

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

RENATO SOUSA LIMA

Biossensor condutométrico sem contato em *microchip*
contendo ácido fólico como biorreceptor

São Carlos

2010

RENATO SOUSA LIMA

Biossensor condutométrico sem contato em *microchip*
contendo ácido fólico como biorreceptor

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho.


São Carlos

2010

EXEMPLAR REVISADO

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 05 de setembro de 2010.



Renato Sousa Lima

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Francisco Sousa Neto e Maria Aparecida de Sousa Lima, e avó (*In Memoriam*), Ana Rosa Xavier, minhas referências de vida, e aos meus irmãos, Francisco Sousa Júnior e Rosana Sousa Lima, pela amizade.

AGRADECIMENTOS

† Aos professores Dr. Emanuel Carrilho, Dr. Mário C. U. de Araújo, Dr. Wendell K. T. Coltro, Dr. Ubirajara P. Rodrigues-Filho e Dr. Pedro A. P. Nascente pelos ensinamentos.

† Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), pelo acesso aos Laboratórios de Microfabricação (LMF), Filmes Finos (LFF) e Microscopia e Tunelamento (LMT).

† Aos técnicos do LNLS Maria Helena (LMF), Ângelo Gobbi (LMF e LFF) e Vínicius Pimentel (LMT), por todo o suporte técnico concedido durante o desenvolvimento deste trabalho.

† Aos integrantes do grupo BioMics, em especial à Gabriela, Thiago e Eduardo, pelas discussões e amizade.

† À CAPES (agosto de 2008), CNPq (setembro de 2008 a fevereiro de 2009) e FAPESP (março de 2009 a agosto de 2010, processo 2008/07597-4), pelas concessões das bolsas de mestrado e apoio financeiro para execução deste projeto de pesquisa.

RESUMO

LIMA, R. S. **Biossensor condutométrico sem contato em *microchip* contendo ácido fólico como biorreceptor**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um biossensor contendo transdução condutométrica sem contato (C^4D , *capacitively coupled contactless conductivity detection*) e ácido fólico (FA) como biorreceptor em *microchip*, uma nova alternativa que poderá ser utilizada na determinação do biomarcador tumoral FR- α . Essa espécie exibe interações com FA altamente específicas, com constantes de formação da ordem de 10^9 - 10^{10} . Os dispositivos microfluídicos, os quais consistiram de uma lâmina de vidro (integrando os eletrodos), dielétrico (contendo a fase biossensora) e substrato de poli(dimetilsiloxano) (PDMS, incorporando os microcanais), foram fabricados utilizando-se processos de fotolitografia e deposição de filmes finos em fase vapor. Objetivando melhorias nos níveis de detecção da C^4D , estudos de sensibilidade com base em parâmetros da curva analítica foram conduzidos alterando-se a natureza do dielétrico e a configuração dos eletrodos. Posteriormente, estudos de caracterização foram realizados para as superfícies modificadas com os intermediários de imobilização; condições reacionais distintas (reagente, concentração, solvente e tempo) foram consideradas. As técnicas de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X foram usadas, respectivamente, a fim de se verificar a possível formação de aglomerados e permitir determinações qualitativas e quantitativas sobre as composições químicas das superfícies. Como resultado dos experimentos de sensibilidade e caracterização de superfície, adotamos os parâmetros seguintes para os ensaios de interações biomoleculares posteriores: filme de SiO_2 como dielétrico, eletrodos seletivos à C^4D com formato retangular e orientação antiparalela e monocamadas automontadas do reagente 3-aminopropil(trietoxissilano) como intermediário de imobilização de FA. As duas etapas finais do trabalho foram: otimização do tempo de funcionalização com FA (3, 5 e 7 h) e caracterização da fase biossensora, realizada a partir de medidas de C^4D e microscopia de força atômica (AFM). Para o primeiro caso, os *microchips* foram aplicados a um padrão de anticorpo monoclonal específico a FA (α -FA). Os ensaios biomoleculares indicaram uma adsorção efetiva de FA junto à superfície de SiO_2 silanizada, sem a ocorrência (ao menos em níveis significativos) de impedimentos estéricos de sua espécie bioativa. Dentre os tempos de funcionalização investigados, 3 h foi aquele que resultou em uma maior sensibilidade do método. Em termos da etapa de caracterização eletroquímica da fase biossensora, seus resultados mostraram haver correlação entre a resposta analítica e as interações FA/ α -FA. Em adição, conforme indicaram as medidas de AFM, não houve alterações drásticas na morfologia do substrato (SiO_2) em função dos processos de modificação química de superfície. Por fim, o uso da C^4D como uma técnica de transdução em biossensores mostrou-se uma alternativa promissora para a análise do biomarcador tumoral FR- α . Dentre outros aspectos, essa plataforma analítica requer uma instrumentação simples, barata e portátil, não apresenta inconvenientes relacionados ao contato eletrodo/solução, dispensa o uso de mediadores redox e permite a determinação simultânea de multianalitos. Neste ínterim, alterações no transdutor devem ser implementadas visando um aumento na sensibilidade do método, o qual representa seu fator limitante principal.

Palavras-chave: Sensor Químico. Condutometria Sem Contato. Microfluídica. Biomarcador Tumoral.

