GIORGIO GIANINI MORBIOLI

Funcionalização de celulose para ensaios bioanalíticos em dispositivos
microfluídicos baseados em papel (μ PADs)

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e
Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos
2015

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao povo brasileiro, que por meio do seu esforço e dos seus impostos possibilita o desenvolvimento da ciência no país.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, William e Helena, pelo dom da vida, pelos ensinamentos, pelas palmadas, pelo carinho e paciência ao longo desses anos.

Ao meu irmão, Guilherme, por me influenciar na escolha dessa carreira, e por sempre me ajudar.

À minha irmã, Giovanna, por ser tão polivalente e esforçada, e ser um exemplo de ética para mim.

À Jéssica Albuquerque, por sempre querer me fazer sorrir, por me acompanhar durante essa jornada e compartilhar do mesmo sonho que eu.

Ao professor Emanuel Carrilho, a quem tenho muito a agradecer. Obrigado pela orientação, pelas oportunidades concedidas, pela atenção e discussões, pelas ideias, pela paciência, pela amizade, e por ser o modelo profissional que eu pretendo seguir.

A um dos melhores químicos que eu já tive a oportunidade de conhecer, meu grande amigo Elias (Abu), pelos conselhos, risadas, cafés, orientações, cornetagens (*bullying* educativo), sugestões e mais café.

Às pessoas que me são as mais caras, sem as quais essa jornada não teria sido tão proveitosa e tão prazerosa: Anderson (Dodói), Mateus (Arroz), Pedro Dias (Taxinha), Marcus (Preto), Maurício Daniel (Yena), Guilherme (Vegetal), Pedro Ivo (Dorado), Lucas Quintal (Psycho), Lucas Sponton (Urso), Isaías (Minas), Luis Felipe (Pininho), Diego Golinelli (Deabo), Ricardo Kita (Yoshi), Glauco (Pombo), Natan (Aborto), Walter (Glô), Adriano Aquino (Mestre Draculino), Thiago Mazzu (Monstro), Márcio Bocelli, Eduardo Quaresma, Michelle Peixoto, Juliana Tamara (Menininha), Julianna Denari (Giu), Maria Isabella (Bella), Larissa Modesto (Larilari), Juliana Ramos de Andrade (Ju), Thairo, Elenice, Francisco Edvan, Cesar Cervantes e Aline Ishikawa.

Ao professor Álvaro José dos Santos Neto, por ser um modelo de educador; a todos os alunos da disciplina Análise Instrumental I em 2014, ao Luis Felipe (Pipe), à Yara Jaqueline, ao Aldimar, ao André Tognoli e a todos os envolvidos no estágio PAE, que me mostraram quanto esforço é necessário para se formar um químico.

Aos integrantes do grupo de bioanalítica, microfabricação e separações (BioMicS).

Aos professores Antônio Aprígio da Silva Curvelo e Ubirajara Pereira Rodrigues Filho pelas contribuições e sugestões durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Thiago Zafalon Miranda pelo *software* de análises de imagens, sem o qual o desenvolvimento desse trabalho seria muito mais lento, e por mostrar que as colaborações nascem nos lugares mais inusitados.

À Professora Carla Cristina Schmitt Cavalheiro e à Dra. Alessandra Lima Poli Leves pelas medidas de FTIR-ATR.

Ao Professor Antônio Carlos Bender Burtoloso e ao João Pedro de Freitas Lima pelo auxílio na síntese do FNAB.

Ao Professor Antônio José Félix de Carvalho e ao Ricardo Gomes Pereira pelas medidas de FTIR-ATR.

Ao Prof. Dr. Eduardo Ribeiro de Azevedo pelas medidas de ^{13}C -RMN.

Ao Dr. Marcelo Luiz Calegaro pelas medidas de DRX.

Ao Dr. Márcio de Paula pelas micrografias eletrônicas de varredura.

À Dra. Debora Terezia Balogh e ao MSc. Bruno Bassi Milan Torres pelas medidas de ângulo de contato.

A todos os funcionários da biblioteca do IQSC pela amizade, auxílio e “shhhh!” durante esses 7 anos, em especial à Bernadete L. C. B. Figueiredo Filho e ao Fábio Boracini da Silva, por tornarem as noites de estudo mais agradáveis. Tenho um carinho muito grande por todos vocês!

Aos funcionários da oficina mecânica do IQSC-USP pelo auxílio na construção do aparato magnético.

Aos funcionários da seção de pós-graduação do IQSC, por todo o auxílio nesses 2 anos.

A todos os funcionários, professores e colaboradores do IQSC-USP, que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho e com a minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Instituto de Química de São Carlos – USP pela qualidade dos recursos humanos e pela infraestrutura.

Muito obrigado!

“Everything should be made as simple as possible, but not simpler.”

Albert Einstein

RESUMO

A funcionalização da matriz celulósica é um ponto essencial para o aprimoramento dos dispositivos microfluídicos baseados em papel (μ PADs). Ela permite minimizar o preparo de amostras e a interferência do usuário, principais fontes de erro no processo analítico. A oxidação da celulose durante uma hora com m-periodato de sódio e a imobilização química de enzimas a partir da formação de bases de Schiff (iminas), via a adição direta da enzima ao substrato oxidado sem a necessidade de outras etapas, é um processo rápido e de baixo custo, apresentando grande potencialidade de aplicação nos dispositivos microfluídicos em papel. A enzima glicose oxidase imobilizada na celulose, com a adição do estabilizante trealose, apresentou elevada atividade catalítica – de $31,9 \pm 5,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para a enzima não imobilizada a $14,8 \pm 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para a enzima imobilizada e com o estabilizante – além de apresentar maior homogeneidade de sinal, condições desejáveis em testes rápidos em papel. A confecção de dispositivos em papel via impressão em cera alia rapidez e baixo custo de produção, e o arranjo em camadas para originar dispositivos tridimensionais (3D) permite ampliar as funcionalidades dos dispositivos em duas dimensões, tal como o tratamento individualizado de camadas e o armazenamento de reagentes no próprio dispositivo. O método da adição de padrão para obtenção de curvas analíticas no próprio microchip em papel surge como alternativa às curvas analíticas externas, minimizando a manipulação e o preparo de amostras. O uso do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) – ABTS como indicador redox para as reações enzimáticas e o método de adição de padrão nos μ PADs apresentou boa correlação com um modelo de crescimento e saturação de Michaelis-Menten ($r^2 = 0,8723$) na faixa de 0 a 10 mmol L^{-1} , e a utilização da faixa linear para quantificação de glicose (0 a 3 mmol L^{-1}) apresentou grande correlação linear com a concentração estimada pelas curvas de adição de padrão ($r^2 = 0,959$), demonstrando a potencialidade do método. A união da tecnologia desses dispositivos em papel com a de um *software* automatizado de reconhecimento de imagens (PALizer) torna instantânea a obtenção de resultados, eliminando-se a necessidade de intervenção humana no processo, tornando os testes em papel mais robustos, reproduzíveis e rápidos. Com o contínuo aperfeiçoamento das funcionalidades e potencialidades dos dispositivos microfluídicos em papel espera-se que os testes diagnósticos de baixo custo atinjam àqueles que deles necessitam, contribuindo para a saúde da população.

ABSTRACT

Functionalization of a cellulosic matrix is essential for the success of the paper-based microfluidic analytical devices (μ PADs). It allows minimization of sample preparation and user interference, both being major sources of errors in the analytical process. Cellulose oxidation with sodium m-periodate during one hour and the direct chemical immobilization of enzymes on it by Schiff-base (imines) formation, which is made by direct insertion of the enzyme on the oxidized substrate without subsequent steps, is a fast and low cost process of immobilization, presenting great potential of application in paper-based microfluidic analytical devices. The glucose oxidase enzyme immobilized on cellulose, with the addition of trehalose stabilizer presented enhanced catalytic activity – from $31.9 \pm 5.5 \text{ mmol L}^{-1}$ for the non-immobilized enzyme to $14.8 \pm 2.0 \text{ mmol L}^{-1}$ for the immobilized enzyme with the stabilizing agent – also presenting greater signal homogeneity, which are ideal characteristics in a paper-based rapid test. Wax printing is a simple, inexpensive and fast method by which micro-devices can be fabricated. Additionally, the stacking of layers originating tridimensional devices (3D) allow for the improvement of functionalities of 2-dimensional ones, such as individualized layer treatment and reagent storage at different layers in the same device. Standard addition to analytical curves in paper-based microchips is an alternative to external analytical curves, minimizing handling/sample preparation. The use of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid – ABTS redox indicator with the enzymatic reactions and the standard addition method in μ PADs presented a good correlation in a growth and saturation Michaelis-Menten model ($r^2 = 0.8723$), in the range of 0 to 10 mmol L^{-1} , and the usage of the linear range to the glucose quantification (0 to 3 mmol L^{-1}) presented a high linear correlation with the estimated concentration from the standard addition curves ($r^2 = 0.959$), showing the potentiality of the method. The coupling of such paper-based devices to automated image analysis software, such as 'PALizer', turns the data acquisition process instantaneous, eliminating the need of human intervention during the process, making it more robust, reproducible and rapid. Expectations lie in improving the devices functions and potential so that these low-cost diagnostic devices can one day reach those who need them, contributing significantly to public health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Precursores dos dispositivos microfluídicos em papel. (a) Criação de zonas individualizadas de reação pela formação de barreiras hidrofóbicas de cera. (b) Dispositivo automático de cromatografia em papel.....	27
Figura 2 - Levantamento sobre a produção científica relacionada à (a) microfluídica e à (b) microfluídica em papel, realizado em Dezembro de 2014.	28
Figura 3 - Estrutura do (a) hemiacetal β -D-anidroglicopirranose e da (b) β -celobiose.	29
Figura 4 - Representação das ligações hidrogênio na celulose. (a) Ligações hidrogênio entre resíduos de β -D-anidroglicopirranose adjacentes na β -celobiose. (b) Ligações hidrogênio entre cadeias de celulose adjacentes.	30
Figura 5 – Representação da formação de complexos de celulose com derivados de cobre-amônia (ressaltados em vermelho) para solubilização da celulose.	31
Figura 6 – Exemplo de lixiviação em um processo de adição direta dos reagentes (a) Dispositivo após aplicação dos reagentes. (b) Regiões onde os reagentes foram depositados (em vermelho, realçado utilizando-se o software Photoshop®), antes da inserção da amostra. (c) Reagentes lixiviados após a adição da amostra, gerando uma coloração heterogênea na zona de detecção, sendo mais intensa próxima às paredes do dispositivo. A amostra é inserida na parte inferior do dispositivo, e chega às zonas de detecção via capilaridade.....	34
Figura 7 – Representação esquemática dos modos de imobilização física de biomoléculas na celulose. (a) Adsorção quando da adição direta de biomoléculas na celulose. (b) Confinamento de biomoléculas adsorvidas na celulose.	36
Figura 8 – Representação esquemática da pigmentação bioativa, com as partículas carreadoras adsorvidas na celulose. (a) Imobilização das biomoléculas na partícula carreadora. A imobilização pode ser realizada por adsorção, ligação covalente ou acoplamento bioquímico. (b) Confinamento de biomoléculas na partícula carreadora via estrutura em rede. (c) Confinamento de biomoléculas na partícula carreadora via encapsulamento.	38
Figura 9 – Representação esquemática do acoplamento bioquímico. (a) Modificação da biomolécula, a qual deve apresentar um módulo de afinidade em sua estrutura e modificação da celulose, ligada covalentemente a um ligante de afinidade, que interagirá com seu respectivo módulo. (b) Biomolécula modificada apresentando um domínio ligante de celulose, o qual interage especificamente com a celulose.....	40
Figura 10 – Representação esquemática de algumas estratégias de modificação da celulose para a imobilização covalente de biomoléculas (modificações em vermelho; produto de interesse em verde).....	43

Figura 11 – Estatísticas das pessoas com acesso à telefonia celular e à internet, frente à população mundial. É possível estimar que ao fim de 2015 o número de pessoas com acesso à telefonia celular se igualará à população mundial, demonstrando o alcance dessa tecnologia.	53
Figura 12 – Espectro eletromagnético na região do visível (380 a 760 nm), destacando-se as bandas dos filtros padrão no sistema RGB.	54
Figura 13 – Principais componentes de uma impressora a cera.	58
Figura 14 – Formação da imagem especular sobre o rolo de transferência, via jatos de cera liquefeita a partir da cera sólida.	59
Figura 15 – Transferência da imagem espelhada do rolo de transferência à folha de papel.	60
Figura 16 – Métodos irreversíveis de união de camadas adjacentes. (a) Colagem entre camadas utilizando-se fita dupla face e pó de celulose. (b) Colagem entre camadas com spray adesivo. (c) Colagem entre camadas utilizando-se toner como adesivo.	62
Figura 17 – Métodos reversíveis de união de camadas adjacentes. (a) Dispositivo unido com garra, sendo este qualquer aparato (descartável ou não) que aplique uma pressão em alguma extremidade do dispositivo. (b) Dispositivo unido com aparato externo, o qual aplica uma pressão uniforme por todo o dispositivo, sendo o aparato externo não descartável.	63
Figura 18 – Programa Corel Draw X6®. As zonas hidrofóbicas são criadas a partir das linhas e áreas escuras, sendo os canais e zonas hidrofílicas preservados nas áreas brancas.	67
Figura 19 – União dos 3D- μ PADs via aparato magnético externo. (a) Ímãs de neodímio e chapas metálicas perfuradas no design do dispositivo. (b) 3D- μ PAD antes da dobradura. (c) 3D- μ PAD após dobradura. (d) 3D- μ PAD sobre a parte inferior do dispositivo. (e) Aparato magnético unindo as camadas do dispositivo – vista superior. (f) Aparato magnético unindo as camadas do dispositivo – vista inferior. (g) Aparato magnético unindo as camadas do dispositivo – vista lateral.	69
Figura 20 – União dos 3D- μ PADs via cliques de papel. (a) Cliques de papel unindo as camadas – vista superior. (b) Cliques de papel unindo as camadas – vista inferior. (c) Cliques de papel unindo as camadas – vista lateral.	70
Figura 21 – União dos 3D- μ PADs via grampos de papel. (a) Grampos de papel unindo as camadas – vista superior. (b) Grampos de papel unindo as camadas – vista inferior. (c) Grampos de papel unindo as camadas – vista lateral.	70
Figura 22 – Delineamento experimental da adição de soluções enzimáticas e trealose à membrana ativada com EDC/NHS. O esquema de cores simboliza os spots onde foram adicionados 0,5 μ L das soluções contendo as enzimas.	78

Figura 23 – Adição de soluções enzimáticas, do reagente redox (KI) e do substrato enzimático (glicose) aos dispositivos com enzimas previamente imobilizadas. Entre cada adição aguardou-se um período de 15 min, para a completa secagem do dispositivo. Após a adição da glicose, aguardou-se 30 min, antes da digitalização do dispositivo. O esquema de cores simboliza o spot onde foram adicionados 0,5 µL das soluções indicadas em cada etapa do processo.	81
Figura 24 – Disposição da adição de solução de glicose nos spots. As soluções com mesma concentração foram adicionadas simultaneamente, com o auxílio de uma micropipeta multicanais. As concentrações estão indicadas em mol L ⁻¹	82
Figura 25 – 3D-µPAD em papel oxidado com adição de padrões.....	84
Figura 26 – Análise de imagem utilizando-se o software Adobe Photoshop®. (a) Utilizando-se a ferramenta histograma, seleciona-se uma região de interesse na figura e o canal de cores apropriado, anotando-se o valor correspondente da intensidade média de pixels naquela região. Para cada spot é necessário realizar o mesmo procedimento. (b) Empregando-se um software de planilha de dados, traça-se o gráfico da concentração de glicose adicionada x intensidade média de pixels, obtendo-se a curva analítica.	85
Figura 27 – Estudo da alteração de tamanho de linhas verticais e horizontais impressas em papel cromatográfico Whatman® nº. 1, nos quatro modos de impressão distintos. (a) Qualidade cor rápida. (b) Qualidade padrão. (c) Qualidade aprimorado. (d) Qualidade foto.....	87
Figura 28 – Estudo da alteração de tamanho de linhas verticais e horizontais impressas em papel cromatográfico Whatman® nº. 1, após aquecimento – Frente da folha. (a) Qualidade cor rápida. (b) Qualidade padrão. (c) Qualidade aprimorado. (d) Qualidade foto.	88
Figura 29 – Estudo da alteração de tamanho de linhas verticais e horizontais impressas em papel cromatográfico Whatman® nº. 1, na qualidade de impressão aprimorado, antes e após aquecimento. (a) Linhas impressas verticalmente. (b) Linhas impressas horizontalmente.	89
Figura 30 – Estudo da alteração de tamanho de linhas verticais e horizontais impressas em papel cromatográfico Whatman® nº. 1, variando-se a orientação do papel na horizontal e na vertical. (a) Linhas após impressão. (b) Linhas após aquecimento.	89
Figura 31 – Representação da dispersão de cera em uma linha impressa na vertical. Tomando-se um elemento de área (azul), tem-se que a cera nesse elemento de área tenderá a se dispersar em direção ao papel - horizontal, onde a resistência ao molhamento será menor (representado pelas setas verdes), ao invés de se dispersar em direção a uma localidade que também contém cera – vertical – e que também está sujeita às mesmas condições de espalhamento (representado pelas setas vermelhas). Assim, o resultado observado será uma dispersão apreciável na horizontal e mínima na vertical, como representado pelas regiões em cinza. O recíproco é verdadeiro para uma linha na horizontal.	90

Figura 32 – Demonstração da variação do diâmetro interno de círculos (7,0 mm) com o incremento do tamanho das linhas de impressão – de 0,1 mm a 2,5 mm.	91
Figura 33 – Estudo da variação da área de círculos impressos com diâmetro nominal de 7,0 mm (diâmetro interno 0,385 cm ²) com o incremento da espessura das linhas impressas.	92
Figura 34 – Estudo da variação da área de círculos impressos com distintos diâmetros.....	92
Figura 35 – Estudo da variação da área de círculos impressos com diâmetros nominais distintos, de 0,3 a 0,7 cm.	93
Figura 36 – Medidas de ângulo de contato das membranas com água. (a) Após impressão, antes do aquecimento. (b) Após aquecimento. (c) Após aquecimento, lavado com metanol. (d) Após aquecimento, lavado com etanol.	94
Figura 37 – Micrografias eletrônicas da celulose recoberta com cera. (a) Padrão de cera (região mais escura) sobre celulose (região mais clara). (b) Interface entre cera depositada e papel sem cera. (c) Região recoberta com cera, apresentando rachaduras e imperfeições.	95
Figura 38 – Teste de funcionalidade da barreira após lavagem com solventes orgânicos. (a) Dispositivo lavado com metanol (i) e dispositivo após aquecimento (ii). Observa-se a coloração acinzentada do dispositivo lavado, pela remoção de pigmentos da cera. Contudo, a barreira hidrofóbica permanece funcional, não havendo extravasamento de líquido – corante vermelho. (b) Dispositivo lavado com etanol (iii) e dispositivo após aquecimento (iv). O etanol afeta a hidrofobicidade da cera, e as barreiras deixam de ser funcionais, havendo extravasamento de líquido, podendo ser observado a formação de um halo vermelho no canto esquerdo superior do dispositivo (iii), além de spots vermelhos com maior área ao centro, quando da adição de solução de corante sobre a cera.	96
Figura 39 – Primeiro design avaliado, baseado em modelo disponível na literatura. (a) Dispositivo pronto para o uso. (b) Aplicação de 5 µL de solução contendo corante. (c) Aplicação de 10 µL de solução contendo corante. (d) Aplicação de 15 µL de solução contendo corante. (e) Aplicação de 20 µL de solução contendo corante. (f) Aplicação de 25 µL de solução contendo corante.....	97
Figura 40 – Segundo design avaliado, com adição de uma camada para maior homogeneidade da dispersão de fluido. (a) Dispositivo pronto para o uso. (b) Aplicação de 5 µL de solução contendo corante. (c) Aplicação de 10 µL de solução contendo corante. (d) Aplicação de 15 µL de solução contendo corante. (e) Aplicação de 20 µL de solução contendo corante. (f) Aplicação de 25 µL de solução contendo corante. (g) Aplicação de 30 µL de solução contendo corante.	98

Figura 41 – Terceiro design avaliado, com remoção de uma camada. (a) Dispositivo pronto para o uso. (b) Aplicação de 5 μ L de solução contendo corante. (c) Aplicação de 10 μ L de solução contendo corante. (d) Aplicação de 15 μ L de solução contendo corante. (e) Aplicação de 20 μ L de solução contendo corante. (f) Aplicação de 25 μ L de solução contendo corante. (g) Aplicação de 30 μ L de solução contendo corante.

.....99

Figura 42 – Quarto design avaliado, com modificação de uma camada. (a) Dispositivo pronto para o uso. (b) Aplicação de 5 μ L de solução contendo corante. (c) Aplicação de 10 μ L de solução contendo corante. (d) Aplicação de 15 μ L de solução contendo corante. (e) Aplicação de 20 μ L de solução contendo corante. (f) Aplicação de 25 μ L de solução contendo corante. (g) Aplicação de 30 μ L de solução contendo corante.....99

Figura 43 – Quinto design avaliado, com a fusão da segunda e terceira camadas. (a) Dispositivo pronto para o uso. (b) Aplicação de 5 μ L de solução contendo corante. (c) Aplicação de 10 μ L de solução contendo corante. (d) Aplicação de 15 μ L de solução contendo corante. (e) Aplicação de 20 μ L de solução contendo corante. (f) Aplicação de 25 μ L de solução contendo corante. (g) Aplicação de 30 μ L de solução contendo corante. (h) Aplicação de 35 μ L de solução contendo corante.100

Figura 44 – Comparação entre os métodos de acoplamento de camadas dos dispositivos tridimensionais estudados. Ressalta-se que a taxa de funcionamento dos dispositivos unidos com grampos foi nula (0%). 106

Figura 45 – Comparação da coloração exibida entre os 8 ensaios funcionais utilizando o aparato magnético, para os dispositivos com o quinto design.107

Figura 46 – Espectro de FTIR do 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB) utilizando-se a síntese 1, evidenciando-se as bandas de interesse..... 109

Figura 47 – Espectro de H^1 -NMR do 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB) em CCl_3D 110

Figura 48 – Espectro de FTIR do 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB) utilizando-se a síntese 2, evidenciando-se as bandas de interesse.....111

Figura 49 – Ativação da celulose utilizando-se o FNAB. (a) Ativação do nitreno do FNAB por irradiação no UV (365 nm), com eliminação de N_2 . (b) Reação de inserção do nitreno em ligação C-H no C3 de um dos anéis de piranose na celobiose.112

Figura 50 – Membranas de celulose ativadas com o FNAB. (a) Aplicação do FNAB sobre o substrato celulósico, após evaporação do metanol. (b) Membranas ativadas com FNAB, após irradiação com radiação UV (365 nm) durante 35 min. (c) Membranas ativadas com FNAB após lavagem com metanol para retirada de espécies não reagidas / não imobilizadas - frente. (d) Membranas ativadas com FNAB após lavagem com metanol para retirada de espécies não reagidas / não imobilizadas – verso – No centro da placa de Petri há um disco de papel de cromatografia Whatman® n°. 1 para comparação de cores..... 113

Figura 51 – Gota de água sobre a superfície de uma membrana de celulose ativada com o FNAB, demonstrando a diminuição da molhabilidade da celulose.	114
Figura 52 – Oxidação da celulose com m-periodato de sódio, para formar o 2,3-dialdeído celulose.....	115
Figura 53 – Espectros de FTIR da celulose oxidada.....	116
Figura 54 – Difractogramas de raios-x da celulose oxidada.	117
Figura 55 – Análise da capacidade retentiva dos analitos em celulose normal e em celulose oxidada durante 1 hora. (a) Capacidade retentiva da glicose em celulose normal. (b) Capacidade retentiva da glicose em celulose oxidada. (c) Capacidade retentiva do H ₂ O ₂ em celulose normal. (d) Capacidade retentiva do H ₂ O ₂ em celulose oxidada. (e) Capacidade retentiva do KI em celulose normal. (f) Capacidade retentiva do KI em celulose oxidada.....	118
Figura 56 – Análise de fluorescência de raios-x para a celulose e celulose oxidada por diferentes períodos.	120
Figura 57 – Efeito da oxidação da celulose na detecção colorimétrica. (a) Celulose normal - destaque para a formação de halos mais escuros ao redor do spot, evidenciando a distribuição desigual de cor. (b) Celulose oxidada - há maior homogeneidade de cor por todo o spot.....	121
Figura 58 – Efeito da lixiviação dos reagentes no sinal colorimétrico. (a) Quando a adição dos analitos é realizada no centro do spot, os reagentes pré-depositados são lixiviados igualmente às bordas, resultando em um sinal mais intenso nas bordas (reagentes colorimétricos concentrados nessa região) e menos intenso no centro. (b) Quando a adição dos analitos é realizada próxima a uma das bordas, a coloração mais intensa ocorrerá na borda oposta, e menos intensa na borda onde foram aplicados os analitos.	123
Figura 59 – Reação da celulose com o EDC, NHS e imobilização enzimática, além das outras reações possíveis dentro das condições experimentais utilizadas.	124
Figura 60 – Reação de condensação entre um aldeído e uma amina primária, dando origem a uma imina (Base de Schiff), via catálise ácida.	125
Figura 61 – Espectros de FTIR da celulose oxidada após imobilização da enzima glicose oxidase. Os tempos de oxidação e da incubação com a enzima estão indicados na legenda.	127
Figura 62 – Ensaios de incubação das membranas de celulose oxidada contendo a enzima glicose oxidase imobilizada em sua superfície. (a) controle negativo – todos os reagentes do ensaio sem a enzima glicose oxidase. (b) membrana de celulose normal. (c) celulose oxidada durante 30 min. (d) celulose oxidada durante 1 h. (e) celulose oxidada durante 2 h. (f) celulose oxidada durante 4 h. (g) celulose oxidada durante 20 h. (h) controle positivo – todos os reagentes do ensaio e a enzima glicose oxidase.....	128

Figura 63 – Espectros de absorbância no UV-vis dos ensaios de incubação das membranas de celulose oxidada contendo a enzima glicose oxidase imobilizada em sua superfície.....	129
Figura 64 – Teste de estabilidade das enzimas em microchips. (a) Glicose oxidase e glicose oxidase imobilizada. (b) Glicose oxidase + trealose e Glicose oxidase imobilizada + trealose. (c) Peroxidase e peroxidase imobilizada. (d) Peroxidase + trealose e peroxidase imobilizada + trealose. (e) Glicose Oxidase + Peroxidase e Glicose Oxidase + Peroxidase imobilizadas.....	131
Figura 65 – Monitoramento do ensaio de glicose pelo método de glicose oxidase / peroxidase / KI, sobre a plataforma de celulose normal.....	136
Figura 66 – Monitoramento do ensaio de glicose pelo método de glicose oxidase / peroxidase / KI, sobre a plataforma de celulose normal com adição de trealose....	137
Figura 67 – Monitoramento do ensaio de glicose pelo método de glicose oxidase / peroxidase / KI, sobre a plataforma de celulose oxidada, com as enzimas imobilizadas em sua superfície.	138
Figura 68 – Monitoramento do ensaio de glicose pelo método de glicose oxidase / peroxidase / KI, sobre a plataforma de celulose oxidada, com as enzimas imobilizadas em sua superfície e adição de trealose.	139
Figura 69 – Curvas de Michaelis-Menten para a determinação dos parâmetros cinéticos da enzima glicose oxidase, em diferentes condições. (a) Enzima sobre o substrato de celulose, livre. (b) Enzima sobre o substrato de celulose, livre, com adição de trealose. (c) Enzima imobilizada na superfície da celulose oxidada. (d) Enzima imobilizada na superfície da celulose oxidada, com adição de trealose. ...	140
Figura 70 – Curva analítica externa obtida para a determinação de glicose via o teste da glicose oxidase e peroxidase, utilizando-se ABTS como indicador colorimétrico.	144
Figura 71 – Disposição da adição de padrões nos dispositivos origami em 3 dimensões. O esquema em cores apresenta a concentração da solução depositada nos spots.....	146
Figura 72 – Curvas de adição de padrão para os 3D- μ PADs. (a) Adição de 65 μ L de solução 0 mmol L ⁻¹ de glicose. (b) Adição de 65 μ L de solução 0,5 mmol L ⁻¹ de glicose. (c) Adição de 65 μ L de solução 1 mmol L ⁻¹ de glicose. (d) Adição de 65 μ L de solução 2 mmol L ⁻¹ de glicose. (e) Adição de 65 μ L de solução 3 mmol L ⁻¹ de glicose.	147
Figura 73 – Concentração calculada por extrapolação nas curvas de adição de padrão x concentração real da amostra.	148
Figura 74 – Descarte dos dispositivos após o ensaio via incineração. (a) μ PAD após o uso. (b) e (c) Dispositivo sendo incinerado. (d) Dispositivo após incineração.....	150
Figura 75 – Placa de 96 poços em papel utilizada para comparação do espectrofotômetro de refletância difusa com um digitalizador de mesa comercial..	151

Figura 76 – Espectros convertidos pela função de Kubelka-Munk para os bioensaios com glicose.	152
Figura 77 – Curva analítica para a glicose oxidase, obtida a partir de medidas de intensidade média de pixel em cada spot do bioensaio de glicose na placa de 96 poços.....	153
Figura 78 – Comparação das curvas analíticas para a determinação de glicose....	154
Figura 79 – Imagens analisadas pelos programas. (a) Imagem analisada pelos softwares comerciais. (b) Imagem analisada pelo software PALizer.....	155
Figura 80 – Resultados da análise da mesma imagem pelos softwares comerciais e pelo software PALizer.....	156
Figura 81 – Tempo médio de análise na análise de um spot. Ressalta-se que a análise utilizando-se o software PALyzer era instantânea ($t = 0$ s).	157
Figura 82 – Variância média de cada programa na análise de uma mesma imagem. Ressalta-se que a análise utilizando-se o software PALyzer não apresentou variação ($s^2 = 0$).	157
Figura 83 – Detecção de zonas teste utilizando o software PALizer. (a) Imagem a ser analisada. (b) Spots detectados pelo programa, nas condições definidas pelo usuário.	158
Figura 84 – Funcionalidade do software criado. (a) Análise do teste de glicose com imagem digitalizada em scanner de mesa. (b) Mesma placa de 96 poços digitalizada com câmera digital, em condição irregular de iluminação e ângulo. (c) Mesma placa de 96 poços analisada com um ângulo mais irregular. (d) Inserção de manchas físicas nos spots.	160
Figura 85 – Diferentes plataformas com configurações geométricas distintas. (a) Plataforma com um tamanho reduzido e 12 poços, apenas, com coloração distinta. (b) Placa com formatos distintos para os spots. (c) Placa com tamanhos distintos de spots.....	161
Figura 86 – Robustez da análise de imagens pelo software criado. (a) Placa de papel com 96 poços, contendo distintas colorações. (b) Placa de papel amassada. (c) Placa digitalizada, onde o software ainda foi capaz de detectar os spots corretamente.	162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais dificuldades enfrentadas por pacientes e provedores de serviços médicos no diagnóstico de doenças	25
Tabela 2 – Especificidade da glicose oxidase e da hexoquinase.....	47
Tabela 3 – Indicadores redox mais utilizados nos testes enzimáticos envolvendo peroxidase.....	50
Tabela 4 - Comparação entre as principais técnicas de confecção de μ PADs	57
Tabela 5 – Composição de cada ensaio para o teste de incubação	77
Tabela 6 – Resultados da união de camadas dos dispositivos origami utilizando-se spray adesivo	101
Tabela 7 – Resultados da união de camadas dos dispositivos origami utilizando-se o aparato magnético externo.....	103
Tabela 8 – Resultados da união de camadas dos dispositivos origami utilizando-se cliques de papel	104
Tabela 9 – Resultados da união de camadas dos dispositivos origami utilizando-se grampos de papel.....	105
Tabela 10 – Resultado ANOVA bimodal para os 8 ensaios funcionais no aparato magnético com o dispositivo com o design 5	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹H-RMN: Ressonância Magnética Nuclear de próton

