Azul Brilhante FCF Brilliant Blue FCF FD&C Blue 1 E133 C.I. 42090 Azul Turquesa</div></div>	<div><div> </div><div>Indigotina Indigo Carmine FD&C Blue 2 E132 C.I. 16255 Azul Real</div></div>	<div><div> </div><div>Azul Patente V Patent Blue V FD&C não permitido E- 131 C.I. 42051 Azul Turquesa</div></div>	<div><div> </div><div>Vermelho 40 Allura Red FD&C Red 40 E129 C.I. 16035 Vermelho-Laranja</div></div>	<div><div> </div><div>Eritrosina Erythrosine FD&C Red 3 E127 C.I. 45430 Vermelho Rosa</div></div>	<div><div> </div><div>Carmoisina Azorubine FD&C não permitido E- 122 C.I. 14720 Vermelho</div></div>
<div><div> </div><div>Ponceu 4R New Coccine FD&C não permitido E- 124 C.I. 16255 Vermelho Morango</div></div>	<div><div> </div><div>Amaranto Amaranth FD&C não permitido E- 123 C.I. 16185 Vermelho Púrpura</div></div>	<div><div> </div><div>Vermelho 2G Red 2G FD&C não permitido E- 128 C.I. 18050 Vermelho Claro</div></div>	<div><div> </div><div>Escarlate GN Scarlet GN FD&C não permitido E- 125 C.I. 14700 Vermelho</div></div>	<div><div> </div><div>Amarelo Crepúsculo FCF Sunset Yellow FCF FD&C Yellow 6 E110 C.I. 15985 Laranja</div></div>	<div><div> </div><div>Tartrazina Tartrazine FD&C Yellow 5 E102 C.I. 19140 Amarelo Limão</div></div>
<div><div> </div><div>Amarelo Sólido AB Fast Yellow AB FD&C não permitido E- não permitido C.I. 13015 Amarelo</div></div>	<div><div> </div><div>Amarelo Quinolina Quinoline Yellow FD&C não permitido E- 104 C.I. 47005 Amarelo Limão</div></div>	<div><div> </div><div>Verde Rápido FCF Fast Green FCF FD&C Green 3 E- não permitido C.I. 42053 Verde Mar</div></div>	<div><div> </div><div>Verde S Green S FD&C não permitido E- 142 C.I. 44090 Verde Azulado</div></div>	<div><div> </div><div>Marrom HT Brown HT FD&C não permitido E- 155 C.I. 20285 Marrom Chocolate</div></div>	<div><div> </div><div>Preto brilhante BN Brilliant Black A FD&C não permitido E- 151 C.I. 28440 Preto violeta</div></div>

Figura 1: Corantes sintéticos mais comuns atualmente empregados na indústria alimentícia. Nomenclaturas no mercado brasileiro, estruturas moleculares, nomenclaturas internacionais, “FD&C-numbers”, “E-numbers”, “C.I.-numbers” e colorações visuais.

Como observado, uma ampla variedade de corantes sintéticos pode ser utilizada para fins alimentares. Quando existem dois ou mais corantes de uma mesma cor, a melhor escolha será feita de acordo com sua estabilidade química no processamento e frente aos outros componentes do alimento. Por exemplo, o Azul Brilhante FCF e o Azul Patente V possuem a mesma cor azul turquesa. Entretanto, devido à boa estabilidade térmica, somente o Azul Patente V é usado quando o processamento do alimento passa por processos de aquecimento. Em muitos casos, para obter uma coloração desejada, as indústrias alimentícias usam misturas de dois ou mais corantes.^[1]

Atualmente, no Brasil, 11 corantes sintéticos alimentares são usados e regulados pela ANVISA: Azul Brilhante FCF, Azul Patente V, Indigotina, Vermelho 40, Eritrosina, Carmosina, Ponceu 4R, Amaranto, Amarelo Crepúsculo FCF, Tartrazina e Verde Rápido FCF.^[10] Nos Estados Unidos, essa lista é reduzida a somente 7 corantes, sendo proibido o uso do Azul Patente V, Carmosina, Ponceu 4R e Amaranto.^[11] Nos países da União Européia, entre os corantes sintéticos apresentados na Figura 1, apenas o Amarelo Sólido AB e o Verde Rápido FCF são proibidos para uso em alimentos e, alguns deles, possuem uso bastante restrito a determinados tipos de alimentos. O Vermelho 2G, por exemplo, tem uso permitido somente em alguns tipos de salsichas com um mínimo de 6% de cereais em sua composição.^[12]

Ainda segundo normas da ANVISA, a adição de corantes sintéticos é restrita a limites máximos que variam entre 0,01 e 0,015 g para cada 100 g de alimento. Além disso, o número máximo de corantes sintéticos em um alimento não deve ser maior do que três.^[10]

Não existem na literatura estudos estatísticos que revelem a dimensão do mercado mundial de corantes alimentares. Uma estimativa em escala global feita por Downham e Collins,^[1] entende que esse é um mercado de 940 milhões de dólares anuais. A Figura 2 apresenta esse montante segmentado de acordo com as diferentes classes de corantes alimentares. Com 42 % de todo o mercado, o que equivale a 400 milhões de dólares anuais, os corantes sintéticos são os mais utilizados atualmente.

Figura 2: Distribuição do mercado de corantes alimentícios de 940 milhões de dólares de acordo com as classes de corantes sintéticos, corantes naturais, pigmentos e caramelos.^[1]

As tendências atuais de mercado, alavancadas principalmente pela mudança cultural e pelo sempre crescente desenvolvimento tecnológico da indústria alimentícia, apontam um crescimento geral no mercado de corantes alimentares. O crescimento mais significativo será experimentado pelo segmento de corantes naturais devido a tendência mundial dos consumidores em atualmente eleger o natural como o melhor. Assim, há previsões de crescimentos anuais de 5 a 10% no mercado dos corantes naturais e de 3 a 5% no mercado dos corantes sintéticos.^[1]

1.3 Azo-corantes em alimentos

Os azo-corantes, caracterizados pela presença de um ou mais grupamentos azo ($-N=N-$) em suas estruturas moleculares, respondem por 65% dos corantes usados em tecidos, polímeros e tintas. Essa classe de compostos vem sendo extensivamente utilizada em inúmeras aplicações industriais principalmente devido a sua elevada capacidade corante e seu baixo custo. Atualmente, existem mais de 3000 azo-corantes, que cobrem um amplo espectro de cores.^[13,14]

Entre os corantes alimentares sintéticos, os azo-corantes, pelo mesmo motivo, também são os mais comumente usados.^[13,14] Como observado na Figura 1, entre os 18 corantes sintéticos atualmente usados na indústria alimentícia mundial, 11 são da classe dos azo-corantes. No Brasil, entre os 11 corantes sintéticos usados, 6 pertencem a classe dos azo-corantes. Além da eficiente capacidade corante e baixo custo, outra característica atrativa dos azo-corantes para uso em alimentos, está em sua resistência à oxidação aeróbica.

Os azo-corantes, entretanto, podem ser facilmente reduzidos, sob condições anaeróbicas, a compostos potencialmente tóxicos, com propriedades carcinogênicas e mutagênicas.^[13,17] A azo-redução, ocorrida no sistema digestivo animal, é catalisada por enzimas hepáticas presentes no fígado e por bactérias azo-redutases presentes na flora intestinal. A Figura 3 apresenta um exemplo da redução de um azo-corante catalisada por bactérias azo-redutases. Como observado, o azo-corante Preto Ácido 77, atualmente de uso proibido em alimentos, é reduzido ao composto carcinogênico benzidina, através da atividade catalítica de enzimas azo-redutases.

Figura 3: Ilustração da redução do azo-corante Preto Ácido 77 para formação do composto carcinogênico benzidina. ^[13]

Os efeitos toxicológicos atribuídos aos azo-corantes são objetivos de constantes estudos, de modo que nunca foram ou serão aprovados de maneira permanente pelas agências reguladoras. Quando as evidências de toxicidade são consideravelmente conclusivas, esses compostos são banidos da lista dos corantes sintéticos permitidos em alimentos, como aconteceu recentemente com o Ponceu 4R e o Amaranto, nos EUA e alguns países da União Européia. ^[4,18]

1.4 Métodos usados na determinação de corantes em alimentos

Uma vez apresentadas algumas considerações acerca do uso de corantes sintéticos em alimentos, principalmente no que envolve sua importância à qualidade estética dos alimentos, às normas regulamentares para o uso e efeitos toxicológicos, fica evidente que é fundamental o desenvolvimento de métodos rápidos e simples para análise dessas substâncias. Vários métodos foram apresentados na literatura para a determinação de corantes sintéticos em alimentos. A Tabela 2 apresenta um sumário com o resumo dos métodos mais relevantes

encontrados na literatura, a técnica utilizada e condições de análise, corantes analisados, limites de detecção (LOD), tempo de análise e aplicações.

Tabela 2: Métodos mais relevantes encontrados na literatura para determinação de corantes sintéticos em alimentos.

TÉCNICA E CONDIÇÕES DE ANÁLISE	CORANTES	LOD µg / mL	AMOSTRA	TEMPO	R.
CZE-UV , tampão borato 15 mM (pH 10,5), capilar com 50 cm comp. efetivo, detecção em 216 nm.	Ácido carmínico, amarantho, amarelo crepúsculo, carmosina, eritrosina, ponceau 4R e vermelho 2G	0,35 a 2,12	Refrigerantes e xaropes	17 min	[19]
CZE-DAD , tampão fosfato 10 mM (pH 11), capilar 50 cm comp. efetivo, detecção em 216 nm.	Amarantho, amarelo crepúsculo, azul patente V, ponceu 4R, tartrazina e vermelho 40	1 a 1,7	Refrigerantes, xaropes e geléias	11 min	[20]
MECC-DAD , tampão fosfato 25 mM + tampão borato (1:1) (pH 8), SDS a 10 mM, capilar com 37,5 cm de comp. efetivo, detecção ótima em 200 nm.	Amarantho, eritrosina, ponceu 4R, riboflavina, rosa bengal e vermelho 40	1,0	Sem aplicação	20 min	[21]
MECC-DAD , tampão carbonato 10 mM (pH 9,5), SDS a 62 mM, capilar com 73 cm de comp. efetivo, detecção ótima em 200 nm. Análise simultânea de corantes e outros aditivos.	Corantes: amarelo crepúsculo, amarelo quinolina, azul brilhante FCF, carmosina, ponceau 4R, preto PN e verde S. Aditivos: acesulfame K, ácido benzóico, ácido sórbico, aspartame e sacarina	0,005 a 0,01	Vários tipos de refrigerantes	14 min	[22]
MECC-DAD , tampão borato 7,5 mM (pH 10), TBS 10 mM + 15% ACN + 20 mM de Brij 35, capilar com 37,5 cm de comp. efetivo, detecção em 200 nm.	Amarantho, amarelo crepúsculo, azul brilhante FCF, azul patente V, carmosina, eritrosina, indigotina, ponceau 4R, tartrazina, verde rápido FCF e vermelho 40	0,47 a 2,3	Refrigerantes e doces	9 min	[23]
MECC-UV , tampão fosfato 10 mM (pH 11), SDS a 10 mM, capilar com 73 cm de comp. efetivo, detecção otimizada em 450, 525 e 625 nm.	Amarantho, amarelo crepúsculo, azul brilhante FCF, azul patente V, carmosina, eritrosina, indigotina, ponceau 4R, tartrazina, verde sólido FCF e vermelho 40	0,4 a 2,5	Vinhos tinto, refrigerante, licores e coquetéis	24 min	[24]

Tabela 2: Métodos mais relevantes encontrados na literatura para determinação de corantes sintéticos em alimentos.

TÉCNICA E CONDIÇÕES DE ANÁLISE	CORANTES	LOD µg / mL	AMOSTRAS	TEMPO	R.
CZE-LIF , tampão fosfato 20 mM (pH 11), capilar com 38,5 cm de comp. efetivo. Mais sensível que aqueles usando DAD.	Amaranto, Carmosina, eritrosina, ponceau 4R e vermelho 2G	0,014 a 1,7	Refrigerantes, xaropes e coquetéis	6 min	[25]
µ-chip-ED , tampão carbonato 40 mM (pH 10,5), microdispositivo em PDMS com microcanal de separação de 7 cm, eletrodo de trabalho fibra de carbono de 10 µm.	Azul Patente V e Verde S	5,7 a 9,8	Refrigerantes e doces	5 min	[26]
RP-HPLC-UV , coluna com fase estacionária C18, fase móvel contendo (A) ACN – Tampão fosfato 10 mM pH 4,2 (45:55v/v) e (B) solução de tetrabutilamônio 10 mM, com eluição isocrática. Detecção otimizada em 450, 500 e 600 nm.	Amarelo crepúsculo, amarelo quinolina, azul brilhante FCF, azul patente, carmosina, eritrosina, indigotina, tartrazina, ponceau, vermelho 2G, vermelho 40	0,01 a 0,03	Sucos de cereja e groselha	25 min	[27]
RP-HPLC-DAD , coluna com fase estacionária C18, fase móvel para os corantes sintéticos de (A) ACN e (B) solução de tetrabutilamônio 1 mM e para os corantes naturais de (A) MeOH e (B) solução de tetrabutilamônio 1 mM com eluição por gradiente. Detecção otimizada em 400, 425, 500, 530 e 610 nm.	Corantes naturais: ácido carmínico, caramelo, curcumina, riboflavina, <i>trans-β</i> -caroteno. Corantes artificiais: azul brilhante FCF, indigotina, preto brilhante BN, tartrazina, verde B	0,03 a 75 (µg / kg)	18 iogurtes de deferentes frutas, 11 molhos de tempero e 3 “milk-shakes”	15 min	[28]
HPLC-DAD-ESI-MS , coluna com fase estacionária C18, fase móvel contendo (A) MeOH e (B) tampão acetato de sódio 20 mM (1% ácido acético), eluição por gradiente.	Amaranto, amarelo crepúsculo, ponceau 4R e sudão I, II, III, IV e V	0,01 a 4	Refrigerantes e molhos de tempero	30 min	[29]

Tabela 2: Métodos mais relevantes encontrados na literatura para determinação de corantes sintéticos em alimentos.