ABSTRACT

LIMA, R. S. **Contactless conductometric biosensor in microchip containing folic acid as bioreceptor.** 2010. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

This work describes the development of a biosensor containing capacitively coupled contactless conductivity transduction (C^4D) and folic acid (FA) as bioreceptor in microchip, a new alternative that can be used in FR- α tumor biomarker analysis. FR- α exhibits highly specific interactions with FA, showing formation constants of the order of 10^9 - 10^{10} . The microfluidic devices consisted of a glass layer (integrating the electrodes), dielectric (containing the biosensor phase), and poly(dimethylsiloxane) substrate (PDMS, incorporating microchannel). The microfabrication stage evolved photolithography processes, metal adsorption via sputtering, and plasma-enhanced vapor film deposition. In order to improve detection levels of C^4D , sensitivity studies were conducted by changing the dielectric nature and electrode configuration. Through flow analysis with given electrolyte standards, the limits of detection and quantification were calculated based on analytical curve parameters. Subsequently, researches were performed to characterize the modified surfaces with immobilization intermediate considering reaction conditions distinct (reagent, concentration, solvent, and time). The techniques of scanning electron microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy were employed, respectively, aiming to verify the clusters formation and allow qualitative and quantitative determinations about the surfaces chemical composition. From the results of sensitivity experiments and surface characterization, we adopt the following parameters for the biomolecular interactions assays: SiO_2 film as dielectric, C^4D selective electrodes with rectangular shape and antiparallel orientation, and self-assembled monolayers of 3-aminopropyl(triethoxysilane) as intermediary for immobilization of FA. The two final steps of the work were: optimizing the FA functionalization time (3, 5, and 7 h) and phase biosensor characterization, made from measures of C^4D and atomic force microscopy (AFM). For the first case, due to the absence of FR- α standard for purchase, the microchips were applied to FA specific monoclonal antibody (α -FA). The biomolecular assay indicated effective adsorption of FA, without occurrence (at least in significant levels) of steric hindrance of its bioactive specie. Among the investigated times of functionalization, 3 h resulted in a higher sensitivity of the method. In terms of biosensor phase electrochemical characterization stage, their results evidenced correlation between analytical response and FA/ α -FA interactions. Additionally, as the AFM measurements showed, drastic changes in the morphology of the substrate (SiO_2) with the surface modification processes did not occur. Finally, the use of the C^4D as transduction technical in biosensors proved to be a promissory alternative for FR- α tumor biomarker analysis. Among other features, this platform has not drawbacks related to the electrode/solution contact, dispenses the use of redox mediators, allows the simultaneous determination of multianalytes, and employs an instrumentation that is simple, cheap, and portable. Nevertheless, changes in the transducer should be implemented to increase the method sensitivity, which represents its main limiting factor.

Keywords: Chemical Sensor. Contactless Conductometry. Microfluidics. Tumor Biomarker.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Estrutura química do FA.	23
Figura 1.2. <i>Chip</i> com fibras ópticas adaptadas para condução (C) e aquisição (A) da radiação. B, bomba-seringa e V, válvula solenóide.	29
Figura 1.3. Microfabricação por fotolitografia-UV. (A) Ajuste do posicionamento do fotorresiste em relação à máscara; (B), exposição à radiação UV; (C), substrato com canal para fotorresistes positivos e (D), substrato com estrutura em alto relevo para fotorresistes negativos.	32
Figura 1.4. Esquema geral do processo de replicação: (A), moldagem e (B), desmoldagem.	35
Figura 1.5. <i>Microchip</i> contendo ouro (Au) depositado sobre uma lâmina de vidro.	38
Figura 1.6. Componentes de um sistema analítico contendo sensor em interação com uma biomolécula.	40
Figura 1.7. Ilustração de um <i>microchip</i> C ⁴ D com eletrodos fixados sobre a sua lâmina de cobertura.	51
Figura 1.8. Modelo elétrico referente ao sistema de detecção C ⁴ D. A, aplicação de sinal alternado de alta frequência sobre e_{exc} e B, aquisição, amplificação e armazenamento do sinal analítico.	52
Figura 1.9. Efeito de assimetria de carga originando a resistência dielétrica (A) e acoplamento capacitivo eletrodo/dielétrico/solução em C ⁴ D (B). q_+ e q_- , cargas consequentes da assimetria de carga; δ , densidade de carga e μ_i , μ_A e μ_R , mobilidades ideal, decorrente do efeito de assimetria e resultante, respectivamente.	53
Figura 2.1. Camadas constituintes do μ BIA-C ⁴ D. C, canal e E, eletrodo	59
Figura 2.2. <i>Layout</i> para construção do molde vidro/SU-8.	60
Figura 2.3. Camada de PDMS contendo canais (C) e tubos de silicone (T) para acesso aos reservatórios.	61
Figura 2.4. <i>Layout</i> para deposição dos metais por <i>sputtering</i> .	62
Figura 2.5. Placa de vidro com eletrodos depositados por <i>sputtering</i> .	64
Figura 2.6. Diagrama esquemático do interior do microcanal na região do transdutor.	65
Figura 2.7. Formação de APTS-SAM sobre superfície de SiO ₂ em solventes anidros.	66
Figura 2.8. Produto da reação entre APTS e FA.	67
Figura 2.9. Foto do μ BIA-C ⁴ D. S, substrato de PDMS contendo canais e mangueiras de silicone, e V, vidro incorporando eletrodos, filme fino de SiO ₂ e fase biossensora.	68
Figura 3.1. Instrumentação analítica suporte ao μ BIA-C ⁴ D. G, gerador de sinal; B, bomba-seringa; S _A e S _B , seringas contendo amostra e tampão, respectivamente; T, mangueira de teflon (adaptada ao tubo de silicone presente no <i>chip</i>); F, fonte de alimentação; C, caixa de Al com microdispositivo e circuito de recepção (ver Figura 3.2); A, circuito de amplificação de sinais em caixa de Al e D, descarte.	71