3D-μPAD: Dispositivos microfluídicos analíticos em papel em três dimensões (*3 dimensional paper-based microfluidic analytical devices*)

ABTS: Ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

ASSURED: Dispositivos de baixo custo, sensíveis, específicos, fáceis de manipular, rápidos e robustos, dispensando o uso de equipamentos e disponíveis (*Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free, Deliverable*)

CCD: Dispositivos de carga acoplada (*Charge-Coupled Device*)

CDI: Carbonildiimidazol

CIS: Sensores de contato de imagem (*Contact Image Sensor*)

CMYK: Sistema de cores ciano, magenta, amarelo, preto (*Cyan, Magenta, Yellow, Black*)

Da: Dalton

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EC Number: Número de classificação da enzima (*Enzyme Commission Number*)

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

FNAB: 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno

FTIR-ATR: Espectroscopia vibracional no infravermelho, no modo de refletância total atenuada (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy – Attenuated Total Reflectance*)

GOx: Glicose oxidase

HRP: Peroxidase extraída da raiz da *Armoracia rusticana* (*Horseradish Peroxidase*)

LbL: Automontagem (*Layer-by-Layer*)

LiCl/DMAC: N,N-dimetilacetamida e cloreto de lítio

MM: Massa molecular

MMS: Sistema de envio de mensagem multimídia (*Multimedia Messaging Service*)

NHS: N-hidroxisuccinimida

OMS: Organização Mundial da Saúde

P.A.: Padrão Analítico

pH: Potencial hidrogeniônico

POCT: Testes diagnósticos realizados diretamente no local (*Point-of-Care testing*)

POx: Peroxidase

RGB: Sistema de cores vermelho, verde, azul (*Red, Green, Blue*)

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

UV: Ultravioleta

XRD: Difração de raios-x (*X-ray Diffraction*)

XRF: Espectrometria de fluorescência de raios-x (*X-ray fluorescence*)

μPAD: Dispositivos microfluídicos analíticos em papel (*paper-based microfluidic analytical devices*)

LISTA DE SÍMBOLOS

A: Área do canal

C_{AP} : Concentração do padrão adicionado

C_D : Concentração da amostra

$C_{\text{Geométrico}}$: Constante que depende da geometria do canal

$F(R)$: Função remissiva de Kubelka-Munk

F_r : Fator de retenção

K: Constante obtida através da curva de regressão

k_M : Constante de Michaelis-Menten

L: Comprimento do canal

R: Refletância da amostra

R_H : Resistência hidrodinâmica do canal

S_0 : Sinal obtido na curva externa

S_1 : Sinal obtido na curva de adição de padrão

θ_{SL} : Ângulo de contato sólido-líquido

ρ_{fibra} : Densidade da fibra

ρ_{papel} : Densidade do papel

τ : Espessura do papel

ϕ_{papel} : Porosidade do papel

ω : Peso base

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Origem da microfluídica em papel	26
1.2 Celulose.....	29
1.3 Papel.....	31
1.4 Uso do papel em dispositivos microfluídicos	32
1.5 Funcionalização da celulose	33
1.5.1 Imobilização física	34
1.5.1.1 Confinamento	35
1.5.2 Pigmentação bioativa	36
1.5.3 Acoplamento bioquímico	39
1.5.4 Imobilização química.....	41
1.6 Biossensores	44
1.6.1 Glicose oxidase	45
1.6.2 Peroxidase	47
1.7 Detecção.....	48
1.7.1 Análise de ensaios colorimétricos	51
1.7.2 Espectroscopia de refletância difusa na análise de <i>spot tests</i>	51
1.7.3 Dispositivos de captura de imagens digitais.....	52
1.7.4 <i>Softwares</i> de análise de imagens.....	55
1.8 Confeção de dispositivos microfluídicos analíticos em papel - μ PADs	55
1.8.1 Impressão a cera.....	58
1.8.2 Dispositivos microfluídicos analíticos em papel em três dimensões –	60
3D- μ PADs	60
1.8.2.1 Empilhamento de camadas nos 3D- μ PADs.....	61
1.9 Motivação	64
2 OBJETIVOS GERAIS.....	66
2.1 Objetivos específicos	66
3 MATERIAIS & MÉTODOS.....	67
3.1 Fabricação de dispositivos microfluídicos analíticos em papel - μ PADs.....	67
3.1.1 Impressão a cera.....	67
3.1.1.1 Materiais e equipamentos.....	67
3.1.1.2 Design dos dispositivos	67
3.1.1.3 Impressão e tratamento térmico	68
3.1.2 Dispositivos em 3 dimensões.....	68
3.1.2.1 Dispositivos tridimensionais colados	68

3.1.2.2 Dispositivos tridimensionais origami unidos por aparato magnético externo.....	68
3.1.2.3 Dispositivos tridimensionais origami unidos por cliques de papel.....	69
3.1.2.4 Dispositivos tridimensionais origami unidos por grampos de papel....	70
3.2 Síntese do 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB).....	71
3.2.1 Síntese 1	71
3.2.1.1 Reagentes	71
3.2.1.2 Materiais e equipamentos.....	71
3.2.1.3 Procedimento.....	71
3.2.2 Síntese 2	72
3.2.2.1 Reagentes	72
3.2.2.2 Materiais e equipamentos.....	73
3.2.2.3 Procedimento.....	73
3.2.3 Caracterização FNAB.....	73
3.3 Ativação da superfície da celulose com FNAB	73
3.3.1 Caracterização membranas ativadas com FNAB.....	74
3.4 Oxidação da celulose com m-periodato de sódio	74
3.4.1 Reagentes.....	74
3.4.2 Materiais e equipamentos	74
3.4.3 Procedimento	74
3.4.4 Caracterização	75
3.5 Ativação da celulose oxidada com EDC / NHS.....	75
3.5.1 Reagentes.....	75
3.5.2 Materiais e equipamentos	75
3.5.3 Procedimento	75
3.6 Imobilização enzimática.....	76
3.6.1 Imobilização enzimática na celulose oxidada.....	76
3.6.1.1 Reagentes	76
3.6.1.2 Materiais e equipamentos.....	76
3.6.1.3 Procedimento.....	76
3.6.1.4 Caracterização.....	77
3.6.2 Imobilização enzimática na celulose ativada com EDC/NHS.....	78
3.6.1.1 Reagentes	78
3.6.1.2 Materiais e equipamentos.....	78
3.6.1.3 Procedimento.....	78
3.7 Análise da capacidade retentiva dos analitos	79
3.7.1 Reagentes.....	79

3.7.2 Materiais e equipamentos	79
3.7.3 Procedimento	79
3.8 Teste de estabilidade das enzimas imobilizadas nos dispositivos	80
3.8.1 Reagentes	80
3.8.2 Materiais e equipamentos	80
3.8.3 Procedimento	80
3.9 Cinética enzimática	81
3.9.1 Reagentes	81
3.9.2 Materiais e equipamentos	81
3.9.3 Procedimento	82
3.10 Dispositivos microfluídicos analíticos em três dimensões com adição de padrão	83
3.10.1 Reagentes	83
3.10.2 Materiais e equipamentos	83
3.10.3 Procedimento	83
3.11 Análise de imagens	84
3.11.1 <i>Softwares</i> comerciais de análise de imagens	84
3.11.2 <i>Software</i> para análise automatizada de imagens	85
4 RESULTADOS & DISCUSSÃO	86
4.1 Fabricação dispositivos microfluídicos analíticos em papel - μ PADs	86
4.1.1 Impressão a cera	86
4.1.2 <i>Design</i> dos dispositivos em três dimensões	96
4.1.3 Dispositivos em 3 dimensões	100
4.1.3.1 Dispositivos tridimensionais colados	100
4.1.3.2 Dispositivos tridimensionais origami unidos por aparato magnético externo	102
4.1.3.3 Dispositivos tridimensionais origami unidos por cliques de papel	103
4.1.3.4 Dispositivos tridimensionais origami unidos por grampos de papel ..	104
4.1.4 Escolha do método de união das camadas nos dispositivos em 3 dimensões	105
4.1.5 Homogeneidade dos testes	106
4.2 Modificação da Celulose	108
4.2.1 Síntese do FNAB	108
4.2.2 Funcionalização da superfície da celulose com FNAB	111
4.2.3 Oxidação da celulose com m-periodato de sódio	115
4.3 Capacidade retentiva dos analitos	117
4.4 Imobilização de enzimas na celulose oxidada	123
4.5 Testes de estabilidade	130

4.6 Cinética enzimática.....	134
4.7 Dispositivos analíticos microfluídicos em 3 dimensões com enzimas imobilizadas em celulose oxidada	143
4.8 Detecção.....	150
4.8.1 Comparação do <i>software</i> PALizer com os métodos tradicionais de análise	155
4.8.2 Funcionalidades do <i>software</i> PALizer	158
5 CONCLUSÃO.....	163
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	164
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166

1 INTRODUÇÃO

Testes diagnósticos corretos e precisos são a primeira etapa para a prevenção, o tratamento e a interrupção da transmissão de doenças. Entretanto, nos países em desenvolvimento, as tecnologias em diagnóstico necessárias não estão disponíveis para grande parte da população [1,2], sendo barreiras para se evitar a proliferação de doenças transmissíveis e para seu tratamento nos estágios iniciais. Tais dificuldades são enfrentadas tanto pelos pacientes quanto pelos provedores de serviços médico-hospitalares (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais dificuldades enfrentadas por pacientes e provedores de serviços médicos no diagnóstico de doenças

Pacientes	Provedores de serviços médicos
<ul style="list-style-type: none">• Grandes distâncias a serem percorridas até os centros médicos;• Necessidade de retornar aos centros médicos para receber resultados e tratamentos.	<ul style="list-style-type: none">• Necessidade de pessoal treinado;• Falta de equipamentos e reagentes;• Necessidade de eletricidade para acondicionar reagentes que necessitam de refrigeração;• Necessidade de eletricidade para operar equipamentos;• Grande distância dos centros distribuidores, especialmente para reagentes que necessitam de refrigeração.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de PEELING, R. W.; HOLMES, K. K.; MABEY, D.; RONALD, A. Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward. **Sexually Transmitted Infections**, v. 82, Suppl 5, p. v1–6, 2006.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os dispositivos diagnósticos destinados aos países em desenvolvimento devem ser de baixo custo (*Affordable*); sensíveis (*Sensitive*), apresentando poucos falsos-negativos;

específicos (***Specific***), gerando poucos falsos-positivos; fáceis de manipular (***User-friendly***), dispensando treinamento; rápidos e robustos (***Rapid and Robust***), sem a necessidade de armazenamento especial e disponibilizando resultados em 30 minutos ou menos; dispensar uso de equipamentos (***Equipment-free***) e serem disponíveis àqueles que necessitam (***Deliverable***), atendendo aos critérios do ***ASSURED Challenge*** [2].

A microfluídica aborda o estudo de sistemas que utilizam e processam quantidades de fluido na ordem de micro a nanolitros, em canais de dimensões reduzidas (10 a 100 μm , em uma ou duas dimensões). Devido a estes aspectos, as aplicações da microfluídica em química analítica tornam-se atrativas, devido a características como: (i) baixo consumo de amostras e reagentes, (ii) reduzido tempo de análise, (iii) separações e detecções mais efetivas e (iv) menores custos por ensaio, quando comparada com métodos em macro escala [3].

Os dispositivos analíticos microfluídicos em papel (*microfluidic paper-based analytical devices* – μPADs) são de baixo custo, de fácil manipulação, transporte e armazenamento [4], tornando seu uso atrativo na área de diagnósticos, uma vez que atendem a grande parte dos requisitos propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no *ASSURED Challenge*. Uma vantagem adicional dos dispositivos em papel é a força capilar proveniente da matriz, eliminando-se a necessidade de forças motrizes externas para o bombeamento de fluidos [4,5].

Além da área de diagnósticos, os dispositivos microfluídicos também são apropriados para uso em situações cotidianas que necessitem de rapidez, simplicidade e baixo custo, tais como o monitoramento de saúde de plantas e animais [5], o controle de qualidade de produtos alimentícios [6,7] e a qualidade da água potável [8]. Outras aplicações incluem até mesmo a detecção de explosivos e agentes de alta periculosidade em aeroportos e em operações militares [5,9,10], demonstrando a versatilidade dos dispositivos.

1.1 Origem da microfluídica em papel

A impregnação de parafina em papel para a criação de regiões hidrofóbicas data do início do século XX; contudo, o primeiro método para a criação de zonas individualizadas de reação em um dispositivo em papel apareceu em 1937 (Figura

1a) [9]. Dadas as limitações tecnológicas da época, possivelmente no que tange à análise de imagens, o uso de tais dispositivos não foi difundido. Outra hipótese a ser considerada é o do crescente interesse na década de 40 no desenvolvimento e avanço de instrumentação analítica [11], contrastando diretamente com a simplicidade dos dispositivos em papel.

Em 1949, Müller e Clegg [12] desenvolveram um “dispositivo automático de cromatografia em papel”, criando barreiras hidrofóbicas de cera em papel para delimitar um canal pelo qual o perfil de eluição da amostra poderia ser analisado, utilizando-se um feixe de radiação monocromática (Figura 1b) [9,12]. A dificuldade em se automatizar o processo de criação dos canais [9], aliado ao sucesso das demais técnicas cromatográficas são fatores que podem ter obscurecido o aparato de Müller e Clegg, o que também pode ter atrasado o desenvolvimento dos dispositivos em papel.

Figura 1 - Precursores dos dispositivos microfluídicos em papel. (a) Criação de zonas individualizadas de reação pela formação de barreiras hidrofóbicas de cera. (b) Dispositivo automático de cromatografia em papel.

Fonte: (a) YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 12, p. 2210–51, 2013.
(b) Adaptação de Morbioli (2015) a partir de MÜLLER, R. H.; CLEGG, D. L. Automatic paper chromatography. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 53, n. 5, p. 1108–1118, 1949.

A introdução dos dispositivos microfluídicos em papel, como conhecidos hoje, é atribuída ao grupo de pesquisa de George Whitesides, da Universidade de Harvard em 2007 [13–15]. As pesquisas iniciaram-se baseadas nas reações

colorimétricas desenvolvidas nos *spot tests* de Fritz Feigl [16], utilizando-se uma técnica simples para a criação de zonas individualizadas de reação, usando fotolitografia em papel cromatográfico [14].

Como é possível observar na Figura 2a, a produção científica em microfluídica vem crescendo anualmente, demonstrando a importância da temática. Na plataforma em papel observa-se a mesma tendência (Figura 2b), duas ordens de grandeza menor. Ressalta-se que as figuras representam apenas a tendência na produção científica no tema, não se tratando de um levantamento exaustivo, sendo utilizada a plataforma *Web of Science* para a obtenção dos dados. Estimativas mostram que apenas no período de 2012 a 2014 publicaram-se mais de 1000 artigos sobre μ PADs [15], dificultando-se uma revisão bibliográfica abrangente sobre o assunto.

Figura 2 - Levantamento sobre a produção científica relacionada à (a) microfluídica e à (b) microfluídica em papel, realizado em Dezembro de 2014.

(a) Plataforma: *Web of Science*, TOPIC: (microfluidic*); Refined by: RESEARCH DOMAINS: (SCIENCE TECHNOLOGY); Timespan: All years; Search language=Auto.

(b) Plataforma: *Web of Science*, Topic=(microfluidic*) AND Topic=(paper-based) Timespan=All years; Search language=Auto.

Fonte: Autoria própria.

A funcionalização e a conjugação de biomoléculas à superfície da celulose (biossensores) aparecem como um avanço necessário à tecnologia dos μ PADs, agregando-se funcionalidades distintas das apresentadas pela celulose pura.

1.2 Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na Terra. A síntese pelas plantas chega de 10^{11} a 10^{12} toneladas anuais, das quais 10^8 toneladas são utilizadas na produção de papel e $4 \cdot 10^6$ toneladas são processadas [17–19]. Isso demonstra que a celulose é subutilizada como matéria-prima passível de agregação de valor, apresentando grande potencial para aplicações na área analítica [20].

Anselme Payen, em 1838, foi o primeiro a realizar a análise elementar da celulose, determinando a fórmula empírica condensada $C_6H_{10}O_5$ e cunhando seu nome [17,18]. A celulose é um homopolímero não-ramificado e linear, constituído por unidades do hemiacetal β -D-anidroglicopiranoose (Figura 3a), unidas via ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$, formando a β -celobiose (Figura 3b) [17,18].

Figura 3 - Estrutura do (a) hemiacetal β -D-anidroglicopiranoose e da (b) β -celobiose.

Fonte: Domínio público.

A reatividade e as propriedades da celulose são função de seus grupos hidroxila e como interagem entre si: duas hidroxilas secundárias (C2 e C3) e uma hidroxila primária (C6). As ligações hidrogênio intramoleculares ocorrem entre C2-OH e C6-OH; e entre C3-OH e o oxigênio da piranose na celobiose (Figura 4a); e as ligações hidrogênio intermoleculares ocorrem entre C3-OH e C6-OH de cadeias poliméricas adjacentes (Figura 4b) [17].

Figura 4 - Representação das ligações hidrogênio na celulose. (a) Ligações hidrogênio entre resíduos de β -D-anidroglicopirranose adjacentes na β -celobiose. (b) Ligações hidrogênio entre cadeias de celulose adjacentes.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de GRANSTRÖM, Mari. **Cellulose derivatives : synthesis, properties and applications**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Faculty of Science, University of Helsinki, Helsinki, 2009.

Tais interações intra e intermoleculares conferem ao polímero resistência mecânica e insolubilidade na maioria dos solventes polares usuais (água, 2-propanona, etanol, acetonitrila) [17–19]. Para solubilizar a celulose é necessário romper suas ligações hidrogênio, o que requer um meio solvente com uma polaridade extremamente elevada, como é o caso dos líquidos iônicos, ou do sistema solvente N,N-dimetilacetamida e cloreto de lítio (LiCl/DMAC) [17,18]. Alguns outros sistemas solventes para a celulose não originam soluções verdadeiras, tal como os derivados de cobre-amônia (Figura 5) ou tartarato de ferro, e sim complexos com a celulose [17,18,21], o que pode levar a uma reatividade distinta da celulose quando das reações em meio homogêneo.

Figura 5 – Representação da formação de complexos de celulose com derivados de cobre-amônia (ressaltados em vermelho) para solubilização da celulose.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.-P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie**, v. 44, n. 22, p. 3358–93, 2005.

Além das interações inter e intramoleculares da celulose é necessário considerar como a cristalinidade da mesma afeta sua reatividade. A microestrutura da celulose nativa apresenta elevados graus de cristalinidade (60 a 80%), o que limita a acessibilidade de suas hidroxilas para reações [18]. Contudo, a celulose também apresenta regiões amorfas, as quais permitem que as reações se processem mais rapidamente, dada a maior disponibilidade dos grupos hidroxila. Considerando-se então as reações heterogêneas com celulose (tais como em folhas de papel) tem-se como resultado produtos reacionais não-uniformes [18,19,22], dificultando-se o controle dos parâmetros da reação e, conseqüentemente, o aumento de escala.

1.3 Papel

Dada a miríade de aplicações e usos do papel, prefere-se definir este material em termos de seu processo de fabricação [23]: Filtra-se rapidamente uma suspensão aquosa diluída de fibras de celulose (cerca de 1% (m/m)), obtendo-se uma rede fibrosa frágil. Esta rede é continuamente estirada através de seções de prensagem e secagem, a uma velocidade de cerca de 100 km/h [20,23]. As folhas secas são recobertas posteriormente, o que apresente influência direta nas propriedades físicas e químicas do papel, tais como resistência mecânica, porosidade, molhabilidade, propriedades ópticas e superficiais [20].

Dado o processo de fabricação descrito tem-se que o papel é um material anisotrópico: as fibras de celulose tendem a se alinhar na direção em que o papel é estirado e a distribuição de massa ao longo de sua espessura varia devido ao processo de prensagem, apresentando maior densidade no interior e menor densidade próximo às bordas [20]. Essa anisotropia pode ocasionar diferenças no transporte de fluidos dependendo da orientação do papel [20] e da distância percorrida pelo fluido, sendo mais crítico em distâncias maiores.

O papel é descrito em termos de sua espessura (τ) e de seu peso base (ω) (massa de papel seco por área). Estas propriedades são correlacionadas por meio da densidade do material (ρ_{papel}) (Equação 1) que, conjuntamente com a densidade das fibras de celulose pode ser utilizada para estimar a porosidade do papel (φ_{papel}), utilizando-se a Equação 2 [20].

$$\rho_{\text{papel}} = \frac{\omega}{\tau} \quad (1)$$

$$\varphi_{\text{papel}} = 1 - \frac{\rho_{\text{papel}}}{\rho_{\text{fibra}}} \quad (2)$$

A porosidade do papel é um parâmetro importante, pois dela dependem propriedades como capilaridade e área superficial disponível para o acoplamento com biomoléculas [20], as quais são de interesse em dispositivos microfluídicos baseados em papel.

1.4 Uso do papel em dispositivos microfluídicos

As características intrínsecas do papel tornam atrativo o uso desse material em microfluídica [20,24]:

- i) É um material de baixo custo, abundante e prontamente disponível em qualquer parte do mundo, diminuindo os custos de fabricação de dispositivos microfluídicos;

- ii) Apresenta facilidade para ser descartado, sendo biodegradável (em solos contendo as enzimas apropriadas) e facilmente incinerado, característica ideal para ensaios com amostras biológicas;
- iii) É facilmente recoberto, impregnado, impresso ou estampado, características essas que permitem distintos modos de fabricação de μ PADs;
- iv) É uma boa barreira filtrante e um bom suporte para separações cromatográficas;
- v) Possui uma estrutura porosa e uma superfície molhável, apresentando o fenômeno de capilaridade, dispensando forças motrizes externas para o bombeamento de líquidos.

Dadas as características apresentadas nota-se o motivo do papel ser uma plataforma versátil, apresentando grande potencial na área analítica / clínica e na fabricação de sensores e biossensores microfluídicos, quando acoplado com moléculas de interesse (funcionalização).

1.5 Funcionalização da celulose

A funcionalização da celulose confere ao polissacarídeo características distintas daquelas apresentadas naturalmente pelo mesmo, via incorporação de moléculas em sua superfície, constituindo o biossensor. Tal incorporação pode se dar, basicamente, via quatro métodos [20,24]: (i) imobilização física; (ii) pigmentação bioativa; (iii) acoplamento bioquímico e (iv) imobilização química. Dada essa versatilidade de métodos, cada qual com suas particularidades, ressalta-se que não há um método de imobilização ideal e universal, e sim um ou outro mais adequado para cada tipo de ensaio, considerando-se também os custos totais, o uso do dispositivo e as propriedades físico-químicas, tanto da matriz quanto das biomoléculas imobilizadas [19].

1.5.1 Imobilização física

A adição direta de reagentes na superfície da celulose para testes bioanalíticos sem a conjugação do reagente com a celulose é a maneira mais rápida e simples de se preparar um biossensor. Outra vantagem da imobilização física é a conservação da estrutura nativa de biomoléculas no substrato, devido ao fato de não haver modificações estruturais decorrentes de processos de incorporação biomolécula - celulose [19].

Contudo, a ressolubilização dos reagentes pelo solvente durante a aplicação da amostra pode remover os reagentes que estavam adsorvidos no substrato dos locais apropriados, o que pode prejudicar a etapa de detecção, principalmente nos casos em que a detecção é colorimétrica (Figura 6). Além disso, a disposição incorreta dos reagentes no dispositivo pode causar seu encobrimento nas fibras ou no interior de poros da matriz celulósica, dependendo do tamanho das moléculas dos reagentes e dos analitos, o que impossibilita que as reações de interesse ocorram [19,20,24].

Figura 6 – Exemplo de lixiviação em um processo de adição direta dos reagentes (a) Dispositivo após aplicação dos reagentes. (b) Regiões onde os reagentes foram depositados (em vermelho, realçado utilizando-se o software Photoshop®), antes da inserção da amostra. (c) Reagentes lixiviados após a adição da amostra, gerando uma coloração heterogênea na zona de detecção, sendo mais intensa próxima às paredes do dispositivo. A amostra é inserida na parte inferior do dispositivo, e chega às zonas de detecção via capilaridade.

Fonte: Autoria própria.

A imobilização física de reagentes na superfície da celulose ocorre por meio de interações intermoleculares inespecíficas entre o polissacarídeo e às moléculas dos reagentes (van der Waals, eletrostáticas ou ligação hidrogênio, dependendo do reagente) e às moléculas de água adsorvidas no substrato (ligações hidrogênio),

levando a uma orientação aleatória das biomoléculas no substrato (Figura 7a) [19,20,24]. Tais interações intermoleculares são fortemente dependentes do meio solvente que contém a amostra, principalmente no que tange à polaridade do solvente, ao pH e à força iônica. Desse modo, dependendo da matriz em que se encontra o analito de interesse (e.g. urina, a qual apresenta uma elevada força iônica dada a grande concentração de sais), pode haver remoção dos reagentes das zonas apropriadas, sendo então uma fonte de erros na etapa de detecção e alterando as figuras de mérito do processo analítico, tais como limites de detecção e quantificação [25].

Além da desvantagem da lixiviação dos reagentes dos locais apropriados, a adsorção física também apresenta como problema a diminuição da atividade enzimática com o passar do tempo. Alguns autores [19] atribuem o fenômeno à dessorção das enzimas do substrato, dadas as temporárias e fracas interações intermoleculares, sugerindo como alternativa a saturação do suporte com biomoléculas. Esta solução paliativa apresenta um custo mais elevado, além de existir a possibilidade de não ser efetiva, no caso de ser outro o efeito preponderante.

1.5.1.1 Confinamento

Uma técnica alternativa de imobilização que pode ser classificada entre a imobilização física e a pigmentação bioativa é o confinamento de biomoléculas [19]. As biomoléculas são adicionadas diretamente no suporte, tal como na imobilização física, e então o sistema é recoberto com um filme semipermeável, o qual interage com o suporte e com as biomoléculas, confinando-as e mantendo-as nos locais apropriados, evitando sua lixiviação, sendo essa uma das vantagens desse método (Figura 7b) [19].

O confinamento também pode ser realizado pela técnica de automontagem (*Layer-by-Layer* – LBL), utilizando-se (i) um polieletrólito para recobrir as biomoléculas, as quais devem apresentar carga oposta ao do polieletrólito (ajustando-se o pH do meio diferentemente de seu ponto isoelétrico) e ainda manter a atividade catalítica, ou (ii) utilizar dois polieletrólitos com cargas opostas para possibilitar a automontagem [19,26].

Ressalta-se que devido ao recobrimento é possível que os analitos não consigam permear as camadas superiores do recobrimento e alcançar as biomoléculas, por limitações na difusão. Assim, é necessário considerar a porosidade do recobrimento, a quantidade de recobrimento aplicado e o tamanho médio dos analitos ao se utilizar esta abordagem [26].

Figura 7 – Representação esquemática dos modos de imobilização física de biomoléculas na celulose. (a) Adsorção quando da adição direta de biomoléculas na celulose. (b) Confinamento de biomoléculas adsorvidas na celulose.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de CREDOU, J.; BERTHELOT, T. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 30, p. 4767, 2014.

1.5.2 Pigmentação bioativa

A pigmentação bioativa é o nome dado à técnica de se adicionar biomoléculas em partículas carreadoras, as quais podem ser impressas / depositadas diretamente na superfície do papel, ou até mesmo adicionadas durante sua fabricação [19,20]. Esta abordagem pode ser considerada como uma combinação dos demais métodos (*i.e.*, imobilização física, imobilização covalente e acoplamento bioquímico) [19],

sendo a partícula carreadora um suporte secundário para as biomoléculas de interesse, que será aplicado na matriz final.

As partículas carreadoras podem ser feitas de materiais inorgânicos e orgânicos, tais como nanopartículas de sílica ou látex de poliestireno, respectivamente [19,20,27], e a adição das biomoléculas à partícula carreadora pode ocorrer de 3 maneiras distintas: i) imobilização; ii) confinamento em rede ou iii) confinamento via encapsulamento (Figura 8) [19].

Figura 8 – Representação esquemática da pigmentação bioativa, com as partículas carreadoras adsorvidas na celulose. (a) Imobilização das biomoléculas na partícula carreadora. A imobilização pode ser realizada por adsorção, ligação covalente ou acoplamento bioquímico. (b) Confinamento de biomoléculas na partícula carreadora via estrutura em rede. (c) Confinamento de biomoléculas na partícula carreadora via encapsulamento.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de CREDOU, J.; BERTHELOT, T. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 30, p. 4767, 2014.

A imobilização das biomoléculas na partícula carreadora pode ser realizada por interações intermoleculares ou via formação de ligações covalentes entre a

biomolécula e a partícula carreadora (Figura 8a); por confinamento via uma estrutura em rede na partícula (Figura 8b) ou por confinamento via encapsulamento das biomoléculas na partícula carreadora (Figura 8c) [19], demonstrando a versatilidade da pigmentação bioativa.

A vantagem desse método é o posicionamento da partícula carreadora e das biomoléculas no substrato. A partícula carreadora apresenta um tamanho superior aos poros da matriz celulósica, ficando exposta em sua superfície. Desse modo, as biomoléculas não ficam encobertas nas fibras ou nos poros do papel, aumentando a possibilidade de entrarem em contato com a amostra contendo os analitos de interesse (dependendo do modo como as biomoléculas foram alocadas à partícula carreadora) [19].

Outra vantagem da pigmentação bioativa é a menor exposição das biomoléculas ao substrato, sendo seu microambiente químico determinado pela partícula carreadora. Uma menor sensibilidade em relação a variações no substrato é mais relevante para biomoléculas menores que apresentam maior dependência com a quantidade de água no meio, em locais sem controle de umidade [19,20].

Como desvantagens da pigmentação bioativa pode-se citar uma possível atenuação da atividade das biomoléculas, dada por limitações na transferência de massa através da estrutura em rede ou do encapsulamento [19], e uma etapa adicional (conjugação da biomolécula com a partícula carreadora), quando em comparação com a imobilização física direta.

1.5.3 Acoplamento bioquímico

Dentre os métodos de imobilização, o acoplamento bioquímico (também denominado como acoplamento por bioafinidade) é o método não-covalente que resulta em biossensores mais robustos, dados o controle da orientação da biomolécula no substrato e uma melhoria em sua estabilidade [19].

Esse método apresenta como inconveniência a necessidade de se modificar (i) o substrato e a biomolécula (Figura 9a) ou (ii) apenas a biomolécula de interesse (Figura 9b), o que requer a expressão de módulos de afinidade via técnicas de engenharia genética. Tais procedimentos são laboriosos e encarecem o processo, aumentando assim os custos da funcionalização [19].

Figura 9 – Representação esquemática do acoplamento bioquímico. (a) Modificação da biomolécula, a qual deve apresentar um módulo de afinidade em sua estrutura e modificação da celulose, ligada covalentemente a um ligante de afinidade, que interagirá com seu respectivo módulo. (b) Biomolécula modificada apresentando um domínio ligante de celulose, o qual interage especificamente com a celulose.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de CREDOU, J.; BERTHELOT, T. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 30, p. 4767, 2014.

Na primeira abordagem do acoplamento bioquímico a celulose é modificada covalentemente a um ligante de afinidade, o qual interage especificamente com seu módulo de afinidade. O módulo de afinidade, por sua vez, é inserido na biomolécula de interesse via mutação sítio-dirigida, modificação pós-traducional, ou por tecnologia de fusão de proteínas, em locais específicos da biomolécula, justificando a orientação preferencial no biossensor [19].