TÉCNICA E CONDIÇÕES DE ANÁLISE	CORANTES	LOD µg / mL	AMOSTRAS	TEMPO	R.
RP-HPLC-UV , coluna com fase estacionária C18, fase móvel binária com MeOH e tampão fosfato 0,1 M (pH 4,0), com eluição por gradiente. Detecção otimizada em 210, 235, 250 e 430 nm.	Corantes: amarelo crepúsculo, ponceu 4R e tartrazina. Aditivos: acesulfame, ácido benzóico, ácido sórbico, aspartame e sacarina.	0,1 a 3,0	Sucos e refrigerantes	20 min	[30]
LC-ESI-MS/MS , coluna com fase estacionária C18, fase móvel contendo (A) MeOH e (B) ácido fórmico com 0,1%. GPC foi usada para limpeza de amostra.	Sudão, laranja sudão G, vermelho sudão B, vermelho sudão G, vermelho sudão 7B e amarelo manteiga	0,1 a 1,8 (µg / kg)	Temperos alimentícios a base de pimenta	20 min	[31]
RP-HPLC-DAD , coluna com fase estacionária C18, fase móvel contendo (A) ACN – MeOH (20:80 v/v) e (B) tampão acetato de amônio a 1% (m/v) pH 7,5, com eluição por gradiente de concentrações.	Amaranto, amarelo crepúsculo, amarelo quinolina, azul brilhante FCF, azul patente, carmosina, eritrosina, indigotina, tartrazina, ponceau 4R, verde S, vermelho 2G	0,01 a 0,022	Sucos, refrigerantes, geléias e doces	30 min	[32]
Espectrofotometria , análise simultânea dos corantes em meio micelar com aplicação de técnica derivativa sobre os espectros.	Amaranto, curcumina e tartrazina	1,23 a 2,46	Gelatinas	-	[33]
Espectrofotometria , análise simultânea dos corantes com aplicação de técnica derivativa sobre os espectros.	Amarelo crepúsculo, ponceu 4R e tartrazina	0,032 a 0,13	Gelatinas e doces	-	[34]
Espectrofotometria , análise simultânea dos corantes com a aplicação de dois métodos derivativos sobre a razão entre os espectros.	Ponceu 4R e tartrazina	0,15 a 0,29	Refrigerantes energéticos e geléias	-	[35]

Tabela 2: Métodos mais relevantes encontrados na literatura para determinação de corantes sintéticos em alimentos.

TÉCNICA E CONDIÇÕES DE ANÁLISE	CORANTES	LOD µg / mL	AMOSTRAS	TEMPO	R.
Voltametria (SWV) , eletrólito suporte com tampão NH ₄ Cl / NH ₃ a 0,1 M (pH 10), eletrodo gotejante de mercúrio (EGM).	Amarelo crepúsculo	0,005	Refrigerantes energéticos	15 s	[36]
Voltametria (SWV) , eletrólito suporte com HCl 0,5 M, eletrodo carbono vítreo com filme de poli-alilamina. Análise não simultânea dos corantes.	Amarelo crepúsculo, tartrazina e vermelho 40	0,7 a 1,6	Refrigerantes, gelatinas e coquetéis	-	[37]
Voltametria (DPP) , eletrólito suporte com tampão Britton-Robinson 0,04 M (pH 9,2), eletrodo gotejante de mercúrio (EGM). Análise simultânea dos corantes 3 com aplicação de PLS nos voltamogramas.	Amarelo crepúsculo, tartrazina e vermelho 40	0,0064 a 0,011	Sucos e refrigerantes	-	[38]
Voltametria (DPP) , eletrólito suporte com tampão fosfato 0,1M (pH 10), eletrodo gotejante de mercúrio (EGM). Análise simultânea sem tratamento derivativo dos voltamogramas.	Carmosina, ponceu 4R e vermelho 40	0,022 a 0,060	Sucos, refrigerantes e xaropes	-	[39]
Voltametria (DPV) , eletrólito suporte com tampão McIlvane 0,5 M (pH 6), eletrodo gotejante de mercúrio (EGM). Análise simultânea com tratamento derivativo dos voltamogramas.	Amaranto e amarelo crepúsculo	< 0,03	Sucos de frutas artificiais	-	[40]
Voltametria (DPV) , eletrólito suporte com NaCl 0,02 M, eletrodo carbono vítreo com filme de bismuto. Análise não simultânea dos corantes.	Amaranto, carmoisine, ponceau 4R, coccine e vermelho 40	1 a 3	Refrigerantes e xaropes	-	[41]

Como observado, métodos que utilizam técnicas de separação como a eletroforese capilar (CE),^[19-25] eletroforese em microdispositivos,^[26] e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)^[27-32] são os mais convenientes para a determinação simultânea de várias espécies, inclusive de diferentes classes de corantes sintéticos ou em conjunto com outros aditivos alimentares. Essas técnicas, por permitir a determinação de analitos múltiplos, são as mais convenientes para o controle de adulterações, como a adição de corantes proibidos em fins alimentares.^[42,43]

Em particular, vários procedimentos usando eletroforese capilar de zona (CZE) e cromatografia eletrocínética micelar (MECC), comumente acoplados a detecção por espectrofotometria de absorção ultravioleta e visível^[20-24] e fluorescência induzida a laser (LIF),^[25] foram apresentados para separação e detecção de corantes sintéticos. Métodos que envolvem o acoplamento entre CZE e espectrometria de massas (MS) também foram desenvolvidos para a determinação de corantes sintéticos, porém em amostras de efluentes industriais^[44] e de seus produtos de degradação^[45]. Entre os métodos desenvolvidos em CE, Jager e colaboradores^[23] usaram o modo de separação MECC, acoplado a um detector DAD, para a determinação simultânea dos 11 corantes sintéticos alimentares atualmente usados no Brasil e regulados pela ANVISA.

Métodos baseados em medidas de absorbância, como a espectrofotometria derivativa, foram relatados^[33-35] mas, embora simples e rápidos, restringem-se à análise simultânea de no máximo três compostos. A mesma discussão pode ser estendida aos métodos eletroquímicos como a voltametria de onda quadrada (SWV),^[36,37] polarografia de pulso diferencial (DPP)^[38,39] e voltametria de pulso diferencial (DPV),^[40,41] que também tem sido usados na análise de corantes artificiais em alimentos. Cabe ressaltar que as técnicas eletroquímicas,

principalmente as adsortivas,^[36] são as que oferecem os menores limites de detecção.

2. RESUMO DO TRABALHO

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um método simples e rápido para a determinação simultânea de azo-corantes comumente usados na indústria alimentícia. Amarantho, Amarelo Crepúsculo FCF, Amarelo Sólido AB, Ponceu 4R e Vermelho 2G, foram separados e quantificados através de eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica. Foram estudados e otimizados vários parâmetros que influenciaram a separação eletroforética e detecção eletroquímica, em experimentos realizados usando microdispositivos de vidro e eletrodo de trabalho de carbono vítreo. A Tabela 3 apresenta as características do sistema e as condições ótimas de análise.

Tabela 3. Características e condições ótimas de análise do método desenvolvido na análise dos azo-corantes

Microdispositivo	Microcanal de separação de 8,2 cm (comprimento efetivo 7,7 cm) e de injeção de 1,0 cm
Microcanais	20 µm altura x 50 µm largura
Eletrólito de separação	Tampão fosfato 10 mmol L ⁻¹ (pH 11)
Potencial de Injeção	+2500 V (4 s)
Potencial de separação	+2500 V
Pré-condicionamento	0,1 M NaOH (30 min.) e água deionizada (5 min)
Deteção	Amperométrica com potencial aplicado de -1.0 V (vs. Ag/AgCl) em um eletrodo de carbono vítreo

Usando as condições apresentadas na Tabela 3, foi possível separar e detectar os cinco azo-corantes em menos de 300 s, com picos bastante repetitivos e ampla faixa linear de concentrações. Os limites de detecção, determinados usando a razão entre sinal e ruído igual a 3 ($S/N = 3$), variaram entre $3,8 \mu\text{M}$ ($1,4 \mu\text{g/mL}$) para o Amarelo Sólido AB e $15,1 \mu\text{M}$ ($9,1 \mu\text{g/mL}$) para o Amaranto. As boas características analíticas do método permitiram que o mesmo fosse aplicado com sucesso na análise quantitativa de produtos alimentícios comerciais como refrigerantes e doces.

A Figura 4 apresenta as estruturas moleculares dos 5 azo-corantes estudados nesse trabalho através de eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica.

Figura 4: Estruturas moleculares dos 5 azo-corantes estudados nesse trabalho através de eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas usando água purificada por um sistema Milli-Q[®] da Millipore, com características apresentadas no Capítulo II (seção 3.1). Os reagentes apresentados em ordem alfabética na Tabela 4, foram usados como recebidos do respectivo fabricante, sem prévio tratamento ou purificação.

Tabela 4: Relação dos reagentes usados no desenvolvimento desse trabalho.

Reagente	Fórmula	MM g/mol	Fabricante	Pureza
Amaranto	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	604,47	Sigma	~90%
Amarelo crepúsculo	$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$	452,37	Aldrich	~90%
Amarelo sólido AB	$C_{12}H_9N_3Na_2O_6S_2$	379,34	Aldrich	95%
Ponceu 4R	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	604,47	Sigma-Aldrich	75%
Vermelho 2G	$C_{18}H_{13}N_3Na_2O_8S_2$	509,42	Sigma-Aldrich	60%
Fosfato de potássio monobásico	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	268,07	Sigma	≥ 99%
Fosfato de potássio dibásico	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	137,99	Aldrich	≥ 98%
Hidróxido de Sódio	NaOH	40,00	Sigma-Aldrich	≥ 98%
Tetraborato de Sódio	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	381,36	Sigma-Aldrich	≥ 99%

Os eletrólitos de separação estudados, basicamente soluções tampão fosfato e borato em diferentes pHs, foram preparados dissolvendo-se massas equivalentes as concentrações desejadas dos respectivos sais. Os pHs desejados foram ajustados usando solução de NaOH 1 mol L⁻¹. Antes do uso, as soluções tampão foram filtradas em membrana com tamanho de poro de 0,45 µm (Gelman Anodisc).

As soluções estoque dos padrões de corantes, armazenadas em geladeira por período máximo de 5 dias, foram preparadas individualmente em concentrações de 10 mmol L^{-1} , dissolvendo-se massas exatamente pesadas de cada composto em 1,5 mL de água. As soluções de referência usadas na otimização do método, contendo misturas dos corantes em concentrações entre 3 e $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, foram preparadas por diluições das soluções estoque no eletrólito de separação.

3.2 Equipamentos

O desenho esquemático do sistema usado para o acoplamento entre o microdispositivo de vidro e a detecção eletroquímica está apresentado no Capítulo II (*seção 3.5.2, Figura 10*). A Figura 5 apresenta fotografias retiradas usando uma câmera convencional do (A) sistema completo, montado e pronto para o desenvolvimento dos experimentos, e (B-J) dos componentes separados do sistema separados.

Figura 5: Fotografias do sistema usado para eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica no desenvolvimento do método para a determinação de azo-corantes em alimentos. **(A)** sistema completo, montado e pronto para o desenvolvimento dos experimentos, **(B)** suporte em acrílico que serve como base para todo o sistema, **(C)** suporte em acrílico com os reservatórios do tampão, amostra e descarte da amostra, **(D)** reservatórios do microdispositivo com ponteiros de pipeta acopladas, **(E)** suporte em teflon para o acoplamento do microdispositivo e a detecção eletroquímica, **(F)** eletrodo de trabalho em carbono vítreo acoplado a um parafuso, **(G)** carbono vítreo com 3 mm de diâmetro, **(H)** reservatório de detecção com o eletrodo de trabalho acoplado, **(I)** reservatório de detecção com o microdispositivo e eletrodo de trabalho acoplados e **(J)** sistema praticamente montado com microdispositivo fixado no suporte em teflon usando uma “tampa” em acrílico.

O microdispositivo de vidro foi comprado da Micralyne Inc. (Modelo MC-BF4-001, Edmonton, Canada), com quatro reservatórios para acomodar as soluções tampão e amostras, sendo que o reservatório de detecção foi cortado para facilitar a detecção eletroquímica no final do microcanal de separação (*“end-channel”*). O microdispositivo constituiu de uma plataforma de vidro com 8,8 × 1,7 cm, com microcanais dispostos no modelo convencional em cruz. Os comprimentos dos microcanais de separação (entre os reservatórios do tampão e detecção) e de injeção foram de 8,2 e 1,0 cm, respectivamente. A intersecção entre os microcanais de separação e injeção foi fabricada a 0,5 cm de distância do reservatório de tampão e, portanto, o comprimento efetivo do microcanal de separação foi de 7,7 cm. As larguras e profundidades dos microcanais foram de 50 e 20 µm, respectivamente. Ponteiros de pipetas cortadas em tamanhos adequados foram encaixadas em cada reservatório do microdispositivo (Figura 5D), como exigido no modelo de sistema usado pelo grupo do Prof. Wang. O microdispositivo de vidro foi então acoplado ao sistema *“home-made”* contruído em acrílico e Teflon (Figura 5A). Para aplicação dos potenciais de alta tensão, os fios de platina contidos em cada reservatório (Figura 5C) foram conectados a uma fonte de alta tensão *home-made*, com ajustes de potencial variando entre 0 e +4000 V.

A detecção amperométrica foi realizada usando um eletrodo de carbono vítreo, com diâmetro de 3 mm, posicionado no final do microcanal de separação. A célula eletroquímica, além do eletrodo de trabalho de carbono vítreo, foi constituída por um fio de platina que serviu como eletrodo auxiliar e um fio de prata recoberto por cloreto de prata (Ag/AgCl) que foi usado como eletrodo de referência.

3.3 Procedimento eletroforético

Antes dos experimentos, os microcanais foram tratados com solução de hidróxido de sódio de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 30 minutos e, em seguida, com água deionizada durante 5 minutos.

Os reservatórios de tampão e amostra do sistema em acrílico, bem como as correspondentes ponteiros de pipeta encaixadas no microdispositivo, foram preenchidos com o eletrólito de corrida e padrões dos analitos (ou a amostra), dissolvidos no eletrólito de corrida.

O procedimento de injeção foi realizado através da aplicação um potencial de +2500 V no reservatório da amostra por 4 s, com o reservatório de detecção aterrado e os demais reservatórios livres. Em seguida, com o *plug* de amostra na intersecção dos microcanais de injeção e separação, a separação eletroforética foi iniciada com a aplicação do mesmo potencial (+2500 V) no reservatório de tampão, mantendo o reservatório de detecção aterrado e os demais reservatórios livres.

3.4 Detecção Eletroquímica

Todas as medidas foram executadas pelo posicionamento do eletrodo de trabalho no final do canal de separação (*“end-channel”*), com uma distância controlada de aproximadamente 20 μm , através do uso de um posicionador de rosca construído em plástico. A detecção amperométrica foi realizada usando um potenciostato da CH Instruments (modelo 621A, Austin, TX), no modo *“amperometric i-t curve”*. Em todas as análises as amostras foram injetadas após estabilização da linha de base e os eletroferogramas registrados com sinal de

corrente obtido na aplicação de um potencial de -1,0 V (vs Ag/AgCl) no eletrodo de trabalho. Os sinais foram coletados com uma resolução temporal de 0,1 s.