Figura 3.2. Foto do porta-amostra (A) , diagramas de fluxo (B-D) e sinais analíticos típicos (E,F) . J, jacarés para conexões elétricas; R, circuito de recepção de sinais; b, fase biossensora e S_r e S_w , respostas obtidas por e_{rr} e e_{wr} , respectivamente.	73
Figura 4.1. <i>Microchips</i> HCD (A) e C^4D^{alt} (B) . S, substrato de PDMS contendo canais e mangueiras de silicone, e V, vidro incorporando eletrodos e filme fino de SiO_2 .	77
Figura 4.2. <i>Layout</i> para deposição dos metais por <i>sputtering</i> em C^4D^{alt} . Os <i>pads</i> localizados no centro da máscara apresentaram espaçamento de 0,6 mm e dimensões iguais a 1,0 x 1,0 mm.	78
Figura 4.3. Sinais e curvas analíticas correspondentes aos microssistemas $C^4D_{SiO_2}$ (A,B) e C^4D_{PDMS} (C,D) . Condições experimentais: 400 kHz, 2,5 V_{p-p} , vazão de $100 \mu L \cdot min^{-1}$ para H_2O e amostra e tempo de amostragem em 15 s.	79
Figura 4.4. Sinais e curvas analíticas obtidos para os microdispositivos contendo C^4D (A,B) , C^4D^{alt} (C,D) e HCD (E,F) . Condições experimentais: 400 kHz, 2,5 V_{p-p} e vazão de $100 \mu L \cdot min^{-1}$ para H_2O e amostra.	82
Figura 5.1. Produto de polimerizações verticais sobre a superfície de SiO_2 envolvendo APTS.	87
Figura 5.2. Reator utilizado para modificações químicas e substrato imerso em solução de silano.	88
Figura 5.3. Micrografias do 3-IUTS formado a partir de soluções de tolueno sobre SiO_2 por 150 min com 200 (A) , 1.000 (B) (registrada para região R_1) e 5.000 (C) (registrada para região R_2) vezes de aumento. Imagens reproduzidas da referência 141.	90
Figura 5.4. Micrografias obtidas para SAM A.3 com 2.000 (A) , 10.000 (B) (registrada para região R_1) e 30.000 (C) (registrada para região R_2) vezes de aumento.	91
Figura 5.5. Micrografias obtidas para SAM B.2 com 2.000 (A) , 10.000 (B) (registrada para região R_1) e 30.000 (C) (registrada para região R_2) vezes de aumento.	92
Figura 5.6. Micrografias obtidas para SAM C.2 com 2.000 (A) , 10.000 (B) (registrada para região R_1) e 30.000 (C) (registrada para região R_2) vezes de aumento.	3
Figura 5.7. Espectros obtidos para SiO_2 modificada com SAM A.1 . Para cada componente, são informados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.	97
Figura 5.8. Espectros obtidos para SiO_2 modificada com SAM A.2 . Para cada componente, são informados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.	98
Figura 5.9. Espectros obtidos para SiO_2 modificada com SAM A.3 . Para cada componente, são informados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.	99
Figura 5.10. Espectros obtidos para SiO_2 modificada com SAM A.4 . Para cada componente, são mostrados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.	100
Figura 5.11. Espectros obtidos para SiO_2 modificada com SAM A.5 . Para cada componente, são mostrados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.	101
Figura 5.12. Espectros obtidos para SiO_2 modificada com SAM B.1 . Para cada componente, são mostrados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.	102
Figura 5.13. Espectros obtidos para SiO_2 modificada com SAM B.2 . Para cada componente, são mostrados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.	103