Na segunda abordagem o substrato não sofre nenhuma modificação, uma vez que o domínio ligante de celulose ligado à biomolécula é um domínio proteico retirado de celulasas. Esses domínios proteicos fazem com que o substrato celulósico esteja disponível para a celulase, o que explica a ligação espontânea domínio proteico – celulose e a orientação preferencial das biomoléculas no biossensor [19].

Outra característica do acoplamento bioquímico é a reversibilidade da imobilização por não haver formação de ligações covalentes entre a biomolécula e o substrato, ainda que a biomolécula esteja covalentemente acoplada ao módulo de afinidade. Assim, dependendo da aplicação desejada, é possível regenerar as biomoléculas em solução, podendo até mesmo o acoplamento bioquímico ser utilizado como um mecanismo de purificação de biomoléculas [19]. Por outro lado, devido ao fato da ligação não ser covalente, matrizes complexas podem causar a dessorção das biomoléculas do substrato, assim como na imobilização física [19].

1.5.4 Imobilização química

A imobilização química de biomoléculas via formação de ligações covalentes com o substrato evita a lixiviação dos reagentes dos locais de interesse, sendo um dos métodos de imobilização mais estável e uniforme [19,24] quando comparado com os demais. As vantagens do método de imobilização química de enzimas na celulose vão desde a reutilização da enzima em reatores e processos industriais [19] até aspectos relevantes para aplicações bioanalíticas, tais como a conservação da atividade enzimática por um tempo prolongado [26,28,29]; aumento na faixa de pH útil da enzima e aumento na estabilidade térmica [28,29].

A utilização de biomoléculas imobilizadas na celulose para aplicações em dispositivos microfluídicos requer a conservação das propriedades mecânicas do papel, o que inviabiliza a solubilização da celulose para reações em meio homogêneo – caso o suporte de imobilização seja diretamente a membrana de celulose. Assim, as reações de modificação da superfície da celulose em meio heterogêneo tornam-se atrativas.

Contudo, dadas suas interações intra e intermoleculares, as membranas de celulose apresentam poucos grupos funcionais disponíveis para a conjugação direta

de biomoléculas em sua superfície – em especial, ácidos carboxílicos provenientes de oxidações ocasionais em C6 ou extremidades redutoras (aldeídos) – sendo necessário modificar sua superfície com outros grupos funcionais para uma subsequente reação com as moléculas de interesse. A Figura 10 representa algumas das modificações possíveis do substrato celulósico para a imobilização covalente de biomoléculas em sua superfície [19].

Figura 10 – Representação esquemática de algumas estratégias de modificação da celulose para a imobilização covalente de biomoléculas (modificações em vermelho; produto de interesse em verde).

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de CREDOU, J.; BERTHELOT, T. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 30, p. 4767, 2014.

As reações heterogêneas, entretanto, apresentam como desvantagens menores velocidades e menor regiosseletividade (em algumas reações), quando comparadas com reações em solução, devido a limitações na acessibilidade dos reagentes aos grupos funcionais do substrato [17].

Alguns métodos de modificação da celulose envolvem reações com suas hidroxilas, usando-se brometo de cianogênio [30], triazinas [31], 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) [32] e epicloridrina [33]. Estes reagentes apresentam elevada toxicidade e a inconveniência de necessitar de ambientes anidros, elevando o número de etapas e o tempo necessário para realizar a modificação [28].

O acoplamento de outras moléculas bifuncionais como pontes entre a celulose e a biomolécula a ser conjugada pode servir como alternativa aos métodos tradicionais de modificação, apresentando como vantagens condições reacionais menos severas, reações mais rápidas e um menor número de etapas [20,24,28], caso as moléculas bifuncionais estejam disponíveis comercialmente. A ativação fotoquímica da celulose com 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB) é um método versátil de modificação da celulose com um reagente em ponte, sendo realizado em etapa única [28,34,35].

Outro método de modificação da celulose que não envolve reagentes anidros e pode ser realizado em uma etapa é a oxidação com m-periodato de sódio [36–38], originando o 2,3-dialdeído-celulose, o qual pode acoplar diretamente a biomolécula de interesse, com posterior redução a amina secundária [38], ou ser modificada adicionalmente para succinimidil-éster, utilizando-se 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS), sofrendo uma transamidificação na presença da biomolécula de interesse, gerando uma amida [37], sendo abordagens adequadas para a funcionalização da celulose visando ensaios bioanalíticos.

A funcionalização da celulose com biomoléculas apresenta como vantagem a diminuição de interferência humana nos ensaios bioanalíticos, uma vez que os reagentes necessários aos ensaios são armazenados diretamente nos biossensores, de maneira que o usuário apenas insere a amostra no dispositivo e coleta o resultado.

1.6 Biossensores

Um biossensor eficiente em uma plataforma em papel deve exercer, basicamente, duas atividades principais: reconhecimento biológico e sinalização. O reconhecimento biológico é a capacidade de uma biomolécula (enzima, anticorpo,

aptâmero de DNA) reconhecer e interagir com a molécula-alvo (substrato, antígeno, DNA). Quanto mais específico o biossensor, mais robusto é o teste. Já a sinalização está relacionada com a indicação do fenômeno de reconhecimento biológico, na qual algum sinal é gerado após a interação biossensor - alvo [20], tais como cor [4], fluorescência [39] ou corrente elétrica [40].

Os bioensaios mais utilizados nas plataformas em papel envolvem enzimas da família óxido-redutase, que catalisam a transferência de elétrons de uma molécula a outra, permitindo detecção tanto amperométrica quanto colorimétrica. A utilização de reações colorimétricas em biossensores é de interesse para os dispositivos microfluídicos em papel [1,5,41–44], dada a menor instrumentação necessária para obtenção dos resultados, quando comparada com técnicas analíticas instrumentais, tais como espectrometria de massas (EM), atendendo também aos requisitos do **ASSURED Challenge** [2].

Dada a variedade de aplicações em diagnósticos clínicos [13,45], os testes enzimáticos tornam-se modelos relevantes de biossensores para aplicações em plataformas em papel, além da quantidade de informação disponível sobre esses sistemas – em especial, a determinação de glicose pelo sistema glicose oxidase / peroxidase [1,5,29,37,45–48].

1.6.1 Glicose oxidase

A glicose oxidase (EC 1.1.3.4) é uma enzima da família das óxido-redutases, mais especificamente das flavoproteínas-oxidases, a qual catalisa a oxidação da β -D-glicose à δ -glucolactona (Equação 3), concomitantemente à redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (Equação 4) [49–51]. A δ -glucolactona pode atuar como um inibidor competitivo da glicose oxidase; contudo, em solução, essa espécie hidrolisa-se espontaneamente a ácido glucônico, desocupando assim o sítio ativo da enzima [50].

A glicose oxidase é composta por 2 subunidades monoméricas idênticas, cada uma unida fortemente a um cofator enzimático flavina adenina dinucleotídeo (FAD) – mas não de maneira covalente [49,50] – os quais são os responsáveis por catalisar as reações descritas nas Equações 3 e 4. É uma proteína globular alongada, com diâmetro médio de 8 nm, e massa molecular na faixa de 151 a 186 kDa, composta por 583 resíduos de aminoácidos, sendo precedida por uma sequência de 22 aminoácidos [49,50]. Desses resíduos, a enzima apresenta oito possíveis sítios para N-glicosilação por monômero [50], os quais são relevantes tanto para modificações pós-traducionais quanto para imobilizações em substratos de interesse.

A respeito de sua atividade catalítica, a glicose oxidase obtida a partir do fungo *Aspergillus niger* possui ampla faixa de trabalho de pH ($4 < \text{pH} < 7$), apresentando máxima atividade em pH = 5,6, e uma constante de Michaelis-Menten $K_M = 15 \text{ mM}$, à 30 °C (na presença de catalase para remover o peróxido de hidrogênio formado) [52].

A aplicação descrita como mais relevante da glicose oxidase é na área de diagnósticos clínicos, para a determinação de glicose em sangue total, soro, plasma ou urina [49–52], ainda que também possa ser utilizada como conservante em alimentos e para a produção de ácido glucônico [45,50]. O baixo custo de obtenção da enzima, associado a sua estabilidade e especificidade – quando comparada a outros sistemas (Tabela 2) [53] – são fatores que podem ter colaborado com a popularidade dessa enzima para os diagnósticos clínicos [1,5,37,45–50,52,54,55].

Tabela 2 – Especificidade da glicose oxidase e da hexoquinase

Taxas reacionais relativamente à reação com β-D-glicose como substrato (em %)		
Substrato	Glicose oxidase	Hexoquinase
β-D-glicose	100	100
2-desóxi-D-glicose	25	100
D-manose	1,0	80
D-xilose	1,0	0
α-D-glicose	0,6	-
Trealose	0,3	0
Maltose	0,2	0
D-altrose	0,2	0,3
D-galactose	0,1	0
Frutose	-	180

Fonte: CARR, P. W.; BOWERS, L. D. **Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry**. In: ADVANCES in biochemical engineering. New York: John Wiley, 1980. v. 15, p. 89-129.

1.6.2 Peroxidase

A peroxidase (EC 1.11.1.7) é uma ferroporfirina da família das óxido-redutases, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à água (Equação 5), com a concomitante oxidação de um agente redutor (Equações 6 a 8) [56,57]. No esquema apresentado nas Equações 5 a 8, HRP refere-se à *Horseradish Peroxidase*, uma peroxidase extraída da raiz da *Armoracia rusticana*, em seu estado nativo; HRP-I e HRP-II referem-se a estados intermediários da enzima, os quais apresentam valências distintas do centro metálico (Fe) do anel porfirínico; DH₂ refere-se ao agente redutor em seu estado reduzido; DH[•] é o estado semi-oxidado do agente redutor e P refere-se ao agente redutor em seu estado oxidado [56,57].

Ao contrário da glicose oxidase, a peroxidase é composta por uma cadeia polipeptídica única com 308 resíduos de aminoácidos (33.890 Da), além de um elevado conteúdo de carboidratos (9.400 Da) e de íons Ca^{2+} (≈ 700 Da) resultando em uma holoenzima com uma massa de ≈ 44 kDa [56,57].

Os íons Ca^{2+} da enzima não participam de sua atividade catalítica, mas acredita-se que sejam os responsáveis pelo incremento em sua estabilidade térmica [56]. Além dessa propriedade, a HRP também apresenta uma faixa de trabalho de pH maior que a glicose oxidase ($5 < \text{pH} < 9$), com um pH ótimo na região 6,0 – 6,5 [58]. O modelo de ação dessa enzima não apresenta nenhum intermediário do tipo Michaelis-Menten, por se tratar de uma enzima alostérica, formando complexos de adsorção com o substrato doador (agente redutor) [59]; entretanto, uma estimativa da constante de Michaelis-Menten para a reação de decomposição do peróxido de hidrogênio na presença de iodeto de potássio como agente redutor apresentou valores de $K_M = 0,004$ mM [58]. A eficiência catalítica da peroxidase explica a utilização dessa enzima acoplada a outros processos enzimáticos [48,60–62], uma vez que tais reações são limitadas pela formação do peróxido, ao invés de seu consumo.

1.7 Detecção

Os agentes redutores comumente utilizados conjuntamente com a peroxidase apresentam colorações distintas nas formas reduzido/oxidado, podendo ser utilizados como indicadores redox em detecções colorimétricas [1,5,41–44]. Para os dispositivos microfluídicos analíticos em papel, as características desejadas para esses cromóforos são:

- i) Não apresentar coloração na forma reduzida;
- ii) Exibir mudança intensa de coloração;
- iii) Manter a coloração por tempo o suficiente para o dispositivo ser digitalizado ou fotografado;
- iv) Apresentar baixa ou nenhuma toxicidade.

Contudo, um indicador redox que atenda a todos esses requisitos não é comum, fazendo com que se busquem alternativas para maximizar as potencialidades desse sistema. Uma das possibilidades é a combinação de indicadores [63–65], com o intuito de se aumentar a sensibilidade dos ensaios. Essa abordagem deve ser realizada com cautela, entretanto, uma vez que os indicadores são utilizados em excesso e, dependendo da diferença do potencial padrão de redução das espécies, pode haver reações competitivas, as quais podem interferir na detecção da reação de interesse. Os indicadores redox mais comuns estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 – Indicadores redox mais utilizados nos testes enzimáticos envolvendo peroxidase

Indicador	Forma reduzida	Forma oxidada	E ⁰ (V)	Ref.
Iodeto de potássio (KI)	I^- $\lambda_{\max} = 193 \text{ nm}$ $\epsilon_{193} = 1,42 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\lambda_{\max 2} = 226 \text{ nm}$ $\epsilon_{226} = 1,34 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	I_3^- $\lambda_{\max} = 353 \text{ nm}$ $\epsilon_{353} = 2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\lambda_{\max 2} = 287,5 \text{ nm}$ $\epsilon_{287} = 4,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$I_3^- + 2e^- \rightleftharpoons 3I^-$ $E^0 = 0,35 \text{ V}$	[66,67]
ABTS (Ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))	$\lambda_{\max} = 340 \text{ nm};$ $\epsilon_{340} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$ $\epsilon_{414} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\lambda_{\max 2} = 340 \text{ nm}$ $\epsilon_{340} = 5,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$A^{2+} + e^- \rightleftharpoons A^+$ $E^0 = 0,472 \text{ V}$ $A^+ + e^- \rightleftharpoons A$ $E^0 = 0,885 \text{ V}$	[68,69]
TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina)	$\lambda_{\max} = 285 \text{ nm}$ $\epsilon_{285} = 2,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$ $\epsilon_{370} = 7,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	(Não disponível)	[70,71]
O-dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina)	(Não absorve no visível)	$\lambda_{\max} = 454 \text{ nm}$ $\epsilon_{454} = 3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\lambda_{\max 2} = 510 \text{ nm}$ $\epsilon_{510} = 2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$D^{2+} + 2e^- + 2H^+ \rightleftharpoons DH_2$ $E^0 = 0,75 \text{ V}$ (em H ₂ SO ₄ 0,1 M)	[72]
O-fenilenodiamina	$\lambda_{\max} = 289 \text{ nm}$ ϵ_{289} (Não disponível)	$\lambda_{\max} = 417 \text{ nm}$ $\epsilon_{417} = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$A + 2e^- + 2H^+ \rightleftharpoons BH_2$ $E^0 = 0,360 \text{ V}$	[73,74]

Fonte: Autoria própria.

1.7.1 Análise de ensaios colorimétricos

Os *spot tests* e testes de fluxo lateral baseados em reações colorimétricas podem ser analisados por três maneiras distintas [15]:

- i) Testes qualitativos, nos quais uma mudança na coloração é indicativo da presença do analito de interesse, comparando-se a zona de teste com a zona controle, sendo obtidas apenas respostas SIM / NÃO (ou inconclusivo) [9,75];
- ii) Testes semi-quantitativos, nos quais a intensidade da mudança de coloração é comparada com uma escala conhecida e pré-determinada, obtendo-se uma estimativa da faixa de concentração do analito na amostra [9];
- iii) Testes quantitativos, na qual uma curva analítica deve ser estabelecida, interpolando-se o resultado (curva analítica externa) [4,9] ou extrapolando-se o resultado (curva analítica de adição de padrão) [47], obtendo-se a quantidade de analito presente na amostra.

Dentre as opções de análise apresentadas, os testes qualitativos e semi-quantitativos não necessitam de equipamentos para fornecer resultados, sendo os mesmos obtidos visualmente [9]. Os testes quantitativos, entretanto, necessitam de instrumentação e tratamento de dados para fornecer a informação desejada, seja a partir de equipamentos específicos, como espectrofotômetros de refletância difusa, seja a partir de instrumentos do cotidiano, como dispositivos de captura de imagem digital.

1.7.2 Espectroscopia de refletância difusa na análise de *spot tests*

Após a geração de cor pela oxidação dos indicadores redox, a detecção colorimétrica pode ser realizada via quatro métodos distintos: (i) absorção, (ii) emissão, (iii) espalhamento ou (iv) reflexão da radiação [76]. O uso da espectroscopia de absorção no ultravioleta – visível é um método de rotina em laboratórios analíticos, dado o baixo custo de aquisição e operação dos espectrofotômetros, além da versatilidade da técnica.

Contudo, para a análise de *spot tests* a espectroscopia de absorção apresenta várias limitações, como (i) presença da matriz celulósica, a qual contribui

com o espalhamento da radiação; (ii) ausência de um caminho óptico bem-definido, pela anisotropia do papel; (iii) dificuldades encontradas ao se tentar igualar o índice de refração do papel pela adição de solventes, ainda que, para este último, existam alternativas de baixo custo para o uso dessa técnica na detecção em ensaios colorimétricos em dispositivos microfluídicos em papel [43].

A espectroscopia de refletância difusa, por outro lado, não foi considerada uma técnica apropriada para análises quantitativas em *spot tests* até os anos 2000 [76], dadas as baixas precisões relativas pela não homogeneidade das manchas sobre os *spots* e pelas limitações tecnológicas nos dispositivos ópticos [76]. Com o avanço da tecnologia nos componentes ópticos e o crescente interesse em métodos analíticos com baixo consumo de solvente / amostra, além de rapidez e simplicidade, a espectroscopia de refletância difusa vem sendo utilizada para a análise quantitativa de metais em solos [77] e princípios ativos em fármacos [76], apresentando grande potencialidade como método de detecção nos dispositivos analíticos microfluídicos em papel [76].

1.7.3 Dispositivos de captura de imagens digitais

Apesar da portabilidade e baixo custo – relativamente a outros sistemas analíticos – os espectrofotômetros de refletância difusa são equipamentos laboratoriais, de modo que não seria um método de detecção adequado para testes diagnósticos realizados diretamente no local (*Point-of-Care testing* – POCT). De acordo com a OMS no **ASSURED Challenge** [2], a disponibilidade de equipamentos para a obtenção de resultados não pode constituir uma barreira à realização de testes diagnósticos, sugerindo-se então que outro método de detecção seria mais adequado à obtenção de resultados nos μ PADs.

Uma alternativa viável ao uso dos espectrofotômetros de refletância difusa seria o uso de *scanners*, câmeras digitais, telefones celulares com câmera ou outros dispositivos de captura de imagens digitais, como uma particularização dos fundamentos da técnica de espectroscopia de refletância difusa. Estimativas indicam que ao fim do ano de 2015 o número de telefones celulares se igualará ao número de pessoas no planeta (Figura 11) [78,79], demonstrando que essa tecnologia de amplo alcance pode ser utilizada como método de detecção nos μ PADs.

Figura 11 – Estatísticas das pessoas com acesso à telefonia celular e à internet, frente à população mundial. É possível estimar que ao fim de 2015 o número de pessoas com acesso à telefonia celular se igualará à população mundial, demonstrando o alcance dessa tecnologia.

(População mundial) UNITED STATES CENSUS BUREAU. *International Data Base. World population*. 2013. Disponível em: http://www.census.gov/population/international/data/worldpop/table_population.php>. Acesso em: 09 mar. 2015.

(Pessoas com acesso à telefonia celular e acesso à internet) INTERNATIONAL TELECOMMUNICATION UNION (ITU). *Global ICT developments*. 2014. Disponível em: <http://www.itu.int/en/ITU-D/Statistics/Pages/stat/default.aspx>>. Acesso em: 09 mar. 2015.

Fonte: Autoria própria.

Os *scanners* e as máquinas de fotografia digital compartilham o mesmo sistema de detecção com os espectrofotômetros de refletância difusa: dispositivos de carga acoplada (*Charge-Coupled Device* – CCD) ou sensores de contato de imagem (*Contact Image Sensor* – CIS), o que possibilita que se utilizem esses equipamentos eletrônicos como ferramentas de detecção [80,81]. Uma das

diferenças entre o espectrofotômetro e os outros dispositivos de captura de imagens digitais reside na presença de grades de difração e/ou prismas no primeiro, com o intuito de separar os comprimentos de onda da radiação incidente, enquanto que no segundo focaliza-se a radiação incidente com lentes através de filtros, com comprimentos de onda centrados aproximadamente em 630 nm (vermelho), 530 nm (verde) e 450 nm (azul), formando o sistema de cores RGB [80]. Isso explica a maior resolução espectral dos espectrofotômetros, em comparação com os dispositivos de captura de imagem (Figura 12).

Figura 12 – Espectro eletromagnético na região do visível (380 a 760 nm), destacando-se as bandas dos filtros padrão no sistema RGB.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de POCE-FATOU, J. A.; BETHENCOURT, M.; MORENO-DORADO, F. J.; PALACIOS-SANTANDER, J. M. Using a flatbed scanner to measure detergency: A cost-effective undergraduate laboratory. **Journal of Chemical Education**, v. 88, p. 1314–1317, 2011.

É relevante também observar a tendência no aumento do número de pessoas com acesso à internet (Figura 11), demonstrando que apesar da popularização dessa tecnologia, ela ainda não está disponível para metade da população mundial, principalmente nas regiões em desenvolvimento [79]. Tal fato sugere que, apesar dos benefícios e facilidades da telemedicina [82], regiões sem acesso à internet ou

com limitação de recursos podem não ser beneficiadas pelos dispositivos diagnósticos μ PADs, justamente onde teriam maior impacto na saúde local. Assim, soluções que não requerem o envio de imagens para um especialista *off-site* – via internet ou *Multimedia Messaging Service* (MMS) – apresentam vantagens sobre aquelas que requerem [4], em termos de economia de tempo, capital e recursos humanos. Assim, os métodos automatizados de análise de imagens aparecem como alternativa ao envio de informações para um especialista *off-site*.

1.7.4 Softwares de análise de imagens

Após a digitalização dos *spot tests* é necessário extrair da imagem as informações necessárias à construção das curvas analíticas, nos termos das componentes RGB, CMYK ou outro código de cores [5,15,80,81,83]. A análise das imagens é comumente realizada de maneira manual, utilizando-se *softwares* comerciais de análise e tratamento de imagens, tais como o Adobe Photoshop® [5,84–86] e o Corel Photo-paint® [37,83], ou *softwares* gratuitos, como o ImageJ [1,83,87,88].

A análise manual de imagens, entretanto, é um processo laborioso e demorado, sujeito a falhas. Uma maneira de se minimizar tais problemas é a utilização de *softwares* automatizados para a análise de imagens [89–93], os quais possibilitam uma análise mais uniforme e rápida, com menor interferência humana. Contudo, as publicações que apresentam a funcionalidade de tais *softwares* não os disponibilizam para pronto *download* [89–91,93], ou então requerem o conhecimento de alguma linguagem de programação para implantar as funções desejadas [92], evidenciando assim as necessidades e oportunidades na área.

1.8 Confecção de dispositivos microfluídicos analíticos em papel - μ PADs

Os primeiros métodos de confecção dos μ PADs utilizavam a fotolitografia para criar barreiras hidrofóbicas seletivamente no papel, de maneira a direcionar o fluxo de solvente no dispositivo e criar zonas de reação individualizadas [4,5,13,14]. Desde então, diferentes métodos foram propostos com esse objetivo, cada um com suas particularidades. Assim como para a funcionalização da celulose [19], ressalta-

se que não há um método ideal para a fabricação de microdispositivos, e sim aquele que mais se adequa à instrumentação disponível e à aplicação dos microdispositivos. A Tabela 4 apresenta os métodos de confecção de dispositivos microfluídicos em papel mais consolidados na literatura [13].

Tabela 4 - Comparação entre as principais técnicas de confecção de μ PADs

Técnica	Princípio	Abordagem	Vantagens	Desvantagens	Ref.
Fotolitografia	Bloqueio de poros no papel	Hidrofobização total seguida de desidrofobização parcial	Canais hidrofílicos com grande resolução	Equipamento de alto custo; Lavagens adicionais necessárias	[94]
Plotagem	Bloqueio de poros no papel	Hidrofobização seletiva	Agente modificador de baixo custo; Dispositivos flexíveis	Baixa definição da barreira; Rendimento baixo	[95]
Gravura com tinta	Deposição de reagente nas fibras	Hidrofobização total seguida de desidrofobização parcial	Requer apenas um aparato para criar canais e depositar reagentes	Necessita 10 ciclos de impressão; Equipamento customizado; Inadequado para produção em massa	[96]
Tratamento com plasma	Modificação química da fibra	Hidrofobização total seguida de desidrofobização parcial	Agente modificador de baixo custo	Requer máscaras distintas	[97]
Impressão com cera	Deposição de reagente nas fibras	Hidrofobização seletiva	Agente modificador de baixo custo; Produção em massa	Requer impressora à cera; Requer ciclo térmico adicional	[98]
Carimbagem	Deposição de reagente nas fibras	Hidrofobização seletiva	Agente modificador de baixo custo; Produção em massa	Requer um molde em metal, capaz de produzir apenas um modelo; Requer ciclo térmico adicional	[37]
Impressão com tinta	Modificação química da fibra	Hidrofobização seletiva	Agente modificador de baixo custo; Produção em massa	Requer impressora modificada; Requer ciclo térmico adicional	[99]
Flexografia	Deposição de reagente nas fibras	Hidrofobização seletiva	Pode utilizar moldes pré-existent; Não necessita ciclos térmicos	Necessita 2 ciclos de impressão e moldes distintos; Qualidade depende do papel	[100]
Serigrafia	Deposição de reagente nas fibras	Hidrofobização seletiva	Processo simples	Baixa resolução dos canais; Requer máscaras distintas	[101]
Tratamento a laser	Bloqueio de poros no papel	Hidrofobização total seguida de desidrofobização parcial	Canais hidrofílicos com grande resolução	Canais não permitem fluxo lateral; Requer recobrimento extra	[102]

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de LI, X.; BALLERINI, D. R.; SHEN, W. A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. **Biomicrofluidics**, v. 6, n. 1, p. 11301–1-11301-13, 2012.

Pela disponibilidade de uma impressora à cera e a versatilidade e rapidez do método [98], optou-se pela impressão com cera como método de confecção dos μ PADs.

1.8.1 Impressão a cera

Os fundamentos de impressão a cera são os mesmos de impressoras a jato de tinta piezoelétricas, com as vantagens de não haver entupimento de tinta na cabeça de impressão; não haver espalhamento de tinta sobre a superfície do papel e de não haver tempo de espera para a tinta secar [103]. A Figura 13 apresenta os principais componentes de uma impressora a cera da Xerox®, pioneira na tecnologia de impressão com tinta sólida [103].

Figura 13 – Principais componentes de uma impressora a cera.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de JAEGER, C. W. **How does a solid ink printer work?** 2000. Disponível em: <http://www.imaging.org/ist/resources/tutorials/solid_ink.cfm>. Acesso em: 01 jan. 2015.

Os bastões de tinta sólida passam por uma zona de fusão, liquefazendo-se. A tinta liquefeita é armazenada na cabeça de impressão, onde os bicos de injeção operam por efeito piezoelétrico. Diferentemente das impressoras comuns, nas quais a tinta é depositada diretamente no papel, na impressão a cera a tinta é depositada

sobre um rolo cilíndrico de alumínio anodizado (Figura 14), formando uma imagem especular do objeto a ser impresso [103,104].

Por fim, o papel pré-aquecido é colocado em contato com o rolo de transferência, e a imagem especular é transferida ao papel na orientação apropriada [103,104].

Figura 14 – Formação da imagem especular sobre o rolo de transferência, via jatos de cera liquefeita a partir da cera sólida.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de JAEGER, C. W. **How does a solid ink printer work?** 2000. Disponível em: <http://www.imaging.org/ist/resources/tutorials/solid_ink.cfm>. Acesso em: 01 jan. 2015.

Figura 15 – Transferência da imagem espelhada do rolo de transferência à folha de papel.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de JAEGER, C. W. **How does a solid ink printer work?** 2000. Disponível em: <http://www.imaging.org/ist/resources/tutorials/solid_ink.cfm>. Acesso em: 01 jan. 2015.

A vantagem da impressão a cera como método de produção de μ PADs é a velocidade de impressão (24 páginas por minuto), menor custo de impressão quando comparada com outros métodos (uso contínuo), além da versatilidade quanto à gramatura de papéis suportados, imprimindo normalmente em papel cromatográfico Whatman[®] n.º. 1 [104], sendo considerado um método ideal para prototipagem de microchips em papel – da concepção do design ao chip finalizado em menos de 5 minutos [98].

1.8.2 Dispositivos microfluídicos analíticos em papel em três dimensões – 3D- μ PADs

Os dispositivos microfluídicos em papel em três dimensões consistem no empilhamento de camadas de microchips de papel confeccionados individualmente

[5,64,105–110], e aparecem como a evolução dos chips em uma única folha de papel [1,26,47,96,98,111–117], uma vez que:

- i) Permitem o tratamento individualizado das camadas, evitando que haja contato dos reagentes antes do momento apropriado, tal como em curvas de adição de padrão [47];
- ii) Dispersam a amostra de dezenas a milhares de vezes, favorecendo testes multiplexados [5];
- iii) Encapsulam as camadas intermediárias, assegurando o armazenamento de reagentes mais eficientemente, sem a necessidade de recobrimento com toner [118];
- iv) Possibilitam a pré-concentração de analitos [15], com eluição diretamente no mesmo dispositivo;
- v) Permitem etapas de preparo de amostra no próprio dispositivo, tais como separação e lavagem [105]

As camadas dos 3D- μ PADs devem ser alocadas no dispositivo de maneira a se estabelecer o contato entre as zonas hidrofílicas de camadas adjacentes, permitindo que o fluxo de fluido permeie através do dispositivo e chegue até as zonas apropriadas.

1.8.2.1 Empilhamento de camadas nos 3D- μ PADs

As abordagens utilizadas para o empilhamento de camadas nos 3D- μ PADs podem ser divididas em duas categorias: (i) métodos irreversíveis, nos quais após a união das camadas não pode haver a separação das mesmas, sem danificar o dispositivo (Figura 16) [5,64,107,119,120]; e (ii) métodos reversíveis, podendo haver separação das camadas sem danos ao dispositivo (Figura 17) [105,109,110,121].

Figura 16 – Métodos irreversíveis de união de camadas adjacentes. (a) Colagem entre camadas utilizando-se fita dupla face e pó de celulose. (b) Colagem entre camadas com spray adesivo. (c) Colagem entre camadas utilizando-se toner como adesivo.

Fonte: (a) Adaptação de Morbioli (2015) a partir de MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 50, p. 19606–11, 2008.

(b) Adaptação de Morbioli (2015) a partir de LEWIS, G. G.; DITUCCI, M. J.; BAKER, M. S.; PHILLIPS, S. T. High throughput method for prototyping three-dimensional, paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 15, p. 2630–3, 2012.

(c) Adaptação de Morbioli (2015) a partir de SCHILLING, K. M.; JAUREGUI, D.; MARTINEZ, A. W. Paper and toner three-dimensional fluidic devices: programming fluid flow to improve point-of-care diagnostics. **Lab on a Chip**, v. 13, p. 628–31, 2013.

Figura 17 – Métodos reversíveis de união de camadas adjacentes. (a) Dispositivo unido com garra, sendo este qualquer aparato (descartável ou não) que aplique uma pressão em alguma extremidade do dispositivo. (b) Dispositivo unido com aparato externo, o qual aplica uma pressão uniforme por todo o dispositivo, sendo o aparato externo não descartável.

Fonte: (a) Adaptação de Morbioli (2015) a partir de WANG, P.; GE, L.; YAN, M.; SONG, X.; GE, S.; YU, J. Paper-based three-dimensional electrochemical immunodevice based on multi-walled carbon nanotubes functionalized paper for sensitive point-of-care testing. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 32, n. 1, p. 238–43, 2012.

(b) Adaptação de Morbioli (2015) a partir de LIU, H.; CROOKS, R. M. Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 17564–17566, 2011.