As medidas de voltametria cíclica convencional foram realizadas no mesmo equipamento com uma célula eletroquímica de três eletrodos. O eletrodo de trabalho consistiu novamente em um eletrodo de carbono vítreo ($\varnothing = 3$ mm), o eletrodo auxiliar em um fio de platina e o eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl sat.).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De maneira a verificar a possibilidade do uso do modo amperométrico na detecção dos azo-compostos, foram realizados estudos preliminares em voltametria cíclica convencional. Soluções de tampão fosfato com pH variando entre 8 e 11 foram testadas na redução dos azo-compostos em uma célula eletroquímica com três eletrodos tendo um eletrodo de carbono vítreo ($\varnothing = 3$ mm) como eletrodo de trabalho. Em concordância com dados presentes na literatura,^[36-41,46] os azo-compostos apresentaram um processo de redução, proporcionando a formação de picos catódicos bastante reprodutíveis em potenciais próximos a -0,8 V. Esses picos catódicos, referentes à redução eletroquímica dos grupamentos azo (-N=N-) presentes nas moléculas dessas substâncias, deslocam-se para potenciais mais negativos com o aumento do pH do eletrólito suporte, o que é esperado quando íons hidrogênio estão envolvidos em reações catódicas. Além disso, cabe ressaltar que a redução de azo-compostos é também facilitada em pHs altos porque a baixa concentração de íons H^+ leva a protonação das ligações azo (-N=N-) através de um rearranjo intra-molecular conhecido como tautomerismo azo / hidrazona.^[46]

A reação eletroquímica ocorre em duas etapas, primeiramente com uma protonação do grupamento azo (etapa 1), seguida da redução da hidrazina formada (etapa 2), que é a etapa determinante da velocidade, de acordo com as reações apresentadas a seguir:

Após esses estudos preliminares, foram avaliados os efeitos do pH e da concentração do eletrólito de corrida sobre a resolução dos picos e a eficiência de separação dos azo-corantes. Devido a presença de vários grupamentos fenólicos e/ou sulfônicos nas estruturas moleculares dos azo-corantes estudados, o pH do eletrólito de corrida teve uma grande influência na ionização e, conseqüentemente, na mobilidade eletroforética dessas espécies. De fato, a dissociação dos azo-corantes em soluções aquosas com pHs elevados sempre ocorre com a formação de compostos iônicos com múltiplas cargas, o que pode melhorar a resolução dos picos em uma separação comandada pela aplicação de campo elétrico, como é a separação eletroforética. Dessa maneira, tampões borato e fosfato com pHs variando entre 9 e 11, próximos aos pK_a s dos azo-corantes, foram avaliados na separação dessas espécies, com o objetivo de alcançar uma boa resolução de picos mesmo tratando-se de compostos com estruturas bastante similares, como é o caso do Amaranto e Ponceu 4R. Os valores elevados de pK_a desses fenil-azo compostos tem origem principalmente na presença de grupos doadores de prótons em posições *orto* e *para*, capazes de formar ligações de hidrogênio intramoleculares com azo-grupos, levando assim a formação de tautômeros azo-hidrazonas.^[47,48] O efeito da concentração do eletrólito de corrida foi avaliado entre 5 e 20 mmol L⁻¹, de

maneira a selecionar a força iônica ótima para uma alta eficiência e baixo tempo de análise, assegurando um baixo nível de ruído da linha de base.

A Figura 6 apresenta alguns eletroferogramas obtidos nos experimentos de otimização do pH e concentração do eletrólito de corrida na separação eletroforética dos cinco azo-compostos. Quando levados em consideração a melhor resolução de picos, eficiência de separação, razão entre sinal e ruído e estabilidade da linha de base, os melhores resultados foram obtidos usando uma solução tampão fosfato pH 11 de concentração de 10 mmol L⁻¹ (Figura 6A). Esse eletroferograma foi obtido para uma mistura contendo os cinco azo-compostos em concentrações de 50 (mol L⁻¹ para Amarelo Sólido AB (a), Vermelho 2G (b) e Amarelo Crepúsculo FCF (c), e 80 mol L⁻¹ para Ponceu 4R (d) e Amaranto (e). Soluções tampão com concentrações menores que 10 mmol L⁻¹ levaram a baixa resolução entre os picos do Amarelo Sólido AB (a) e Vermelho 2G (b), bem como a distorção de todos os picos da separação devido, principalmente, a grande diferença entre as mobilidades do EOF (μ EOF) e dos azo-compostos (Figura 6B). Contrariamente, o uso de concentração maiores (15 e 10 mmol L⁻¹) levaram a altos tempos de migração e conseqüente alargamento dos picos, ou seja, separações pouco eficientes (eletroferograma não apresentado). O uso de soluções tampão borato de concentração 10 mmol L⁻¹ com pHs menores que 11, resultaram em baixas resoluções entre picos. Como observado na Figura 6C, em pH 10,1, não houve resolução entre os picos do Amarelo Sólido AB (a) e Vermelho 2G (b). Em pH 9,2 (Figura 6D), não houve resolução entre os picos do Vermelho 2G (b) e Amarelo Crepúsculo FCF (c), e entre os picos do Ponceu 4R (d) e Amaranto (e).

Figura 6: Eletroferogramas obtidos nos experimentos de otimização do eletrólito de corrida na separação eletroforética dos cinco azo-compostos, com (a) Amarelo Sólido AB, (b) Vermelho 2G, (c) Amarelo Crepúsculo FCF, (d) Ponceu 4R e (e) Amaranto. **(A)** Solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 11), **(B)** solução tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 11), **(C)** solução tampão borato 10 mmol L⁻¹ (pH 10,1) e **(D)** solução tampão borato 10 mmol L⁻¹ (pH 9,2). Detecção com eletrodo de carbono vítreo usando um potencial de -0,9 V (vs fio de Ag/AgCl), potenciais de separação de +2500 V para (A), (C) e (D), e de +2250V para (B); potenciais de injeção de +2000 V e tempo de injeção, 4 s.

Uma vez definido o eletrólito de corrida usado na separação eletroforética dos azo-corantes, foi a vez da otimização do potencial usado na detecção

eletroquímica. A Figura 7 apresenta os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos em condições eletroforéticas para a redução dos cinco azo-compostos em concentrações de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. O potencial aplicado na separação eletroforética foi de + 2500 V e o eletrólito de corrida utilizado foi uma solução tampão fosfato de concentração 10 mmol L^{-1} (pH 11). Esses voltamogramas, construídos através da variação do potencial aplicado no eletrodo de trabalho entre 0 e -1,2 V, em incrementos de 100 mV, apresentaram respostas sigmóides bem definidas para todos os azo-compostos. O potencial de -1,0 V foi selecionado como ótimo, uma vez que é justamente nesse potencial que ocorre a estabilização da corrente de detecção, atingindo um patamar constante. A aplicação de potenciais mais negativos levaram a um aumento considerável no ruído e no sinal da linha de base, decorrentes principalmente da redução eletroquímica do oxigênio presente na solução e da maior interferência causada pelo acoplamento indesejável do campo elétrico aplicado na separação com o potencial aplicado na detecção. A Figura 7 também apresenta um voltamograma cíclico obtido para o Amarelo Crepúsculo FCF. Como observado, um pico de redução bem definido ($E_p = -0,83 \text{ V}$) e outro anódico no sentido reverso da varredura ($E_p = -0,05 \text{ V}$), são tipicamente obtidos.

Figura 7: Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos em condição eletroforética para (a) Amarelo Sólido AB, (b) Vermelho 2G, (c) Amarelo Crepúsculo FCF, (d) Ponceu 4R e (e) Amaranto em concentrações de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, obtido usando um eletrodo de carbono vítreo variando-se o potencial aplicado entre 0 e -1,2 V. Condições: eletrólito de corrida, tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 11); potenciais de injeção e separação, +2500 V; tempo de injeção, 4 s. Também mostrado acima está um voltamograma cíclico obtido para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Amarelo Crepúsculo FCF registrado em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} usando um eletrodo de carbono vítreo em uma janela de potenciais variando entre + 0,4 e -1,2 V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . O voltamograma com linha pontilhada corresponde ao branco.

O efeito do potencial aplicado na separação eletroforética dos azo-compostos foi avaliado em um intervalo de potenciais entre +1750 e +2750 V, em incrementos de +250 V. Como esperado e observado na Figura 8, o aumento no potencial de separação (A – E) ocasionou a diminuição no tempo de migração dos cinco azo-compostos, levando a análises mais rápidas. O efeito do potencial aplicado sobre a eficiência da separação, também apresentado na Figura 8, mostra que para os

compostos Amarelo Sólido AB, Vermelho 2G e Amarelo Crepúsculo, o número de pratos teóricos aumentou de 17900 para 34600 N/m, de 14700 para 38700 N/m e de 28000 para 43400 N/m, respectivamente, com o aumento no potencial de separação de +1750 para +2750 V. Observa-se também, principalmente para o Vermelho 2G (b), que houve um aumento considerável na eficiência de separação até o potencial de +2500 V, a partir do qual houve a estabilização no número de pratos teóricos. Cabe ressaltar que o aumento do potencial de separação teve um efeito muito pequeno sobre o ruído da linha de base, mas produziu um aumento progressivo no nível de corrente de fundo, atingindo um patamar relativamente alto e instável quando o potencial aplicado foi de +2750 V. As variações observadas nos níveis da corrente de fundo novamente refletem a interferência causada pelo acoplamento do campo elétrico do potencial de separação com o potencial aplicado na detecção. O potencial de 2500 V foi selecionado como ótimo para estudos subseqüentes.

Figura 8: Efeito do potencial aplicado sobre a separação eletroforética e resposta amperométrica de uma mistura contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Amarelo Sólido AB (a), Vermelho 2G (b) e Amarelo Crepúsculo FCF (c), e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ Ponceu 4R (d) e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ Amaranto (e). Potenciais de separação, (A) 1750 V, (B) 2000 V, (C) 2250 V, (D) 2500 V, e (E) 2750 V. Condições: eletrólito de corrida, tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 11); potenciais de injeção e separação, +2500 V; tempo de injeção, 4 s; potencial de detecção, -1.0 V (vs fio de Ag/AgCl). Também apresentadas acima são as influências do potencial de separação sobre a eficiência, representada pelo número de pratos teóricos (N/m), para os azo-corantes Amarelo Sólido AB (a), Vermelho 2G (b) e Amarelo Crepúsculo FCF (c).

Em condições ótimas de análise, a separação eletroforética dos azo-corantes, seguida da detecção amperométrica usando eletrodo de carbono vítreo, além de proporcionar picos bem resolvidos e definidos, apresentou também curvas de calibração com boas proporcionalidades entre concentração analítica e corrente de pico, para uma ampla faixa de concentrações. A Figura 9 apresenta eletroferogramas obtidos para misturas contendo níveis de concentrações

crescentes de Vermelho 2G (a), Amarelo Crepúsculo FCF (b) e Ponceu 4R (c), em incrementos de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a faixa de concentrações entre 20 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A – E). Como observado, foram obtidos picos bem definidos e proporcionais a concentração do analito, com curvas de calibração lineares. Os coeficientes de correlação linear foram de 0,998 para o Vermelho 2G, 0,995 para o Amarelo Crepúsculo FCF e 0,999 para o Ponceu 4R, com sensibilidades de 0,084, 0,076 e $0,038 \text{ nA}/\mu\text{M}$, respectivamente.

Figura 9: Eletroferogramas para misturas contendo concentrações crescentes de (a) Vermelho 2G, (b) Amarelo Crepúsculo FCF e (c) Ponceu 4R, em incrementos de 20 (mol L^{-1} (A – E). Condições: eletrólito de corrida, tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 11); potenciais de injeção e separação, $+2500 \text{ V}$; tempo de injeção, 4 s e potencial de detecção, $-1,0 \text{ V}$ (vs fio de Ag/AgCl). Acima estão as curvas de calibração no intervalo de concentrações entre 20 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para os três compostos.

A boa sensibilidade da detecção amperométrica, combinada com o baixo nível de ruído da linha de base, resultaram em limites de detecção satisfatórios para os compostos estudados. Avaliados levando-se em consideração a razão entre sinal e ruído de 3 ($S/N = 3$), os limites de detecção foram de $3,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1,4 \mu\text{g / mL}$) para o Amarelo Sólido AB, $3,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1,7 \mu\text{g / mL}$) para o Vermelho 2G, $3,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1,6 \mu\text{g / mL}$) para o Amarelo Crepúsculo FCF, $9,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($5,5 \mu\text{g / mL}$) para o Ponceu 4R e $15,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($9,1 \mu\text{g / mL}$) para o Amaranto. Os limites de detecção obtidos para o Amarelo Sólido AB, Vermelho 2G e Amarelo Crepúsculo FCF, são comparáveis aos limites de máximos detecção obtidos por outros grupos através de CE convencional acoplada a detecção por UV-vis (DAD).[19-21,23,34] Os limites de detecção relativamente altos obtidos para o Ponceu 4R e o Amaranto são justificáveis, pois o modo de injeção eletrocínético usado na operação do microdispositivo faz com que as espécies com baixas mobilidades sejam injetadas em menores quantidades no microcanal de separação. Entretanto, cabe ressaltar que mesmo sendo relativamente altos, os limites de detecção de $5,5$ e $9,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ são adequados para a determinação dessas espécies em qualquer amostra alimentícia, pois estão abaixo dos limites estipulados pela legislação.

A boa precisão é outra característica do novo método desenvolvido para determinação de azo-corantes usando eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica. Como apresentado na Figura 10, a repetibilidade do sistema foi avaliada para injeções consecutivas de uma mistura contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Amarelo Sólido AB (a), Vermelho 2G (b) e Amarelo Crepúsculo FCF (c), e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Ponceu 4R (d).

Figura 10: Eletroferogramas para cinco injeções consecutivas de uma mistura contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Amarelo Sólido AB (a), Vermelho 2G (b) e Amarelo Crepúsculo FCF (c), e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Ponceu 4R. Outras condições apresentadas na Figura 9.

Sinais repetitivos foram obtidos com desvios padrões relativos (RSD %, $n = 10$) de 2,4 % (Amarelo Sólido AB), 1,8 % (Vermelho 2G), 2,3 % (Amarelo Crepúsculo FCF) e 3,2 % (Ponceu 4R) para as correntes de pico, e 0,8 % (Amarelo Sólido AB), 0,7 % (Vermelho 2G), 0,9 % (Amarelo Crepúsculo FCF) e 1,2 % (Ponceu 4R) para os tempos de migração. Esses dados são bastante satisfatórios e indicam que não há passivação significativa na superfície do eletrodo de carbono vítreo.

4.1 Amostras reais

A aplicabilidade do método foi avaliada através da análise quantitativa de produtos alimentícios comerciais como refrigerantes e doces que contêm algum dos corantes estudados. Com relação aos refrigerantes, antes da análise, os mesmos foram submetidos a um mínimo pré-tratamento que consistiu somente na retirada do gás através de sonicação, seguida de diluição no eletrólito de corrida (1:1 v/v).