Figura 5.14. Espectros obtidos para SiO ₂ modificada com SAM B.3 . Para cada componente, são mostrados o valor de E _L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.	104
Figura 5.15. Espectros obtidos para SiO ₂ modificada com SAM C.1 . Para cada componente, são mostrados o valor de E _L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.	105
Figura 5.16. Espectros obtidos para SiO ₂ modificada com SAM C.2 . Para cada componente, são mostrados o valor de E _L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.	106
Figura 5.17. Relações N/Si para as condições de silanização investigadas.	108
Figura 6.1. Otimização dos parâmetros da C ⁴ D.	112
Figura 6.2. Sinais analíticos registrados para os dispositivos μBIA-C ⁴ Ds microfabricados segundo os tempos de funcionalização de 3 (A) , 5 (B) e 7 h (C) . Condições experimentais: 400 kHz, 2,5 V _{p-p} , vazão de 20 μL.min ⁻¹ para tampão (MES) e amostra (α-FA) e tempo de amostragem em 15 s.	114
Figura 6.3. Sinais obtidos pelos sistemas: e _{rr} /SiO ₂ (S _r), e _r /SiO ₂ /APTS-SAM (S) e e _{wr} /SiO ₂ /APTS-SAM/FA (S _w). Condições experimentais: 400 kHz, 2,5 V _{p-p} , vazão de 20 μL.min ⁻¹ para tampão (MES) e amostra (α-FA) e tempo de amostragem em 20 s.	116
Figura 6.4. Micrografias de 5 μm x 5 μm das superfícies: SiO ₂ (A) , SiO ₂ /APTS-SAM (B) e SiO ₂ /APTS-SAM/FA (C) .	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Biomarcadores associados ao diagnóstico e prognóstico de câncer	45
Tabela 1.2 - Exemplos de biossensores (imunossensores) para análise de biomarcadores de câncer	48
Tabela 4.1 - Valores de RSD (%) para a faixa de trabalho adotada	79
Tabela 4.2 - Valores de LOD e LOQ estimados para 95,0, 99,0 e 99,9% de confiança	80
Tabela 4.3 - Valores de RSD (%) para a faixa de trabalho adotada	81
Tabela 4.4 - Valores de LOD e LOQ estimados para 95,0, 99,0 e 99,9 % de confiança	82
Tabela 5.1 - Condições reacionais para silanização de SiO ₂ estudadas	86
Tabela 5.2 - Concentrações atômicas percentuais	95
Tabela 6.1. Valores de RMS, S _{dr} e S _{ds} calculados para as superfícies SiO ₂ , SiO ₂ /APTS-SAM e SiO ₂ /APTS-SAM/FA	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - área dos eletrodos.

Ab_{FA} - anticorpo monoclonal específico a FA.

AFM - microscopia de força atômica (*atomic force microscopy*).

A_p - área integrada de pico.

APTS - 3-aminopropil(trietoxisilano).

APTS-SAM - SAMs do silano APTS.

ButCN - 4-(trietoxisilil)butironitrila.

C - capacitância.

C₁ /C₂ - capacitores referentes aos sistemas eletrodo/solução em C⁴D.

CAQI - Central de Análises Químicas Instrumentais.

CCD - detecção condutométrica sem contato (*contactless conductivity detection*).

CCDM - Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais.

C⁴D - detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (*capacitively coupled contactless conductivity detection*).

C⁴D^{alt} - microdispositivo C⁴D contendo eletrodos segundo as dimensões e geometria propostas por Kubaň e Hauser.

C⁴D_{PDMS} - microdispositivo C⁴D contendo PDMS como dielétrico.

C⁴D_{SiO2} - microdispositivo C⁴D contendo SiO₂ como dielétrico.

CD-R - discos compactos regraváveis (*recordable compact disc*).

C_{eq} - capacitância equivalente.

C_{exc} - capacitância referente ao sistema e_{exc}/solução em HCD.

c_i - concentração das espécies iônicas presentes na amostra.

CNTFET - transistor de efeito de campo incorporando nanotubo de carbono (*carbon nanotube field-effect transistor*).

C_o - capacitância de fuga (*stray capacitance*).

C_r - capacitância referente ao sistema e_r/SiO₂/solução em HCD.

d - distância entre eletrodo e solução.

D - coeficiente de difusão.

DMSO - dimetil-sulfóxido.

DCC - N,N'-diciclohexilcarbodiimida.

DEM - Departamento de Engenharia de Materiais.

DO - detecção oscilométrica.

e - carga elementar.

\bar{E}_D - campo elétrico gerado pela polarização dos centros de carga de um dielétrico.

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

E_{ci} - energia cinética de pico.

e_{exc} - eletrodo de excitação.

EIS - espectroscopia de impedância eletroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy*).

E_L - energia de ligação.

ELISA - ensaio imunoabsorvente de ligações enzimáticas (*enzyme linked immuno sorbent assay*).

e_r - eletrodo receptor.

e_{rr} - eletrodo receptor de referência.

\bar{E}_S - campo elétrico do sistema eletrodo/dielétrico/solução em C⁴D.

e_{wr} - eletrodo receptor de trabalho.

FUNDP - *Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix.*

GA - glutaraldeído.

HPLC - cromatografia em fase líquida de alta eficiência (*high performance liquide chromatography*).

INCA - Instituto Nacional do Câncer.

i - fluxo de carga proveniente de e_r .

i_d - fluxo de carga que se direciona ao transdutor.

i_o - parcela do fluxo de carga proveniente de e_r associada a C_o .

IQSC - Instituto de Química de São Carlos.

IrO_x - óxido de irídio.

J_D - fluxo de difusão.

K_f - onstante de formação.

L - condutância.

LFF - Filmes Fino.

LISE - *Laboratoire Interdisciplinaire de Spectroscopie Électronique.*

LMF - Laboratórios de Microfabricação.

LMT - Laboratório de Microscopia e Tunelamento.

LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

LOC - *lab-on-a-chip.*

LOD - limites de detecção.