Dentre os métodos apresentados – e suas variantes – tem-se que o uso da fita dupla face é o procedimento mais laborioso e menos indicado para a produção em massa de 3D- μ PADs, uma vez que é necessário alinhar e perfurar as camadas de fita com as regiões hidrofílicas das camadas de papel, preenchendo os furos com celulose em pó, produzindo-se um dispositivo por vez em processos de difícil automação [5]. Por outro lado, o uso de adesivo em *spray* é o método mais indicado para a produção de dispositivos em série, pois o alinhamento das bordas de folhas

adjacentes alinha todos os dispositivos de uma só vez, além de não haver etapas de perfuração de fita e adição de celulose em pó [107].

Os microchips com camadas unidas reversivelmente, também conhecidos como μ PADs origami, em alusão ao método de dobraduras japonês [110], apresentam como vantagem a eliminação de camadas adicionais de fita e de etapas durante seu fabrico, e são mais utilizados quando se deseja realizar algum procedimento em etapas [105] ou estudar o *design* do dispositivo na dispersão de fluidos, facilitando-se a análise pós-ensaio.

1.9 Motivação

A minimização do preparo de amostras é uma das principais motivações no desenvolvimento de tecnologias de testes diagnósticos, visando-se minimizar seus erros [122] e, dessa forma, aperfeiçoar a fabricação de dispositivos baseados em papel, diminuindo-se os tempos de análise e dispensar a necessidade de especialistas no local de análise.

Alguns métodos propostos para análise de sangue sugerem a amostragem realizada fora do local de análise (*off-site*): O próprio usuário coleta a amostra de sangue em um cartão, e a envia ao laboratório de análise [123]. O responsável recorta as amostras do cartão e inicia um procedimento de extração por solventes, para só depois dar início à análise. Tal procedimento apresenta como inconvenientes a possibilidade de degradação dos analitos de interesse; a descaracterização da amostra, a contaminação durante o transporte e extração, além da impossibilidade de se enviar amostras biológicas pelos serviços postais.

A análise realizada diretamente no local (*Point-of-Care testing* – POCT) não apresenta tais inconvenientes, e tem como vantagem a possibilidade de se realizar a análise do resultado *off-site*, por meio da telemedicina [1,4], ou de se obter o resultado instantaneamente com o auxílio de programas específicos [89–93], eliminando-se a necessidade de um analista.

Ao se funcionalizar a superfície da celulose com enzimas e gerar uma curva analítica diretamente em cada dispositivo é possível eliminar a necessidade do transporte de reagentes que necessitam de refrigeração, além de aumentar o tempo

de vida útil dos dispositivos, características essas necessárias em locais remotos e com limitações de equipamentos e/ou energia elétrica [2].

Os μ PADs possibilitam a realização de ensaios com resultados qualitativos, semi-quantitativos ou quantitativos rapidamente, com baixa ou nenhuma instrumentação requerida, diminuindo-se os custos do processo analítico; o consumo de amostra e o tempo de espera para obtenção de resultados, além de facilitar a incorporação dos testes rápidos para diagnósticos em regiões carentes, zonas rurais e países em desenvolvimento, facilitando assim o direcionamento clínico dos pacientes.

2 OBJETIVOS GERAIS

Modificar a superfície da celulose em papel cromatográfico, de maneira a imobilizar enzimas no papel. Após a funcionalização da matriz celulósica, construir dispositivos microfluídicos baseados em papel em três dimensões, avaliando-se o *design* e a funcionalidade do dispositivo. Construir curvas analíticas de adição de padrão de glicose nos dispositivos 3D, e automatizar o método de análise de imagens para a obtenção das curvas.

2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar o 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB);
- Modificar a celulose (i) utilizando o FNAB, via uma reação de inserção, ativando sua superfície;
- Oxidar a superfície da celulose (ii) com m-periodato de sódio;
- Ativar a celulose oxidada (iii) com EDC/NHS;
- Imobilizar as enzimas glicose oxidase e peroxidase na celulose modificada (i,ii,iii);
- Construir dispositivos microfluídicos tridimensionais em papel, utilizando a impressão em cera para criação das barreiras hidrofóbicas, avaliando-se diferentes *designs*;
- Construir dispositivos microfluídicos funcionais com a celulose contendo as enzimas imobilizadas, para realizar os testes enzimáticos;
- Montar curvas analíticas de adição de padrão nos dispositivos tridimensionais com a celulose contendo as enzimas;
- Realizar ensaios bioanalíticos nos μ PADs, quantificando-se glicose em distintas concentrações.
- Automatizar o método de análise de imagens nos microdispositivos.

3 MATERIAIS & MÉTODOS

3.1 Fabricação de dispositivos microfluídicos analíticos em papel - μ PADs

3.1.1 Impressão a cera

3.1.1.1 Materiais e equipamentos

Papel cromatográfico Whatman® nº. 1; impressora a cera Xerox Phaser 8560®; prensa térmica.

3.1.1.2 Design dos dispositivos

Projetaram-se os designs dos dispositivos microfluídicos utilizando-se o software Corel Draw X6®, ilustrado na Figura 18.

Figura 18 – Programa Corel Draw X6®. As zonas hidrofóbicas são criadas a partir das linhas e áreas escuras, sendo os canais e zonas hidrofílicas preservados nas áreas brancas.

Fonte: Autoria própria.

3.1.1.3 Impressão e tratamento térmico

Imprimiram-se os *designs* criados em papel cromatográfico Whatman® nº 1, utilizando-se uma impressora a cera comercial. Para a criação das barreiras hidrofóbicas realizou-se um tratamento térmico nas folhas impressas, utilizando-se uma prensa térmica a 150 °C durante 2 min, a qual derreteu a cera e permitiu sua permeação através de toda espessura da folha [98].

3.1.2 Dispositivos em 3 dimensões

Por se tratarem de dispositivos em 3 dimensões foi necessário unirem-se as camadas adjacentes, para permitir uma permeação completa e homogênea de fluidos através do dispositivo.

3.1.2.1 Dispositivos tridimensionais colados

Uniram-se as camadas de dispositivos impressos (3.1.1 Impressão a cera) via o adesivo em *spray 77*® da 3M, como relatado recentemente na literatura [107]. Posicionou-se o tubo de *spray* a 24 cm da folha e aplicou-se o *spray* durante 1 s sobre a superfície da folha. Alinhou-se uma camada de papel sobre a outra, a partir de suas bordas, e com o auxílio de um rolo, aplicou-se igualmente pressão sobre as camadas. Aguardou-se 1 h para a secagem do adesivo. Cortaram-se os dispositivos individuais após a secagem.

3.1.2.2 Dispositivos tridimensionais origami unidos por aparato magnético externo

Dobraram-se as camadas de dispositivos impressos individuais (3.1.1 Impressão a cera) e inseriu-se o dispositivo dobrado em um aparato que mantinha as camadas unidas por atração magnética entre duas chapas metálicas e ímãs de neodímio, conforme a Figura 19.

Figura 19 – União dos 3D- μ PADs via aparato magnético externo. (a) Ímãs de neodímio e chapas metálicas perfuradas no design do dispositivo. (b) 3D- μ PAD antes da dobradura. (c) 3D- μ PAD após dobradura. (d) 3D- μ PAD sobre a parte inferior do dispositivo. (e) Aparato magnético unindo as camadas do dispositivo – vista superior. (f) Aparato magnético unindo as camadas do dispositivo – vista inferior. (g) Aparato magnético unindo as camadas do dispositivo – vista lateral.

Fonte: Autoria própria.

3.1.2.3 Dispositivos tridimensionais origami unidos por cliques de papel

Dobraram-se as camadas de dispositivos impressos individuais (3.1.1 Impressão a cera) e inseriram-se cliques de papel nas bordas dos dispositivos, de acordo com a Figura 20.

Figura 20 – União dos 3D- μ PADs via cliques de papel. (a) Cliques de papel unindo as camadas – vista superior. (b) Cliques de papel unindo as camadas – vista inferior. (c) Cliques de papel unindo as camadas – vista lateral.

Fonte: Autoria própria.

3.1.2.4 Dispositivos tridimensionais origami unidos por grampos de papel

Dobraram-se as camadas de dispositivos impressos individuais (3.1.1 Impressão a cera) inseriram-se grampos de papel nas bordas dos dispositivos, de acordo com a Figura 21.

Figura 21 – União dos 3D- μ PADs via grampos de papel. (a) Grampos de papel unindo as camadas – vista superior. (b) Grampos de papel unindo as camadas – vista inferior. (c) Grampos de papel unindo as camadas – vista lateral.

Fonte: Autoria própria.

3.2 Síntese do 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB)

3.2.1 Síntese 1

3.2.1.1 Reagentes

Água desionizada Milli-Q®; 4-flúor-3-nitroanilina (MM: 156,12 g mol⁻¹), ácido sulfúrico (H₂SO₄, MM: 98,08 g mol⁻¹); 2-metil-2-propanol (C₄H₁₀O, MM: 71,12 g mol⁻¹); nitrito de sódio (NaNO₂, MM: 69,00 g mol⁻¹); bicarbonato de sódio (NaHCO₃, MM: 84,01 g mol⁻¹); cloreto de sódio (NaCl, MM: 58,44 g mol⁻¹); sulfato de sódio (Na₂SO₄, MM: 142,04 g mol⁻¹); acetato de etila (C₄H₈O₂, MM: 88,105 g mol⁻¹); azida de sódio (NaN₃, MM: 65,01 g mol⁻¹);

3.2.1.2 Materiais e equipamentos

Balão de fundo redondo; termômetro; barra magnética; agitador magnético; espátula; béqueres; rotoevaporador; funil de separação; funil de Buchner; papel de filtro.

3.2.1.3 Procedimento

A síntese do 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB) foi realizada em duas partes: i) síntese do precursor terc-butil nitrito (t-BuONO) e ii) desaminação do 4-flúor-3-nitroanilina.

3.2.1.3.1 Síntese do terc-butil nitrito (t-BuONO)

Preparou-se uma solução de H₂SO₄ concentrado (15,5 g) em água desionizada (8,4 g). Resfriou-se a solução em banho de gelo, a 0 °C, adicionando-se ao balão 11,79 g de t-butanol, gota a gota. Separadamente preparou-se uma solução de nitrito de sódio em água (12,0 g de nitrito em 4,75 mL de água desionizada), resfriando-se a solução a 0 °C. Adicionou-se a solução de nitrito ao balão reacional contendo t-butanol, lentamente, durante 1 hora, tomando-se o cuidado de manter o meio reacional a 0 °C durante a adição.

Após a adição a mistura reacional foi retirada do banho de gelo e deixada em repouso, até atingir a temperatura ambiente. Feito isso, agitou-se a mistura continuamente durante 12 horas, com o auxílio de um agitador magnético. Após a agitação separou-se a fase aquosa da fase orgânica, com o auxílio de um funil de separação. A porção orgânica foi lavada com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio e cloreto de sódio (5 g e 27 g, respectivamente, em 100 mL de água desionizada), em 4 porções de 25 mL. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio, e destilada posteriormente à pressão atmosférica, coletando-se a fração entre 80 a 90 °C. O líquido obtido foi armazenado a 4 °C, sob proteção da luz [124].

3.2.1.3.2 Desaminação do 4-flúor-3-nitroanilina

Esta síntese foi realizada em escala semi-micro, com o intuito de se avaliar a viabilidade da rota sintética. Umedeceu-se 0,625 g de azida de sódio com 0,96 mL de água desionizada, em um balão de fundo redondo. Adicionaram-se 5 mL de t-butanol no frasco reacional, sob agitação. Feito isso, adicionaram-se 0,5 g de 4-flúor-3-nitroanilina no balão, seguido da adição de 7,6 mL de t-BuONO, agitando-se a mistura durante 1 hora, em temperatura ambiente. Após o término da reação adicionaram-se 15 mL de água no balão, extraíndo-se a mistura com 3 porções de 25 mL de acetato de etila. Separou-se a fase aquosa, com o auxílio de um funil de separação, e secou-se a fração orgânica com sulfato de sódio. Obteve-se o produto de interesse após roto-evaporação [124].

3.2.2 Síntese 2

3.2.2.1 Reagentes

Água desionizada Milli-Q®; 4-flúor-3-nitroanilina (MM: 156,12 g mol⁻¹); nitrito de sódio (MM: 69,00 g mol⁻¹); azida de sódio (MM: 65,01 g mol⁻¹); ácido sulfúrico P.A. (MM: 98,079 g mol⁻¹); éter de petróleo.

3.2.2.2 Materiais e equipamentos

Balão de fundo redondo; termômetro; barra magnética; agitador magnético; espátula; béqueres; rotoevaporador; funil de separação; funil de Buchner; papel de filtro.

3.2.2.3 Procedimento

Preparou-se uma solução de ácido sulfúrico dissolvendo-se 25 mL de ácido sulfúrico em 75 mL de água destilada. Alocou-se a solução em um balão de fundo redondo envolto em papel alumínio, em banho de gelo. Adicionou-se, sob agitação, 5,02 g de 4-flúor-3-nitroanilina ao balão, e aguardou-se até a completa dissolução, obtendo-se uma solução de coloração amarelada. Feito isso, adicionaram-se 2,43 g de nitrito de sódio ao meio reacional, de uma só vez, obtendo-se uma solução de coloração alaranjada. Aguardou-se 30 minutos.

Preparou-se uma solução de azida de sódio (2,29 g) em 45 mL de água, e adicionou-se esta solução à mistura do balão reacional, gota a gota, e aguardou-se 15 minutos. Filtrou-se a mistura, obtendo-se um precipitado laranja, o qual foi lavado com porções de água gelada. Rotoevaporou-se o precipitado, para a remoção de águas residuais, e recristalizou-se o precipitado em éter de petróleo, obtendo-se um precipitado laranja (1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno) [125].

3.2.3 Caracterização FNAB

Caracterizou-se o material obtido pelas técnicas de espectroscopia vibracional no infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

3.3 Ativação da superfície da celulose com FNAB

O papel cromatográfico Whatman[®] nº 1 foi cortado em círculos de 0,6 cm de diâmetro, lavados com uma solução de água e metanol (1:1) (V/V) e secos à temperatura ambiente durante 30 min. Preparou-se uma solução 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de FNAB em metanol, e adicionou-se 3 μL dessa solução em cada círculo, secando-se à temperatura ambiente por 30 min. As membranas foram irradiadas em uma

câmera UV (365 nm) durante 2100 s (35 min). Após esse período, lavaram-se as membranas com porções de metanol até que as águas de lavagem não apresentassem mais coloração alaranjada [28].

3.3.1 Caracterização membranas ativadas com FNAB

As membranas ativadas foram caracterizadas pelas técnicas de espectroscopia vibracional no infravermelho, no modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR) e mensuração do ângulo de contato com água.

3.4 Oxidação da celulose com m-periodato de sódio

3.4.1 Reagentes

Água desionizada Milli-Q[®]; água destilada; m-periodato de sódio (NaIO_4 , MM: 213,89 g mol⁻¹).

3.4.2 Materiais e equipamentos

Balão volumétrico; recipiente retangular de vidro; funil de Buchner.

3.4.3 Procedimento

Dissolveram-se 26,7362 g de m-periodato de sódio em um balão volumétrico de 250 mL, completando-se seu volume com água desionizada (0,5 mol L⁻¹). Adicionou-se esta solução a 10 folhas de papel cromatográfico Whatman[®] n.º. 1 nas dimensões 216 mm x 279 mm (tamanho carta), em um recipiente retangular de vidro. Deixaram-se as membranas em repouso nesta solução durante (i) 30 min; (ii) 1 h; (iii) 2 h; (iv) 4 h e (v) 20 h, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, após a qual se lavaram as membranas oxidadas abundantemente com água destilada para a retirada de m-periodato de sódio residual, além de produtos reduzidos (IO_3^-). Aguardou-se 3 h para a secagem das membranas, com posterior prensagem a 150 °C durante 2 min, para a retirada de umidade residual [37,126].

3.4.4 Caracterização

As membranas oxidadas foram caracterizadas pelas técnicas de espectroscopia vibracional no infravermelho, no modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR), difração de raios-x (XRD), espectrometria de fluorescência de raios-x (XRF) e mensuração do ângulo de contato com água.

3.5 Ativação da celulose oxidada com EDC / NHS

3.5.1 Reagentes

Água desionizada Milli-Q®; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) ($C_8H_{17}N_3$, MM: $155,24 \text{ g mol}^{-1}$); N-hidroxisuccinimida (NHS) ($C_4H_5NO_3$, MM: $115,09 \text{ g mol}^{-1}$);

3.5.2 Materiais e equipamentos

Balões volumétricos; micropipetas.

3.5.3 Procedimento

Dissolveram-se 0,1917 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 0,1151 g de N-hidroxisuccinimida (NHS) em 10 mL de água destilada ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em cada componente). Imprimiram-se os padrões de cera no papel oxidado durante 1 h (Seção 3.4 Oxidação da celulose com m-periodato de sódio), realizando-se uma prensagem a 150°C durante 2 min, para a completa permeação da cera. Aplicou-se $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de EDC/NHS em cada *spot*, aguardando-se 20 min para a secagem das membranas [37,126].

3.6 Imobilização enzimática

3.6.1 Imobilização enzimática na celulose oxidada

3.6.1.1 Reagentes

Água desionizada Milli-Q[®]; glicose oxidase liofilizada de *Aspergillus niger* (113 kU g⁻¹); peroxidase de *Armoracia rusticana* (300 kU g⁻¹); fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄, MM: 136,09 g mol⁻¹); solução hidróxido de sódio (NaOH, M: 0,1 mol L⁻¹). Tween 20[®] (C₅₈H₁₁₄O₂₆, MM: 1227,54 g mol⁻¹); glicose anidra P.A. (C₆H₁₂O₆, MM: 180,16 g mol⁻¹); iodeto de potássio (KI, MM: 166,00 g mol⁻¹).

3.6.1.2 Materiais e equipamentos

Balões volumétricos; béqueres; micropipetas, pHmetro, tubos de polipropileno.

3.6.1.3 Procedimento

Preparou-se um tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ adicionando-se 0,3402 g de fosfato monobásico de potássio em um balão volumétrico de 25 mL, completando-se seu volume com água desionizada. Ajustou-se o pH da solução para 6,0, adicionando-se uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹. Preparou-se um segundo tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ com detergente Tween 20[®] 0,05% (V/V), ajustando-se o pH da solução para 7,4.

Adicionou-se 10,6 mg de glicose oxidase e 1,36 mg de peroxidase a um balão volumétrico de 10 mL, completando-se seu volume com o tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ (pH 6,0), de maneira a obter uma solução 120 U mL⁻¹ em glicose oxidase e 300 U mL⁻¹ em peroxidase. Prepararam-se também soluções individuais de glicose oxidase e peroxidase, nas mesmas concentrações.

Prepararam-se soluções de glicose em água desionizada (0,5 mmol L⁻¹ a 500 mmol L⁻¹), e de iodeto de potássio em água desionizada (0,6 mol L⁻¹), para os ensaios enzimáticos.

Recortaram-se círculos com 0,6 cm de diâmetro da celulose oxidada durante os diferentes períodos (30 min; 1 h; 2 h; 4 h; 20 h), além de uma membrana de

celulose sem tratamento, e adicionando os círculos de membrana em distintos tubos de polipropileno de 1,5 mL. Adicionou-se a cada tubo de polipropileno 0,5 mL da solução de glicose oxidase, incubando-se as membranas por 30 minutos. Após esse período, lavaram-se as membranas abundantemente com o tampão fosfato salino e Tween 20[®] (pH 7,4), deixando-se as membranas incubadas com o tampão durante 8 h. Após esse período, lavaram-se as membranas com água desionizada, e as membranas foram secas à temperatura ambiente [126].

3.6.1.4 Caracterização

As membranas contendo as enzimas foram caracterizadas utilizando-se a espectroscopia vibracional no infravermelho, no modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR), e utilizando-se um teste de incubação. Adicionou-se a distintos tubos de polipropileno 0,5 mL da solução enzimática de peroxidase; 0,5 mL de uma solução de glicose 400 mM e 0,5 mL de uma solução de iodeto de potássio 0,6 mol L⁻¹, de acordo com a Tabela 5. O ensaio do tubo n. 1 foi utilizado como controle negativo, enquanto o ensaio do tubo n. 8 foi utilizado como controle positivo para os testes. A incubação foi realizada durante 48 horas, após as quais removeram-se as membranas dos tubos e realizaram-se as leituras espectrofotométricas em um espectrofotômetro de absorção molecular no UV-vis.

Tabela 5 – Composição de cada ensaio para o teste de incubação

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Membrana	-	Celulose lavada	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	20 horas	-
Glicose Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	0,5 mL
Peroxidase	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
KI (0,6 M)	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Glicose (400 mM)	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

Fonte: Autoria própria.

3.6.2 Imobilização enzimática na celulose ativada com EDC/NHS

3.6.1.1 Reagentes

Água desionizada Milli-Q®; solução de glicose oxidase (120 U mL^{-1}); solução de peroxidase (300 U mL^{-1}); trealose dihidratada ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MM: $378,33 \text{ g mol}^{-1}$).

3.6.1.2 Materiais e equipamentos

Balões volumétricos; béqueres; micropipetas;

3.6.1.3 Procedimento

Dissolveram-se 1,1350 g de trealose em 10 mL de água desionizada ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$). Utilizando-se as membranas ativadas com EDC/NHS (3.5 Ativação da celulose oxidada com EDC / NHS), adicionou-se $0,5 \mu\text{L}$ das soluções de glicose oxidase; peroxidase e trealose ao dispositivo, na disposição apresentada na Figura 22 [37,126].

Figura 22 – Delineamento experimental da adição de soluções enzimáticas e trealose à membrana ativada com EDC/NHS. O esquema de cores simboliza os spots onde foram adicionados $0,5 \mu\text{L}$ das soluções contendo as enzimas.

3.7 Análise da capacidade retentiva dos analitos

3.7.1 Reagentes

Água desionizada Milli-Q®; solução de glicose oxidase (120 U mL^{-1}); solução de peroxidase (300 U mL^{-1}); solução de iodeto de potássio ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$); solução de glicose ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$); peróxido de hidrogênio P.A. (H_2O_2 , MM: $34,01 \text{ g mol}^{-1}$).

3.7.2 Materiais e equipamentos

Cuba para cromatografia em papel; papel de filtro; pinça; borrifador.

3.7.3 Procedimento

Recortaram-se tiras de papel cromatográfico Whatman® n.º 1 nas dimensões $9 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$. Recobriu-se a parede da cuba cromatográfica com um papel de filtro previamente umedecido em água desionizada. Aplicou-se em uma tira, com o auxílio de um capilar, uma pequena porção da solução de glicose $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, aguardando-se 15 min para a completa secagem do solvente. Em uma segunda tira adicionou-se peróxido de hidrogênio P.A., e em uma terceira tira adicionou-se uma solução $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ de iodeto de potássio em água. Inseriu-se cada tira de papel cromatográfico na cuba, separadamente, afixada na tampa da mesma. O eluente escolhido foi água destilada. Após 15 min retirou-se a tira de papel da cuba, anotando-se a localização da frente do solvente. Para a revelação das tiras aplicaram-se soluções distintas, com o auxílio de um borrifador. Para a amostra de glicose utilizou-se como solução reveladora uma solução de glicose oxidase (120 U mL^{-1}), peroxidase (300 U mL^{-1}) e iodeto de potássio ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$), na proporção 1:1:1.

Para a amostra de peróxido utilizou-se como solução reveladora uma solução de iodeto de potássio ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$). Para a amostra de iodeto de potássio a solução reveladora utilizada foi peróxido de hidrogênio P.A..

O mesmo procedimento foi realizado com tiras de papel cromatográfico Whatman® n.º 1 oxidado com m-periodato de sódio durante 1 h (3.4 Oxidação da celulose com m-periodato de sódio), nas dimensões $9 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$.

3.8 Teste de estabilidade das enzimas imobilizadas nos dispositivos

3.8.1 Reagentes

Solução de glicose oxidase (120 U mL^{-1}); solução de peroxidase (300 U mL^{-1}); solução de iodeto de potássio ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$); solução de glicose ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$);

3.8.2 Materiais e equipamentos

Suporte com garra; micropipetas; digitalizador de mesa.

3.8.3 Procedimento

Utilizando-se os dispositivos contendo as enzimas imobilizadas (3.6.2 Imobilização enzimática na celulose ativada com EDC/NHS), adicionaram-se $0,5 \mu\text{L}$ das soluções de glicose oxidase, peroxidase, iodeto de potássio e glicose aos dispositivos, de acordo com o esquema da Figura 23. Aguardou-se 15 min entre a adição de cada reagente, para garantir a secagem do dispositivo à temperatura ambiente. Após a adição da glicose aguardou-se 30 min, antes de se digitalizar os dispositivos.

Figura 23 – Adição de soluções enzimáticas, do reagente redox (KI) e do substrato enzimático (glicose) aos dispositivos com enzimas previamente imobilizadas. Entre cada adição aguardou-se um período de 15 min, para a completa secagem do dispositivo. Após a adição da glicose, aguardou-se 30 min, antes da digitalização do dispositivo. O esquema de cores simboliza o spot onde foram adicionados 0,5 µL das soluções indicadas em cada etapa do processo.

Dispositivo inicial

Adição enzimas

Adição reagente redox

Adição substrato

Fonte: Autoria própria.

O teste de estabilidade foi realizado durante um período de 100 dias consecutivos, sendo um período superior ao avaliado na literatura [37].

3.9 Cinética enzimática

3.9.1 Reagentes

Solução de glicose oxidase (120 U mL^{-1}); Solução de peroxidase (300 U mL^{-1}); Solução de iodeto de potássio ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$); Solução de glicose ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$); Solução de trealose ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$);

3.9.2 Materiais e equipamentos

Suporte com garra; micropipetas; câmera digital;

3.9.3 Procedimento

Imprimiram-se os padrões de cera no papel oxidado (1 h) (Seção 3.4 Oxidação da celulose com m-periodato de sódio) e em papel cromatográfico Whatman® n°. 1. Adicionaram-se 3 μL das soluções de glicose oxidase, peroxidase, iodeto, nas proporções 1:1:1, em duas placas de papel oxidado e em duas placas de papel cromatográfico, aguardando-se 1 hora para completa secagem dos *spots*. Em uma placa de papel oxidado e em uma placa de papel cromatográfico aplicou-se posteriormente 3 μL da solução de trealose, aguardando-se mais uma hora até a completa secagem dos *spots*.

Posicionou-se uma câmera digital sobre as placas de papel, e adicionaram-se 10 μL de soluções de glicose em cada *spot*, em quadruplicata, de acordo com a Figura 26. As reações foram gravadas durante uma hora, após a qual se analisaram as imagens obtidas [62].

Figura 24 – Disposição da adição de solução de glicose nos *spots*. As soluções com mesma concentração foram adicionadas simultaneamente, com o auxílio de uma micropipeta multicanais. As concentrações estão indicadas em mol L^{-1} .

Fonte: Autoria própria.

3.10 Dispositivos microfluídicos analíticos em três dimensões com adição de padrão

3.10.1 Reagentes

Água desionizada Milli-Q®; Glicose oxidase liofilizada de *Aspergillus niger* (113 kU g⁻¹); peroxidase de *Armoracia rusticana* (300 kU g⁻¹); fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄, MM: 136,09 g mol⁻¹); solução hidróxido de sódio (NaOH, M: 0,1 mol L⁻¹); iodeto de potássio (KI, MM: 166,00 g mol⁻¹); soluções de glicose (0 a 500 mmol L⁻¹); ABTS (Ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) (C₁₈H₁₈N₄O₆S₄, MM: 514,62 g mol⁻¹), trealose (C₁₂H₂₂O₁₁·2H₂O; MM: 378,33 g mol⁻¹).

3.10.2 Materiais e equipamentos

Suporte com garra; aparato magnético; micropipetas; digitalizador de mesa.

3.10.3 Procedimento

Dissolveu-se 0,9961 g de iodeto de potássio; 1,36 mg de peroxidase; 10,6 mg de glicose oxidase em 10 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 6,0), sendo esta denominada como solução reagente 1. Dissolveu-se também 0,1287 g de ABTS; 1,36 mg de peroxidase; 10,6 mg de glicose oxidase em 10 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 6,0), sendo esta a solução reagente 2.

Imprimiram-se padrões de cera no papel oxidado (1 h) (Seção 3.4 Oxidação da celulose com m-periodato de sódio), obtendo-se os dispositivos do tipo origami, apresentados na Figura 25. Adicionaram-se 0,5 µL da solução reagente 1 em cada *spot* da última camada, e 0,5 µL das soluções padrão de glicose nos *spots* da penúltima camada, aguardando-se 30 min antes de dobrar o dispositivo e colocar as camadas em contato, com o auxílio do aparato magnético (3.1.2.2 Dispositivos tridimensionais origami unidos por aparato magnético externo). Adicionaram-se 65 µL de amostra no topo do dispositivo, e aguardaram-se 15 min antes de se abrir o aparato magnético e digitalizar o teste [47].

Figura 25 – 3D- μ PAD em papel oxidado com adição de padrões.

Fonte: Autoria própria.

3.11 Análise de imagens

3.11.1 Softwares comerciais de análise de imagens

Após a realização dos bioensaios, os μ PADs foram digitalizados em um *scanner* de mesa, para a obtenção das imagens digitais. As imagens foram analisadas com o auxílio dos *softwares* comerciais Adobe Photoshop[®], Corel Photo-Paint[®] e do *software* livre ImageJ [127]. Seleciona-se a região de interesse – *spot* de detecção – avaliando-se a intensidade média de pixels (*mean pixel intensity*) em canais de interesse (no sistema RGB, CMYK ou escala de cinza), selecionando-se o canal correspondente à coloração do teste. Com a intensidade média de pixel e a concentração dos reagentes nos *spots* constroem-se as curvas analíticas ou as curvas de adição de padrões, como ilustrado no esquema da Figura 26 [5,84–86].

Figura 26 – Análise de imagem utilizando-se o software Adobe Photoshop®. (a) Utilizando-se a ferramenta histograma, seleciona-se uma região de interesse na figura e o canal de cores apropriado, anotando-se o valor correspondente da intensidade média de pixels naquela região. Para cada spot é necessário realizar o mesmo procedimento. (b) Empregando-se um software de planilha de dados, traça-se o gráfico da concentração de glicose adicionada x intensidade média de pixels, obtendo-se a curva analítica.

Fonte: Autoria própria.

3.11.2 Software para análise automatizada de imagens

A análise de imagens pelos softwares comerciais de análise de imagem é um processo demorado e altamente sujeito a falhas, diminuindo-se a eficiência das análises e comprometendo todas as figuras de mérito do processo analítico. Para minimizar as falhas nessa etapa estabeleceu-se uma colaboração com um cientista da computação (Thiago Zafalon Miranda – <http://mirandatz.wordpress.com>), o qual nos auxiliou no desenvolvimento de um software para a análise automatizada dos testes colorimétricos digitalizados, de acordo com as necessidades apresentadas.

4 RESULTADOS & DISCUSSÃO

4.1 Fabricação dispositivos microfluídicos analíticos em papel - μ PADs

4.1.1 Impressão a cera

Com o intuito de se encontrar as melhores condições de impressão para a produção dos microdispositivos, avaliou-se como a direção de impressão e o posicionamento das folhas de papel cromatográfico Whatman[®] n^o. 1 afetavam os padrões impressos.

A impressora Xerox Phaser 8560[®] permite quatro modos de impressão, a saber: Cor rápida (menos tinta); Padrão; Aprimorado e Foto (mais tinta). Avaliou-se a diferença entre o valor designado para a linha no *software* de *design* – denominado largura nominal – e o valor impresso na folha – denominado largura da barreira – após a impressão e após o aquecimento em prensa térmica.

A Figura 27 demonstra que as linhas impressas verticalmente apresentam maior resolução de impressão do que as que são impressas horizontalmente. Isso ocorre porque linhas verticais são impressas de maneira contínua – um bico de impressão é responsável pela aplicação contínua de tinta sobre o rolo de transferência em movimento – enquanto que as linhas horizontais são impressas a partir de aplicações de tinta por bicos de impressão posicionados lado a lado durante a movimentação do rolo [63].