Os doces analisados consistiram em pastilhas refrescantes sabor laranja, da marca “*tic tac*”, contendo uma película protetora com o corante laranja Amarelo Crepúsculo FCF. Para que fossem analisadas, três unidades da referida pastilha (~1g) foram pesadas com exatidão, maceradas e mergulhadas em 2 mL do eletrólito de corrida, solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 11). Após a completa dissolução da película superficial colorida contida nas pastilhas, a solução foi centrifugada (10.000 rpm, 1 min) e diluída no eletrólito de corrida (1:4 v/v).

A identidade dos azo-corantes e o efeito de matriz praticamente desprezível sobre os tempos de migração e intensidades de pico, foram averiguados através de estudos de adição de padrão. Esses estudos permitiram identificar os corantes contidos nas amostras através do esperado aumento de intensidade de pico após a adição de uma quantidade conhecida do padrão analítico. Para os cálculos de recuperação, concentrações conhecidas do padrão foram adicionadas à amostra e os resultados obtidos na análise foram comparados com as concentrações adicionadas, descontadas daquelas originalmente presentes na amostra sem a adição do analito. Os resultados foram bastante satisfatórios com recuperações variando entre 98 e 103% para ambas as amostras, o que revela a boa exatidão do método. Todos os cálculos efetuados nas análises quantitativas foram feitos usando

a curva de calibração analítica construída, como mostra a Figura 10, usando os padrões analíticos dos azo-compostos dissolvidos no eletrólito de corrida.

A Figura 11 apresenta exemplos representativos de eletroferogramas tipicamente obtidos na análise do (A) refrigerante Fanta laranja, (B) pastilha *tic tac* sabor laranja e (C) pastilha *tic tac* sabor laranja fortificada com (a) Amarelo Sólido AB e (c) Ponceu 4R.

Figura 11: Eletroferogramas obtidos na análise do (A) refrigerante fanta laranja, (B) pastilha “*tic tac*” sabor laranja e (C) pastilha “*tic tac*” sabor laranja fortificada com (a) Amarelo Sólido AB e (c) Ponceu 4R, usando o novo método de eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica. A Figura em destaque no canto superior direito representa uma ampliação da região dos picos. Outras condições apresentadas Figura 9.

Como observado, todas as análises revelaram a presença de somente um corante (Amarelo Crepúsculo FCF, (b)) nas amostras, o que está de comum acordo

com as especificações do fabricante. As amostras foram fortificadas com outros corantes como o Amarelo Sólido AB (a) e Ponceu 4R (c) (Figura 7C), de maneira a demonstrar a utilidade do método para separação e detecção simultânea de outros corantes potencialmente tóxicos e proibidos em alguns países. Como pode ser observado, o eletroferograma apresenta os picos dos três compostos perfeitamente resolvidos, mesmo quando a análise é realizada na presença da matriz.

A ausência de outros picos na análise de amostras reais revela a alta seletividade da detecção eletroquímica que, como se sabe, detecta somente compostos eletroativos. Em contraste, outros métodos de detecção que usam espectrofotometria de absorção no UV/vis são sujeitos a interferências causadas pela presença de outros compostos na matriz da amostra que absorvem luz no mesmo comprimento de onda em que a análise está sendo realizada.

5. CONCLUSÕES

Um método para determinação de azo-corantes sintéticos em amostras de alimentos foi desenvolvido e otimizado usando eletroforese em microdispositivos com detecção eletroquímica. O método proposto é caracterizado pela rapidez na análise, instrumentação com grande potencial para portabilidade e baixo consumo de reagentes. Os limites de detecção, embora não melhores do que os encontrados nos métodos presentes na literatura, foram satisfatórios pois estão abaixo dos limites estipulados pela legislação no uso dessas substâncias em alimentos. O procedimento foi usado na análise de refrigerantes e pastilhas coloridas com o uso de um simples protocolo de pré-tratamento das amostras.

Quando comparado aos demais métodos de separação desenvolvidos para a determinação de corantes em alimentos, o novo método em microdispositivos proporciona análises rápidas para um número adequado de cinco analitos. Muitos métodos desenvolvidos em CE ou HPLC permitem a análise simultânea de até 11-12 analitos,^[24,32] porém, o grande tempo gasto na análise (15-30 min) não traz vantagens analíticas para a maioria das aplicações, pois é impossível encontrar alimentos que contenham mais do que três diferentes corantes sintéticos como ingredientes.

O uso da eletroforese em microdispositivos na análise de alimentos já foi previamente explorado na análise de várias classes de compostos, incluindo corantes sintéticos orgânicos,^[22] compostos polifenólicos, amino ácidos, cátions e ânions inorgânicos,^[49] mas esse é o primeiro trabalho envolvendo a determinação de azo-corantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Coloring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 5-22, 2000.
- [2] FRAZIER, R. A. Recent advances in capillary electrophoresis methods for food analysis. **Electrophoresis**, v. 22, n. 19, p. 4197-4206, 2001.
- [3] SCOTTER, M. J.; CASTLE, L. Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 2, p. 93-124, 2004.
- [4] REDLINGER, P.; NELSON, D. Food Additives: What are they? **NCR Educational Materials Project**, Cooperative Extension Service. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1993. Disponível em: <<http://www.extension.iastate.edu/Publications/NCR438.pdf>>. Acesso em: 05 mar. 2008.

- [5] BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto Lei nº 50.040 de 24 de janeiro de 1961. Norma técnica de regulação do emprego dos aditivos químicos em alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.com.br>>. Acesso em: 16 dez. 2008.
- [6] USA, Code of Federal Regulations (CFR). Food & Drug Administration (FDA). Regulations for food additive safety from 1977 revised in 2007. Disponível em: <http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/21cfrv3_01.html>. Acesso em: 05 mar. 2008.
- [7] EUROPEAN UNION. European Commission (EC). Directive of the European Parliament and of the Council 89/107/EC of 21st December 1988 on the approximation of the laws of the Member States concerning food additives authorized for use in foodstuffs intended for human consumption on additives for use in foodstuffs. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/additives/comm_legisl_en.htm>. Acesso em 05 mar. 2008.
- [8] SOBAL, J.; WANSINK, B. Kitchenscapes, tablescape, platescapes, and foodscapes: Influences of microscale built environments on food intake. **Environment and Behavior**, v. 39, n.1, p.124-142, 2007.
- [9] STROEBELE, N.; DE CASTRO, J. M. Effect of ambience on food intake and food choice. **Nutrition**, v. 20, n. 9, p. 821-838, 2004.
- [10] BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resoluções ANVISA/MS números 382, 385, 388 e 389 de 05 de agosto de 1999. Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.com.br>>. Acesso em: 16 dez. 2008.
- [11] USA, Code of Federal Regulations (CFR). Food & Drug Administration (FDA). Regulations for food color additives from 1977 revised in 2007. Disponível em: <http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/21cfrv1_01.html>. Acesso em 05 mar. 2008.
- [12] EUROPEAN UNION, European Commission (EC), Directive of the European Parliament and of the council 94/36/EC of 30th June 1994 on colours for use in foodstuffs. intended for human consumption on additives for use in foodstuffs. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/additives/comm_legisl_en.htm>. Acesso em 05 mar. 2008.

- [13] AHLSTRÖM, L. H.; ESKILSSON, C. S.; BJÖRKLUND, E. Determination of banned azo dyes in consumer goods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 49-56, 2005.
- [14] RAFII, F.; HALL, J. D.; CERNIGLIA, C. E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *clostridium* species from the human Intestinal tract. **Food Chemical Toxicology**, v. 35, n. 9, p. 897-901, 1997.
- [15] GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z. W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**, v. 151, n. 1, p. 203-210, 2004.
- [16] CHUNG, K. T.; CERNIGLIA, C. E. Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. **Mutation Research**, v. 277, n. 3, p. 201-220, 1992.
- [17] CHUNG, K. T.; STEVENS, S. E.; CERNIGLIA, C. E. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 175-190, 1992.
- [18] DOSSI, N.; PICCIN, E.; BONTEMPELLI, G.; CARRILHO, E.; WANG, J. Rapid analysis of azo-dyes in food by microchip electrophoresis with electrochemical detection. **Electrophoresis**, v. 28, n. 22, p.4240-4246, 2007.
- [19] BERZAS NEVADO, J. J.; GUIBERTEAU CABANILLAS, C.; CONTENTO SALCEDO, A. M. Method development and validation for the simultaneous determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 378, n. 1-3, p. 63-71, 1999.
- [20] PÉREZ-URQUIZA, M.; BELTRÁN, J. L. Determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 898, n. 2, p. 271-275, 2000.
- [21] SUZUKI, S.; SHIRAO, M.; AIZAWA, M.; NAKAZAWA, H.; SASA, K.; SASAGAWA, H. Determination of synthetic food dyes by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 680, n. 2, p. 541-547, 1994.
- [22] FRAZIER, R. A.; INNS, E. L.; DOSSI, N.; AMES J. M.; NURSTEN H. E. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. **Journal of Chromatography A**, v. 876, n. 1-2, p. 213-220, 2000.
- [23] JAGER, A. V.; TONIN, F. G.; MAGGI TAVARES, M. F. Optimizing the separation of food dyes by capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 9-10, p. 957-965, 2005.

- [24] PRADO, M. A.; VILAS BOAS, L. F.; BRONZE, M. R.; GODOY, H. T. Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, n. 2, p. 231-236, 2006.
- [25] RYVOLOVÁ, M.; TÁBORSKÝ, P.; VRÁBEL, P.; KRÁSENSKÝ, P.; PREISLER, J. Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, n. 2, p. 206-211, 2007.
- [26] DOSSI, N.; TONIOLO, R.; PIZZARIELLO, A.; SUSMEL, S.; PERENNES, F.; BONTEMPELLI, G. A capillary electrophoresis microsystem for the rapid in-channel amperometric detection of synthetic dyes in food. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 601, n. 1-2, p. 1-7, 2007.
- [27] KISELEVA, M. G.; PIMENOVA, V. V.; ELLER, K. I. Optimization of Conditions for the HPLC Determination of Synthetic Dyes in Food. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 685-690, 2003.
- [28] GONZÁLEZ, M.; GALLEGRO, M.; VALCÁRCEL, M. Liquid Chromatographic Determination of Natural and Synthetic Colorants in Lyophilized Foods Using an Automatic Solid-Phase Extraction System, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2121-2129, 2003.
- [29] MA, M.; LUO, X.; CHEN, B.; SU, S.; YAO, S. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 170-176, 2006.
- [30] DOSSI, N.; TONIOLO, R.; SUSMEL, S.; PIZZARIELLO, A.; BONTEMPELLI, G. Simultaneous RP-LC determination of additives in soft drinks. **Chromatographia**, v. 63, n. 11/12, p. 557-562, 2006.
- [31] SUN, H.; WANG, F.; AI, L. Determination of banned 10 azo-dyes in hot chili products by gel permeation chromatography-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, n. 1-2, p. 120-128, 2007.
- [32] MINIOTI, K. S.; SAKELLARIOU, C. F.; THOMAIDIS, N. S. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 583, n. 1, p. 103-110, 2007.

- [33] BLANCO, C. C.; CAMPAÑA, A. M. G.; BARRERO, F. A. Derivative spectrophotometric resolution of mixtures of the food colourants Tartrazine, Amaranth and Curcumin in a micellar medium. **Talanta**, v. 43, n. 7, p. 1019-1027, 1996.
- [34] NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; CABANILLAS, C. G.; LLERENA, M. J. V.; SALCEDO, A. C. Resolution of ternary mixtures of tartrazine, sunset yellow and ponceau 4R by derivative spectrophotometric ratio spectrum-zero crossing method in commercial foods. **Talanta**, v. 46, n. 5, p. 933–942, 1998.
- [35] ALTINOZ, S.; TOPTAN, S. Determination of tartrazine and ponceau-4R in various food samples by Vierordt's method and ratio spectra first-order derivative UV spectrophotometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 6, p. 667-683, 2002.
- [36] NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; LLERENA, M. J. V. Square wave adsorptive voltammetric determination of sunset yellow. **Talanta**, v. 44, n. 3, p. 467-474, 1997.
- [37] SILVA, M. L. S.; GARCIA, M. B. Q.; LIMA, J. L. F. C.; BARRADO, E. Voltammetric determination of food colorants using a polyallylamine modified tubular electrode in a multicommutated flow system. **Talanta**, v. 72, n. 1, p. 282-288, 2007.
- [38] LÓPEZ-DE-ALBA, P. L.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, L.; DE-LEÓN-RODRÍGUEZ, M. L. Simultaneous determination of synthetic dyes tartrazine, allura red and sunset yellow by differential pulse polarography and partial least squares. A multivariate calibration method. **Electroanalysis**, v. 14, n. 3, p. 197-205, 2002.
- [39] COMBEAU, S.; CHATELUT, M.; VITTORI, O. Identification and simultaneous determination of azorubin, allura red and ponceau 4R by differential pulse polarography: application to soft drinks. **Talanta**, v. 56, n. 1, p. 115-122, 2002.
- [40] NI, Y.; BAI, J. Simultaneous determination of amaranth and sunset yellow by ratio derivative voltammetry. **Talanta**, v. 44, n. 1, p. 105-109, 1997.
- [41] CLAUX, B.; VITTORI, O. Bismuth film electrode as an alternative for mercury electrodes: determination of azo dyes and application for detection in food stuffs. **Electroanalysis**, v. 19, n. 21, p. 2243-2246, 2007.
- [42] BOYCE, M. C. Determination of additives in food by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 22, n. 8, p. 1447-1459, 2001.
- [43] BOYCE, M. C. Determination of additives and organic contaminants in food by CE and CEC. **Electrophoresis**, v. 28, n. 22, p. 4046-4062, 2007.

- [44] TAKEDA, S.; TANAKA, Y.; NISHIMURA, Y.; YAMANE, M.; SIROMA, Z.; WAKIDA, S. Analysis of dyestuff degradation products by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 853, n. 1-2, p. 503–509, 1999.
- [45] RIU, J.; SCHÖNSEE, I.; BARCELÓ, D. Determination of sulfonated azo dyes in groundwater and industrial effluents by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis / mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 33, n. 8, p. 653-663, 1998.
- [46] GOODING, J. J.; COMPTON, R. G.; BRENNAN, C. M.; ATHERTON, J. H. The mechanism of the electro-reduction of some azo dyes. **Electroanalysis**, v. 8, n. 6, p. 519-523, 1996.
- [47] KURTOĞLU, M.; BIRBIÇER, N.; KIMYONŞEN, U. È.; SERIN, S. Determination of pKa values of some azo dyes in acetonitrile with perchloric acid. **Dyes and Pigments**, v. 41, n. 1-2, p. 143-147, 1999.
- [48] DOS SANTOS, H. F.; OLIVEIRA, L. F. C.; DANTAS, S. O.; SANTOS P. S.; ALMEIDA W. B. Quantum mechanical investigation of the tautomerism in the azo dye sudan III. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 80, n. 4-5, p. 1076–1086, 2000.
- [49] ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C.; CREVILLÉN, A. G.; BLASCO, A. J. CE microchips: An opened gate to food analysis. **Electrophoresis**, v. 28, n. 6, p. 1002-1011, 2007.