LOQ - quantificação.

MEV - microscopia eletrônica de varredura.

MIP - polímeros impressos molecularmente (*molecularly imprinted polymers*).

MMQ - método dos mínimos quadrados.

5-MTHF - 5-metiltetrahidrofolato.

NHS - N-Hidroxisuccinimida.

PC - policarbonato.

PDMS - poli(dimetilsiloxano).

PE - polietileno.

PECVD - deposição química em fase vapor assistida por plasma (*plasma-enhanced chemical vapor deposition*).

PET - poli(etileno-tereftalato).

PFPE - perfluoropoliéter.

PMMA - poli(metilmetacrilato).

PP - polipropileno.

PPF - filmes obtidos pela polimerização por plasma.

PSA - antígeno seletivo ao câncer de próstata (*prostate specific antigen*).

PT - poliéster/toner.

PU - poliuretana.

PVC - poli(cloreto de vinila).

QCM - microbalança de cristal de quartzo (*quartz crystal microbalance*).

R² - fatores de correlação das curvas analíticas.

r_i - raio iônico da partícula considerada.

RMS - rugosidade média quadrática (*root mean square*).

R_s - resistência associada ao fluido eletrolítico.

RSD - desvio padrão relativo.

RT-PCR - reações em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (*reverse transcription-polymerase chain reaction*).

SAM - monocamadas automontadas (*self-assembled monolayers*).

S_{dr} - razão da área superficial (*surface area ratio*).

S_{ds} - densidade de picos (*density of summits*).

SELEX - evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).

SPR - ressonância plasmônica de superfície (*surface plasmon resonance*).

S_r - sinal de e_{rr}.

Sulfo-LC-SPDP - hexanoato de sulfosuccinimida 6-[3-(2-piridilditiol) propilamino].

S_w - resposta de e_{wr}.

TBS - tampão TRIS salino (*TRIS buffered saline*).

Tg - tiroglobulina.

UA - uretana-acrilato.

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos.

USP - Universidade de São Paulo.

UV - radiação ultravioleta.

UV-VIS - ultravioleta-visível.

X_c - reatância capacitiva.

XPS - espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (*X-ray photoelectron spectroscopy*).

z_i - carga das espécies iônicas presentes na amostra.

α-FA - anticorpo monoclonal específico a FA.

∇c - gradiente de concentração resultante.

ε_c - permissividade elétrica da camada de isolamento do eletrodo.

ε_e - permissividade elétrica do eletrodo.

ϵ_0 - constante de permissividade.

η - viscosidade da solução.

u_i - mobilidade efetiva das espécies iônicas presentes na amostra.

μ BIA-C⁴D - microssistema contendo biossensor condutométrico sem contato para análise de interações biomoleculares.

μ TAS - microssistema para análises totais (*micro total analysis system*).

ρ_{SiO_2} - densidade do substrato SiO₂.

σ - seção de choque de fotoionização.

λ - percurso livre médio.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DO TEMA E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	19
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais e Objetivo Geral	22
1.1. Ácido Fólico e Receptores de Folato	23
1.1.1. Conceitos	23
1.1.2. Diagnóstico de Câncer Empregando FR- α como Biomarcadores	24
1.2. Microssistemas Analíticos	27
1.2.1. Miniaturização em Química Analítica	27
1.2.2. Substratos	29
1.2.3. Técnicas de Microfabricação	31
1.2.4. Tipos de Selagem	35
1.2.5. Métodos de Detecção Integrados a <i>Microchips</i>	37
1.3. Biossensores	38
1.3.1. Fundamentos	38
1.3.2. Funcionalização de Superfície	42
1.3.3. Biossensores como Plataformas de Análise de Biomarcadores Tumorais	44
1.4. Detecção Condutométrica Sem Contato	50
1.4.1. Histórico	50
1.4.2. Teoria	50
1.4.3. Vantagens em Relação à Condutometria Convencional	56
1.4.4. Tendências	57
1.5. Objetivo Geral	57
CAPÍTULO 2 – Microfabricação do μ BIA-C ⁴ D	58
2.1. Confecção dos Microcanais	59
2.2. Fabricação dos Eletrodos	61
2.3. Isolamento Elétrico dos Eletrodos	63
2.4. Construção da Fase Biossensora	64

2.5. Selagem	68
CAPÍTULO 3 – Ferramentas e Rotina de Análise	70
3.1. Instrumentação e Software	71
3.2. Rotina de Análise	72
CAPÍTULO 4 – Estudos de Sensibilidade do Transdutor	74
4.1. Microdispositivos	76
4.2. Natureza do Dielétrico: Experimental, Resultados e Discussão	78
4.3. Configurações do Transdutor: Experimental, Resultados e Discussão	80
4.4. Conclusões	84
CAPÍTULO 5 – Estudo das Condições de Silanização	85
5.1. Preâmbulo	86
5.2. Experimental	88
5.3. MEV: Resultados e Discussão	89
5.4. XPS: Resultados e Discussão	94
5.5. Conclusões	109
CAPÍTULO 6 – Estudo das Condições de Funcionalização e Caracterização da Fase Biossensora	110
6.1. Estudo das Condições de Funcionalização: Experimental, Resultados e Discussão	111
6.2. Caracterização da Fase Biossensora: Experimental, Resultados e Discussão	115
6.2.1. Caracterização Eletroquímica	115
6.2.2. Caracterização Morfológica	116
6.3. Conclusões	118
CAPÍTULO 7 – Conclusões Gerais	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
SÚMULA CURRICULAR	135

APRESENTAÇÃO DO TEMA E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO



O projeto aborda quatro assuntos em destaque na química analítica moderna: microsistemas analíticos, biossensores de reconhecimento molecular por afinidade, detecção condutométrica sem contato e análise de biomarcadores tumorais.