As linhas impressas no papel apresentam maior espessura que as linhas nominais devido ao processo de impressão a cera: a cera é aplicada sobre o rolo de transferência, o qual transfere os padrões de cera ao papel pela aplicação de pressão via um rolo auxiliar. Ao se pressionar o papel sobre o rolo de impressão tem-se que o padrão em cera será comprimido e sofrerá uma deformação antes de se solidificar na superfície do papel, resultando em barreiras mais espessas (tanto vertical quanto horizontalmente), conforme é possível observar na Figura 27.

Figura 27 – Estudo da alteração de tamanho de linhas verticais e horizontais impressas em papel cromatográfico Whatman® n.º 1, nos quatro modos de impressão distintos. (a) Qualidade cor rápida. (b) Qualidade padrão. (c) Qualidade aprimorado. (d) Qualidade foto.

Fonte: Autoria própria.

A quantidade de cera aplicada deve ser grande o suficiente para permear completamente o papel após o aquecimento, para formar as barreiras hidrofóbicas funcionais e individualizar zonas reacionais, mas não deve ser aplicada em demasia, ou então diminuirá a resolução dos padrões impressos no papel por dispersão lateral durante o aquecimento. A Figura 28 apresenta o aumento da espessura da barreira criada com o incremento da quantidade de tinta depositada, definida pela qualidade de impressão. Observa-se, também, a aproximação no tamanho final das barreiras impressas vertical e horizontalmente, o que sugere que a dispersão lateral da cera liquefeita é homogênea na matriz celulósica.

Figura 28 – Estudo da alteração de tamanho de linhas verticais e horizontais impressas em papel cromatográfico Whatman® nº. 1, após aquecimento – Frente da folha. (a) Qualidade cor rápida. (b) Qualidade padrão. (c) Qualidade aprimorado. (d) Qualidade foto.

Fonte: Autoria própria.

A qualidade de impressão aprimorado insere quantidade suficiente de tinta para permear através de toda a extensão do papel, além de não apresentar dispersão lateral em demasia após aquecimento, sendo escolhida como modo de impressão para a confecção dos dispositivos microfluídicos em papel. É possível observar na Figura 29 que as linhas no verso do dispositivo após aquecimento apresentam tamanhos inferiores aos da linha na frente do papel – tanto verticalmente quanto horizontalmente – o que está de acordo com o fato do papel apresentar maior anisotropia no eixo z [20], sendo a permeação da tinta mais favorável lateralmente do que através do papel.

Figura 29 – Estudo da alteração de tamanho de linhas verticais e horizontais impressas em papel cromatográfico Whatman® nº. 1, na qualidade de impressão aprimorado, antes e após aquecimento. (a) Linhas impressas verticalmente. (b) Linhas impressas horizontalmente.

Fonte: Autoria própria.

Contudo, é aceito também que o método de fabricação do papel orienta suas fibras na direção na qual o papel é estirado [98], o que também afetaria a permeação de fluidos pela matriz. Para se avaliar tal efeito imprimiram-se linhas horizontais e verticais em papel cromatográfico Whatman® nº. 1, variando-se a orientação do papel na vertical e na horizontal (Figura 30).

Figura 30 – Estudo da alteração de tamanho de linhas verticais e horizontais impressas em papel cromatográfico Whatman® nº. 1, variando-se a orientação do papel na horizontal e na vertical. (a) Linhas após impressão. (b) Linhas após aquecimento.

Fonte: Autoria própria.

Como se pode observar na Figura 30, não há indicativo aparente da influência da orientação do papel na dispersão lateral da cera. Se a orientação do papel fosse relevante, as curvas tenderiam a se separar, devido à dispersão preferencial em determinada direção, não sendo este o caso. Pode se considerar também que a cera não se disperse consideravelmente nos eixos x e y, simultaneamente em uma linha, devido ao excesso de cera que há ao seu redor, como exemplificado na Figura 31.

Figura 31 – Representação da dispersão de cera em uma linha impressa na vertical. Tomando-se um elemento de área (azul), tem-se que a cera nesse elemento de área tenderá a se dispersar em direção ao papel - horizontal, onde a resistência ao molhamento será menor (representado pelas setas verdes), ao invés de se dispersar em direção a uma localidade que também contém cera – vertical – e que também está sujeita às mesmas condições de espalhamento (representado pelas setas vermelhas). Assim, o resultado observado será uma dispersão apreciável na horizontal e mínima na vertical, como representado pelas regiões em cinza. O recíproco é verdadeiro para uma linha na horizontal.

Fonte: Autoria própria.

Desse modo, é possível que até exista uma direção preferencial de dispersão de fluido no papel, definida pela orientação das fibras [98], mas devido ao fato de que os padrões de cera não constituem pontos isolados sobre o papel nos dispositivos microfluídicos, tal dispersão preferencial não modificaria os dispositivos em uma extensão apreciável, podendo ser desconsiderado na construção dos canais dos dispositivos em papel.

Um canal funcional para permeação de líquidos em um dispositivo microfluídico deve conduzir o fluido pelo padrão impresso no papel, sem bloquear sua passagem ou permitir o extravasamento do líquido para outras regiões. Esses canais são definidos por barreiras de cera nominais mínimas de 300 μm (cerca de 850 μm após aquecimento) separadas por uma distância mínima de 1100 μm (cerca de 550 μm após aquecimento) [98]. Entretanto, não se utilizaram apenas canais retangulares nos dispositivos, sendo necessário avaliar como o aquecimento da cera alteraria secções circulares.

Para avaliar a alteração do diâmetro de círculos após o aquecimento da cera, projetaram-se círculos com diâmetro interno constante de 7,0 mm, e variou-se a espessura nominal das linhas, medindo-se a variação do diâmetro interno dos círculos após o aquecimento da cera (Figura 32) [98].

Figura 32 – Demonstração da variação do diâmetro interno de círculos (7,0 mm) com o incremento do tamanho das linhas de impressão – de 0,1 mm a 2,5 mm.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7091–5, 2009.

Como é possível observar pela Figura 33, após a impressão a área interna dos círculos é praticamente constante e próxima ao valor nominal (valor calculado - 0,385 cm^2). Contudo, após o aquecimento, ocorre uma diminuição na área interna dos círculos, devido à permeação da cera [104]. A partir de uma espessura nominal de linha de 2,0 mm, entretanto, o tamanho da linha não influencia mais na área efetiva do círculo, atingindo um patamar inferior em torno de 0,27 cm^2 (70% do valor nominal inicial).

Figura 33 – Estudo da variação da área de círculos impressos com diâmetro nominal de 7,0 mm (diâmetro interno 0,385 cm²) com o incremento da espessura das linhas impressas.

Fonte: Autoria própria.

Considerando-se que o processo de difusão lateral da cera nos círculos é constante, independentemente da área nominal dos círculos [104], tem-se que círculos com uma área nominal menor sofreriam maior variação na área final, após impressão. Com o intuito de se avaliar tal hipótese imprimiu-se uma placa com círculos de diâmetro variável, de 0,3 a 0,7 cm, como apresentado na Figura 34.

Figura 34 – Estudo da variação da área de círculos impressos com distintos diâmetros.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de JACOB, Jorge Alexandre Marmelo.

Desenvolvimento de placas de microtitulação em papel. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

Analisando-se a porcentagem da variação relativa das áreas dos círculos, tem-se que a hipótese inicial é confirmada, como se observa na Figura 35. Para o círculo com diâmetro de 7,0 mm a variação é de 30%, como observado anteriormente no experimento descrito na Figura 33; para os círculos com diâmetros menores, entretanto, a variação chega próximo a 65%, com os erros relativos sendo superiores para os valores de diâmetro mais baixos (barras de erro menores que o tamanho dos pontos). Desse modo, é necessário levar em consideração a difusão constante da cera nos círculos com diâmetros menores, quando do *design* desses componentes nos microdispositivos.

Figura 35 – Estudo da variação da área de círculos impressos com diâmetros nominais distintos, de 0,3 a 0,7 cm.

Fonte: Autoria própria.

Avaliou-se também a hidrofobicidade das ceras sobre o papel, medindo-se o ângulo de contato da cera com água, após impressão e após aquecimento, e sua compatibilidade com solventes orgânicos, como o metanol e o etanol (Figura 36). Considerando-se que o papel cromatográfico Whatman[®] n.º. 1 é totalmente molhável ($\theta_{SL} = 0^\circ$), tem-se que a aplicação da cera na celulose a torna hidrofóbica, como era de se esperar [98]. A cera após impressão apresenta um ângulo de contato $\theta_{SL} =$

$108^\circ \pm 2^\circ$, enquanto a cera após aquecimento e permeação no papel apresenta um ângulo de contato $\theta_{SL} = 116^\circ \pm 1^\circ$, corroborando com resultados apresentados em outros trabalhos [64].

Figura 36 – Medidas de ângulo de contato das membranas com água. (a) Após impressão, antes do aquecimento. (b) Após aquecimento. (c) Após aquecimento, lavado com metanol. (d) Após aquecimento, lavado com etanol.

Fonte: Autoria própria.

O maior ângulo de contato da água com o substrato após o aquecimento pode ser devido à presença de defeitos na camada de cera impressa, como pode ser observado nas micrografias eletrônicas da Figura 37, ou pela degradação de algum composto que não a parafina (aditivos e estabilizantes [63,104]) durante o aquecimento da cera para permeação no papel (150 °C durante 2 min).

Figura 37 – Micrografias eletrônicas da celulose recoberta com cera. (a) Padrão de cera (região mais escura) sobre celulose (região mais clara). (b) Interface entre cera depositada e papel sem cera. (c) Região recoberta com cera, apresentando rachaduras e imperfeições.

Fonte: Autoria própria.

A diminuição no ângulo de contato da água com o substrato, quando da lavagem com etanol é devido à remoção de parte dos compostos hidrofóbicos da cera [98], havendo um decréscimo do ângulo de contato $\theta_{SL} = 116^\circ \pm 1^\circ$ a $\theta_{SL} = 99^\circ \pm 2^\circ$. Quando a lavagem é realizada com metanol, entretanto, não há variação apreciável do ângulo de contato ($\theta_{SL} = 118^\circ \pm 3^\circ$), demonstrando que não há remoção dos compostos hidrofóbicos da cera, e que a barreira permanece funcional após a lavagem – salientando-se que para meios aquosos. Contudo, é perceptível a alteração na coloração da cera, demonstrando que os pigmentos são removidos, como é possível observar na Figura 38.

Figura 38 – Teste de funcionalidade da barreira após lavagem com solventes orgânicos. (a) Dispositivo lavado com metanol (i) e dispositivo após aquecimento (ii). Observa-se a coloração acinzentada do dispositivo lavado, pela remoção de pigmentos da cera. Contudo, a barreira hidrofóbica permanece funcional, não havendo extravasamento de líquido – corante vermelho. (b) Dispositivo lavado com etanol (iii) e dispositivo após aquecimento (iv). O etanol afeta a hidrofobicidade da cera, e as barreiras deixam de ser funcionais, havendo extravasamento de líquido, podendo ser observado a formação de um halo vermelho no canto esquerdo superior do dispositivo (iii), além de spots vermelhos com maior área ao centro, quando da adição de solução de corante sobre a cera.

Fonte: Autoria própria.

4.1.2 Design dos dispositivos em três dimensões

Testaram-se distintos *designs* de dispositivos em três dimensões, com o intuito de se avaliar a influência da geometria dos mesmos na distribuição dos fluidos ao longo dos canais. A permeação homogênea dos líquidos pelos dispositivos é condição fundamental para que os mesmos operem de maneira eficiente, uma vez que as reações enzimáticas são dependentes tanto da quantidade de substrato que chega à enzima quanto do tempo de reação.

A geometria dos dispositivos foi avaliada utilizando-se os μ PADs tridimensionais do tipo origami, unindo-se as camadas adjacentes com o auxílio do aparato magnético externo (3.1.2.2 Dispositivos tridimensionais origami unidos por aparato magnético externo). Isso facilita a análise pós-ensaio por não se utilizar cola, fita dupla-face ou grampos para manter as camadas em contato, o que não danifica

os dispositivos quando da sua abertura. Uma solução contendo corante vermelho foi escolhida como fluido modelo para os dispositivos, permitindo a análise da permeação do fluido após a evaporação do solvente.

Figura 39 – Primeiro design avaliado, baseado em modelo disponível na literatura. (a) Dispositivo pronto para o uso. (b) Aplicação de 5 μL de solução contendo corante. (c) Aplicação de 10 μL de solução contendo corante. (d) Aplicação de 15 μL de solução contendo corante. (e) Aplicação de 20 μL de solução contendo corante. (f) Aplicação de 25 μL de solução contendo corante.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de LEWIS, G. G.; DITUCCI, M. J.; BAKER, M. S.; PHILLIPS, S. T. High throughput method for prototyping three-dimensional, paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 15, p. 2630–3, 2012.

Como é possível observar na Figura 39, esse *design* não é eficiente para a permeação homogênea de fluidos no dispositivo, uma vez que a permeação vertical acontece mais rapidamente do que a permeação lateral, fazendo com que o fluido passe às camadas inferiores sem antes completar a camada anterior. Tal fato é devido à menor resistência hidrodinâmica [128], dada pela Equação 9.

$$R_H = C_{\text{Geométrico}} \eta \frac{L}{A^2} \quad (9)$$

onde:

R_H é a resistência hidrodinâmica do canal;

$C_{\text{Geométrico}}$ é uma constante que depende da geometria do canal;

L é o comprimento do canal;

A é a área do canal.

A resistência hidrodinâmica é menor verticalmente porque a área do canal é muito maior que a área da secção transversal no papel, e o comprimento do canal passa a apresentar a mesma ordem de grandeza da espessura da camada, fazendo com que o líquido permeie mais rapidamente na vertical, onde as zonas hidrofóbicas estão em contato, do que na horizontal. Como citado anteriormente, tais dispositivos comportarão reações enzimáticas, de modo que a dispersão homogênea de líquidos é condição fundamental para seu funcionamento adequado, fazendo com que o *design* do dispositivo fosse alterado (Figura 40).

Figura 40 – Segundo *design* avaliado, com adição de uma camada para maior homogeneidade da dispersão de fluido. (a) Dispositivo pronto para o uso. (b) Aplicação de 5 μL de solução contendo corante. (c) Aplicação de 10 μL de solução contendo corante. (d) Aplicação de 15 μL de solução contendo corante. (e) Aplicação de 20 μL de solução contendo corante. (f) Aplicação de 25 μL de solução contendo corante. (g) Aplicação de 30 μL de solução contendo corante.

Fonte: Autoria própria.

O segundo *design* estudado (Figura 40) apresentava uma camada a mais do que seu predecessor – 6 no total – com o intuito de se controlar o fluxo de líquido de maneira mais eficiente. Como é possível notar, o objetivo foi alcançado, uma vez que as camadas posteriores só eram preenchidas após a completa dispersão de líquido na camada anterior. Entretanto, o *design* da Figura 40 apresentava uma camada a mais (comparando-se com o *design* da Figura 39), tornando mais difícil a união das camadas e o perfeito funcionamento dos chips, uma vez que fica mais difícil se unir um número maior de camadas eficientemente [107]. Para minimizar o número de camadas modificou-se novamente o *design* do dispositivo (Figura 41 e Figura 42).

Figura 41 – Terceiro design avaliado, com remoção de uma camada. (a) Dispositivo pronto para o uso. (b) Aplicação de 5 μL de solução contendo corante. (c) Aplicação de 10 μL de solução contendo corante. (d) Aplicação de 15 μL de solução contendo corante. (e) Aplicação de 20 μL de solução contendo corante. (f) Aplicação de 25 μL de solução contendo corante. (g) Aplicação de 30 μL de solução contendo corante.

Fonte: Autoria própria.

Figura 42 – Quarto design avaliado, com modificação de uma camada. (a) Dispositivo pronto para o uso. (b) Aplicação de 5 μL de solução contendo corante. (c) Aplicação de 10 μL de solução contendo corante. (d) Aplicação de 15 μL de solução contendo corante. (e) Aplicação de 20 μL de solução contendo corante. (f) Aplicação de 25 μL de solução contendo corante. (g) Aplicação de 30 μL de solução contendo corante.

Fonte: Autoria própria.

O terceiro e o quarto *designs* estudados (Figura 41 e Figura 42) foram uma modificação do primeiro design (Figura 39), de maneira a impedir o contato entre zonas hidrofílicas adjacentes sem a completa permeação das camadas, mantendo-se o número de camadas em 5. Como é possível observar, ambos os *designs* foram eficientes e impediram a permeação heterogênea de líquidos pelo dispositivo. Contudo, observou-se que seria possível diminuir ainda mais o número de camadas no dispositivo, se fosse possível mesclar a segunda e a terceira camada do quarto *design* estudado (Figura 42), o que deu origem ao quinto *design* (Figura 43).

Figura 43 – Quinto design avaliado, com a fusão da segunda e terceira camadas. (a) Dispositivo pronto para o uso. (b) Aplicação de 5 μL de solução contendo corante. (c) Aplicação de 10 μL de solução contendo corante. (d) Aplicação de 15 μL de solução contendo corante. (e) Aplicação de 20 μL de solução contendo corante. (f) Aplicação de 25 μL de solução contendo corante. (g) Aplicação de 30 μL de solução contendo corante. (h) Aplicação de 35 μL de solução contendo corante.

Fonte: Autoria própria.

Desse modo, o quinto *design* (Figura 43) mostrou-se mais eficiente perante os demais *designs* estudados, tanto em termos de dispersão homogênea de amostra como em menor número de camadas, sendo o escolhido para comportar os testes enzimáticos.

4.1.3 Dispositivos em 3 dimensões

Após a escolha do *design* do microchip, avaliaram-se os métodos de união de camadas dos dispositivos. Utilizando-se uma solução contendo corante vermelho como fluido modelo, aplicou-se um excesso de solução (65 μL) em 10 dispositivos, para cada modo de união de camadas, com o intuito de não haver limitações quanto à quantidade de fluido disponível. Avaliaram-se os tempos de permeação do fluido no dispositivo, o número de *spots* que o fluido atingiu e o número de dispositivos funcionais, dentro dos 10 utilizados.

4.1.3.1 Dispositivos tridimensionais colados

Ao se utilizar o adesivo em *spray 77*[®] da 3M para unir as camadas dos dispositivos (3.1.2.1 Dispositivos tridimensionais colados) houve dificuldade em se reproduzir os resultados reportados na literatura [107]. Montou-se um aparato para assegurar que o *spray* permanecesse a 24 cm da superfície do papel em todas as aplicações. Entretanto, a dispersão do *spray* a partir do bico de aplicação é radial, o que faz com que o centro do papel concentre mais adesivo do que as bordas,

tornando a aplicação desigual. Além disso, algumas gotas de adesivo não se nebulizavam corretamente, concentrando adesivo em alguns pontos da superfície do papel. Com isso, decidiu-se aplicar o *spray* manualmente, tentando manter uma distância aproximada de 24 cm, movendo-se o *spray* lentamente sobre o papel, demonstrando que o controle das variáveis relevantes foi problemático.

Outro problema observado foi o do tempo de secagem recomendado pela literatura [107], sendo de 30 min após a aplicação da última camada. Contudo, mesmo após 1 h da aplicação da última camada os dispositivos ainda exalavam o odor dos solventes presentes no adesivo, indicando que a secagem do dispositivo não era completa.

Alguns testes preliminares realizados com os dispositivos após 30 min de secagem (não mostrados) apresentaram boa reprodutibilidade, quando da adição da solução contendo corante vermelho, permeando o dispositivo completamente. Entretanto, é de se assumir que os dispositivos microfluídicos não serão utilizados imediatamente após sua fabricação, e aumentando-se o tempo de secagem do dispositivo observou-se uma diminuição de sua eficácia. Aguardaram-se 24 h após a fabricação do dispositivo para se realizarem os testes de funcionalidade. Os resultados dos testes para os dispositivos colados estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da união de camadas dos dispositivos origami utilizando-se spray adesivo

Número dispositivo	Tempo para atingir 1º spot	Tempo para atingir último spot	Spots coloridos	Funcionou?
1	00:13:49	-	7	Não
2	00:04:54	-	15	Não
3	00:03:59	-	12	Não
4	00:07:03	-	13	Não
5	00:10:49	-	5	Não
6	00:05:26	-	14	Não
7	00:03:49	00:06:15	16	Sim
8	00:05:05	-	15	Não
9	00:08:02	-	5	Não
10	00:03:48	-	14	Não
% Funcionamento				10%

Fonte: Autoria própria.

Os dispositivos colados apresentam como inconveniência a impossibilidade de se desacoplar as camadas para avaliar a causa da baixa taxa de sucesso, pois

acabam rasgando quando separadas as camadas. Inicialmente propôs-se que a baixa taxa de funcionamento desses dispositivos fosse devido ao aumento da hidrofobicidade do adesivo entre as camadas após a cura por 24 h. Contudo, medidas de ângulo de contato do adesivo sobre celulose demonstraram que o papel permanecia hidrofílico com aplicação do adesivo em *spray* ($\theta_{SL} = 0^\circ$), e que a aplicação do adesivo sobre padrões de cera impressa e aquecida inclusive diminuía o ângulo de contato com água ($\theta_{SL} = 112^\circ \pm 3^\circ$ para $95^\circ \pm 2^\circ$, ou para $82^\circ \pm 4^\circ$ quando adicionada em excesso) [107], demonstrando que o adesivo em *spray* é mais hidrofílico do que hidrofóbico.

Levando-se em consideração as dificuldades experimentais encontradas para a aplicação do *spray* no dispositivo, acredita-se que se inseriu adesivo em excesso entre as camadas, criando outras direções de permeação que não as estipuladas pelos padrões em cera, o que pode explicar o insucesso desse método de acoplamento entre camadas (10% de funcionamento).

4.1.3.2 Dispositivos tridimensionais origami unidos por aparato magnético externo

O aparato magnético externo (3.1.2.2 Dispositivos tridimensionais origami unidos por aparato magnético externo) apresentou os melhores resultados nos testes de união de camadas adjacentes, quando comparado com os demais métodos. Esse método também foi útil para avaliar a dispersão dos fluidos, no estudo do *design* dos dispositivos, pois não é um método de união permanente. O aparato magnético também apresenta a vantagem de não ser descartável, podendo ser utilizado para realizar diversos testes, o que também minimiza os custos de produção dos microchips.

Entretanto, os aparatos magnéticos apresentam como desvantagem a influência do operador, o qual deve alinhar o μ PAD com as camadas superior e inferior do aparato, além de inserir a amostra e digitalizar o resultado. Os resultados obtidos com os dispositivos unidos com o aparato magnético externo estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da união de camadas dos dispositivos origami utilizando-se o aparato magnético externo

Número dispositivo	Tempo para atingir 1º spot	Tempo para atingir último spot	Spots coloridos	Funcionou?
1	00:02:20	00:04:52	16	Sim
2	00:02:07	00:03:27	16	Sim
3	00:02:11	00:05:22	16	Sim
4	00:01:58	-	15	Não
5	00:01:51	00:04:49	16	Sim
6	00:01:49	00:04:22	16	Sim
7	00:01:28	00:03:28	16	Sim
8	00:02:11	00:05:10	16	Sim
9	00:02:15	00:05:36	16	Sim
10	00:01:59	-	14	Não
% Funcionamento				80%

Fonte: Autoria própria.

4.1.3.3 Dispositivos tridimensionais origami unidos por cliques de papel

A união das camadas adjacentes via cliques de papel (3.1.2.3 Dispositivos tridimensionais origami unidos por cliques de papel) foi realizada com o intuito de se minimizar a interferência do usuário na utilização do microchip, uma vez que não seria necessário a dobragem nem a inserção dos cliques pelo usuário, o qual atuaria apenas inserindo a amostra no dispositivo e obtendo a imagem digitalizada. Contudo, os cliques de papel aplicam uma tensão grande ao dispositivo, como é possível observar na Figura 20, distorcendo-o. A tensão aplicada também era desigual, exercendo uma pressão maior nas bordas do dispositivo do que no centro, favorecendo a permeação dos fluidos aos spots das bordas do que nos spots do centro do dispositivo. Os resultados obtidos com os dispositivos unidos com cliques de papel estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados da união de camadas dos dispositivos origami utilizando-se cliques de papel

Número dispositivo	Tempo para atingir 1º spot	Tempo para atingir último spot	Spots coloridos	Funcionou?
1	00:02:00	00:03:29	16	Sim
2	00:01:34	-	15	Não
3	00:01:23	00:03:43	16	Sim
4	00:01:44	-	14	Não
5	00:01:51	-	15	Não
6	00:01:40	-	15	Não
7	00:01:49	-	15	Não
8	00:01:57	-	14	Não
9	00:01:46	-	14	Não
10	00:01:36	-	14	Não
			% Funcionamento	20%

Fonte: Autoria própria.

4.1.3.4 Dispositivos tridimensionais origami unidos por grampos de papel

A união das camadas adjacentes via grampos de papel (3.1.2.4 Dispositivos tridimensionais origami unidos por grampos de papel) foi aplicada como alternativa ao uso dos cliques de papel (3.1.2.3 Dispositivos tridimensionais origami unidos por cliques de papel), pois teoricamente distorceriam menos os dispositivos, aplicando uma pressão mais uniforme. Contudo, este método não se apresentou eficiente, visto que não permitiu a permeação do fluido através do dispositivo inteiro.

Outro problema observado com este método foi a da permeação desigual do fluido, quando o mesmo alcançava a última camada do dispositivo. Dado que as bordas dos dispositivos foram grampeadas para unir as camadas, a pressão aplicada era maior nas bordas do que no centro do dispositivo, assim como no método dos cliques de papel. Isso fez com que os *spots* das bordas também fossem preenchidos preferencialmente aos *spots* centrais, o que não é interessante para as reações enzimáticas. Os resultados obtidos com os dispositivos grampeados estão representados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados da união de camadas dos dispositivos origami utilizando-se grampos de papel

Número dispositivo	Tempo para atingir 1º spot	Tempo para atingir último spot	Spots coloridos	Funcionou?
1	00:01:27	-	12	Não
2	00:01:21	-	12	Não
3	00:01:21	-	10	Não
4	00:01:16	-	13	Não
5	00:01:12	-	13	Não
6	00:01:04	-	14	Não
7	00:01:34	-	13	Não
8	00:01:07	-	12	Não
9	00:00:55	-	14	Não
10	00:00:41	-	15	Não
% Funcionamento				0%

Fonte: Autoria própria.

4.1.4 Escolha do método de união das camadas nos dispositivos em 3 dimensões

Os primeiros dispositivos do tipo origami na literatura utilizavam como método de união de camadas aparatos externos com parafusos [110] (Figura 17b), os quais exercem a pressão conforme se aplica torque sobre os parafusos. Entretanto, esse método é sensivelmente mais difícil de reproduzir, pois o torque exercido no parafuso é diferente cada vez que se abre / fecha o dispositivo, além de operar com 4 parafusos distintos, o que também pode exercer pontos de pressão distintos no dispositivo, fazendo com que alternativas a esse método fossem estudadas.

Dos métodos de união de camadas aqui estudados, nenhum permitiu que os fluidos chegassem exatamente ao mesmo tempo na última camada. Houve uma diferença de cerca de 2 min no método do aparato magnético externo, o qual apresentou uma maior porcentagem de dispositivos funcionais. Ainda assim, a dispersão de líquidos na última camada foi aleatória nos 10 testes realizados com o aparato magnético, demonstrando que não há formação de zonas preferenciais de distribuição do líquido, o que é um indicativo que a pressão aplicada ao dispositivo é uniforme, característica essa desejável. Comparando-se a eficiência dos métodos de união em termos do número de dispositivos funcionais (Figura 44), tem-se que o aparato magnético externo apresentou-se como mais apropriado, sendo escolhido para unir os dispositivos para a realização dos ensaios enzimáticos.

Figura 44 – Comparação entre os métodos de acoplamento de camadas dos dispositivos tridimensionais estudados. Ressalta-se que a taxa de funcionamento dos dispositivos unidos com grampos foi nula (0%).

Fonte: Autoria própria.

4.1.5 Homogeneidade dos testes

Após escolher o melhor *design* para o dispositivo (4.1.2 *Design* dos dispositivos em três dimensões) e o melhor método de união de camadas (4.1.4 Escolha do método de união das camadas nos dispositivos em 3 dimensões), avaliou-se a homogeneidade da coloração nos *spots* nessas condições, sendo este o parâmetro indicativo da funcionalidade do sistema.

Utilizando-se os 8 ensaios funcionais com o aparato magnético (3.1.2.2 Dispositivos tridimensionais origami unidos por aparato magnético externo), avaliou-se a intensidade média de pixel em cada *spot* (3.11.1 *Softwares* comerciais de análise de imagens) no canal vermelho. Visualmente, os dispositivos apresentaram homogeneidade em todos os *spots* (16 *spots* / dispositivo) Os resultados estão representados na Figura 45.

Figura 45 – Comparação da coloração exibida entre os 8 ensaios funcionais utilizando o aparato magnético, para os dispositivos com o quinto design.

Fonte: Autoria própria.

Realizou-se uma análise de variância bimodal (ANOVA) com 99,9% de significância para os resultados da Figura 45. Os resultados do teste (Tabela 10) demonstram que não há diferença estatística significativa dentro de um mesmo ensaio, o que indica que a dispersão de fluidos no sistema avaliado é, de fato, homogênea ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$), como era esperado.

Entretanto, é importante notar que essa análise estatística também demonstrou que há diferenças estatísticas significativas entre dispositivos distintos ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$). Isso indica que a detecção por curva analítica externa nesses dispositivos pode ser prejudicada pela baixa homogeneidade entre testes, justificando-se o uso de curvas analíticas por adição de padrão no sistema estudado [47], ao invés de curvas externas, apenas.

Tabela 10 – Resultado ANOVA bimodal para os 8 ensaios funcionais no aparato magnético com o dispositivo com o design 5

ANOVA bimodal (99,9% de significância)						
Fonte da variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	valor-P	F _{crítico}
Spots	92,36719	15	6,157813	2,64	0,00198	2,82
Testes	308,1797	7	44,02567	18,91	3,97E-16	3,81
Erro	244,4453	105	2,328051			

Fonte: Autoria própria.

4.2 Modificação da Celulose

4.2.1 Síntese do FNAB

O procedimento de síntese 1 do FNAB (3.2.1 Síntese 1) foi escolhido com base no maior rendimento reportado pela literatura (92%), objetivando-se a economia de recursos [124]. O espectro de FTIR da síntese 1 é apresentado na Figura 46. A banda em $3064,8\text{ cm}^{-1}$ é característica do estiramento C-H de anel aromático; em $2135,1\text{ cm}^{-1}$ do estiramento dos nitrogênios da azida; em $1537,2\text{ cm}^{-1}$ o estiramento assimétrico N-O; em $1357,8\text{ cm}^{-1}$ o estiramento simétrico do N-O; em $1271,0\text{ cm}^{-1}$ o estiramento C-F; em $827,5\text{ cm}^{-1}$ a torção fora do plano C-H de anel aromático tri-substituído nas posições 1,2,4 [129]. Pela interpretação do espectro concluiu-se que a molécula sintetizada era a de interesse.

Figura 46 – Espectro de FTIR do 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB) utilizando-se a síntese 1, evidenciando-se as bandas de interesse.

Fonte: Autoria própria.

O espectro de ^1H -RMN do FNAB é apresentado na Figura 47. Para a molécula de FNAB esperava-se um espectro constituído por poucas bandas, nomeadamente um singlete muito desblindado, com integração relativa a 1; um dublete menos blindado, com integração relativa a 1 e um dublete mais blindado, com integração relativa a 1. Entretanto, ao se interpretar o espectro obtido observou-se a presença de diversos picos que não correspondiam aos do composto de interesse. Analisando-se os espectros dos reagentes utilizados na síntese (em especial o do 4-flúor-3-nitroanilina, reagente de partida) observou-se grande correspondência de picos [129], concluindo-se que a amostra ainda apresentava impurezas.