CAPÍTULO IV

***DESENVOLVIMENTO DE UM DETECTOR ELETROQUÍMICO
ADAPTATIVO E MAGNETICAMENTE MODULÁVEL PARA
ELETROFORESE EM MICRODISPOSITIVOS***

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistemas adaptativos em química analítica

Sistemas adaptativos, os quais suas funções podem ser controladas externamente através de estímulos magnéticos, fotônicos entre outros, oferecem grandes oportunidades na operação de sensores e microdispositivos, em resposta a uma necessidade específica.^[1] Por exemplo, os eventos bio-eletrocatalíticos de biosensores amperométricos podem ser controlados magneticamente, de acordo com a demanda analítica, através do movimento de partículas magnéticas contendo enzimas imobilizadas.^[2] Similarmente, as propriedades magnéticas e eletrocatalíticas de nanofios de níquel podem ser exploradas no desenvolvimento de sensores adaptativos magneticamente moduláveis para análise de aminoácidos e carboidratos.^[3]

Introduzindo um novo conceito em dispositivos “magneto-bioeletrônicos”, o primeiro biosensor eletroquímico adaptativo e magneticamente modulável foi desenvolvido em 2000 pelo grupo do Prof. Itamar Willner, em colaboração com Hirsch e Katz.^[4] A Figura 1 apresenta um diagrama esquemático desse primeiro biosensor magneticamente modulável usado na bioeletrocatalise oxidativa de glicose pela enzima glicose oxidase (GOx), com o ferroceno como mediador de elétrons (M). Como pode ser observado, as partículas magnéticas, previamente silanizadas, foram funcionalizadas com o mediador de elétrons (M) e a superfície de uma camada de ouro depositada sobre a base da célula eletroquímica foi funcionalizada com a enzima GOx. Um ímã externo foi usado no controle das partículas magnéticas de forma que a operação do biosensor pôde ser

interconvertida reversivelmente entre dois estados: (A) estado ativo (“ON”) e (B) estado passivo (“OFF”). O posicionamento do imã abaixo da célula eletroquímica, proporcionando o contato entre as partículas magnéticas contendo o mediador de elétrons e a sobre superfície de ouro funcionalizada com a enzima GOx, faz com que o biosensor esteja no estado ativo e pronto para oxidar o substrato em um processo bioeletrocatalítico (Figura 1A, “ON”). Em contraste, o posicionamento do imã e das partículas magnéticas em qualquer outro ponto da célula eletroquímica faz com que o biosensor seja desativado, pois o mediador de elétrons não está mais em contato com a enzima GOx (Figura 1B, “OFF”).

Figura 1: Diagrama esquemático do primeiro biosensor adaptativo magneticamente modulável desenvolvido para determinação de glicose através de oxidação bioeletrocatalítica.^[4] O posicionamento ou remoção das partículas magnéticas contendo o mediador de elétrons (M) sobre a camada de ouro funcionalizada com a enzima GOx permitiu que operação do biosensor fosse interconvertida reversivelmente entre os estados **(A)** ativo (“ON”) e **(B)** passivo (“OFF”).

A Figura 2A apresenta as respostas eletroquímicas obtidas para a oxidação do ferroceno, através de voltametrias de pulso diferencial (DPV), em função do controle magnético reversível do posicionamento das partículas magnéticas sobre a superfície de ouro não funcionalizada com a enzima GOx. No estado ativo (“ON”),

observa-se a oxidação do ferroceno em um pico bem definido com $E_p = 0,31 \text{ V}$ (vs. ECS) (Figura 2A, “ON”). No estado passivo (“OFF”), com a remoção das partículas magnéticas do contato com a superfície em ouro, nenhum sinal de oxidação é obtido (Figura 2A, “OFF”). O gráfico apresentado no interior da Figura 2A mostra que essa alternância entre os estados “ON” e “OFF” da detecção pode ser realizada inúmeras vezes com sinais bastante repetitivos para as correntes de oxidação.

A Figura 2B apresenta as respostas eletroquímicas obtidas para a oxidação da glicose, através de voltametrias cíclicas, também em função do controle magnético reversível do posicionamento das partículas magnéticas sobre a superfície de ouro, desta vez funcionalizada com a enzima GOx. A atração magnética das partículas sobre o eletrodo resulta na oxidação do ferroceno funcionalizado e a consequente ativação da enzima GOx. A oxidação bioeletrocatalítica da glicose pela GOx, mediada pelo ferroceno, é evidenciada pela corrente anódica consideravelmente maior obtida no voltamograma cíclico (Figura 2B, “ON”). Em contraste, no estado passivo (“OFF”), a corrente anódica referente à oxidação da glicose não é mais observada (Figura 2A, “OFF”). Como pode ser observado no gráfico apresentado no interior da Figura 2B, alternância entre os estados “ON” e “OFF” também pode ser realizada inúmeras vezes de maneira reversível com respostas obtidas para a oxidação da glicose bastante repetitivas.

Figura 2: Respostas eletroquímicas obtidas no controle magnético reversível dos estados ativo (“ON”) e passivo (“OFF”) do biosensor eletroquímico.^[4] **(A)** Voltametrias de pulso diferencial obtidas para a oxidação do ferroceno com as partículas magnéticas funcionalizadas posicionadas (“ON”) e removidas (“OFF”) da superfície de ouro do biosensor. **(B)** Voltametrias cíclicas obtidas para a oxidação bioeletrocatalítica da glicose com as partículas magnéticas funcionalizadas com o mediador de elétrons posicionadas (“ON”) e removidas (“OFF”) da camada de ouro funcionalizada com a enzima GOx. Os gráficos apresentados no interior de cada voltamograma mostram a alternância entre os estados “ON” e “OFF” em múltiplos ciclos de posicionamento e remoção das partículas magnéticas.

Vários outros trabalhos envolvendo a construção de sensores adaptativos magneticamente moduláveis foram desenvolvidos pelo grupo do Prof. Willner.^[5-11] Entre esses trabalhos destacam-se dois artigos de revisão^[2,5] e outros 7 artigos de pesquisa,^[6-11] com o desenvolvimento de biosensores adaptativos, similares ao apresentado anteriormente, mas para a determinação de outros analitos como o NADH^[6] e determinação simultânea de múltiplos analitos como lactato e glicose.^[7] Além de biosensores, outra linha bastante explorada foi a do desenvolvimento de sensores eletroquímicos com propriedades de superfície adaptativamente controladas. Nesse sentido, através do posicionamento ou remoção de partículas

magnéticas recobertas com material hidrofóbico sobre a superfície do eletrodo, as propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas dos sensores foram controladas de acordo com o tipo de aplicação.^[8-11]

Enquanto que os trabalhos desenvolvidos pelo grupo do Prof. Willner usaram microesferas ferro-magnéticas funcionalizadas, o grupo do Prof. Wang apresentou, em 2005, seu primeiro trabalho em dispositivos “magneto-bioeletrônicos”, explorando as propriedades magnéticas e eletrocatalíticas de partículas de níquel.^[12] O níquel é bastante conhecido em eletroanalítica por sua capacidade de eletrocatalisar a oxidação de álcoois, aminoácidos e carboidratos. Assim, nesse primeiro trabalho, Wang e colaboradores^[12] usaram partículas de níquel (5 µm de diâmetro) para desenvolver um sensor adaptativo magneticamente modulável para determinação dessas três classes de compostos. Com protocolo operacional similar ao sistema previamente apresentado por Hirsch e colaboradores^[4] (Figura 1), o posicionamento e remoção das partículas magnéticas de níquel foi feito usando um ímã externo permitindo que os estados ativo (“ON”) e passivo do detector (“OFF”) também fossem alternados de acordo com a demanda analítica.

Em trabalho similar, o mesmo grupo apresentou o uso de nanofios de níquel, ao invés de micropartículas de níquel, também para o controle magnético reversível da atividade eletrocatalítica de sensores adaptativos.^[3] A Figura 3A apresenta um diagrama esquemático da operação desse sensor magneticamente modulável construído usando os nanofios de níquel. Como pode ser observado, diferentemente da alternância entre estados “ON” e “OFF” com posicionamento e remoção de partículas, a atividade eletrocatalítica do sensor foi desta vez modulada através da orientação dos nanofios de níquel em diferentes ângulos, sem que fossem removidos da superfície do contato. Os desenhos mostram o ímã externo orientando

os nanofios em posições horizontal (H) e vertical (V) na base da célula eletroquímica. Na parte de baixo da mesma Figura 3A estão apresentadas imagens ópticas obtidas durante a modulação dos nanofios em ângulos de 0, 45 e 90 graus. Os nanofios de níquel foram sintetizados através de deposição eletroquímica em moldes de alumina com 200 nm de diâmetro e 6 μm de comprimento.

A Figura 3B mostra o efeito da modulação magnética dos nanofios de níquel sobre a resposta eletrocatalítica do sensor frente à oxidação de metanol. Como observado, as respostas eletroquímicas, obtidas em experimentos de amperometria e voltametria cíclica, foram diferentes quando o sensor operava (a) na ausência de nanofios de níquel e na presença de nanofios orientados nas posições (b) vertical e (c) horizontal. Esse comportamento reflete as mudanças no acesso do analito aos sítios ativos dos nanofios. Enquanto que os sítios catalíticos dos nanofios de níquel estão completamente disponíveis na posição vertical (b), a mudança de orientação para a horizontal (c) faz com que esses sítios sejam parcialmente bloqueados pelo contato entre si e com a superfície do eletrodo de carbono “*screen-printed*” da base da célula eletroquímica. Como indicado na Figura 3B através de experimentos de amperometria, as orientações vertical e horizontal podem ser alternadas inúmeras vezes com sinais bastante repetitivos entre conversões.

Figura 3: (A) Diagrama esquemático da operação do sensor adaptativo com atividade eletrocatalítica magneticamente modulada através da orientação dos nanofios de níquel em diferentes ângulos. **(B)** Efeito da modulação magnética dos nanofios de níquel sobre a resposta eletrocatalítica do sensor frente à oxidação de metanol, em experimentos de amperometria e voltametria cíclica, com nanofios de níquel (a) fora da superfície, (b) orientados verticalmente e (c) orientados horizontalmente.^[3]

Nanofios híbridos segmentados por ouro e níquel também foram usados, no grupo do Prof. Wang, para o desenvolvimento de biosensores eletroquímicos magneticamente moduláveis.^[13] Preparados por eletrodeposição em membranas de alumina, os nanofios foram funcionalizados, somente sobre o segmento de ouro, com a enzima glicose oxidase (GOx) e usados para oxidação bioeletrocatalítica de glicose, em conexão com um mediador de elétrons, o ferroceno (Fc). A Figura 4 apresenta um diagrama esquemático do funcionamento desse biosensor adaptativo magneticamente modulável. O posicionamento dos nanofios híbridos funcionalizados na orientação horizontal assegura um contato efetivo entre a enzima GOx e o mediador de elétrons Fc, evidenciado pelo substancial aumento na

corrente anódica referente à oxidação da glicose registrado pelo voltamograma cíclico (Figura 4, “H”). A mudança de orientação dos nanofios híbridos de horizontal para vertical impede a “comunicação” efetiva entre a enzima GOx e o mediador de elétrons Fc, causando a perda quase que completa do sinal de oxidação da glicose (Figura 4, “V”). A remoção completa dos nanofios da superfície de ouro causa o bloqueio completo da ativação da GOx mediada pelo Fc e nenhuma corrente anódica no voltamograma cíclico (Figura 4, “OFF”) foi observado. Novamente, em contraste ao sistema proposto por Hirsh e colaboradores^[4] (Figura 1), em que os estados ativo e passivo são obtidos pelo posicionamento e remoção de partículas, usando nanofios essa alternância de estados é feita pela orientação horizontal e vertical dos mesmos, sem que sejam removidos da superfície de contato.

Figura 4: Diagrama esquemático do funcionamento do biosensor adaptativo magneticamente modulável para a oxidação bioeletrocatalítica de glicose.^[4] Os nanofios de GOx-Au-Ni foram orientados de maneira horizontal (“H”) e vertical (“H”) sobre a superfície em Au funcionalizada com ferroceno (Fc) usando o campo magnético de um ímã externo. A remoção completa dos nanofios da superfície de ouro causa o bloqueio completo da ativação da GOx mediada pelo Fc. À esquerda estão apresentados os voltamogramas cíclicos correspondentes a cada estado do biosensor.

Outros dois trabalhos envolvendo a construção de sensores adaptativos magneticamente moduláveis foram desenvolvidos recentemente pelo mesmo grupo.^[14,15] Em um desses trabalhos, nanofios híbridos Ni-Au-Ni foram funcionalizados com duas enzimas, álcool desidrogenase (ADH) e álcool oxidase (AOX), e usados na construção de um biosensor adaptativo, com operação similar ao apresentado na Figura 4, para determinação simultânea de etanol e metanol.^[14] O segundo trabalho envolveu a construção de um sensor eletroquímico adaptativo

em que a superfície pode ser protegida contra adsorção de espécies indesejáveis através da modulação magnética de nanofios híbridos Ni-Au funcionalizados com material hidrofóbico.^[15]

1.2 Microfluídica e magnetismo

Desde a introdução do conceito de “microsistemas de análises totais” (μ TAS) ou “*lab-on-a-chip*” (LOC), em 1990, várias tecnologias tem sido avaliadas para o desenvolvimento e aplicação de microdispositivos, buscando principalmente a construção da ponte que envolve o mundo molecular que governa os processos vitais e o mundo digital da computação e comunicação.^[16,17]

Paralelamente, e com maior incidência nos últimos anos, a manipulação magnética de partículas no interior de microcanais tem recebido bastante interesse por parte de um grande número de pesquisadores.^[18,19] Os ensaios bioquímicos baseados em reações de superfície, usando microesferas magnéticas funcionalizadas, foram o ponto de partida para o uso de forças magnéticas em combinação com microdispositivos.^[19]

Em microfluídica, ensaios bioquímicos, por exemplo enzimáticos, baseados em reações de superfície, são mais freqüentemente usados para derivação de analitos. Ou seja, uma espécie não detectável é convertida em uma espécie detectável após sofrer uma reação específica com um material ativo imobilizado.^[20] Inicialmente, os bioensaios baseados em reações de superfície eram realizados usando principalmente a imobilização de moléculas bioespecíficas, como enzimas e anticorpos, diretamente nas superfícies das paredes dos microcanais dos dispositivos.^[21,22] Entretanto, embora a imobilização do material ativo nas paredes

de microcanais ofereça uma razão entre superfície reativa e volume do canal razoavelmente adequada para a interação efetiva entre o analito e o material imobilizado, o uso de microesferas (“beads”) ou micropartículas funcionalizadas pode gerar resultados ainda melhores. A área superficial disponível para imobilização do material por unidade de volume é significativamente aumentada quando são utilizadas as microesferas. Em consequência, além da capacidade de imobilizar um número maior de moléculas em um menor volume, as propriedades de transporte de fluidos no microdispositivo atuarão em benefício de uma melhor interação entre o analito e o material ativo imobilizado. Ambos os fatores contribuem para uma melhora nos limites de detecção da espécie analisada.^[23]

O uso de micropartículas ou microesferas magnéticas possuem ainda uma vantagem adicional: podem ser manipuladas externamente através da aplicação de um campo magnético de maneira paralela às operações convencionais do microdispositivo.^[19] Esse grau de liberdade extra usado inicialmente em bioreatores com enzimas ou anticorpos imobilizados em partículas com propriedades magnéticas,^[24,25] oferece possibilidades únicas de controle externo das operações de microdispositivos de forma que, atualmente, vários materiais magnéticos estão sendo usados em combinação com a microfluídica em uma ampla variedade de aplicações.^[18] Forças magnéticas estão sendo combinadas com a microfluídica no desenvolvimento de válvulas de bombeamento magneto-hidrodinâmicas^[26] e atuadas pelo movimento de ferrofluidos,^[27] misturadores com barras magnéticas micrométricas^[28] e partículas magnéticas,^[29] separadores de partículas através da magnetoforese,^[30] aprisionadores e classificadores de células,^[31-33] separadores de DNA^[34], fases estacionárias para eletrocromatografia^[35] e sensores capazes de detectar seletivamente partículas magnéticas.^[36,37] Dois trabalhos de revisão,

publicados recentemente pelos especialistas nos conceitos de magnetismo e microfluídica, Pamme^[18] e Gijs,^[19] resumem os trabalhos mais relevantes relacionados a essa ramificação do campo de pesquisa relacionado à microfluídica.