A dissertação apresenta-se sob a forma de capítulos, quais sejam:

CAPÍTULO 1 - Aborda inicialmente aspectos relacionados ao ácido fólico, com destaque para sua capacidade de atuar como biorreceptor do biomarcador tumoral FR- α . Em seguida, dada a relevância que a miniaturização em química analítica vem adquirindo nos últimos anos, substratos, técnicas de microfabricação, modos de selagem e detectores integrados a sistemas microfluídicos serão discutidos. Em relação aos sensores químicos, apresentaremos aspectos históricos, convenções preconizadas pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), métodos de funcionalização de superfície e uma breve revisão sobre o uso de biossensores para a detecção de biomarcadores de câncer. Por fim, fundamentos intrínsecos ao transdutor (condutometria sem contato) utilizado neste projeto serão descritos;

CAPÍTULO 2 - Apresenta os detalhes a respeito do processo de microfabricação da plataforma analítica;

CAPÍTULO 3 - Descreve sucintamente a instrumentação analítica empregada e a rotina dos ensaios analíticos;

CAPÍTULO 4 - Retrata estudos sistemáticos os quais tiveram por finalidade principal suplantar os baixos níveis de detectabilidade da transdução condutométrica sem contato. A natureza do dielétrico e configurações distintas para os eletrodos foram avaliadas através do cálculo das figuras de mérito precisão e sensibilidade, determinadas a padrões de eletrólitos;

CAPÍTULO 5 - Discute estudos de caracterização realizados para superfícies modificadas quimicamente com intermediários de imobilização, os quais consistiram de monocamadas automontadas de organossilano. Condições reacionais (reagente, concentração, solvente e tempo) distintas foram investigadas. As técnicas de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X foram usadas, respectivamente, a fim de se verificar a possível formação de aglomerados e permitir determinações qualitativas e quantitativas sobre as composições químicas das superfícies modificadas;

CAPÍTULO 6 - Apresenta as duas etapas finais do trabalho, a saber: (i) otimização do tempo de funcionalização com ácido fólico e (ii) caracterização da fase biossensora. Para o primeiro caso, haja vista a ausência de padrões de FR- α para compra, os *microchips* foram aplicados a um padrão de anticorpo monoclonal específico ao biorreceptor ácido fólico; as intensidades dos sinais analíticos em μ BIA-C⁴D foram consideradas como parâmetro de referência na escolha do tempo a ser adotado. O processo de caracterização, por sua vez, foi realizado mediante medidas de condutância e rugosidade. Adicionalmente, neste capítulo é apresentada uma hipótese sobre o princípio de transdução do método;

CAPÍTULO 7 - Aborda conclusões gerais sobre o método desenvolvido.

CAPÍTULO 1



Considerações Gerais e Objetivo Geral

1.1. Ácido Fólico e Receptores de Folato

1.1.1. Conceitos

Os folatos são vitaminas do complexo B e ocorrem fisiologicamente sob formas reduzidas de moléculas hidrofílicas. Tais substâncias exercem papel preponderante em um grande número de processos bioquímicos essenciais para a vida, como a síntese de nucleotídeos. O 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) é a forma de folato mais presente na circulação, enquanto que o ácido fólico (FA) é uma espécie oxidada e não fisiológica dessa vitamina.¹ A estrutura química do FA é apresentada na **Figura 1.1**.

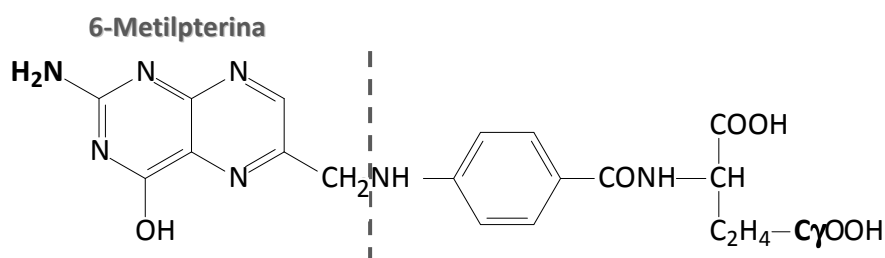


Figura 1.1. Estrutura química do FA.