Figura 47 – Espectro de ^1H -NMR do 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB) em CCl_3D .

Fonte: Autoria própria.

Apesar de a literatura reportar o procedimento como o de maior rendimento, talvez o mesmo não fosse o mais apropriado. A síntese dessa aril-azida a partir do t-ButONO é um procedimento considerado brando, mais recomendado para moléculas com grupamentos básicos susceptíveis à degradação nas condições normais de uma reação de diazotação, não sendo este o caso. A necessidade de se preparar o precursor terc-butil-nitrito em uma reação com duração superior a 12 h e um maior número de etapas reacionais não justificam o ganho no rendimento [124], de maneira que se optou pela mudança para a síntese convencional [125] (3.2.2 Síntese 2).

O espectro de FTIR da síntese 2 é apresentado na Figura 48. A banda em $3080,3\text{ cm}^{-1}$ é característica do estiramento C-H de anel aromático; em $2129,4\text{ cm}^{-1}$ do estiramento dos nitrogênios da azida; em $1541,1\text{ cm}^{-1}$ o estiramento assimétrico N-O; em $1352,1\text{ cm}^{-1}$ o estiramento simétrico do N-O; em $1271,0\text{ cm}^{-1}$ o estiramento C-F; em $827,5\text{ cm}^{-1}$ a torção fora do plano C-H de anel aromático tri-substituído nas posições 1,2,4 [129]. Pela interpretação do espectro concluiu-se que a molécula sintetizada era a de interesse.

Figura 48 – Espectro de FTIR do 1-flúor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB) utilizando-se a síntese 2, evidenciando-se as bandas de interesse.

Fonte: Autoria própria.

4.2.2 Funcionalização da superfície da celulose com FNAB

A irradiação da membrana de celulose contendo FNAB com radiação no UV em 365 nm ativa o grupo nitreno do FNAB pela eliminação de N_2 . O nitreno ativado reage com a matriz celulósica, nomeadamente no hidrogênio ligado a C3, e liga-se a esse carbono via uma reação de inserção, tal como representado na Figura 49.

Figura 49 – Ativação da celulose utilizando-se o FNAB. (a) Ativação do nitreno do FNAB por irradiação no UV (365 nm), com eliminação de N_2 . (b) Reação de inserção do nitreno em ligação C-H no C3 de um dos anéis de piranose na celobiose.

(a)

(b)

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de BORA, U.; KANNAN, K.; NAHAR, P. A simple method for functionalization of cellulose membrane for covalent immobilization of biomolecules. **Journal of Membrane Science**, v. 250, n. 1-2, p. 215–222, 2005.

Ao se ativar a celulose com o FNAB, observou-se a mudança na cor do substrato celulósico, de branco para marrom, como se pode observar na Figura 50. Tal fato não é de interesse na produção de dispositivos microfluídicos com detecção colorimétrica, principalmente utilizando-se o par I_2/I_3^- como indicador redox, pois a coloração marrom altera o sinal de fundo e prejudica os limites de detecção e quantificação do método.

Figura 50 – Membranas de celulose ativadas com o FNAB. (a) Aplicação do FNAB sobre o substrato celulósico, após evaporação do metanol. (b) Membranas ativadas com FNAB, após irradiação com radiação UV (365 nm) durante 35 min. (c) Membranas ativadas com FNAB após lavagem com metanol para retirada de espécies não reagidas / não imobilizadas - frente. (d) Membranas ativadas com FNAB após lavagem com metanol para retirada de espécies não reagidas / não imobilizadas – verso – No centro da placa de Petri há um disco de papel de cromatografia Whatman® n°. 1 para comparação de cores.

Fonte: Autoria própria.

Outro fato que contraria o uso do FNAB como reagente em ponte para aplicações em microfluídica em papel é alteração do ângulo de contato da celulose com a água. O papel cromatográfico Whatman® n°. 1 é completamente molhante ($\theta_{SL} = 0^\circ$), mas quando ativado com o reagente em ponte FNAB passa a apresentar

um ângulo de contato $\theta_{SL} = 112^\circ \pm 5^\circ$, indicando que a molhabilidade da celulose foi alterada (Figura 51), tornando o papel mais hidrofóbico. Para os dispositivos microfluídicos em 3 dimensões, a alteração da permeação de soluções aquosas pela matriz celulósica impede que os reagentes atinjam a zona de detecção, inutilizando o teste.

Figura 51 – Gota de água sobre a superfície de uma membrana de celulose ativada com o FNAB, demonstrando a diminuição da molhabilidade da celulose.

Fonte: Autoria própria.

Assim, a alteração na cor da matriz celulósica e a alteração no ângulo de contato celulose-água para valores superiores a 90° indicam que o FNAB não é o reagente mais apropriado para ativação da celulose, em aplicações que envolvam permeação de líquido na matriz celulósica ou detecção colorimétrica.

Outro fato que também desestimula o uso desse reagente para o uso em μ PADs é a impossibilidade de se inserirem enzimas distintas em uma mesma camada, dado que o método de imobilização enzimática requer a incubação da membrana ativada com as enzimas de interesse durante 2 horas, sob agitação constante e temperatura de 37°C [28]. Além disso, considerando-se o *design* proposto e os métodos de união de camadas para os chips tridimensionais (3.1.2 Dispositivos em 3 dimensões), apenas a união com *spray* adesivo seria adequado para a ativação da celulose com FNAB, dado o tratamento independente possível para cada camada, e este método mostrou-se ineficiente durante os ensaios.

4.2.3 Oxidação da celulose com m-periodato de sódio

Acredita-se que a oxidação de dióis vicinais pelo íon periodato ocorre por meio da formação de um aduto cíclico entre o diol e o periodato, como representado na Figura 52 [130].

Figura 52 – Oxidação da celulose com m-periodato de sódio, para formar o 2,3-dialdeído celulose.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry: reaction and synthesis**. 5th. ed. New York: Springer, 2007. 1322 p.

Esta reação se processa em meio brando, e o grau de oxidação da celulose pode ser aumentado tanto por um incremento na temperatura de reação [36] quanto pelo tempo de reação [36,131]. Contudo, é relevante destacar que as propriedades físico-químicas da celulose dependem do seu grau de oxidação, além das propriedades mecânicas, também de interesse na fabricação de dispositivos microfluídicos. Membranas de celulose com alto grau de oxidação tendem a ser pouco maleáveis e quebradiças, o que restringe os métodos de confecção dos μPADs .

A Figura 53 apresenta espectros de FTIR-ATR para o papel cromatográfico Whatman[®] n^o. 1, normal e oxidado durante diferentes períodos. É possível observar nos espectros o aparecimento de uma banda na região de 1734 cm^{-1} , e o aumento na intensidade dessa banda com o aumento no tempo de oxidação quando em contato com o periodato. Essa banda é característica de carbonilas de grupos aldeídos [129], o que comprovou a oxidação da celulose no papel cromatográfico Whatman[®] n^o. 1. A banda na região de 1640 cm^{-1} é referente ao dobramento angular das moléculas de água adsorvidas na superfície da celulose [129].

Figura 53 – Espectros de FTIR da celulose oxidada.

Espectros de FTIR para celulose oxidada

Fonte: Autoria própria.

A oxidação da celulose em condições brandas por breves períodos não modifica a celulose a nível estrutural, como demonstrado nos difratogramas de raios-x da Figura 54. Oxidando-se a celulose em temperatura ambiente (25 °C), em até 2 horas, modifica-se apenas sua superfície, mantendo-se sua cristalinidade inalterada, corroborando com dados da literatura [131]. A partir de 4 h, no entanto, o grau elevado de oxidação da celulose afeta sua cristalinidade, tornando o material mais amorfo [131]. Experimentos preliminares com m-periodato de sódio e celulose durante 24 h e temperatura de 65 °C chegaram até mesmo a oxidar completamente a membrana de papel, obtendo-se uma solução com coloração castanha e I_2 sólido (não mostrados), dado o poder oxidante do periodato.

Figura 54 – Difratomogramas de raios-x da celulose oxidada.

Fonte: Autoria própria.

Buscou-se então um compromisso entre a quantidade de grupos carbonílicos gerados (responsáveis pelo acoplamento das enzimas na superfície da celulose) e os aspectos estruturais do papel – mantendo-se sua maleabilidade e facilidade de fabricação de microdispositivos, optando-se então pela oxidação da celulose durante 1 hora. A oxidação da celulose apenas durante 30 min [37] gera poucos grupos carbonílicos na superfície da celulose, como se pode observar no espectro de FTIR (Figura 53), não se aproveitando todo o potencial que a imobilização de biomoléculas tem a oferecer aos PADs.

4.3 Capacidade retentiva dos analitos

Para que os ensaios nos dispositivos microfluídicos sejam reprodutíveis é necessário assegurar que a concentração dos analitos não sofra alterações durante a permeação do líquido na matriz celulósica, desde a aplicação da amostra em uma extremidade do dispositivo até a detecção na outra extremidade, a não ser que mais analito seja adicionado durante o percurso, tal como no método de adição de padrão. Para tanto, as interações entre a celulose / água (fase estacionária) e os

analitos não deve afetar sua migração até a última camada do dispositivo, mantendo assim a concentração da solução constante durante o percurso.

Analizou-se a capacidade retentiva da glicose, do peróxido de hidrogênio e do iodeto de potássio em papel cromatográfico Whatman® n°. 1 e o papel cromatográfico Whatman® n°. 1 oxidado com m-periodato de sódio durante 1 h, utilizando-se água deionizada como eluente.

Como é possível observar na Figura 55, o papel cromatográfico Whatman® n°. 1 não apresentou sinais de alteração na migração da glicose e dos íons iodeto (fator de retenção unitário para ambas espécies), como era de se esperar, uma vez que a fase estacionária (água suportada em celulose) e a fase móvel (água) eram as mesmas, não havendo força motriz para um processo de partição dos analitos entre as fases [132]. O peróxido de hidrogênio, por outro lado, apresentou certa retenção ($F_r = 0,89$), indicando que pode ter havido interação entre o peróxido e a celulose diretamente, onde o papel pode não ter atuado apenas como suporte da fase estacionária.

Figura 55 – Análise da capacidade retentiva dos analitos em celulose normal e em celulose oxidada durante 1 hora. (a) Capacidade retentiva da glicose em celulose normal. (b) Capacidade retentiva da glicose em celulose oxidada. (c) Capacidade retentiva do H_2O_2 em celulose normal. (d) Capacidade retentiva do H_2O_2 em celulose oxidada. (e) Capacidade retentiva do KI em celulose normal. (f) Capacidade retentiva do KI em celulose oxidada.

Para as membranas oxidadas observou-se que a glicose e o peróxido não apresentaram variações em suas migrações ($F_r = 1,0$ e $0,89$, respectivamente), sendo uma característica considerada positiva, demonstrando que a oxidação da celulose não afeta o analito de interesse (glicose) nem o seu intermediário (H_2O_2).

Contudo, o iodeto apresentou uma variação de $F_r = 1,0$ para $0,88$, indicando que a celulose oxidada possa ter atuado também como fase estacionária. Sendo o único composto iônico dentre os avaliados, presume-se que as interações intermoleculares do iodeto com a fase estacionária (seja ela água adsorvida na celulose oxidada, a celulose oxidada diretamente ou alguma outra espécie presente no meio, como íons Na^+ provenientes do m-periodato de sódio) sejam mais fortes do que seriam apenas tratando-se de compostos polares.

Analísaram-se as composições químicas das membranas (normal e oxidadas), para avaliar se houve a incorporação de outras espécies no papel durante a oxidação. A análise por fluorescência de raios-x da Figura 56 não representa a composição química real das membranas, uma vez que, segundo o fabricante, o papel cromatográfico Whatman® n.º 1 é composto apenas por celulose [133]. Outros trabalhos [63] reportam a presença de cálcio e cloro na composição dos papéis Whatman®, decorrentes de processos de branqueamento / aditivos no processo de fabricação do papel. O objetivo da análise por XRF foi demonstrar que não há variação na composição do papel após o processo de oxidação, seja por incorporação ou perda de íons, o que de fato não ocorre.

Figura 56 – Análise de fluorescência de raios-x para a celulose e celulose oxidada por diferentes períodos.

Fonte: Autoria própria.

Desse modo, a variação no fator de retenção do iodeto poderia ser explicada por algum dos seguintes mecanismos:

- i) Hidratação dos aldeídos formados durante a oxidação, gerando dióis geminais – ou seja, de uma hidroxila por carbono presente na molécula original da celulose passa-se a ter duas hidroxilas por carbono em C2 e C3, aumentando-se assim a polaridade do meio, possibilitando-se uma maior interação com o I^- / I_3^- ;
- ii) Alteração nas ligações hidrogênio realizadas pela celulose. Como apresentado na Figura 4, as ligações intermoleculares na celulose se dão por ligações hidrogênio entre C2-OH e C6-OH; e entre C3-OH e o oxigênio da piranose na celobiose e entre C3-OH e C6-OH de cadeias poliméricas adjacentes. Ao se oxidar a ligação entre C2 e C3, rompe-se essa intrincada rede de interações, na qual a C3-OH possui um duplo papel, permitindo então que mais hidroxilas estejam disponíveis para reagir com a água ou com outras espécies do meio;

- iii) Oxidações posteriores das carbonilas dos grupos aldeídos formados, dando origem a ácidos carboxílicos. Ao serem desprotonados, os carboxilatos poderiam interagir com cátions Na^+ do m-periodato de sódio ou com cátions K^+ do iodeto de potássio, e essas interações eletrostáticas também poderiam afetar a migração do iodeto durante a permeação na matriz.

Independentemente do mecanismo pelo qual o iodeto fica mais retido na celulose oxidada, o fato do $\text{I}^- / \text{I}_3^-$ ficar retido por si só já constitui uma vantagem para aplicações nos dispositivos microfluídicos. A falta de homogeneidade da coloração dos *spots* nos dispositivos microfluídicos com detecção colorimétrica constitui um problema analítico [37,76], pois aumenta os erros na etapa de detecção, comprometendo assim as figuras de mérito desse método. Ao se diminuir a mobilidade do iodeto – ou de qualquer indicador redox em sua forma reduzida com carga – impede-se que o indicador seja lixiviado às paredes do dispositivo, causando o efeito demonstrado na Figura 57.

Figura 57 – Efeito da oxidação da celulose na detecção colorimétrica. (a) Celulose normal - destaque para a formação de halos mais escuros ao redor do spot, evidenciando a distribuição desigual de cor. (b) Celulose oxidada - há maior homogeneidade de cor por todo o spot.

Fonte: Autoria própria.

Inicialmente considerou-se que os halos formados nas bordas dos *spots* na Figura 57a eram devidos ao efeito conhecido como *Coffee Rings* [134]: a

evaporação de uma gota depositada em uma superfície tende a exibir um fluxo de matéria do centro da gota à sua periferia, quando o raio da gota é fixo, e há alteração em sua altura pela evaporação do solvente. A alteração na altura da gota muda sua energia superficial, uma vez que a gota não diminui seu raio de curvatura durante a secagem, e o fluxo de matéria ocorre para minimizar as perdas por evaporação. Contudo, ao se considerar os dispositivos em papel, tem-se que em nenhum momento há a formação de gotas propriamente ditas nos dispositivos, uma vez que a celulose é completamente molhável pela água ($\theta_{SL} = 0^\circ$) e não há excesso de líquido – pelo menos nas camadas de detecção, que são as mais inferiores. Considerando-se então apenas uma camada de papel, tem-se um sistema em duas dimensões, onde não há uma força motriz que empurre os reagentes à periferia dos *spots*.

A aplicação dos reagentes nos dispositivos em papel foi realizada com o auxílio de uma micropipeta. Quando a solução do analito é depositada por último, ela tende a lixiviar os reagentes colorimétricos depositados previamente no dispositivo, fazendo com que a cor se desenvolva mais fortemente próxima às paredes do dispositivo (Figura 58). Esse fato indica que a lixiviação dos reagentes é responsável pela formação de halos e colorações mais intensas nas paredes do dispositivo, ao invés dos *Coffee Rings*.

Figura 58 – Efeito da lixiviação dos reagentes no sinal colorimétrico. (a) Quando a adição dos analitos é realizada no centro do spot, os reagentes pré-depositados são lixiviados igualmente às bordas, resultando em um sinal mais intenso nas bordas (reagentes colorimétricos concentrados nessa região) e menos intenso no centro. (b) Quando a adição dos analitos é realizada próxima a uma das bordas, a coloração mais intensa ocorrerá na borda oposta, e menos intensa na borda onde foram aplicados os analitos.

Fonte: Autoria própria.

Alguns autores atribuem a maior homogeneidade do sinal colorimétrico em celulose oxidada devido à imobilização da enzima no papel [37]. Esse efeito pode contribuir para diminuir a distribuição desigual de cor no papel; entretanto, esse efeito não seria o preponderante, e sim a maior retenção dos indicadores redox no papel, como demonstrado.

4.4 Imobilização de enzimas na celulose oxidada

A ativação da celulose oxidada pelo método do EDC/NHS para imobilização de biomoléculas em sua superfície é um método consolidado na literatura [19,37,135], evitando-se os inconvenientes de se trabalhar em meios anidros. Contudo, para se utilizar este método de bioconjugação, é necessário que a oxidação da celulose não gere apenas grupos aldeído em sua superfície, e sim

grupos ácido carboxílico. O carboxilato é responsável pelo ataque nucleofílico à carbodiimida do EDC, para gerar o intermediário instável O-acilisouréia (Figura 59). A carbonila de um aldeído não é capaz de tal ataque à carbodiimida, sendo necessária então uma etapa posterior à oxidação da celulose com m-periodato de sódio, tal como adição de clorato de sódio, para oxidar os aldeídos a ácidos carboxílicos [131,136].

Figura 59 – Reação da celulose com o EDC, NHS e imobilização enzimática, além das outras reações possíveis dentro das condições experimentais utilizadas.

Fonte: Adaptação de Morbioli (2015) a partir de HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. San Diego: Elsevier, 1996. p. 785.

Desse modo, preferiu-se optar pela conjugação direta dos grupos aldeídos da oxidação da celulose com m-periodato de sódio com os grupos laterais amina primária das enzimas, via uma reação de condensação (Figura 60). Essa abordagem é mais vantajosa que a utilização do EDC/NHS [37], uma vez que se eliminam 3 etapas reacionais do processo e o uso de 3 reagentes (1. oxidação posterior da celulose a carboxilato; 2. esterificação com EDC; 3. transesterificação com NHS).

Figura 60 – Reação de condensação entre um aldeído e uma amina primária, dando origem a uma imina (Base de Schiff), via catálise ácida.

Fonte: Autoria própria.

Alguns autores [19,20,38] recomendam a redução da imina formada durante a reação de condensação (Figura 60) a uma amina secundária, utilizando-se borohidreto de sódio ou cianoboroidreto de sódio, justificando que a redução da imina torna a ligação da biomolécula com o substrato mais estável. A preocupação da estabilidade da ligação biomolécula-substrato via uma imina reside no fato da reação representada na Figura 60 ser reversível, caso a água não seja removida do meio reacional.

Contudo, nas condições reacionais usadas, as reações entre as biomoléculas e o substrato ocorrem apenas enquanto o substrato estiver úmido, sendo que a evaporação do solvente ocorre em torno de 15 min (dependendo do tamanho dos *spots*). Assim, há a remoção contínua de água durante a imobilização enzimática, dada pela evaporação do solvente, o que dificulta a hidrólise das iminas formadas.

A glicose oxidase apresenta 16 possíveis sítios para N- glicosilação (8 de cada subunidade monomérica), além das duas extremidades N-terminal [50]; contudo, as extremidades N-terminal interagem fortemente (mas não covalentemente) com o cofator enzimático FAD, o que resulta em 16 sítios possíveis de N-glicosilação no total. Considera-se que os sítios para N-glicosilação são os responsáveis pela união covalente da enzima com o substrato, via formação de bases de Schiff (Figura 60). A adição de carboidratos à enzima é uma modificação pós-traducional comum, apresentando como funções o aumento da solubilidade da

enzima e a resistência ao ataque de proteases [50]. A união da enzima com o substrato através dessas regiões permite que a enzima permaneça ativa, por não modificar seu sítio ativo e sua conformação funcional.

A modificação da superfície da celulose oxidada pela adição da glicose oxidase é apresentada nos espectros de FTIR-ATR da Figura 61. Como é possível observar, a banda referente à carbonila de aldeídos (na região de 1730 cm^{-1}) desapareceu dos espectros. Observando-se a reação de condensação representada na Figura 60, observa-se que no produto final não há mais a carbonila de aldeído, sendo um indicativo que a reação se processou como esperado.

No espectro referente à celulose oxidada durante 20 h, com imobilização enzimática durante 30 min (Figura 61), observa-se ainda uma pequena banda em 1728 cm^{-1} , indicando a presença de aldeídos na celulose oxidada. Contudo, ao se aumentar o tempo de contato da enzima com a celulose oxidada (celulose oxidada (20 h) + enzima (12 h)), tem-se que a banda referente ao aldeído desaparece completamente, sendo outro indicativo da ocorrência da reação na direção desejada.

Os espectros de FTIR-ATR da celulose não sofrem outras alterações perceptíveis quando da imobilização enzimática em sua superfície. Isso é devido ao fato das bandas dos outros grupos funcionais ficarem encobertas por outras bandas já existentes no espectro. As bandas de estiramento de iminas ocorrem na faixa de $1690\text{ a }1640\text{ cm}^{-1}$, ficando encobertas pela banda de dobramento angular das moléculas de água adsorvidas na superfície da celulose [129]. As enzimas, por serem proteínas, apresentam diversas ligações amídicas em sua estrutura. Desse modo, a cada 1 enzima incorporada na superfície da celulose há a presença de um grande número de amidas ($n-1$ resíduos de aminoácidos). Contudo, as bandas de estiramento das carbonilas em amidas ocorrem na região de $1680\text{ a }1630\text{ cm}^{-1}$, também ficando encobertas pelas bandas de dobramento angular das moléculas de água adsorvidas na superfície da celulose [129]; as bandas de estiramento N-H ocorrem na faixa de $3475\text{ a }3150\text{ cm}^{-1}$, ficando encobertas pelas bandas de estiramento das diversas hidroxilas presentes na celulose, tanto de sua própria composição quanto as adsorvidas em sua superfície [129].

Figura 61 – Espectros de FTIR da celulose oxidada após imobilização da enzima glicose oxidase. Os tempos de oxidação e da incubação com a enzima estão indicados na legenda.

Fonte: Autoria própria.

Desse modo, o desaparecimento da banda de carbonila de aldeídos nos espectros da Figura 61 é um bom indicativo do processamento da reação de formação de iminas, mas ainda não constitui evidência o suficiente para confirmar que a imobilização das biomoléculas na superfície da celulose de fato ocorreu, ou que ocorreu de maneira eficiente, conservando as propriedades catalíticas da enzima.

Considerando-se este fato, um teste de incubação das membranas contendo as enzimas imobilizadas foi realizado. Se a oxidação da glicose ocorresse, este seria o teste definitivo para comprovar que as enzimas foram de fato imobilizadas, e que permanecem funcionais após a imobilização.

As membranas após a adição das enzimas foram lavadas abundantemente com uma solução-tampão fosfato salino e detergente não iônico Tween 20[®] (pH 7,4), deixando-se as membranas incubadas com a solução-tampão de lavagem durante 8 h. Esta etapa foi realizada para se remover todas as enzimas que não estivessem imobilizadas no papel, dada a força iônica mais elevada de um tampão salino. O pH mais elevado da solução-tampão (pH 7,4) foi escolhido de maneira a impedir que a hidrólise das iminas formadas ocorresse, pois como demonstrado no esquema da Figura 60, a reação é reversível e ocorre via catálise ácida.

Os resultados dos testes de incubação estão representados na Figura 62. Como é possível observar, o tubo contendo a membrana de celulose sem sofrer oxidação (Figura 62b) aparentemente apresenta a mesma tonalidade que o controle negativo (Figura 62a), o qual não continha enzima glicose oxidase, sendo um indicativo que a reação de oxidação da glicose não ocorreu pela ausência da enzima glicose oxidase. Para os demais tubos (Figura 62c-g), observa-se uma tonalidade amarelada, indicativo que a reação se processou. O ensaio do tubo do controle positivo (Figura 62h) foi realizado com o intuito de se avaliar a atividade da enzima, confirmando que a enzima aplicada nas membranas estava funcional.

Figura 62 – Ensaios de incubação das membranas de celulose oxidada contendo a enzima glicose oxidase imobilizada em sua superfície. (a) controle negativo – todos os reagentes do ensaio sem a enzima glicose oxidase. (b) membrana de celulose normal. (c) celulose oxidada durante 30 min. (d) celulose oxidada durante 1 h. (e) celulose oxidada durante 2 h. (f) celulose oxidada durante 4 h. (g) celulose oxidada durante 20 h. (h) controle positivo – todos os reagentes do ensaio e a enzima glicose oxidase.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 63 apresenta os espectros de absorvância no UV-vis dos testes de incubação da Figura 62. Como é possível observar, a celulose sem sofrer a etapa de oxidação não foi capaz de reter a glicose oxidase em sua superfície após a lavagem, resultando em um espectro de absorvância igual ao do controle negativo. Por outro lado, as membranas oxidadas realmente sofreram a reação de condensação e imobilizaram as biomoléculas em sua superfície, as quais permaneceram funcionais e foram capazes de oxidar a glicose nos ensaios de incubação. Os espectros de absorvância referentes à membrana de 20 h e do controle positivo não foram

realizados, dada a saturação do detector do espectrofotômetro já nos ensaios referentes às membranas de 2 e 4 h.

Figura 63 – Espectros de absorbância no UV-vis dos ensaios de incubação das membranas de celulose oxidada contendo a enzima glicose oxidase imobilizada em sua superfície.

Fonte: Autoria própria.

Pelos resultados obtidos no teste de incubação (Figura 63) comprovaram-se as evidências dos espectros de FTIR-ATR (Figura 61), e confirmou-se que a reação de imobilização enzimática via uma reação de condensação é eficaz, não necessitando de uma etapa adicional de redução, sendo o método de imobilização mais rápido e com menores custos, ideal para a aplicação em dispositivos microfluídicos em papel.

4.5 Testes de estabilidade

Os testes de estabilidade das enzimas nos dispositivos de papel foram realizados com o intuito de se avaliar o efeito do armazenamento na atividade enzimática, comparando-se as diferentes enzimas (glicose oxidase e peroxidase); a presença de um estabilizante (trealose) e o efeito da imobilização. Os resultados dos testes de estabilidade estão representados na Figura 64.

Figura 64 – Teste de estabilidade das enzimas em microchips. (a) Glicose oxidase e glicose oxidase imobilizada. (b) Glicose oxidase + trealose e Glicose oxidase imobilizada + trealose. (c) Peroxidase e peroxidase imobilizada. (d) Peroxidase + trealose e peroxidase imobilizada + trealose. (e) Glicose Oxidase + Peroxidase e Glicose Oxidase + Peroxidase imobilizadas.

Fonte: Autoria própria.

Inicialmente é necessário explicitar que os erros e a dispersão dos dados apresentados nos gráficos apresentam essa ordem de magnitude porque são devidos à: i) variabilidade dos dispositivos em papel, uma vez que os testes foram realizados apenas em triplicata, mas a medida do branco foi realizada uma única vez (dada a disposição de 16 *spots* no dispositivo, sendo 5 testes em triplicata), e o sinal absoluto foi subtraído da medida do sinal do branco [47]; ii) baixo volume de amostra inserido no dispositivo (0,5 μL / *spot*); iii) quantidade de enzimas que foram imobilizadas, quando se utilizou celulose oxidada; iv) maior sinal de fundo nos dispositivos com celulose oxidada [37]; v) representação do erro via uma distribuição de Student a 95%, ao invés de ± 1 desvio-padrão, o que aumenta a ordem do erro para medidas com um baixo número de replicatas. Já a variação entre dias pode ser explicada pela variação da temperatura e umidade no momento da realização dos testes: as variações são iguais para todos os testes realizados no mesmo dia, pois essas variáveis não foram controladas. Feita essas considerações é possível extrair informações relevantes a partir desses resultados, mesmo com erros considerados grandes.

Há um decaimento na atividade enzimática ao decorrer dos dias, já reportado na literatura [4]. Como é possível observar na Figura 64a,c,e, o decaimento observado da atividade enzimática da glicose oxidase é mais intenso, enquanto que a peroxidase apresentou uma menor variação em sua atividade durante o período avaliado (100 dias). Ao se observar o comportamento das curvas de decaimento na Figura 64e, observa-se que o perfil da curva é o mesmo da curva da glicose oxidase sozinha (Figura 64a), o que confirma que a etapa envolvendo a glicose oxidase é a limitante para a reação de interesse.

As enzimas não-imobilizadas apresentam uma queda mais acentuada na atividade próximo ao 30º dia, mas tendem a um patamar após esse período inicial. Isso pode ser explicado pela alteração na conformação das proteínas, que não estão imobilizadas na celulose, apenas adsorvidas em sua superfície.

A adsorção de proteínas na superfície da celulose é um processo dinâmico, no qual as proteínas podem se adsorver, rearranjar e desorver no substrato [137]. Ainda que as interações proteína – substrato não sejam totalmente compreendidas [137], é de se esperar que tais mudanças ocorram em maior extensão enquanto o meio apresente uma quantidade apreciável de solvente.

Estudos de adsorção de proteínas sobre substratos de ouro [137] indicam que em um primeiro momento as proteínas alongadas tendem a se adsorver paralelamente ao substrato, de maneira a cobrir sua superfície mais rapidamente. Após esse período ocorre um segundo mecanismo de adsorção, no qual as proteínas adsorvidas tendem a se rearranjar perpendicularmente ao substrato, de modo a permitir que outras proteínas também se adsorvam, aumentando interações proteína-proteína. Esse mesmo estudo demonstrou que proteínas globulares sofrem uma pequena distorção ao serem adsorvidas no substrato, modificando-se pouco após a adsorção inicial (em solução). Sendo uma proteína globular alongada, a glicose oxidase tenderá a apresentar o mesmo comportamento das proteínas globulares [49,50], sofrendo pequenas alterações de conformação em solução, após a adsorção inicial.

Enquanto o meio apresentar água o suficiente – tanto sobre a enzima quanto no substrato celulósico – determinadas conformações ativas da proteína serão mais estáveis. Contudo, com o passar do tempo novas águas poderão se adsorver / desorver da superfície da celulose ou da proteína, e a enzima tenderá a distorcer sua conformação para maximizar suas interações superficiais, o que pode favorecer conformações sem atividade biológica, podendo explicar a diminuição do sinal observado na Figura 64a.

A comparação entre os testes com enzimas imobilizadas e não imobilizada não apresentou tendências claras inicialmente, uma vez que não se lavaram os dispositivos para a retirada das enzimas não imobilizadas. Observou-se uma diminuição na atividade enzimática inicial que coincide com o período de maior queda de atividade das enzimas não imobilizadas. Isso é devido às enzimas que não sofreram imobilização no substrato, mas que permaneceram no dispositivo.

Ao se adicionar as enzimas na matriz celulósica é importante assegurar que a quantidade de enzimas seja aproximadamente a mesma em cada *spot*, uma vez que as reações colorimétricas são dependentes desse parâmetro. Ao se modificar a superfície da celulose para a imobilização enzimática tem-se que não há um controle preciso da quantidade de carbonilas geradas, pois se trata de uma reação em meio heterogêneo [18,19,22]; da quantidade desses grupos que reagiram com as enzimas; da quantidade de enzimas que permaneceram imobilizadas e, por fim, da maneira que essas enzimas foram imobilizadas – com o sítio ativo exposto ou não.