Em contraste ao controle de fluidos através de campo elétrico, como em separações eletroforéticas, bombeamento eletrosmótico e dieletroforese, a manipulação de partículas magnéticas, geralmente, não é afetada pela carga da superfície de microcanais, temperatura, pH e concentração iônica da eletrólito de separação. Além disso, o material com propriedades magnéticas contido no interior dos microcanais do dispositivo pode ser manipulado de forma externa, sem que o ímã esteja em contato com a solução fluídica.^[18]

A Figura 5 apresenta alguns exemplos de microdispositivos com componentes controlados externamente através de forças magnéticas. Uma microbomba circular atuada pelo movimento de um *plug* de ferrofluido no interior de um microcanal é apresentada na Figura 5A.^[27] Como pode ser observado, dois ímãs externos (M) foram usados na operação da microbomba. Enquanto que um ímã estático foi usado para segurar um plug de ferrofluido entre os fluxos de entrada e saída de solução, o outro ímã, com movimento circular apresentado nas etapas (a), (b), (c) e (d), atuou no movimento de um segundo plug de ferrofluido responsável por impulsionar o fluxo de solução através do microcanal. A Figura 5B apresenta um misturador constituído por uma barra magnética micrométrica atuada por um agitador magnético convencional externo.^[28] Como pode ser observado, a barra magnética de 400 μm foi posicionada na intersecção de dois microcanais dispostos em V (a). A eficiência da agitação foi avaliada através da dispersão de um corante impulsionado em apenas um dos microcanais (b). Outro exemplo do uso de agitação magnética em microcanais está apresentado na Figura 5C. Nesse caso a

agitação foi feita por micropartículas magnéticas de 2 μm de diâmetro controladas externamente por dois eletroímãs (a) microfabricados no próprio dispositivo. O movimento circular frenético das micropartículas (b,c) é obtido pela aplicação de um campo magnético alternado entre os dois eletroímãs.^[29] A Figura 5D mostra um microdispositivo usado em eletrocromatografia, com fase estacionária constituída por micropartículas magnéticas funcionalizadas com octadecilsilano e imobilizadas usando dois ímãs externos.^[35] A Figura 5E apresenta um exemplo de reator enzimático constituído por partículas magnéticas funcionalizadas e imobilizadas em microcanais usando um ímã externo. Nesse caso, a funcionalização com tripsina permitiu que o dispositivo fosse usado para digestão de proteínas.^[24] A Figura 5F apresenta separadores de partículas magnéticas em forma de H. As partículas magnéticas podem ser isoladas de uma suspensão qualquer usando (a) um dispositivo com dois microcanais separados por uma “ponte” ou (b) um dispositivo com apenas um microcanal e duas saídas operando em fluxo contínuo.^[38]

Figura 5: Microdispositivos com operações controladas externamente por forças magnéticas. (A) Bombeamento de solução através do movimento de ferrofluido,^[27] (B) agitação com barra magnética micrométrica,^[28] (C) agitação com micropartículas magnéticas,^[29] (D) eletrocromatografia com fase estacionária constituída por partículas magnéticas funcionalizadas,^[35] (E) reator enzimático com tripsina funcionalizada em partículas magnéticas.^[24] e (F) separação de partículas magnéticas.^[38]

2. RESUMO DO TRABALHO

Esse trabalho apresenta o uso das propriedades magnéticas e eletrocatalíticas de nanofios de níquel no desenvolvimento de um detector adaptativo magneticamente modulável para microdispositivos. Os nanofios de níquel, similares aos utilizados em trabalho previamente desenvolvido por Wang e colaboradores,^[3] foram sintetizados através do método de eletrodeposição em moldes de alumina. A Figura 6 apresenta um desenho esquemático da operação do sensor adaptativo magneticamente modulável desenvolvido para detecção de aminoácidos e carboidratos separados por eletroforese em microdispositivos. Um ímã externo foi usado para o controle magnético do posicionamento e orientação dos nanofios de níquel sobre uma camada de ouro depositada por *sputtering* na saída do microcanal de separação. Esse controle magnético permitiu a modulação e alternância reversível do detector em três diferentes configurações: (Figura 6A) estado passivo (“OFF”) sem a presença dos nanofios de níquel sobre a camada de ouro na saída do microcanal de separação, (Figura 6B) estado ativo (“ON”) com a presença dos nanofios de níquel alinhados longitudinalmente em relação ao microcanal de separação, e (Figura 6C) estado ativo (“ON”) com nanofios de níquel orientados transversalmente em relação ao microcanal de separação. O filme obtido usando uma câmera CCD, contido na informação suplementar (*Supporting Information, SI*) do trabalho publicado,^[39] apresenta como foi feito o posicionamento, orientação e remoção dos nanofios no final do microcanal de separação usando o ímã externo. Experimentos de separações eletroforéticas efetuados nos microdispositivos mostraram que a resolução dos picos de analitos detectados

usando o novo sensor adaptativo é bastante influenciada pelo alinhamento longitudinal ou transversal dos nanofios em relação ao microcanal de separação.

Figura 6: Diagrama esquemático do detector eletroquímico adaptativo magneticamente modulável acoplado à eletroforese em microdispositivos. Um ímã externo foi usado para o controle magnético do posicionamento e orientação dos nanofios de níquel sobre uma camada de ouro depositada por *sputtering* na saída do microcanal de separação. Também apresentados acima estão os eletroferogramas obtidos para separação de uma mistura de aminoácidos usando o detector adaptativo (A) no estado passivo (“OFF”), (B) no estado ativo (“ON”) com a presença dos nanofios de níquel alinhados longitudinalmente e (C) no estado ativo (“ON”) com nanofios de níquel orientados transversalmente ao microcanal de separação.

A ativação do detector apenas quando na necessidade de detecção das espécies oferece vantagens quando comparado ao uso de detectores modificados permanentemente, como por exemplo, a eletrodeposição de níquel na saída do microcanal de separação.^[40]

O presente uso dos nanofios de níquel na detecção amperométrica de aminoácidos e carboidratos, separados por eletroforese em microdispositivos, baseia-se em suas propriedades eletrocatalíticas sobre a oxidação dessas espécies, bem como de álcoois alifáticos, já bastante explorada na literatura.^[41] Adicionalmente, as propriedades magnéticas do níquel o qualificam como material ideal para o desenvolvimento do detector adaptativo magneticamente modulável.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas usando água purificada por um sistema Milli-Q[®] da Millipore, com resistividade de 18,2 MΩ.cm e carbono orgânico total, eliminado por fotoxidação com luz UV a 254 e 185 nm, abaixo de 10 ppb. Os reagentes, apresentados em ordem alfabética na Tabela 1, foram usados como recebidos do respectivo fabricante, sem prévio tratamento ou purificação.

Tabela 1: Relação dos reagentes usados no desenvolvimento desse trabalho.

Reagente	Fórmula	MM g/mol	Fabricante	Pureza
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	61,83	Sigma-Aldrich	≥99.5%
Cloreto de Níquel	NiCl ₂ .6H ₂ O	237,69	Fluka	≥98.0%
DL - Arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ . HCl	174,21	Sigma	≥98%
DL - Histidina	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155,15	Sigma	≥99%
Glicina	NH ₂ CH ₂ COOH	75,07	Sigma-Aldrich	≥98.5%
Sulfamato de níquel	Ni(SO ₃ NH ₂) ₂ .4H ₂ O	322,93	Sigma	98%
Hidróxido de Sódio	NaOH	40,00	Sigma-Aldrich	≥98%

Os eletrólitos utilizados nas separações de carboidratos e aminoácidos, basicamente soluções aquosas de NaOH de concentrações 50 e 10 mM, foram preparados através de diluições de uma solução estoque de concentração 0,50 M. As soluções estoque foram preparadas semanalmente através da dissolução de massas acuradamente pesadas do sal em volume adequado de água.

As soluções estoque dos padrões de aminoácidos e carboidratos foram preparadas semanalmente em concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, dissolvendo-se massas exatamente pesadas de cada composto em 1,5 mL de água, e estocadas diariamente em geladeira. As soluções de referência usadas nos estudos de separações eletroforéticas, contendo glicose na concentração de 1 mM e misturas dos compostos arginina, histidina e glicina em concentrações de 500 μM , foram preparadas diariamente por diluições das soluções estoque no eletrólito de separação.

3.2 Equipamentos

O desenho esquemático e fotografias do sistema em acrílico usado como suporte para o acoplamento entre o microdispositivo e a detecção amperométrica foram apresentados anteriormente nos Capítulos II e III. Os microdispositivos, adquiridos comercialmente da Mycralyne Inc. (modelo MC-BF4-001, Edmonton, Canada), consistiram em plataformas de vidro de $68 \times 17 \text{ mm}$ com microcanais de injeção e separação dispostos em cruz. Os comprimentos dos microcanais de injeção (entre os reservatórios da amostra e de descarte da amostra) e de separação (entre os reservatórios do tampão e de detecção) foram de 10 e 65 mm,

respectivamente. O reservatório de detecção foi retirado, através de um corte transversal ao microcanal de separação, para facilitar a detecção amperométrica na saída do canal de separação. A intersecção entre o microcanal de injeção e separação foi localizada a 5 mm de distância do reservatório do tampão, resultando em um microcanal de separação com comprimento efetivo de 60 mm. As profundidades e larguras dos microcanais foram de 20 e 50 μm , respectivamente. Pequenas pontas de pipetas, cortadas com uma altura de 0,5 cm, foram acopladas aos orifícios dos reservatórios para facilitar o preenchimento com tampão e amostra, em volumes de 15 μL . Uma fonte de alta tensão com potencial ajustável no intervalo entre 0 e +4000 V foi usada nos experimentos de eletroforese em microdispositivos. O contato elétrico entre a fonte de alta tensão e as soluções foi feito com fios de platina inseridos em cada reservatório.

3.3 Construção do contato elétrico

O contato elétrico e suporte para os nanofios de níquel no detector eletroquímico magneticamente modulável consistiu em uma camada de ouro depositada por *sputtering* no final do microcanal de separação. Esse contato foi feito usando procedimento similar ao descrito previamente por Wang e colaboradores,^[42] no acoplamento entre eletroforese em microdispositivos e detecção amperométrica usando como eletrodo de trabalho apenas uma fina camada de ouro depositada por *sputtering* na saída do microcanal de separação. A Figura 7 apresenta o desenho esquemático desse sistema, constituído pelo microdispositivo em vidro, por um suporte em acrílico para os reservatórios e, em destaque, pelo eletrodo de trabalho em ouro. Procedimento similar para eletroforese capilar convencional foi executado

por Voegel e colaboradores,^[43] com a camada de ouro depositada na ponta do capilar de sílica fundida.

Figura 7: Detecção amperométrica em microdispositivos usando como eletrodo de trabalho uma camada de ouro fina depositada por *sputtering* na saída do microcanal de separação.^[39] (A) microdispositivo de vidro, (B) microcanal de separação, (C) microcanal de injeção, (D) ponta de pipeta acoplada ao reservatório do tampão, (E) ponta de pipeta acoplada ao reservatório da amostra, (F) ponta de pipeta acoplada ao reservatório de descarte da amostra, (G) sistema em acrílico contendo reservatórios, (H) reservatório do tampão, (I) reservatório da amostra, (J) reservatório de descarte da amostra, (K) suporte em acrílico para detecção, (L) reservatório de detecção, (M) eletrodo de ouro depositado por *sputtering*, (N) contato elétrico do eletrodo, (O) camada isolante para delimitar área do eletrodo, (P) contra eletrodo de Pt, (Q) fio de Ag recoberto com AgCl como eletrodo de referência e (R) fios de platina para contato elétrico com a fonte de alta tensão.

Para a deposição da camada de ouro por *sputtering*, a área da superfície em vidro que cerca o microcanal de separação foi primeiramente submetida a um processo de limpeza através de imersão em solução “piranha” (4:1 de H₂SO₄ concentrado / 30 % H₂O₂) durante 5 min. Em seguida, essa área foi lavada vigorosamente com água deionizada e deixada ao ar para secar. A deposição de

ouro através de sputtering foi conduzida durante 360 s usando um equipamento Denton Vacuun Desk-III (Denton Vacuun Inc., Moorestown, NJ), com uma pressão de argônio de 50 mTorr e corrente de 400 mA. Esses parâmetros estabelecidos na deposição resultaram em um filme de ouro com aproximadamente 200 nm de espessura. A área do depósito de ouro no final do canal de separação, usualmente 1×5 mm, foi definida pela proteção da área não depositada com fita adesiva. O contato elétrico foi feito com um fio de cobre fixo na extremidade da camada de ouro usando cola epóxi condutora (SPI Supplies, West Chester, PA). Finalmente, uma tinta isoladora azul (Ercon ink R-488C1) foi usada para proteger o contato elétrico e cobrir parte da camada de ouro depositada, deixando uma camada de ouro exposta de aproximadamente 1×1 mm em volta do final do microcanal de separação. A Figura 8 apresenta fotografias retiradas usando uma câmera convencional (A) da área do depósito de ouro definida no final do microcanal de separação e (B) do eletrodo finalizado com o contato elétrico e isolante delimitando a área da camada de ouro.