Dentre as fontes naturais de FA, temos: frutas cítricas, folhas verdes, alguns grãos (ervilha, arroz etc.), aspargos, brócolis, cenoura, abacate e amendoim. A deficiência desse composto acarreta em diminuição da taxa de crescimento em crianças; em adultos, as consequências envolvem anemia megaloblástica e distúrbios no trato gastrointestinal. Por outro lado, embora ofereça baixo nível de intoxicação, um excesso de FA (ingestão diária superior a 1 mg) pode mascarar a deficiência de vitamina B12, fundamental para uma boa manutenção do sistema nervoso.²

Para a captura de FA exógeno, as células animais possuem substâncias denominadas receptores de folato (FR), as quais são representadas por uma família de glicopolipeptídeos

com massa molecular aparente entre 38.000 e 45.000. Os FRs exibem interações com FA via o grupo amino ($-NH_2$) da 6-metilpterina (ver **Figura 1.1**). Essas interações são altamente específicas, com constantes de formação da ordem de 10^9 - 10^{10} e segundo uma estequiometria de 1:1. Pesquisas sobre o genoma humano revelaram a existência de quatro genes distintos para os FRs: $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$ e $-\delta$. Tais isoformas possuem de 220 a 237 aminoácidos, compartilham de 68 a 79% da mesma sequência e apresentam oito ligações dissulfureto. Os FRs $-\alpha$ e $-\beta$, os quais estão presentes em maiores quantidades nas células, contêm três e dois sítios de N-glicosilação, respectivamente. Os números de ligações dissulfureto e sítios de N-glicosilação contribuem para a estabilidade do polipeptídeo.^{1,3}

1.1.2. Diagnóstico de Câncer Empregando FR- α como Biomarcadores

Câncer, conhecido também como cancro ou neoplasia maligna, é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que se caracterizam pelo crescimento não sistemático das células, as quais invadem tecidos e órgãos podendo propagar-se para outras regiões do organismo através do sangue ou vasos linfáticos. Esse crescimento celular aleatório é consequência de erros genéticos que ocorrem no oncogene, responsável pelo controle da divisão celular, a mitose. Os processos de dispersão das células tumorais (cancerígenas, neoplásicas ou malignas) e posterior estabelecimento em novos tecidos e órgãos são conhecidos como metástase e colonização, respectivamente, com formação do denominado câncer metastático. O processo de metástase responde pela maior parcela de óbitos dentre as vítimas de câncer.⁴

A incidência do câncer tem crescido significativamente no contexto mundial em consequência direta às transformações globais ocorridas nas últimas décadas, bem como a

urbanização acelerada e os novos modos de vida e padrões de consumo. Em 2002, foram registrados mundialmente em torno de 10 milhões de novos casos e 6 milhões de mortes. Estudos preveem que até o ano de 2020, esses números irão aumentar para 15 e 12 milhões, respectivamente.⁵ Nos países mais desenvolvidos, o câncer figura como a segunda maior causa de óbito; nos Estados Unidos e no Canadá, os cânceres de próstata, pulmão, mama e colo lideram a lista de mortalidade dentre os diversos tipos dessa patologia.⁶ No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são registradas aproximadamente 130 mil mortes anuais, um número menor apenas quando comparado ao das doenças cardiovasculares. No âmbito econômico, em 2008, os gastos federais no Brasil com assistência oncológica aumentaram em 103% com relação ao ano de 2000.⁵ Neste cenário, o diagnóstico precoce é fundamental na medida em que auxilia nos prognósticos médicos, conferindo maior possibilidade de cura aos pacientes mediante tratamento terapêutico medicamentoso e/ou cirúrgico e menores gastos públicos.

As técnicas convencionais empregadas para detecção de células cancerígenas envolvem biópsia e posterior exame do tecido removido, utilizando-se fixação celular e estudos sobre a morfologia das células. Esses testes, no entanto, não são individualmente conclusivos, envolvem subjetividade em suas análises, são extremamente invasivos e não permitem o diagnóstico precoce da doença. Uma alternativa a esses inconvenientes é o uso de biossensores (item 1.3) para detecção de biomarcadores em urina, sangue ou demais fluidos biológicos. Tal plataforma de análise apresenta facilidade de operação, baixo custo, rapidez, prescinde a realização de etapas de preparo de amostra e, desde que o nível do biomarcador esteja correlacionado ao estágio patológico, possibilita o monitoramento da doença.^{6,7} Adicionalmente, os biossensores possibilitam a determinação de multianálises; são exemplos as determinações dos biomarcadores: AFP, ferritina, β -hCG, CEA, CA 125, Ca

15-3 e CA 19-9;⁸ AFP, β -hCG, CEA e CA 125;⁹ CEA e AFP¹⁰ e PSA livre (PSA_f) e total (PSA_t).^{11,12}

Em oncologia, a detecção de diferentes bioanalitos, sequencial ou simultânea, aumenta o poder de diagnóstico dos métodos analíticos uma vez que os biomarcadores, em geral, não são específicos a um tumor em particular, mas a uma série deles.¹³ As características supracitadas representam vantagens também em relação a outras técnicas de diagnóstico e monitoramento, como o uso de ferramentas moleculares (genoma e proteoma) e imagens não invasivas para localização de tumores.⁶