Desse modo, ao se adicionar as enzimas em cada *spot* na celulose ativada conhece-se a quantidade de enzima adicionada. Lavando-se a celulose perde-se essa informação, uma vez que não se conhece a quantidade de enzimas imobilizadas; a quantidade de enzima que ficou retida na matriz celulósica por interações inespecíficas e a quantidade de enzima que foi retirada durante a lavagem. Mais do que isso, ao se lavar as membranas, a quantidade de enzimas disponíveis para a reação pode diminuir substancialmente, impossibilitando que a reação colorimétrica se processe de maneira mensurável no intervalo de tempo em que a região reacional permanece úmida (considerando que a reação enzimática se processe em uma extensão apreciável somente em solução), o que inviabiliza o teste em papel. Eliminando-se a etapa de lavagem após a imobilização das enzimas tem-se um ganho no processo de fabricação dos μ PADs, tanto de solventes para a lavagem quanto de tempo. Dados os motivos supracitados, a etapa de lavagem após a imobilização das enzimas na matriz celulósica torna-se dispensável.

Para os testes contendo trealose (Figura 64b,d) observa-se uma menor diminuição da atividade enzimática, tanto para as enzimas imobilizadas quanto para as não imobilizadas, quando comparadas com os testes sem trealose. Isso é devido ao fato da trealose permitir que as enzimas permaneçam hidratadas por um tempo mais longo, diminuindo a influência do meio na conformação enzimática, dado o largo volume hidratado da trealose [138,139]. Observando-se os resultados da Figura 64b,d, observa-se que o acoplamento das enzimas imobilizadas com o conservante trealose tende a assegurar um meio mais homogêneo e estável para os testes enzimáticos, sendo ideal para os dispositivos microfluídicos.

4.6 Cinética enzimática

O teste de cinética enzimática no papel pode ser uma ferramenta exploratória útil para se estimar os parâmetros de uma enzima antes de sua utilização, sendo uma ferramenta versátil e de baixo custo [62].

Contudo, é importante considerar as limitações que os testes de cinética no papel podem apresentar. O método de detecção por uma câmera de vídeo constitui uma limitação nesses ensaios, uma vez que a saturação de cor em um CCD de um *scanner* ocorre mais rapidamente que nos detectores dos espectrofotômetros UV-

vis; ou seja, ao se atingir a condição de estado estacionário, pode-se ter a falsa impressão de que a velocidade máxima foi atingida, sendo na realidade apenas a saturação do detector. Desse modo, recomenda-se operar em condições de concentrações mais baixas de substrato.

Outro problema associado à detecção refere-se aos ensaios que podem ser realizados. Apenas reações colorimétricas podem ser acompanhadas por este método, o que implica no acoplamento de reações enzimáticas para atender a um número maior de ensaios possíveis. Contudo, ao se trabalhar com testes enzimáticos acoplados, nos quais o substrato de uma enzima é o produto de uma reação enzimática anterior, necessita-se ajustar o pH para ambas enzimas, o que pode ser incompatível. Dificilmente o pH ótimo para ambas enzimas será o mesmo, de maneira que elas podem estar longe do seu pH ideal (ainda que dentro da faixa de trabalho). A imobilização das enzimas no substrato pode aumentar sua faixa de trabalho [28], o que pode favorecer a condição para uma enzima sem prejudicar a outra. Dependendo do sistema, pode-se operar em uma faixa de pH que seja próxima da ideal para a enzima com menor atividade catalítica, melhorando a eficiência do teste (em termos do substrato / produto formado).

Se enzima responsável pela oxidação do reagente colorimétrico redox apresentar um K_M muito menor que a enzima de interesse, pode-se operar na condição ideal para a enzima de interesse, tal como é o caso do sistema glicose oxidase – peroxidase [62].

Além dos problemas apresentados também existe o fato das reações enzimáticas se processarem apenas enquanto houver solvente no meio. Quando realizadas na plataforma de papel, as reações estão sujeitas à evaporação do solvente, o que também pode dar a falsa impressão de um estado estacionário, quando na realidade a reação foi interrompida pela ausência de água.

Ainda assim, os testes de cinética no papel podem ser aplicados em estudos exploratórios, testes rápidos [62] ou em aulas de bioquímica / físico-química, como ferramenta didática de baixo custo.

Realizou-se o ensaio enzimático para as enzimas adicionadas diretamente sobre a plataforma de papel (Figura 65); sobre a plataforma de papel com o agente estabilizante trealose (Figura 66); sobre a plataforma de papel oxidado (Figura 67) e sobre a plataforma de papel oxidado com o estabilizante trealose (Figura 68).

Figura 65 – Monitoramento do ensaio de glicose pelo método de glicose oxidase / peroxidase / KI, sobre a plataforma de celulose normal.

Fonte: Autoria própria.

Como é possível observar na Figura 65, há uma alteração na linha de base do ensaio com água (0 mM) a partir de 1750 s, indicando que o *spot* secou totalmente. Ainda assim, como se nota para as demais concentrações, a reação prosseguiu até cerca de 3000 s, atingindo o estado estacionário em seguida. Não se consegue atribuir o formato das curvas e a alteração da linha de base às reações enzimáticas em si ou às condições experimentais empregadas, como citado anteriormente. Entretanto, tal fato não constitui necessariamente um problema para o cálculo das constantes de cinética enzimática, uma vez que para as curvas de Michaelis-Menten é necessário considerar apenas as taxas iniciais de reação para as distintas concentrações de substrato.

Figura 66 – Monitoramento do ensaio de glicose pelo método de glicose oxidase / peroxidase / KI, sobre a plataforma de celulose normal com adição de trealose.

Fonte: Autoria própria.

Ao se analisarem as curvas da Figura 66 observa-se que não há alteração apreciável da linha de base até 3500 s. Isso confirma o fato que a trealose consegue reter um grande volume de água [138,139], mantendo o meio úmido por mais tempo e permitindo que as reações enzimáticas se processem por um período mais longo, constituindo outra vantagem para as aplicações nos dispositivos microfluídicos em papel. Algumas enzimas apresentam maior atividade enzimática na presença de trealose, como a pirofosfatase (EC 3.6.1.1) [138], sendo necessário levar tal fato em consideração quando da adição desse reagente nos testes enzimáticos.

Figura 67 – Monitoramento do ensaio de glicose pelo método de glicose oxidase / peroxidase / KI, sobre a plataforma de celulose oxidada, com as enzimas imobilizadas em sua superfície.

Fonte: Autoria própria.

Ao se analisarem as curvas da Figura 67 observa-se que a celulose oxidada também consegue reter um volume maior de água, com uma alteração na linha de base a partir de 2750 s. Essa maior capacidade de reter água é um indicativo de que a celulose oxidada apresenta maior polaridade, quando comparada com a celulose normal, o que também ajuda a explicar o maior fator de retenção do iodeto (4.3 Capacidade retentiva dos analitos).

Figura 68 – Monitoramento do ensaio de glicose pelo método de glicose oxidase / peroxidase / KI, sobre a plataforma de celulose oxidada, com as enzimas imobilizadas em sua superfície e adição de trealose.

Fonte: Autoria própria.

A celulose oxidada na presença de trealose (Figura 68) aparentemente não apresentou um estado estacionário até 3600 s, mesmo para as concentrações mais elevadas de substrato, nem uma mudança significativa na linha de base. Pelo sinal obtido, nota-se que a saturação do detector não havia ocorrido ainda, demonstrando que a determinação da glicose oxidase via testes em papel não apresenta a maioria dos problemas apresentados anteriormente, e que a combinação da celulose oxidada com a trealose cria um ambiente favorável às reações enzimáticas.

Calculando-se as taxas de reação iniciais para as curvas de monitoramento de reação, traçaram-se as curvas de cinética enzimática de Michaelis-Menten para a glicose oxidase, na presença da peroxidase para o consumo de H_2O_2 . As curvas obtidas estão representadas na Figura 69.

Figura 69 – Curvas de Michaelis-Menten para a determinação dos parâmetros cinéticos da enzima glicose oxidase, em diferentes condições. (a) Enzima sobre o substrato de celulose, livre. (b) Enzima sobre o substrato de celulose, livre, com adição de trealose. (c) Enzima imobilizada na superfície da celulose oxidada. (d) Enzima imobilizada na superfície da celulose oxidada, com adição de trealose.

Fonte: Autoria própria.

Segundo o fornecedor [140], a glicose oxidase de *Aspergillus niger* apresenta uma constante de Michaelis-Menten K_M na faixa de 33 a 110 mM em solução. Outros autores indicam que a atividade da enzima é ainda maior, com K_M na faixa de 15 a 20 mM [52,141], e outros ainda com uma faixa de 25 a 27 mM [62], de maneira que o valor obtido no ensaio utilizando a placa de papel com celulose normal representado na Figura 69a ($K_M = 31,9 \pm 5,5 \text{ mM}$) é uma boa estimativa da atividade da enzima livre, sendo um indicativo que a utilização da plataforma de papel pode ser utilizada para análises exploratórias em experimentos com enzimas.

A adição da trealose ao sistema (Figura 69b) indica que houve um aumento na afinidade da enzima com o substrato, pela redução do valor de K_M de $31,9 \pm 5,5$ mM a $19,9 \pm 4,1$ mM. Tal fato já foi reportado na literatura [141], relatando que a interação entre a trealose e a enzima tende a estabilizar o complexo enzima-substrato, favorecendo assim a reação, corroborando com a mudança de K_M observada.

Entretanto, ao se imobilizar a enzima na celulose oxidada (Figura 69c) observou-se um aumento da atividade enzimática, de $31,9 \pm 5,5$ mM a $24,0 \pm 5,4$ mM. Tal fato não era esperado, pois a imobilização enzimática tende a diminuir a atividade das enzimas [141], devido a fatores como:

- i) Diminuição dos graus de liberdade da enzima, o que aumenta a estabilidade estrutural e confere maior faixa de pH útil e maior estabilidade térmica, mas dificulta a interação enzima-substrato [142];
- ii) Limitações de transporte de massa para a enzima [143];
- iii) Orientação inadequada da enzima no suporte [19];

Outros autores [62,144] afirmam que a glicose oxidase, ao ser imobilizada, em estruturas microfluídicas, realmente apresenta maior afinidade à glicose, apresentando valores de K_M mais baixos. A explicação para o efeito seria do efeito do confinamento das enzimas em um canal na escala nano, onde segundo os autores [144] a estrutura em escala reduzida permite que as enzimas se organizem de maneira mais eficiente, eliminando-se configurações expandidas e expondo os sítios catalíticos para o meio.

Na realidade, enzimas imobilizadas dificilmente atingiriam atividades catalíticas superiores a das enzimas em solução, pelos motivos supracitados. A aparente diminuição da constante de Michaelis-Menten pode ser atribuída a um aumento da carga de enzima sobre uma superfície, onde por unidade de área a quantidade de enzima é superior do que em um elemento de volume, como em solução. Além disso, canais nanométricos não apresentam fluxo turbulento, e sim fluxos laminares [128]. Estando imobilizadas na superfície dos canais, as enzimas não apresentariam problemas com transporte de massa, dado o fluxo laminar,

eliminando-se assim dois dos principais problemas apresentados anteriormente, o que explica essa aparente discrepância.

O resultado obtido na Figura 69c pode ser devido à melhoria da obtenção de sinal possibilitada pela oxidação da celulose (4.2.3 Oxidação da celulose com m-periodato de sódio), além da combinação das atividades das enzimas imobilizadas com as não imobilizadas, combinando-se esses dois sistemas, uma vez que não se lavou o substrato após a imobilização para remoção das enzimas não imobilizadas.

As membranas oxidadas não foram lavadas após a etapa de imobilização enzimática porque não havia disponível um método que quantificasse as enzimas imobilizadas na celulose, e sem o controle desse parâmetro seriam comparados sistemas com quantidade de enzimas distintas, resultando em valores de atividade enzimática distintos. Inicialmente realizou-se um teste para quantificação de proteínas com azul de tetrabromofenol [4] nas membranas de celulose normal com enzimas depositadas, para avaliar a viabilidade do método.

Contudo, o teste utilizando o azul de tetrabromofenol não apresentou resultados satisfatórios para avaliar a quantidade de enzima presente nas membranas de celulose, uma vez que se esperava observar quantidades de enzima na ordem de 17 pmol, e o teste no papel nessas condições não apresentou sensibilidade para tanto. Nas membranas lavadas a situação seria ainda mais crítica, pois a quantidade de enzima seria ainda menor, o que justifica as membranas não terem sido lavadas.

A tendência da melhoria da atividade enzimática com a trealose no teste com a enzima imobilizada e o conservante (Figura 69d) foi confirmada, como predito pela literatura [141], ainda que os valores encontrados tenham sido os mais eficientes de todos – de $31,9 \pm 5,5$ mM a $14,8 \pm 2,0$ mM – superando até mesmo os testes em que as enzimas não estavam imobilizadas no suporte. A justificativa para tanto seria pelo i) aumento de homogeneidade de sinal possibilitada pela oxidação da celulose; ii) a presença do estabilizante trealose no meio; iii) a combinação das atividades de enzimas imobilizadas e não imobilizadas, além da iv) conservação da umidade no meio pela oxidação da celulose a adição de trealose.

4.7 Dispositivos analíticos microfluídicos em 3 dimensões com enzimas imobilizadas em celulose oxidada

Após avaliar o melhor *design* e método de união das camadas (4.1.4 Escolha do método de união das camadas nos dispositivos em 3 dimensões) e o método mais apropriado para imobilização das enzimas na superfície da celulose (4.4 Imobilização de enzimas na celulose oxidada), construíram-se dispositivos analíticos microfluídicos em papel em 3 dimensões, com enzimas imobilizadas em sua superfície.

Optou-se por fabricar o dispositivo de maneira a permitir a construção de uma curva analítica de adição de padrões durante o momento da análise. Esta abordagem é vantajosa porque os efeitos de matriz em amostras biológicas podem afetar consideravelmente os resultados [145], e dependendo do modo pelo qual se obtém a imagem digital (celular, câmera digital, *scanner*), luminosidade e ângulo de obtenção, os resultados podem variar consideravelmente [146]. Ao se construir a curva analítica no microdispositivo no momento da análise, todos os *spots* de detecção estão submetidos às mesmas condições, tornando o método mais robusto [47].

Os μ PADs com adição de padrão já são conhecidos [47], mas por serem construídos em apenas uma camada de papel apresentam como inconveniente a possibilidade de ocorrer a reação entre os padrões e as enzimas antes do momento apropriado, causando erros à determinação. Ao se trabalhar com dispositivos em 3 dimensões, as camadas são tratadas individualmente, o que minimiza tais problemas.

Para trabalhar com a adição de padrão nos dispositivos em papel é necessário que algumas condições sejam satisfeitas:

- i) A concentração de analito não deve sofrer alterações ao longo do percurso, a não ser que padrões de analito sejam adicionados;
- ii) Quando o solvente alcança um padrão depositado previamente no papel é necessário que o padrão seja completamente solubilizado e passe às camadas posteriores;
- iii) Os produtos colorimétricos não devem retornar às camadas anteriores do dispositivo, pois isso diminui o sinal da amostra na zona de detecção.

Escolheu-se trabalhar com o ABTS como indicador colorimétrico para os 3D μ PADs com adição de padrão [47], pois o KI não apresentou sensibilidade o suficiente para diferenciar concentrações mais baixas nas condições utilizadas no dispositivo. Optou-se por construir as curvas de adição de padrão na faixa de 0 a 4 mmol L^{-1} , uma vez que essa faixa compreende os níveis normais de glicose na urina (0,1 a 0,8 mmol L^{-1}) [37] e os níveis alterados (acima de 1,4 mmol L^{-1}) [62], indicativo de algum distúrbio no organismo. Contudo, o uso de ABTS como indicador colorimétrico nos dispositivos em papel apresenta como inconveniente uma baixa faixa de linearidade, como demonstrado na literatura [47], sendo a saturação do detector obtida em baixas concentrações, como representado na Figura 70. O modelo que melhor se ajusta a essa condição é o de crescimento e saturação, assim como as curvas de cinética enzimática de Michaelis-Menten [47].

Figura 70 – Curva analítica externa obtida para a determinação de glicose via o teste da glicose oxidase e peroxidase, utilizando-se ABTS como indicador colorimétrico.

Fonte: Autoria própria.

Devido a esta condição o trabalho pioneiro na adição de padrão em dispositivos em papel recomenda a utilização de duas curvas: uma curva analítica externa, a qual fornecerá os dados referentes ao K da equação de crescimento

(Figura 70), e uma curva de adição de padrão [47], sendo que a concentração da amostra desconhecida é obtida ao se inserirem os dados da curva externa e da curva de adição de padrão na Equação 10.

$$C_D = \sqrt{\frac{(C_{AP} + K)^2}{4} + \frac{S_0 C_{AP} K}{S_1 - S_0}} - \frac{C_{AP} + K}{2} \quad (10)$$

Onde:

C_D é a concentração da amostra;

C_{AP} é a concentração do padrão adicionado;

K é a constante obtida através da curva de regressão;

S_1 é o sinal obtido na curva de adição de padrão;

S_0 é o sinal obtido na curva externa.

Contudo, tal abordagem não é interessante, pois ainda há a necessidade de se utilizar uma curva de calibração externa. Além do mais, apesar do modelo de Michaelis-Menten ajustar-se aos dados experimentais, tem-se o problema de atribuir uma propriedade física à constante K , sendo demonstrado que ela não depende das condições de iluminação / obtenção da imagem [47]. Por fim, outra vantagem no uso das curvas de adição de padrão é a facilidade de se extrair o resultado de interesse (concentração de analito na amostra) pela extrapolação da curva, o que não pode ser realizado se não houver uma regressão linear.

Desse modo, considerando-se apenas o intervalo de concentração mais baixo da curva analítica (0 a 4 mmol L⁻¹), adicionaram-se 0,5 µL de padrões de glicose no dispositivo 3D na disposição apresentada na Figura 71, e adicionaram-se 65 µL de soluções de glicose no topo do dispositivo, em diferentes concentrações (0 mmol L⁻¹; 0,5 mmol L⁻¹; 1 mmol L⁻¹; 2 mmol L⁻¹ e 3 mmol L⁻¹). Após 30 min digitalizaram-se os dispositivos, calculando-se a regressão linear para as curvas analíticas de adição de padrão obtidas nos 3D-µPADs (Figura 72).

Figura 71 – Disposição da adição de padrões nos dispositivos origami em 3 dimensões. O esquema em cores apresenta a concentração da solução depositada nos spots.

Fonte: Autoria própria.

Figura 72 – Curvas de adição de padrão para os 3D- μ PADs. (a) Adição de 65 μ L de solução 0 mmol L⁻¹ de glicose. (b) Adição de 65 μ L de solução 0,5 mmol L⁻¹ de glicose. (c) Adição de 65 μ L de solução 1 mmol L⁻¹ de glicose. (d) Adição de 65 μ L de solução 2 mmol L⁻¹ de glicose. (e) Adição de 65 μ L de solução 3 mmol L⁻¹ de glicose.

Fonte: Autoria própria.

Analisando-se as curvas obtidas na Figura 72, observa-se que para a faixa de concentração analisada a regressão linear retornou resultados satisfatórios. Nota-se que para o dispositivo em que se introduziram concentrações mais elevadas de analito (Figura 72e) os erros foram mais elevados, uma vez que a concentração final de analito (analito no padrão somado ao analito presente na amostra) estava fora da faixa considerada linear.

Ao se utilizar a relação coeficiente linear / coeficiente angular para estimar a concentração de analito na amostra observou-se que os valores obtidos foram sempre superiores à concentração real. Contudo, ao se construir os gráficos de concentração obtida por extrapolação das curvas de adição de padrão x concentração real da amostra adicionada ao dispositivo, observou-se uma grande correlação entre os valores (Figura 73).

Figura 73 – Concentração calculada por extrapolação nas curvas de adição de padrão x concentração real da amostra.

Fonte: Autoria própria.

Tal fato pode ser explicado utilizando-se as curvas de adição de padrão obtidas na Figura 72. Para a solução que não continha analito (0 mmol L^{-1} , Figura 72a), o coeficiente linear da regressão linear apresentou um valor não-nulo e aleatório, uma vez que: i) a matriz celulósica não é perfeitamente homogênea; ii) a glicose oxidase apresenta uma coloração amarelada natural, devido aos grupos FAD em sua estrutura; iii) o ABTS apresenta uma coloração azulada de baixa intensidade, quando na forma reduzida; iv) a celulose após o processo de oxidação passa a apresentar uma coloração também amarelada. Todos esses fatores se somam, gerando um sinal de fundo relativamente elevado.

Pelo fato de cada dispositivo ser único, não é possível subtrair um valor constante de todos os dispositivos, de forma a obter uma curva analítica passando pela origem do gráfico. Ainda assim, a curva de correlação da Figura 73 fornece uma boa estimativa da concentração de analito para as amostras com concentrações mais baixas de glicose. Para as concentrações mais altas, no entanto, o método começa a apresentar maiores erros por estar fora da zona linear.

Os dispositivos em papel apresentam baixa precisão por sua natureza, dada a quantidade de variáveis que podem afetar os resultados; ainda assim, quando um número adequado de replicatas é realizado, os erros tendem a ser minimizados, e os dispositivos passam a apresentar boa exatidão [47].

Desse modo, os 3D- μ PADs com enzimas imobilizadas em sua superfície e adição de padrão apresentam um grande potencial para testes diagnósticos realizados diretamente no local (*Point-of-Care testing* – POCT), atendendo a grande parte dos requisitos do **ASSURED Challenge** [2]. Além disso, outra vantagem dos 3D- μ PADs que não consta no **ASSURED Challenge** é a facilidade de descarte. Ao se analisar amostras biológicas é necessário evitar que o material contaminado entre em contato com pessoas e com o ambiente. Por serem constituídos de papel, os dispositivos são facilmente incinerados (Figura 74), evitando-se assim seu armazenamento [1].

Figura 74 – Descarte dos dispositivos após o ensaio via incineração. (a) μ PAD após o uso. (b) e (c) Dispositivo sendo incinerado. (d) Dispositivo após incineração.

Fonte: Autoria própria.

4.8 Detecção

O uso de *scanners* e câmeras fotográficas digitais para digitalização das imagens dos testes colorimétricos surge como alternativa ao uso de equipamentos laboratoriais, que além do elevado preço de aquisição / manutenção, também requerem profissionais treinados para sua operação, mas é necessário conhecer as limitações que tal abordagem traz consigo. Alguns trabalhos na literatura [147] afirmam que é possível utilizar um *scanner* de mesa para se realizar medidas de absorvância tal como na espectrofotometria no visível, no modo de transmitância. Essa abordagem é incorreta, uma vez que não se mede a atenuação do feixe de radiação através da amostra, e não há um caminho óptico propriamente dito.

Quando se usa o *scanner* (ou qualquer outra ferramenta digitalizadora de imagens) para se extrair informações semi-quantitativas ou quantitativas de algum sistema, tem-se que se utilizam os princípios da espectroscopia de refletância difusa, sendo esta a abordagem mais apropriada.

Utilizando-se o bioensaio de determinação da glicose a partir do sistema glicose oxidase, peroxidase e KI (Figura 75), compararam-se o espectrofotômetro de refletância difusa com um digitalizador de mesa comercial.

Figura 75 – Placa de 96 poços em papel utilizada para comparação do espectrofotômetro de refletância difusa com um digitalizador de mesa comercial.

Fonte: Autoria própria.

Os espectros de refletância obtidos foram transformados nas curvas de Kubelka-Munk (Figura 76), por meio da função de remissão de Kubelka-Munk (Equação 11).

$$F(R) = \frac{(1 - R)^2}{2R} \quad (11)$$

Onde:

F(R) é a função remissiva de Kubelka-Munk;

R é a refletância da amostra.

Figura 76 – Espectros convertidos pela função de Kubelka-Munk para os bioensaios com glicose.

Fonte: Autoria própria.

Analisando-se os espectros da Figura 76, observa-se que há um deslocamento das bandas de refletância do I_2 para maiores comprimentos de onda, conforme há o aumento da concentração desse componente. O I_2 em solventes apolares mantém sua simetria, exibindo uma coloração violeta. Contudo, em solventes polares, o I_2 acaba sendo polarizado por coordenação por elementos doadores de densidade eletrônica do solvente. Essa polarização faz com que o I_2 absorva em menores comprimentos de onda, exibindo uma coloração acastanhada [148]. Na celulose, ao se aumentar a quantidade de I_2 no meio, e mantendo-se a quantidade relativa de hidroxilas na celulose constante de um *spot* ao outro, tem-se que menos moléculas de I_2 serão polarizadas (ou serão polarizadas com uma intensidade menor), o que causa o deslocamento batocrômico observado na Figura 76.

Na Figura 77 observa-se uma curva analítica típica obtida em análises de imagens digitais [1].

Figura 77 – Curva analítica para a glicose oxidase, obtida a partir de medidas de intensidade média de pixel em cada spot do bioensaio de glicose na placa de 96 poços.

Fonte: Autoria própria.

Para comparar ambos os sistemas (espectrofotômetro e *scanner*) é necessário construir uma curva analítica para as curvas de Kubelka-Munk da Figura 76. Para tanto, ao invés de se utilizar o máximo das curvas, preferiu-se integrar as bandas, dado o deslocamento batocrômico citado anteriormente. As curvas analíticas para ambos os sistemas foram normalizadas pelos seus respectivos máximos, de maneira a permitir a comparação. A comparação entre os métodos de detecção é apresentada na Figura 78.

Figura 78 – Comparação das curvas analíticas para a determinação de glicose.

Fonte: Autoria própria.

Como é possível observar na Figura 78, o espectrofotômetro exibe uma maior região de linearidade (0 a 200 mmol L⁻¹, aproximadamente), quando comparado à curva obtida pelo *scanner*. Esse fato é devido à separação dos comprimentos de onda no espectrofotômetro, o que faz com que a saturação do detector demore mais a ocorrer. Já o *scanner* começa a apresentar desvios na linearidade a partir de concentrações de 20 mmol L⁻¹, por focalizar a radiação ao invés de dispersá-la, o que causa a saturação do detector em um menor intervalo de concentração.

Pelo perfil de ambas as curvas da Figura 78, nota-se que é válido se utilizar dos métodos de análise de imagens digitais via equipamentos de baixo custo para analisar os testes colorimétricos em plataformas de papel, respeitando-se as limitações do método.

4.8.1 Comparação do *software* PALizer com os métodos tradicionais de análise

Para avaliar a eficácia do *software* PALizer para a análise de dispositivos microfluídicos em papel, compararam-se os programas mais comumente utilizados na análise de imagens de ensaios em papel: i) Adobe Photoshop®, ii) Corel Paintshop® e iii) ImageJ com o *software* PALizer. Analisou-se a mesma imagem (Figura 79a) em triplicata usando os três programas comerciais, e a imagem com bordas recortadas (Figura 79b) para o *software* PALizer. Foi necessário remover as bordas da imagem original porque as primeiras versões do programa começavam a coletar as informações do *background* dos dispositivos a partir das bordas. As novas versões estão sendo aprimoradas para que não apresentem esse inconveniente, pois o usuário tem a opção de selecionar as regiões que contenham essa informação.

Figura 79 – Imagens analisadas pelos programas. (a) Imagem analisada pelos softwares comerciais. (b) Imagem analisada pelo *software* PALizer.

Fonte: Autoria própria.

É relevante explicitar que as triplicatas realizadas não são triplicatas verdadeiras, no sentido que não foram realizados novos experimentos. A questão relevante neste estudo foi demonstrar como o processo de análise manual de imagens é um processo sujeito a erros, além de consumir tempo. A Figura 80 apresenta o resultado das análises.

Figura 80 – Resultados da análise da mesma imagem pelos softwares comerciais e pelo software PALizer.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 81 apresenta o tempo médio consumido pela análise de um *spot* em uma imagem, enquanto a Figura 82 apresenta uma estimativa do erro cometido pela análise da mesma imagem pelos 4 *softwares*.

Figura 81 – Tempo médio de análise na análise de um spot. Ressalta-se que a análise utilizando-se o software PAllyzer era instantânea ($t = 0$ s).

Fonte: Autoria própria.

Figura 82 – Variância média de cada programa na análise de uma mesma imagem. Ressalta-se que a análise utilizando-se o software PAllyzer não apresentou variação ($s^2 = 0$).

Fonte: Autoria própria.

Como é possível observar, o *software* PALizer apresenta eficiência superior a todos os outros para a análise de imagens de testes em dispositivos em papel, tanto em termos de tempo despendido na análise de cada *spot* quanto no erro cometido ao se analisar a mesma imagem (em termos da variância média). Por não depender do operador para efetuar a medida, a análise de uma mesma imagem fornece os mesmos resultados instantaneamente, tornando a análise muito mais reprodutível e o método muito mais robusto.

4.8.2 Funcionalidades do *software* PALizer

Para detectar as regiões de interesse, ou seja, aquelas contendo o sinal analítico, basicamente, o *software* PALizer compara cores de *pixels* com suas vizinhanças. Nas versões iniciais, o *software* varria as imagens a partir das bordas, para obter as informações de *pixel* que correspondem ao *background* da imagem. Com base nessa informação o *software* compara a diferença quadrática das cores dos *pixels* do *background* com os *pixels* da imagem. Quando essa diferença atinge um limiar definido pelo usuário, o programa detecta um *spot*, e marca o local definido como *spot* como uma mancha vermelha (Figura 83). Isso auxilia o usuário na definição do limiar, caso seja necessário reanalisar a imagem.

Figura 83 – Detecção de zonas teste utilizando o *software* PALizer. (a) Imagem a ser analisada. (b) Spots detectados pelo programa, nas condições definidas pelo usuário.

Fonte: Autoria própria.

O *software* ainda continua sendo aprimorado, de maneira a atender os diferentes *designs* dos dispositivos microfluídicos. Na versão utilizada para a elaboração desse trabalho o *software* só era capaz de analisar imagens que apresentassem um *background* com coloração distinta dos *spots*, o que inviabilizava seu uso para a análise de chips em 2 dimensões, dada a variedade de cores que não correspondiam a *spots*. Mesmo com as limitações iniciais o *software* mostrou-se robusto, como se pode verificar pelas diferentes imagens e condições analisadas (Figura 84 à Figura 86).

Figura 84 – Funcionalidade do software criado. (a) Análise do teste de glicose com imagem digitalizada em scanner de mesa. (b) Mesma placa de 96 poços digitalizada com câmera digital, em condição irregular de iluminação e ângulo. (c) Mesma placa de 96 poços analisada com um ângulo mais irregular. (d) Inserção de manchas físicas nos spots.

Fonte: Autoria própria.

Figura 85 – Diferentes plataformas com configurações geométricas distintas. (a) Plataforma com um tamanho reduzido e 12 poços, apenas, com coloração distinta. (b) Placa com formatos distintos para os spots. (c) Placa com tamanhos distintos de spots.

Fonte: Autoria própria.

Figura 86 – Robustez da análise de imagens pelo software criado. (a) Placa de papel com 96 poços, contendo distintas colorações. (b) Placa de papel amassada. (c) Placa digitalizada, onde o software ainda foi capaz de detectar os spots corretamente.

Fonte: Autoria própria.

Desse modo, demonstra-se que o software PALizer apresenta grande potencialidade para aplicação em dispositivos microfluídicos em papel, e que após o aprimoramento poderá atender às mais diversas plataformas.

5 CONCLUSÃO

A oxidação da celulose com m-periodato de sódio durante 1 h possibilita a imobilização de enzimas diretamente na superfície da celulose, sem a necessidade de outras etapas e de outros reagentes, sendo um método econômico e eficiente, apropriado a testes diagnósticos de baixo custo. As membranas de celulose oxidadas com o m-periodato e contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase imobilizadas em sua superfície, na presença do conservante trealose, apresentam uma elevada atividade catalítica, adequada à realização de testes enzimáticos rápidos para determinação de glicose.