Figura 8: Fotografias obtidas do final do microcanal de separação do microdispositivo durante a construção do contato elétrico do sensor eletroquímico magneticamente modulável. (A) Camada de ouro depositada por *sputtering* no final do microcanal de separação e (B) contato elétrico com o isolante azul delimitando a área da camada de ouro somente em torno da saída do microcanal de separação.

3.4 Síntese dos nanofios de níquel

Os nanofios de níquel foram preparados através do método de eletrodeposição em moldes de alumina com 200 nm de porosidade e 60 μm de espessura (Anodisc, Whatman, Inc.).^[2] A Figura 9 apresenta o diagrama esquemático das etapas envolvidas nesse procedimento. Uma fina camada de ouro foi depositada por *sputtering* em um dos lados da membrana (Figura 9A) para servir como contato elétrico na célula eletroquímica. Em seguida, em uma célula eletrolítica desenvolvida especialmente para essa finalidade, o níquel metálico foi eletrodepositado entre os poros da alumina (Figura 9B) através da aplicação de um potencial de -1,0 V (vs Ag/AgCl), usando uma solução eletrolítica contendo 20 g L⁻¹ de NiCl₂·6H₂O, 515 g L⁻¹ de Ni(H₂NSO₃)₂·4H₂O e 20 g L⁻¹ de H₃BO₃ (pH 3.4). A eletrodeposição foi conduzida até a obtenção de uma carga de 50 C. Esses parâmetros estabelecidos na eletrodeposição resultaram em nanofios de níquel com 15 μm de comprimento.

Após a eletrodeposição do níquel, o filme de ouro depositado por *sputtering* sobre a membrana foi removido através de polimento com partículas de alumina (3 μm), usando uma politriz South Bay modelo 900 (South Bay Technology Inc., San Clemente, CA). Finalmente, a membrana foi dissolvida usando uma solução de NaOH 3 M sob agitação durante 10 minutos, liberando os nanofios de níquel (Figura 9B). Os nanofios foram então lavados repetidamente com água destilada e armazenados no eletrólito de corrida usado nos experimentos de eletroforese, solução de NaOH de concentração 35 mM.

Figura 9: Diagrama esquemático das etapas envolvidas na síntese dos nanofios de níquel usando eletrodeposição em moldes de alumina.

A ativação dos nanofios de níquel foi realizada diariamente através de voltametrias cíclicas, com 50 varreduras entre os potenciais de -1,0 a +1,0 V e usando como eletrólito suporte solução de NaOH de concentração 1 M. Nesse processo de ativação, os nanofios foram posicionados verticalmente sobre eletrodos *screen-printed* ($0,8 \times 1,2$ cm) contruídos em células eletroquímicas fabricadas justamente para essa finalidade.^[3]

3.5 Eletroforese em microdispositivos

Antes dos experimentos de eletroforese, os microcanais dos dispositivos foram lavados com água deionizada, solução de hidróxido de sódio e novamente com água deionizada, durante 10, 20 e 5 minutos, respectivamente. Cada reservatório do suporte em acrílico do microdispositivo, bem como as pontas de pipeta acopladas nos orifícios do microdispositivo, foram preenchidos com suas respectivas soluções de tampão ou de amostra. Os eletrólitos de corrida usados

para os experimentos envolvendo carboidratos e aminoácidos foram soluções de NaOH com concentrações de 35 e 10 mM, respectivamente.

As injeções eletrocinéticas foram realizadas através da aplicação de potenciais (+1000 e +700 V para experimentos com carboidratos e aminoácidos, respectivamente) durante intervalos tempo (10 e 5 s para experimentos com carboidratos e aminoácidos, respectivamente) no reservatório da amostra, mantendo o reservatório de detecção aterrado e os demais reservatórios livres. As separações dos analitos nos microdispositivos foram feitas pela aplicação dos mesmos potenciais no reservatório do tampão de corrida, com o reservatório de detecção aterrado e os demais reservatórios livres.

3.6 Detecção eletroquímica

A detecção amperométrica foi conduzida usando um potenciostato modelo 621A da CH Instruments (CH Instruments Inc., Austin, TX) operando no modo “*amperometric i-t curve*”. As injeções dos analitos no microdispositivo foram feitas somente após a completa estabilização da linha de base. Os eletroferogramas foram registrados com uma resolução temporal de 0,1 s. Em todos os experimentos, o potencial de detecção aplicado foi de +0,55 V (vs fio Ag/AgCl).

3.7 Posicionamento e orientação dos nanofios de níquel

O modulação dos nanofios de níquel na saída do microcanal de separação foi realizada usando um ímã (NdFeB recoberto com Ni) com formato cúbico ($3/8 \times 3/8 \times 3/8$ pol, 12,4 kG) posicionado sobre a superfície do microdispositivo e atrás do

microcanal de separação (Figura 6). O movimento rotacional do ímã em 90° corresponde a mudança de orientação dos nanofios de níquel em 90° (Figura 6, B vs C). A interconversão entre os estados passivo (“OFF”) e ativo (“ON”) do detector foi executada pela mudança no posicionamento do ímã sobre o microdispositivo (Figura 6, A vs B). O posicionamento do ímã exatamente sobre o microcanal de separação (Figura 6, B e C) faz com que os nanofios de níquel permaneçam na saída do microcanal de separação e sobre a camada de ouro e opere no estado ativo (“ON”). Reciprocamente, o posicionamento do ímã para o lado do reservatório de detecção (Figura 6A) faz com que o detector opere no estado passivo (“OFF”) pois os nanofios de níquel estão localizados em uma região vizinha à camada de ouro depositada sobre o final do microcanal de separação.

A Figura 10 apresenta fotografias retiradas usando uma câmera convencional digital do reservatório de detecção durante a modulação dos nanofios de níquel no final do microcanal de separação nas orientações (A) vertical e (B) horizontal. Como observado, uma lâmina de vidro foi usada para “cobrir” o final do microdispositivo e todo o reservatório de detecção para facilitar o controle magnético dos nanofios.

Figura 10: Fotografias retiradas usando uma câmera convencional digital do reservatório de detecção durante a modulação dos nanofios de níquel no final do microcanal de separação nas orientações (A) vertical e (B) horizontal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atração e remoção dos nanofios de níquel sobre a camada de ouro depositada no final do microcanal de separação permitiu que o detector adaptativo do microdispositivo fosse ativado periodicamente para efetuar uma medida, e reajustado ao estado passivo (“OFF”) entre duas ou mais determinações. A Figura 11 mostra o efeito desse controle magnético reversível sobre a resposta do detector durante a operação do microdispositivo. Como observado, foram registrados eletroferogramas para dez injeções consecutivas de glicose, alternando os estados ativo (“ON”) e passivo (“OFF”) a cada duas injeções.

Figura 11: Eletroferogramas para injeções consecutivas de glicose usando o detector adaptativo nos estados ativo (“ON”) e passivo (“OFF”) durante múltiplos ciclos de atração e remoção dos nanofios de níquel sobre superfície da camada de ouro depositada no final do microcanal de separação. Condições: eletrólito de separação, solução de NaOH de concentração 35 mM; potenciais de injeção e separação, +1000V; tempo injeção, 10 s; potencial de detecção, +0,55 V (vs Ag/AgCl); concentração de glicose, 1mM.

Como observado, picos bem definidos de oxidação da glicose foram obtidos na presença dos nanofios de níquel na saída do microcanal de separação (“ON”). Em contraste, nenhum sinal foi observado quando os nanofios foram removidos, (“OFF”). Esses processos podem ser repetidos inúmeras vezes através de vários ciclos de atração e remoção dos nanofios na saída do microcanal, com picos bastante repetitivos e sem efeito de memória (*“carry-over”*) entre as alternâncias dos estados “ON” e “OFF”. O desvio padrão relativo (RSD), determinado para altura de pico em injeções consecutivas de glicose, para cinco ciclos “ON/OFF” (Figura 11) foi de 4.7%, o que reflete a boa repetibilidade no posicionamento e remoção dos nanofios de níquel na saída do microcanal de separação. Obviamente, a repetibilidade no posicionamento e remoção dos nanofios na saída do microcanal exige um certo treinamento do operador do sistema que o faz através do controle magnético usando como mencionado anteriormente um ímã externo. A Figura 12 mostra como essa habilidade no posicionamento exato dos nanofios na saída do microcanal de separação é fundamental para a boa repetibilidade dos sinais obtidos entre os múltiplos ciclos “ON/OFF”. Como observado, as duas primeiras injeções usando o detector no estado ativo (“ON”) resultaram em picos bem definidos para a oxidação da glicose. Entretanto, após as duas injeções no estado passivo (“OFF”) sem a detecção do analito, o reposicionamento dos nanofios, ponto indicado pela seta vermelha, não foi eficiente. Como consequência, a linha de base não voltou ao mesmo patamar da primeira análise no estado ativo (“ON”) e, dessa maneira, a detecção não ofereceu a mesma sensibilidade para a oxidação eletrocatalítica da glicose.

Figura 12: Efeito do reposicionamento não efetivo, indicado pela seta vermelha, dos nanofios de níquel na saída do microcanal de separação durante a volta ao estado ativo (“ON”) do detector. A linha de base retornou apenas parcialmente ao nível da primeira análise no estado ativo (“ON”) e a detecção dos picos de oxidação da glicose ficou comprometida. Condições: eletrólito de separação, solução de NaOH de concentração 35 mM; potenciais de injeção e separação, +1000V; tempo injeção, 10 s; potencial de detecção, +0,55 V (vs Ag/AgCl); concentração de glicose, 1 mM.

Durante os estudos de controle magnético reversível na alternância entre os estados ativo (“ON”) e passivo (“OFF”), observou-se que a resposta da detecção, em termos de definição e alargamento de picos, era influenciada significativamente pela orientação dos nanofios de níquel com relação ao microcanal de separação. A Figura 13 apresenta eletroferogramas obtidos para injeções consecutivas de glicose em que foram constatadas diferenças nas larguras dos picos detectados nos diferentes ciclos “ON/OFF”. Como pode ser observado, as larguras dos picos tiveram aumentos consideráveis do primeiro para o segundo ciclo (Figura 13, a-b e

c-d), e do segundo para o terceiro ciclo “ON/OFF” (Figura 13, c-d e e-f), para as injeções duplas de glicose realizadas a cada estado ativo (“ON”) do detector.

Figura 13: Eletroferogramas obtidos para injeções consecutivas de glicose mostrando as diferenças nas larguras dos picos obtidos durante múltiplos ciclos “ON/OFF”. As larguras dos picos de oxidação da glicose apresentaram o comportamento crescente $a, b < c, d < e, f$ para as injeções duplas realizadas a cada estado ativo (“ON”) do detector. Condições: eletrólito de separação, solução de NaOH de concentração 35 mM; potenciais de injeção e separação, +1000V; tempo injeção, 10 s; potencial de detecção, +0,55 V (vs Ag/AgCl); concentração de glicose, 1 mM.

Em experimentos posteriores, somente a influência da orientação dos nanofios com relação ao microcanal de separação foi avaliada sobre a resposta da detecção. A Figura 14 apresenta eletroferogramas obtidos para injeções consecutivas de glicose usando o detector adaptativo com os nanofios de níquel orientados (A) transversal e (B) longitudinalmente com relação ao microcanal de separação. Como observado, a resposta de detecção muda consideravelmente com

diferentes orientações dos nanofios no final do microcanal de separação. Picos estreitos e bem definidos foram obtidos somente quando os nanofios foram orientados longitudinalmente ao microcanal de separação. As orientações transversal e longitudinal dos nanofios de níquel no final do microcanal de separação (detector no estado ativo, “ON”) também foram controladas reversível e externamente de acordo com o movimento rotacional de um ímã, como apresentado no vídeo contido na informação suplementar do trabalho publicado.^[39]

Figura 14: Influência da orientação dos nanofios de níquel na saída do microcanal de separação sobre a resposta da detecção em eletroferogramas obtidos para injeções consecutivas de glicose. Nanofios de níquel orientados (A) transversal e (B) longitudinalmente ao microcanal de separação. Condições: eletrólito de separação, solução de NaOH de concentração 35 mM; potenciais de injeção e separação, +1000V; tempo injeção, 10 s; potencial de detecção, +0,55 V (vs Ag/AgCl); concentração de glicose, 1 mM.

O efeito da orientação dos nanofios de níquel sobre a resposta de detecção também foi avaliado para uma mistura de aminoácidos. A Figura 15 demonstra a influência da orientação dos nanofios sobre a resposta da detecção de uma mistura

de aminoácidos contendo 500 μM de (a) arginina, (b) histidina e (c) glicina, separados por eletroforese no microdispositivo. Os experimentos foram conduzidos usando as mesmas condições de análise, porém com os nanofios orientados de maneira (A) longitudinal, (B) 45° e (C) transversal com relação ao microcanal de separação.

Figura 15: Influência da orientação dos nanofios de níquel na saída do microcanal de separação sobre a resposta da detecção de uma mistura de aminoácidos. Eletroferogramas obtidos para uma mistura contendo 500 μM de (a) arginina, (b) histidina e (c) glicina, com os nanofios orientados de maneira (A) longitudinal, (B) 45° e (C) transversal com relação ao microcanal de separação. Condições: eletrólito de separação, solução de NaOH de concentração 35 mM; potenciais de injeção e separação, +700V; tempo de injeção, 5 s; potencial de detecção, +0,55 V (vs Ag/AgCl). Também apresentadas acima estão fotografias, obtidas usando uma câmera CCD, dos nanofios de níquel posicionados nas três diferentes orientações na saída do microcanal de separação.

Como pode ser observado, foram obtidos picos bem resolvidos e definidos quando a detecção dos aminoácidos foi efetuada usando os nanofios de níquel orientados longitudinalmente (Figura 15A). Em contraste, picos largos e mal resolvidos foram observados quando os nanofios de níquel estavam orientados

transversalmente (Figura 15C), e um comportamento intermediário foi observado com os nanofios de níquel posicionados em uma orientação de 45° (Figura 15B), em relação ao microcanal de separação.

A influência da orientação dos nanofios de níquel na saída do microcanal de separação sobre a resposta da detecção pode ser atribuída às diferentes difusões experimentadas pelos analitos nas diferentes geometrias do detector. Enquanto os analitos que deixam o microcanal de separação são rapidamente difundidos através dos nanofios orientados longitudinalmente, os mesmos enfrentam barreiras difusionais adicionais quando passam através dos nanofios orientados de maneira transversal. A dispersão em múltiplas direções causada pelo aumento na área do detector exposta ao analito faz com que ocorra um deterioramento considerável na resposta, refletido pelo alargamento de picos.

No estado ativo, o detector apresentou bom desempenho analítico com respostas bastante repetitivas. A Figura 16 apresenta eletroferogramas obtidos em cinco injeções consecutivas da mesma mistura de aminoácidos contendo 500 µM de (a) arginina, (b) histidina e (c) glicina, usando os nanofios de níquel orientados longitudinalmente ao microcanal de separação. Nesse experimento, desvios padrões relativos (RSD) de 1,91, 2,4 e 1,78% foram obtidos para as correntes de pico dos analitos histidina, arginina e glicina, respectivamente.

Figura 16: Eletroferogramas obtidos para cinco injeções consecutivas de uma mistura contendo 500 μM de (a) arginina, (b) histidina e (c) glicina, com os nanofios de níquel na posição “ON” e orientados longitudinalmente ao microcanal de separação. Condições: eletrólito de separação, solução de NaOH de concentração 35 mM; potenciais de injeção e separação, +700V; tempo de injeção, 5 s; potencial de detecção, +0,55 V (vs Ag/AgCl).

Nos experimentos de avaliação de repetibilidade nas resposta de detecção para injeções consecutivas de aminoácidos, constatou-se que após a quinta ou sexta injeção a resolução dos picos e estabilidade da linha de base ficavam comprometidas. Esse comportamento pode ser observado nas Figuras 17 e 18, que apresentam eletroferogramas obtidos em dez injeções consecutivas da mesma mistura de aminoácidos contendo 500 μM de (a) arginina, (b) histidina e (c) glicina, com potenciais de injeção e separação de 700 e 800 V, respectivamente.

Figura 17: Eletroferogramas obtidos para dez injeções consecutivas de uma mistura contendo 500 μM de (a) arginina, (b) histidina e (c) glicina. Condições com na Fig. 15.

Figura 18: Eletroferogramas obtidos para dez injeções consecutivas de uma mistura contendo 500 μM de (a) arginina, (b) histidina e (c) glicina. Potenciais de injeção e separação, +800V. Outras condições como na Fig. 16.

Acredita-se que esse comportamento ocorra não por problemas na detecção e sim como consequência da injeção eletrocinética usada para introdução da amostra no microdispositivo. Uma vez que os microcanais e reservatórios do microdispositivo fossem lavados com a solução do eletrólito de corrida, as respostas obtidas em injeção consecutivas dos mesmos analitos voltavam ao normal até, novamente, a sexta injeção.

A resposta quantitativa do detector foi avaliada através da construção de curvas de calibração com a corrente de pico e a concentração analítica da espécie detectada. A Figura 19 apresenta eletroferogramas obtidos para concentrações crescentes de arginina, em incrementos de 100 μM , com a curva de calibração construída no intervalo de concentrações entre 100 e 500 μM . Como pode ser observado, foram obtidos picos bem definidos e proporcionais à concentração do aminoácido, com coeficiente de correlação linear de 0,9989 e sensibilidade de 142,7 nA / mM.

Figura 19: Eletroferogramas obtidos para concentrações crescentes de arginina, em incrementos de 100 μM , para o intervalo de concentrações entre 100 e 500 μM . Também apresentado acima está a curva de calibração resultante. Outras condições na Fig. 17.

Para demonstrar a versatilidade do detector adaptativo, foram realizados experimentos de eletroforese com detecção amperométrica usando como eletrodo de trabalho somente a camada de ouro depositada por *sputtering* no final do microcanal de separação.^[42] Ou seja, os nanofios de níquel foram eliminados do sistema e um novo protocolo foi ajustado para analisar um analito pertencente a outra classe de compostos. A Figura 20 apresenta eletroferogramas obtidos para injeções consecutivas de dopamina, usando como eletrolito de corrida uma solução tampão MES de concentração 20 mM (pH 5,1). Como observado, picos bem definidos e bastante repetíveis (RSD 2,6%, para área de pico) foram obtidos para dopamina nesse experimento.

Figura 20: Eletroferogramas obtidos para quatro injeções consecutivas de dopamina em uma concentração de 200 μM , usando como eletrodo de trabalho somente uma camada de ouro depositada por *sputtering* no final do microcanal de separação. Condições: eletrólito de separação, tampão MES de concentração 20 mM (pH 5,1), potenciais de injeção e separação, +1300V; tempo de injeção, 2 s; potencial de detecção, +0,80 V (vs Ag/AgCl).

5. CONCLUSÕES

Esse trabalho representa o primeiro exemplo do acoplamento de um detector adaptativo com operações comandadas por estímulos externo a eletroforese em microdispositivos. Em contraste aos grandes esforços atualmente voltados para o desenvolvimento de microdispositivos com componentes controlados usando forças magnéticas, poucos trabalhos tem demonstrado a combinação entre o magnetismo e a detecção eletroquímica.

O controle magnético de nanofios de níquel usando um ímã externo permitiu que o detector desenvolvido nesse trabalho fosse ajustado para efetuar uma medida

somente quando necessário, isto é, de acordo com a demanda analítica. Essa operação confere ao detector adaptativo certas vantagens quando comparado a detectores construídos através de modificação permanente, como por exemplo, a deposição de níquel no final do microcanal de separação.^[42] Além de evitar a execução de protocolos complicados geralmente usados para modificação de eletrodos amperométricos, a superfície do detector adaptativo é renovada a cada posicionamento e remoção dos nanofios de níquel no final do microcanal de separação. Essa característica é bastante interessante uma vez que a passivação de superfície é um dos maiores problemas enfrentados na aplicação de eletrodos amperométricos modificados.

Outras características como a versatilidade e a boa performance analítica, demonstradas na discussão dos resultados, tornam ainda mais atrativo o uso do detector adaptativo magneticamente modulável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BYRNE, R.; DIAMOND, D. Chemo/bio-sensor networks. **Nature Materials**, v. 5, n. 6, p. 421-424, 2006.
- [2] WILLNER, I.; KATZ, E. Magnetic Control of electrocatalytic and bioelectrocatalytic processes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 38, p. 4576-4588, 2003.
- [3] WANG, J.; SCAMPICCHIO, M.; LAOCHAROENSUK, R.; VALENTINI, F.; GONZALEZ-GARCIA, O.; BURDICK, J. Magnetic tuning of the electrochemical reactivity through controlled surface orientation of catalytic nanowires. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 14, p. 4562-4563, 2006.
- [4] HIRSCH, R.; KATZ, E.; WILLNER, E. Magneto-switchable bioelectrocatalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 48, p. 12053-12054, 2000.

- [5] KATZ, E.; SHEENEY-HAJ-ICHIA, L.; WILLNER, I. Magneto-Switchable Electrocatalytic and Bioelectrocatalytic Transformations. **Chemistry-A European Journal**, v. 18, n. 8, p. 4138-4148, 2002.
- [6] KATZ, E.; WILLNER, I. Magnetic control of chemical transformations: application for programmed electrocatalysis and patterning. **Electrochemistry Communications**, v. 3, n. 12, p. 683-685, 2001.
- [7] KATZ, E.; SHEENEY-HAJ-ICHIA, L.; BUCKMANN, A. F.; WILLNER, I. Dual biosensing by magneto-controlled bioelectrocatalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 8, p. 1343-1346, 2002.
- [8] KATZ, E.; SHEENEY-HAJ-ICHIA, L.; BASNAR, B.; FELNER, I.; WILLNER, I. Magnetoswitchable controlled hydrophilicity/hydrophobicity of electrode surfaces using alkyl-chain-functionalized magnetic particles: Application for switchable electrochemistry. **Langmuir**, v. 20, n. 22, p. 9714-9719, 2004.
- [9] KATZ, E.; WILLNER, I. Magneto-controlled quantized electron transfer to surface-confined redox units and metal nanoparticles. **Sensors**, v. 6, n. 4, p. 420-427, 2006.
- [10] KATZ, E.; LIUBASHEVSKI, O.; WILLNER, I. Magneto-switchable single-electron charging of Au-nanoparticles using hydrophobic magnetic nanoparticles. **Chemical Communications**, n. 10, p. 1109-1111, 2006.
- [11] KATZ, E.; BARON, R.; WILLNER, I. Magnetoswitchable electrochemistry gated by alkyl-chain-functionalized magnetic nanoparticles: Control of diffusional and surface-confined electrochemical processes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 11, p. 4060-4070, 2005.
- [12] WANG, J.; MUSAMEH, M.; LAOCHAROENSUK, R.; Magnetic catalytic nickel particles for on-demand control of electrocatalytic processes. **Electrochemistry Communications**, v. 7, n. 7, p. 652-656, 2005.
- [13] LOAIZA, O. A.; LAOCHAROENSUK, R.; BURDICK, J.; RODRÍGUEZ, M. C.; PINGARRON, J.M.; PEDRERO, M.; WANG, J. Adaptive orientation of multifunctional nanowires for magnetic control of bioelectrocatalytic processes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 9, p. 1508-1511, 2007.
- [14] LAOCHAROENSUK, R.; BULBARELLO, A.; MANNINO, S.; WANG, J. Adaptive nanowire–nanotube bioelectronic system for on-demand bioelectrocatalytic transformations. **Chemical Communications**, n. 32, p. 3362-3367, 2007.

- [15] LAOCHAROENSUK, R.; BULBARELLO, A.; HOCEVAR, S. B.; MANNINO, S.; OGOREVC, B.; WANG, J. On demand protection of electrochemical sensors based on adaptive nanowires. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 25, p. 7774-7775, 2007.
- [16] DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 3887-3907, 2006.
- [17] THORSEN, T.; MAERKL, S. J.; QUAKE, S. R. Microfluidic large-scale integration. **Science**, v. 298, n. 5593, p. 580-584, 2002.
- [18] PAMME, N. Magnetism and Microfluidics. **Lab on a Chip**, v. 6, n. 1, p. 24-38, 2006.
- [19] GIJS, M. A. M. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 1, n. 1, p. 22-40, 2004.
- [20] Wang, J. On-chip enzymatic assays. **Electrophoresis**, v. 23, n. 5, p. 713-718, 2002.
- [21] DODGE, A.; FLURI, K.; VERPOORTE, E.; ROOIJ, N. F. Electrokinetically driven microfluidic chips with surface-modified chambers for heterogeneous immunoassays. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 14, p. 3400-3409, 2001.
- [22] Yakovleva, J.; Davidsson, R.; Lobanova, A.; Bengtsson, M.; Eremin, S.; Laurell, T.; Emnéus, J. Microfluidic enzyme immunoassay using silicon microchip with immobilized antibodies and chemiluminescence detection. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 13, p. 2994-3004, 2002.
- [23] VERPOORTE, E. Beads and chips: new recipes for analysis. **Lab on a Chip**, v. 3, n. 4, p. 60N-68N, 2003.
- [24] LI, Y.; XIUQING, 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**, v. 6, n. 6, p. 2367-2375, 2007.
- [25] CHOI, J. W.; OH, K. W.; THOMAS, J. H.; HEINEMAN, W. R.; HALSALL, H. B.; NEVIN, J. H.; HELMICKI, A. J.; HENDERSON, H. T.; AHN, C. H. An integrated microfluidic biochemical detection system for protein analysis with magnetic bead-based sampling capabilities. **Lab on a Chip**, v. 2, n. 1, p. 27-30, 2002.
- [26] JANG, J.; LEE, S. S. Theoretical and experimental study of MHD (magnetohydrodynamic) micropump. **Sensors and Actuators A - Physical**, v. 80, n. 1, p. 84-89, 2000.

- [27] HATCH, A.; KAMHOLZ, A. E.; HOLMAN, G.; YAGER, P.; BÖHRINGER, K. F. A ferrofluidic magnetic micropump. **Journal of Microelectromechanical Systems**, v. 10, n. 2, p. 215-221, 2001.
- [28] RYU, K.S.; SHAIKH, K.; GOLUCH, E.; FAN, Z.F.; LIU, C. Micro magnetic stir-bar mixer integrated with parylene microfluidic channels. **Lab on a Chip**, v. 4, n. 6, 608-613, 2004.
- [29] RIDA, A.; GIJS, A. M. Manipulation of self-assembled structures of magnetic beads for microfluidic mixing and assaying. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 21, p. 6239-6246, 2004.
- [30] PAMME, N.; MANZ, A. On-chip free-flow magnetophoresis: Continuous flow separation of magnetic particles and agglomerates. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 24, p. 7250-7256, 2004.
- [31] FURDUI, V.I.; HARRISON, D. J. Immunomagnetic T cell capture from blood for PCR analysis using microfluidic systems. **Lab on a Chip**, v. 4, n. 6, p. 614-618, 2004.
- [32] LIU, R. H.; YANG, J. N.; LENIGK, R.; BONANNO, J.; GRODZINSKI, P. Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 7, p. 1824-1831, 2004.
- [33] FURDUI, V. I.; KARIUKI J. K.; HARRISON D. J.; Microfabricated electrolysis pump system for isolating rare cells in blood. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 13, n. 4, p. S164-S170, 2003.
- [34] DOYLE, P. S.; BIBETTE, J.; BANCAUD, A.; VIOVY, J. L. Self-assembled magnetic matrices for DNA separation chips. **Science**, v. 295, n. 5563, 2002.
- [35] WANG, Y.; ZHANG, Z.; ZHANG, L.; LI, F.; CHEN, L.; WAN, Q. Magnetically immobilized beds for capillary electrochromatography. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 13, p. 5082-5086, 2007.
- [36] PEKAS, N.; PORTER M. D.; TONDRA, M.; POPPLE, A.; JANDER, A. Giant magnetoresistance monitoring of magnetic picodroplets in an integrated microfluidic system. **Applied Physics Letters**, v. 85, n. 20, p. 4783-4785, 2004.
- [37] FERREIRA, H. A.; GRAHAM, D. L.; PARRACHO, P.; SOARES, V.; FREITAS, P. P. Flow velocity measurement in microchannels using magnetoresistive chips. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 40, n. 4, p. 2652-2654, 2004.

- [38] OSTERGAARD, S.; BLANKENSTEIN, G.; DIRAC, H.; LEISTIKO, O. A novel approach to the automation of clinical chemistry by controlled manipulation of magnetic particles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, n. 1-3, p. 156-162, 1999.
- [39] PICCIN, E.; LAOCHAROENSUK, R.; BURDICK, J.; CARRILHO, E.; WANG, J. Adaptive nanowires for switchable microchip devices. *Analytical Chemistry*, v. 79, n. 12, p. 4720-4723, 2007.
- [40] WANG, J.; CHEN, G.; CHATRATHI, M. D. Nickel amperometric detector prepared by electroless deposition for microchip electrophoretic measurement of alcohols and sugars. **Electroanalysis**, v. 16, n. 19, p. 1603-1608, 2004.
- [41] CASELLA, I. G.; CATALDI, T. R.; SALVI, A.; DESIMONI, E. Electrocatalytic oxidation and liquid chromatographic detection of aliphatic alcohols at a nickel-based glassy carbon modified electrode. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 21, p. 3143-3150, 1993.
- [42] WANG, J.; TIAN, B.; SAHLIN, E. Integrated electrophoresis chips/amperometric detection with sputtered gold working electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 17, p. 3901-3904, 1999.
- [43] VOEGEL, P. D.; ZHOU, W.; BALDWIN, R. P. Integrated capillary electrophoresis/electrochemical detection with metal film electrodes directly deposited onto the capillary tip. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 5, p. 951-957, 1997.