Os 3D- μ PADs com enzimas imobilizadas e com um método de adição de padrões são ferramentas promissoras no desenvolvimento e aprimoramento da microfluídica em papel, sendo uma iniciativa pioneira nessa área. O acoplamento dos 3D- μ PADs com a detecção automatizada pelo *software* desenvolvido (PALizer) minimiza ainda mais a interferência humana nos ensaios, possibilitando a obtenção de resultados instantaneamente. Entretanto, é necessário que o método de adição de padrões nos 3D- μ PADs independa completamente de curvas externas e de outros métodos de comparação, habilitando assim sua aplicação, evidenciando-se uma carência e uma oportunidade na área de microfluídica em papel.

Desse modo, os avanços na microfluídica em papel possibilitarão o uso de uma tecnologia eficiente e de baixo custo para diagnósticos, voltada para regiões carentes, zonas rurais e países em desenvolvimento, diminuindo-se a necessidade de tratamentos tardios e mais custosos, quando comparados com a medicina preventiva, suportada pelos diagnósticos precoces.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Durante o desenvolvimento desse trabalho buscou-se trabalhar novos conceitos dos dispositivos 3D em papel, por meio da imobilização de enzimas na celulose, incorporação de curvas de adição de padrão no dispositivo e detecção automatizada, sendo este um trabalho pioneiro na incorporação dessas funcionalidades em um só dispositivo, servindo bem como prova de conceito.

A evolução natural desse trabalho envolve o aprimoramento das técnicas aqui desenvolvidas, visando a aplicação dos dispositivos em campo, servindo como um método de baixo custo para diagnóstico. Para tanto, é necessária a validação do método analítico, avaliando-se todas suas figuras de mérito com a utilização de amostras reais e, de preferência, com fluidos biológicos obtidos de maneira não-invasiva, tais como urina, lágrima e suor [43].

A modificação da celulose por outros métodos, tais como organossilanos modificados [149] também pode ser incorporada nos dispositivos microfluídicos em papel em 3 dimensões, pois a alteração seletiva de alguns grupos funcionais na superfície do papel, em regiões específicas dos dispositivos, pode permitir a separação de interferentes antes dos analitos de interesse alcançarem as zonas de detecção dos dispositivos. Tal fato permite a introdução direta de uma matriz complexa nos microchips [123], eliminando-se etapas de preparo de amostra.

Inicialmente os bioensaios foram realizados individualmente em cada dispositivo, objetivando-se avaliar o funcionamento e as potencialidades dos microchips, além de permitir replicatas necessárias para a análise estatística dos dispositivos em papel [47]. Após o aprimoramento dos métodos de confecção e análise dos 3D- μ PADs, as plataformas multi-analitos em cada microchip tendem a se tornar a evolução dos mesmos. Estas plataformas diminuem o consumo de amostra e o tempo de análise, uma vez que apenas uma imagem necessita ser obtida para um diagnóstico de triagem [5].

A mudança no uso de papel cromatográfico Whatman® n.º 1 para outras matrizes celulósicas também abre um novo campo de pesquisa nos dispositivos microfluídicos. A modificação de celulose bacteriana com alteração no meio de cultura pode introduzir funcionalidades na celulose de maneira mais branda e mais eficiente [150], em comparação com as modificações em meio heterogêneo.

Por fim, o aprimoramento do *software* criado para outros *designs* de dispositivos e para outras plataformas (como *smartphones*) permitirá o desenvolvimento mais rápido das tecnologias dos dispositivos em papel, pela facilidade e rapidez de obtenção de resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M.; CARRILHO, E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 3–10, 2010.
- 2 PEELING, R. W.; HOLMES, K. K.; MABEY, D.; RONALD, A. Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward. **Sexually Transmitted Infections**, v. 82, Suppl 5, p. v1–6, 2006.
- 3 WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–73, 2006.
- 4 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S. W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G. M. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3699–707, 2008.
- 5 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 50, p. 19606–11, 2008.
- 6 JOKERST, J. C.; ADKINS, J. A.; BISHA, B.; MENTELE, M. M.; GOODRIDGE, L. D.; HENRY, C. S. Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of select foodborne pathogens. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 6, p. 2900–7, 2012.
- 7 LIN, G.; LEE, A. P. Microfluidics: an emerging technology for food and health science. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1190, p. 186–92, 2010.
- 8 LEWIS, G. G.; ROBBINS, J. S.; PHILLIPS, S. T. A prototype point-of-use assay for measuring heavy metal contamination in water using time as a quantitative readout. **Chemical Communications**, v. 50, n. 40, p. 5352–4, 2014.
- 9 YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 12, p. 2210–51, 2013.
- 10 SALLES, M. O.; MELONI, G. N.; DE ARAUJO, W. R.; PAIXÃO, T. R. L. C. Explosive colorimetric discrimination using a smartphone, paper device and chemometrical approach. **Analytical Methods**, v. 6, n. 7, p. 2047, 2014.
- 11 MORRIS, P. J. T. **From classical to modern chemistry**: The instrumental revolution. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2002. 347 p.
- 12 MÜLLER, R. H.; CLEGG, D. L. Automatic paper chromatography. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 53, n. 5, p. 1108–1118, 1949

- 13 LI, X.; BALLERINI, D. R.; SHEN, W. A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. **Biomicrofluidics**, v. 6, n. 1, p. 11301–1-11301-13, 2012.
- 14 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; BUTTE, M. J.; WHITESIDES, G. M. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie**, v. 46, n. 8, p. 1318–20, 2007.
- 15 CATE, D. M.; ADKINS, J. A.; METTAKOONPITAK, J.; HENRY, C. S. Recent developments in paper-based microfluidic devices. **Analytical chemistry**, v. 87, n. 1, p. 19–41, 2014.
- 16 FEIGL, F.; ANGER, V. **Spot tests in organic analysis**. 7. Ed. Amsterdam: Elsevier, 1966. 772 p.
- 17 GRANSTRÖM, Mari. **Cellulose derivatives : synthesis, properties and applications**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Faculty of Science, University of Helsinki, Helsinki, 2009.
- 18 KLEMM, D.; PHILIP, B.; HEINZE, T.; HEINZE, U.; WAGENKNECHT, W. **Comprehensive cellulose chemistry: fundamentals and analytical methods**. Weinheim: Wiley-VCH, 1998. v. 1. 253 p.
- 19 CREDOU, J.; BERTHELOT, T. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 30, p. 4767, 2014.
- 20 PELTON, R. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 925–942, 2009.
- 21 KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.-P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie**, v. 44, n. 22, p. 3358–93, 2005.
- 22 VIEIRA, Júlia Graciele. **Síntese e caracterização da metilcelulose, a partir do bagaço de cana-de-açúcar, para utilização como aditivo na construção civil**. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.
- 23 ROBERTS, J. C. **The chemistry of paper**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1996. 190 p.
- 24 KONG, F.; HU, Y. F. Biomolecule immobilization techniques for bioactive paper fabrication. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, n. 1, p. 7–13, 2012.
- 25 VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009.
- 26 ALKASIR, R. S. J.; ORNATSKA, M.; ANDREESCU, S. Colorimetric paper bioassay for the detection of phenolic compounds. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 22, p. 9729–37, 2012.

- 27 EVANS, E.; GABRIEL, E. F. M.; COLTRO, W. K. T.; GARCIA, C. D. Rational selection of substrates to improve color intensity and uniformity on microfluidic paper-based analytical devices. **The Analyst**, v. 139, n. 9, p. 2127–32, 2014.
- 28 BORA, U.; KANNAN, K.; NAHAR, P. A simple method for functionalization of cellulose membrane for covalent immobilization of biomolecules. **Journal of Membrane Science**, v. 250, n. 1-2, p. 215–222, 2005.
- 29 BORA, U.; SHARMA, P.; KANNAN, K.; NAHAR, P. Photoreactive cellulose membrane - A novel matrix for covalent immobilization of biomolecules. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 2, p. 220–9, 2006.
- 30 BARTLING, G. J.; BROWN, H. D.; FORRESTER, L. J.; KOES, M. T.; MATHER, A. N.; STASIW, R. O. A study of the mechanism of cyanogen bromide activation of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 14, p. 1039–1044, 1972.
- 31 HOU, A.; ZHOU, M.; WANG, X. Preparation and characterization of durable antibacterial cellulose biomaterials modified with triazine derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 328–332, 2009.
- 32 STÖLLNER, D.; SCHELLER, F. W.; WARSINKE, A. Activation of cellulose membranes with 1,1'-carbonyldiimidazole or 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate as a basis for the development of immunosensors. **Analytical Biochemistry**, v. 304, n. 2, p. 157–65, 2002.
- 33 BARROSO, T.; TEMTEM, M.; HUSSAIN, A.; AGUIAR-RICARDO, A.; ROQUE, A. C. A. Preparation and characterization of a cellulose affinity membrane for human immunoglobulin G (IgG) purification. **Journal of Membrane Science**, v. 348, n. 1-2, p. 224–230, 2010.
- 34 NAHAR, P.; WALI, N. M.; GANDHI, R. P. Light-induced activation of an inert surface for covalent immobilization of a protein ligand. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 2, p. 148–53, 2001.
- 35 FLEET, G. W. J.; PORTER, R. R.; KNOWLES, J. R. Affinity labelling of antibodies with aryl nitrene as reactive group. **Nature**, v. 224, n. 5218, p. 511–512, 1969.
- 36 VARMA, A. J.; KULKARNI, M. P. Oxidation of cellulose under controlled conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 77, p. 25–27, 2002.
- 37 GARCIA, P. D. T.; CARDOSO, T. M. G.; GARCIA, C. D.; CARRILHO, E.; COLTRO, W. K. T. A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays. **RSC Advances**, v. 4, p. 37637–37644, 2014.
- 38 WANG, S.; GE, L.; SONG, X.; YAN, M.; GE, S.; YU, J.; ZENG, F. Simple and covalent fabrication of a paper device and its application in sensitive chemiluminescence immunoassay. **The Analyst**, v. 137, p. 3821, 2012.

- 39 CARRILHO, E.; PHILLIPS, S. T.; VELLA, S. J.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Paper microzone plates. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 15, p. 5990–8, 2009.
- 40 CARVALHAL, R. F.; KFOURI, M. S.; PIAZETTA, M. H. D. O.; GOBBI, A. L.; KUBOTA, L. T. Electrochemical detection in a paper-based separation device. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 1162–5, 2010.
- 41 LEE, D. S.; ICK JANG, W.; YEON JUNG, M.; GU JEON, B.; IHM, C. A pocket-sized colorimetric urine reader for telemedicine in the developing countries. In: IEEE Sensors. **Proceedings...** . 2011. p.1495–1498. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6127234>>. Acesso em: 30 mar. 2015.
- 42 LEE, D.-S.; JEON, B. G.; IHM, C.; PARK, J.-K.; JUNG, M. Y. A simple and smart telemedicine device for developing regions: a pocket-sized colorimetric reader. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 1, p. 120–6, 2011.
- 43 ELLERBEE, A. K.; PHILLIPS, S. T.; SIEGEL, A. C.; MIRICA, K. A.; MARTINEZ, A. W.; STRIEHL, P.; JAIN, N.; PRENTISS, M.; WHITESIDES, G. M. Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 20, p. 8447–52, 2009.
- 44 VYKOUKAL, D. M.; STONE, G. P.; GASCOYNE, P. R. C.; ALT, E. U.; VYKOUKAL, J. Quantitative detection of bioassays with a low-cost image-sensor array for integrated microsystems. **Angewandte Chemie**, v. 48, n. 41, p. 7649–54, 2009.
- 45 SANTOS, Jaciara Cássia de Carvalho. **Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 46 CARDIEL, J.; ZHAO, Y.; TONGGU, L.; WANG, L.; CHUNG, J. H.; SHEN, A. Flow-induced immobilization of glucose oxidase in nonionic micellar nanogels for glucose sensing. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 20, p. 3912-6, 2014.
- 47 CHAPLAN, C. A.; MITCHELL, H. T.; MARTINEZ, A. W. Paper-based standard addition assays. **Analytical Methods**, v. 6, n. 5, p. 1296, 2014.
- 48 CHEN, X.; CHEN, J.; WANG, F.; XIANG, X.; LUO, M.; JI, X.; HE, Z. Determination of glucose and uric acid with bienzyme colorimetry on microfluidic paper-based analysis devices. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 35, n. 1, p. 363–8, 2012.
- 49 PAZUR, J. H. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Methods in Enzymology**, v. 9, n. 7, p. 82–87, 1966.
- 50 WILSON, R.; TURNER, A. P. F. Glucose oxidase: An ideal enzyme. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 7, p. 165–185, 1992.

- 51 FREY, P. A.; HEGEMAN, A. D. **Enzymatic reaction mechanisms**. London: Oxford University Press, 2007. 831 p.
- 52 RABA, J.; MOTTOLA, H. A. Glucose oxidase as an analytical reagent. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 1–42, 1995.
- 53 CARR, P. W.; BOWERS, L. D. Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry. In: **ADVANCES in biochemical engineering**. New York: John Wiley, 1980. v. 15, p. 89-129.
- 54 WANG, J. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. **Electroanalysis**, v. 13, n. 12, p. 983–988, 2001.
- 55 YU, J.; GE, L.; HUANG, J.; WANG, S.; GE, S. Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 7, p. 1286–91, 2011.
- 56 LEBEDEVA, O. V.; UGAROVA, N. N. Mechanism of peroxidase-catalyzed oxidation. Substrate-substrate activation in horseradish peroxidase-catalyzed reactions. **Russian Chemical Bulletin**, v. 45, n. 1, p. 18–25, 1996.
- 57 VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249–259, 2004.
- 58 SCHOMBERG, D.; SALZMANN, M.; STEPHAN, D. Class 1.5-1.12: Oxidoreductases. In: **ENZYME Handbook**. Berlin: Springer, 1994. v. 7, p. 1.5.1.1-1.12.99.2.
- 59 WANG, W.; NOËL, S.; DESMADRIL, M.; GUÉGUEN, J.; MICHON, T. Kinetic evidence for the formation of a Michaelis-Menten-like complex between horseradish peroxidase compound II and di-(N-acetyl-L-tyrosine). **The Biochemical Journal**, v. 340, (pte. 1, p. 329–336, 1999.
- 60 NIE, Z.; DEISS, F.; LIU, X.; AKBULUT, O.; WHITESIDES, G. M. Integration of paper-based microfluidic devices with commercial electrochemical readers. **Lab on a Chip**, v. 10, p. 3163–3169, 2010.
- 61 WU, Y.; XUE, P.; HUI, K. M.; KANG, Y. A paper-based microfluidic electrochemical immunodevice integrated with amplification-by-polymerization for the ultrasensitive multiplexed detection of cancer biomarkers. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 52, p. 180–7, 2014.
- 62 OLIVEIRA, K. A.; MEDRADO E SILVA, P. B.; DE SOUZA, F. R.; MARTINS, F. T.; COLTRO, W. K. T. Kinetic study of glucose oxidase on microfluidic toner-based analytical devices for clinical diagnostics with image-based detection. **Analytical Methods**, v. 6, n. 14, p. 4995, 2014.

63 COSTA, Mafalda Quintino do Nascimento. **Desenvolvimento de microfluídica em papel para utilização em biossensores**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

64 SANTOS, David Pena de Sousa. **Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos 3D em papel para utilização em biossensores**. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

65 DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S. Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, n. 2, p. 227–33, 2010.

66 BOSCHLOO, G.; HAGFELDT, A.; SPECTUS, C. O. N. Characteristics of the iodide / triiodide redox mediator in dye-sensitized solar cells. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 11, p. 1819–1826, 2009.

67 AWTREY, A. D.; CONNICK, R. E. The Absorption Spectra of I_2 , I_3^- , I^- , IO_3^- , $S_4O_6^{2-}$ and $S_2O_3^{2-}$. Heat of the Reaction $I_3^- = I_2 + I^-$. **Journal of American Chemical Society**, v. 73, n. 1, p. 1842–1843, 1951.

68 BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1379, p. 381–390, 1998.

69 KADNIKOVA, E. N.; KOSTIĆ, N. M. Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass. Effects of glass matrix on reactivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, p. 39–48, 2002.

70 JOSEPHY, P. D.; ELING, T.; MASON, R. P. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 7, p. 3669–3675, 1982.

71 BALLY, R. W.; GRIBNAU, T. C. Some aspects of the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as hydrogen donor in a horseradish peroxidase assay. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 27, p. 791–796, 1989.

72 HULANICKI, A.; GLAB, S. Redox indicators. Characteristics and applications. **Pure and Applied Chemistry**, v. 50, p. 463–498, 1978.

73 FORNERA, S.; WALDE, P. Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o-phenylenediamine. **Analytical Biochemistry**, v. 407, n. 2, p. 293–295, 2010.

74 S. STEENKEN, S.; NETA, P. One-electron redox potentials of phenols. Hydroxy- and aminophenols and related compounds of biological interest. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 75, p. 3661–3667, 1982.

75 HOSSAIN, S. M. Z.; LUCKHAM, R. E.; MCFADDEN, M. J.; BRENNAN, J. D. Reagentless bidirectional lateral flow bioactive paper sensors for detection of pesticides in beverage and food samples. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 21, p. 9055–64, 2009.

76 GOTARDO, Mara Andréia. **Desenvolvimento de métodos para análise de medicamentos utilizando reflectância difusa e espectrofotometria**, 2006. 173 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

77 SONG, Y.; LI, F.; YANG, Z.; AYOKO, G. A.; FROST, R. L.; JI, J. Diffuse reflectance spectroscopy for monitoring potentially toxic elements in the agricultural soils of Changjiang River Delta, China. **Applied Clay Science**, v. 64, p. 75–83, 2012.

78 UNITED STATES CENSUS BUREAU. International Data Base. **World population**. 2013. Disponível em: http://www.census.gov/population/international/data/worldpop/table_population.php. Acesso em: 09 mar. 2015.

79 INTERNATIONAL TELECOMMUNICATION UNION (ITU). **Global ICT developments**. 2014. Disponível em: <http://www.itu.int/en/ITU-D/Statistics/Pages/stat/default.aspx>. Acesso em: 09 mar. 2015.

80 POCE-FATOU, J. A.; BETHENCOURT, M.; MORENO-DORADO, F. J.; PALACIOS-SANTANDER, J. M. Using a flatbed scanner to measure detergency: A cost-effective undergraduate laboratory. **Journal of Chemical Education**, v. 88, p. 1314–1317, 2011.

81 GÖRÖCS, Z.; OZCAN, A. Biomedical imaging and sensing using flatbed scanners. **Lab on a Chip**, p. 3248–3257, 2014.

82 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global observatory for ehealth. Telemedicine: Opportunities and developments in Member States. **Observatory**, v. 2, p. 96, 2010. Disponível em: http://www.who.int/goe/publications/goe_telemedicine_2010.pdf. Acesso em: 09 mar. 2015.

83 NERY, E. W.; KUBOTA, L. T. Sensing approaches on paper-based devices: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7573–95, 2013.

84 KLASNER, S. A.; PRICE, A. K.; HOEMAN, K. W.; WILSON, R. S.; BELL, K. J.; CULBERTSON, C. T. Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 5, p. 1821–9, 2010.

85 LAPRESTA-FERNÁNDEZ, A.; CAPITÁN-VALLVEY, L. F. Environmental monitoring using a conventional photographic digital camera for multianalyte disposable optical sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 2, p. 328–37, 2011.

- 86 APILUX, A.; UKITA, Y.; CHIKAE, M.; CHAILAPAKUL, O.; TAKAMURA, Y. Development of automated paper-based devices for sequential multistep sandwich enzyme-linked immunosorbent assays using inkjet printing. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 1, p. 126–35, 2013.
- 87 FU, E.; KAUFFMAN, P.; LUTZ, B.; YAGER, P. Chemical signal amplification in two-dimensional paper networks. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 149, n. 1, p. 325–328, 2010.
- 88 XU, Y.; ENOMAE, T. Paper substrate modification for rapid capillary flow in microfluidic paper-based analytical devices. **RSC Advances**, v. 4, n. 25, p. 12867, 2014.
- 89 SHEN, L.; HAGEN, J. A.; PAPAUTSKY, I. Point-of-care colorimetric detection with a smartphone. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 21, p. 4240–3, 2012.
- 90 WANG, S.; ZHAO, X.; KHIMJI, I.; AKBAS, R.; QIU, W.; EDWARDS, D.; CRAMER, D. W.; YE, B.; DEMIRCI, U. Integration of cell phone imaging with microchip ELISA to detect ovarian cancer HE4 biomarker in urine at the point-of-care. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 20, p. 3411–8, 2011.
- 91 WONG, J. X. H.; LIU, F. S. F.; YU, H. Mobile app-based quantitative scanometric analysis. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 11966–11971, 2014.
- 92 MATTHEWS, J.; KULKARNI, R.; GERLA, M.; MASSEY, T. Rapid dengue and outbreak detection with mobile systems and social networks. **Mobile Networks and Applications**, v. 17, n. 2, p. 178–191, 2011.
- 93 YETISEN, A. K.; MARTINEZ-HURTADO, J. L.; GARCIA-MELENDEZ, A.; DA CRUZ VASCONCELLOS, F.; LOWE, C. R. A smartphone algorithm with inter-phone repeatability for the analysis of colorimetric tests. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 196, p. 156–160, 2014.
- 94 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WILEY, B. J.; GUPTA, M.; WHITESIDES, G. M. FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 8, n. 12, p. 2146–50, 2008.
- 95 NIE, J.; ZHANG, Y.; LIN, L.; ZHOU, C.; LI, S.; ZHANG, L.; LI, J. Low-cost fabrication of paper-based microfluidic devices by one-step plotting. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 15, p. 6331–5, 2012.
- 96 ABE, K.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 18, p. 6928–6934, 2008.
- 97 LI, X.; TIAN, J.; NGUYEN, T.; SHEN, W. Paper-based microfluidic devices by plasma treatment. **Lab on a Chip**, v. 8, n. 10, p. 9131–9134, 2008.
- 98 CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7091–5, 2009.

99 LI, X.; TIAN, J.; GARNIER, G.; SHEN, W. Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing. **Colloids and Surfaces B, Biointerfaces**, v. 76, n. 2, p. 564–70, 2010.

100 OLKKONEN, J.; LEHTINEN, K.; ERHO, T. Flexographically printed fluidic structures in paper. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 24, p. 10246–50, 2010.

101 DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. **The Analyst**, v. 136, n. 1, p. 77–82, 2011.

102 CHITNIS, G.; DING, Z.; CHANG, C.-L.; SAVRAN, C. A.; ZIAIE, B. Laser-treated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 6, p. 1161–5, 2011.

103 JAEGER, C. W. **How does a solid ink printer work?** 2000. Disponível em: <http://www.imaging.org/ist/resources/tutorials/solid_ink.cfm>. Acesso em: 01 jan. 2015.

104 JACOB, Jorge Alexandre Marmelo. **Desenvolvimento de placas de microtitulação em papel**. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

105 GE, L.; WANG, S.; SONG, X.; GE, S.; YU, J. 3D origami-based multifunction-integrated immunodevice: low-cost and multiplexed sandwich chemiluminescence immunoassay on microfluidic paper-based analytical device. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 17, p. 3150–8, 2012.

106 GONG, X.; YI, X.; XIAO, K.; LI, S.; KODZIUS, R.; QIN, J.; WEN, W. Wax-bonding 3D microfluidic chips. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 19, p. 2622–7, 2010.

107 LEWIS, G. G.; DITUCCI, M. J.; BAKER, M. S.; PHILLIPS, S. T. High throughput method for prototyping three-dimensional, paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 15, p. 2630–3, 2012.

108 ZANG, D.; GE, L.; YAN, M.; SONG, X.; YU, J. Electrochemical immunoassay on a 3D microfluidic paper-based device. **Chemical Communications**, v. 48, n. 39, p. 4683–5, 2012.

109 ZHANG, M.; GE, L.; GE, S.; YAN, M.; YU, J.; HUANG, J.; LIU, S. Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence device for simultaneous detection of Pb^{2+} and Hg^{2+} based on potential-control technique. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 41, p. 544–50, 2013.

110 LIU, H.; CROOKS, R. M. Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 17564–17566, 2011.

- 111 ABBAS, A.; BRIMER, A.; SLOCIK, J. M.; TIAN, L.; NAIK, R. R.; SINGAMANENI, S. Multifunctional analytical platform on a paper strip: separation, preconcentration, and subattomolar detection. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 8, p. 3977–83, 2013.
- 112 CATE, D. M.; DUNGCHAI, W.; CUNNINGHAM, J. C.; VOLCKENS, J.; HENRY, C. S. Simple, distance-based measurement for paper analytical devices. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 12, p. 2397–404, 2013.
- 113 CHENG, C.-M.; MARTINEZ, A. W.; GONG, J.; MACE, C. R.; PHILLIPS, S.T.; CARRILHO, E.; MIRICA, K. A.; WHITESIDES, G. M. Paper-based ELISA. **Angewandte Chemie**, v. 49, n. 28, p. 4771–4, 2010.
- 114 KHAN, M. S.; THOUAS, G.; SHEN, W.; WHYTE, G.; GARNIER, G. Paper diagnostic for instantaneous blood typing. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 10, p. 4158–64, 2010.
- 115 LUTZ, B. R.; TRINH, P.; BALL, C.; FU, E.; YAGER, P. Two-dimensional paper networks: programmable fluidic disconnects for multi-step processes in shaped paper. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 24, p. 4274–8, 2011.
- 116 MENTELE, M. M.; CUNNINGHAM, J.; KOEHLER, K.; VOLCKENS, J.; HENRY, C. S. Microfluidic paper-based analytical device for particulate metals. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 10, p. 4474–80, 2012.
- 117 PARK, T. S.; LI, W.; MCCracken, K. E.; YOON, J.-Y. Smartphone quantifies Salmonella from paper microfluidics. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 24, p. 4832–40, 2013.
- 118 SCHILLING, K. M.; LEPORE, A. L.; KURIAN, J. A; MARTINEZ, A. W. Fully enclosed microfluidic paper-based analytical devices. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 1579–85, 2012.
- 119 NOH, H.; PHILLIPS, S. T. Metering the capillary-driven flow of fluids in paper-based microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 10, p. 4181–7, 2010.
- 120 SCHILLING, K. M.; JAUREGUI, D.; MARTINEZ, A. W. Paper and toner three-dimensional fluidic devices: programming fluid flow to improve point-of-care diagnostics. **Lab on a Chip**, v. 13, p. 628–31, 2013.
- 121 WANG, P.; GE, L.; YAN, M.; SONG, X.; GE, S.; YU, J. Paper-based three-dimensional electrochemical immunodevice based on multi-walled carbon nanotubes functionalized paper for sensitive point-of-care testing. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 32, n. 1, p. 238–43, 2012.
- 122 MITRA, S.; BRUKH, R. Sample preparation: an analytical perspective. In: MITRA, S. (Ed.). **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. New York: John Wiley, 2003. v. 1, p. 1-35.
- 123 TANNA, S.; LAWSON, G. Analytical methods used in conjunction with dried blood spots. **Analytical Methods**, v. 3, n. 8, p. 1709, 2011.

- 124 DAS, J.; PATIL, S. N.; AWASTHI, R.; NARASIMHULU, C. P.; TREHAN, S. An easy access to aryl azides from aryl amines under neutral conditions. **Synthesis**, v. 2005, n. 11, p. 1801–1806, 2005.
- 125 RAWLINGS, A. J.; LOMAS, H.; PILLING, A. W.; LEE, M. J. R.; ALONZI, D. S.; ROUNTREE, J. S. S.; JENKINSON, S. F.; FLEET, G. W. J.; DWEK, R. A.; JONES, J. H.; BUTTERS, T. D. Synthesis and biological characterisation of novel N-alkyl-deoxynojirimycin glucosidase inhibitors. **ChemBioChem**, v. 10, p. 1101–1105, 2009.
- 126 EDWARDS, R. **Immunodiagnosics: a practical approach**. Oxford: Oxford University, 1999. p. 300.
- 127 IMAGE PROCESSING AND ANALYSIS IN JAVA. 2015. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 01 jan. 2015.
- 128 OH, K. W.; LEE, K.; AHN, B.; FURLANI, E. P. Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 3, p. 515–45, 2012.
- 129 PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. Tradução de Paulo Sérgio Ramos. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2009. 700 p.
- 130 CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry: reaction and synthesis**. 5th. ed. New York: Springer, 2007. 1322 p.
- 131 KIM, U. J.; KUGA, S.; WADA, M.; OKANO, T.; KONDO, T. Periodate oxidation of crystalline cellulose. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 3, p. 488–492, 2000.
- 132 COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 5. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 2006. 453 p.
- 133 GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES. **Grade 1 chr cellulose chromatography paper, roll, 1**. [201-]. Disponível em: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences/products/AlternativeProductStructure_21507/28419169>. Acesso em: 01 jan. 2015.
- 134 DEEGAN, R. D.; BAKAJIN, O.; DUPONT, T. F.; HUBER, G.; NAGEL, S. R.; WITTEN, T. A. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 827–829, 1997.
- 135 HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. San Diego: Elsevier, 1996. p. 785.
- 136 FRAS, L.; JOHANSSON, L. S.; STENIUS, P.; LAINE, J.; STANA-KLEINSCHKE, K.; RIBITSCH, V. Analysis of the oxidation of cellulose fibres by titration and XPS. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 260, n. 1-3, p. 101–108, 2005.

- 137 ROACH, P.; FARRAR, D.; PERRY, C. C. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 22, p. 8168–73, 2005.
- 138 SOLA-PENNA, M.; MEYER-FERNANDES, J. R. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, n. 1, p. 10–14, 1998.
- 139 COLAÇO, C.; SEN, S.; THANGAVELU, M.; PINDER, S.; ROSER, B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. **Bio/technology**, v. 10, n. 9, p. 1007–1011, 1992.
- 140 SIGMA-ALDRICH. **Glucose oxidase Type VII from *Aspergillus niger***. 2005. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/7/g2133dat.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2015.
- 141 PAZ-ALFARO, K. J.; RUIZ-GRANADOS, Y. G.; URIBE-CARVAJAL, S.; SAMPEDRO, J. G. Trehalose-mediated thermal stabilization of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology**, v. 141, n. 3-4, p. 130–136, 2009.
- 142 CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. p. 563.
- 143 COONEY, M. J. Kinetic measurement for enzyme immobilization. In: MINTEER, S. D. (Ed.). **Enzyme stabilization and immobilization: methods and protocols**. New York: Springer, 2011. v. 1, p. 207-225.
- 144 WANG, C.; SHENG, Z. H.; OUYANG, J.; XU, J. J.; CHEN, H. Y.; XIA, X. H. Nanoconfinement effects: Glucose oxidase reaction kinetics in nanofluidics. **ChemPhysChem**, v. 13, n. 3, p. 762–768, 2012.
- 145 CHIU, M. L.; LAWI, W.; SNYDER, S. T.; WONG, P. K.; LIAO, J. C.; GAU, V. Matrix effects - A challenge toward automation of molecular analysis. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 15, n. 3, p. 233–242, 2010.
- 146 SOUZA, F. R. DE; DUARTE JUNIOR, G. F.; GARCIA, P. DE T.; COLTRO, W. K. T. Evaluation of digital image capture devices for colorimetric detection on printed microzones. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1171–6, 2014.
- 147 GOMES, M. S.; TREVIZAN, L. C.; NÓBREGA, J. A.; KAMOGAWA, M. Y. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: Aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1577–1581, 2008.
- 148 FAIRBROTHER, F. Colour of iodine solutions. **Nature**, v. 159, n. 4055, p. 87, 1947.

149 CASTELLANO, M.; GANDINI, A.; FABBRI, P.; BELGACEM, M. N. Modification of cellulose fibres with organosilanes: Under what conditions does coupling occur? **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 273, n. 2, p. 505–511, 2004.

150 HU, W.; CHEN, S.; YANG, J.; LI, Z.; WANG, H. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 1043–1060, 2014.