Os biomarcadores são espécies que se encontram presentes em tecidos tumorais determinados. Idealmente, essas substâncias devem possibilitar uma distinção entre células normais e malignas com sensibilidade e seletividade apreciáveis a partir da interação com receptores específicos.¹⁴ Do ponto de vista da sua localização nas células, os biomarcadores podem ser extra ou intracelulares. Nesse último caso, geralmente são necessárias etapas de pré-concentração a fim de se conseguir uma sensibilidade analítica satisfatória.⁶ Dentre os métodos desenvolvidos para esse propósito, incluem separações imunomagnéticas¹⁵⁻¹⁷ e centrifugação.¹⁸ Embora a grande maioria dos biomarcadores de câncer apresente alta afinidade, muitos exibem especificidade reduzida, como é o caso do antígeno seletivo ao câncer de próstata (PSA).⁴ Esse inconveniente decorre do fato dos biomarcadores serem acessíveis no fluido biológico quando também associados a células normais, o que vem a reduzir drasticamente a especificidade das análises. Neste contexto, os FRs- α têm se mostrado marcadores altamente sensíveis e específicos.

Os FRs- α são biomarcadores extracelulares e estão presentes sob maiores níveis de concentração em células cancerígenas originadas do tecido glandular localizado, por sua vez, no ovário, no útero e na cérvix. Tais biomarcadores não são acessíveis diretamente via corrente sanguínea quando presentes em células normais, mas somente quando aderidos a

células malignas. Esse fenômeno confere especificidade a interações com biorreceptores e agentes terapêuticos, sendo pois implementado nas áreas de diagnóstico e transporte e desenvolvimento de novos medicamentos (triagens clínicas em seres humanos empregando-se essas drogas se encontram em fase de execução). Adicionalmente, o nível de FR- α está diretamente correlacionado ao estágio tumoral dos pacientes, de modo que esse biomarcador pode ser usado não apenas como ferramenta de diagnóstico, como também de monitoramento e tratamento do câncer.¹

Em função das vantagens intrínsecas ao FR- α como biomarcador tumoral, essa espécie vem a representar uma alternativa das mais promissoras nos campos de diagnóstico, monitoramento e tratamento dessa patologia. Estudos recentes demonstraram o uso de voltametria cíclica,¹⁹ microscopia de força atômica (AFM)²⁰ e difratometria²¹ como técnicas de transdução associadas a biossensores de FR- α contendo FA como biorreceptor.

1.2. Microssistemas Analíticos

1.2.1. Miniaturização em Química Analítica

Da mesma forma que os microchips revolucionaram os universos da informática e da eletrônica na década de 80, o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos figura, no momento, como uma verdadeira revolução no campo da química analítica. Com efeito, o interesse por sistemas de análise química miniaturizados tem crescido substancialmente nos últimos anos. Um indicativo desse crescimento, bem como da importância dos sistemas microfluídicos para a comunidade científica, é a publicação frequente de artigos relacionados ao tema em periódicos especializados.²²

O primeiro dispositivo em miniatura para fins analíticos foi publicado em 1979: um analisador à base de silício aplicado à cromatografia em fase gasosa.²³ Não obstante a redução do tempo de separação, esse microdispositivo não foi prontamente aceito no meio acadêmico em virtude da falta de experiência tecnológica em métodos de separação. Com isso, na década de 80, as pesquisas em microfluídica ficaram limitadas ao desenvolvimento de sensores químicos e ferramentas de análise em fluxo (bombas, válvulas e misturadores) miniaturizadas.²⁴

Inicialmente, a finalidade principal para a miniaturização dos sistemas de análise consistia em aumentar a eficiência analítica. Neste ínterim, com a conversão da escala macro para a escala micro, outras vantagens foram advindas; são exemplos a redução no consumo de reagentes e amostras (da ordem de nL a pL) e os aumentos na frequência de análises, na sensibilidade e na portabilidade, o que vem a viabilizar a realização de análises em campo.²² Esses fatores são relevantes em aplicações clínicas, nas quais o consumo reduzido de amostras vem a resultar em maior comodidade e, em determinados casos, menor risco à saúde dos pacientes.²⁵

As vantagens supracitadas, somadas ao desenvolvimento de novos substratos e técnicas de microfabricação, têm impulsionado a consolidação científica e comercial dos microdispositivos analíticos, com marco inicial datado em 1990.²⁶ Na ocasião, Manz, Graber e Widmer propuseram o conceito de microsistema para análises totais (μ TAS): “sistema miniaturizado plenamente capaz de realizar as etapas prévias e de medida de um procedimento analítico com todos seus componentes (bombas, válvulas, reatores etc.) integrados”.²⁷ Na sua essência, o termo μ TAS está associado a procedimentos analíticos. Contudo, demais funções químicas podem ser implementadas, de maneira que atualmente esses sistemas são também conhecidos como *lab-on-a-chip* (LOC).²⁸

No que se refere à evolução dos microsistemas para análises químicas, convém ainda ressaltar a atuação imprescindível de diferentes ramos da ciência, sem os quais não se tornaria possível tal processo evolutivo. São exemplos: micromecânica (vem a partir da “tecnologia do silício” possibilitar a confecção de microestruturas para fins analíticos); ciência de materiais (proporciona a detecção em escalas diminutas a partir do uso, por exemplo, dos sensores de fibra óptica como mostra a **Figura 1.2**) e microeletrônica (dispõe atualmente de circuitos integrados multifuncionais extremamente reduzidos).²⁹

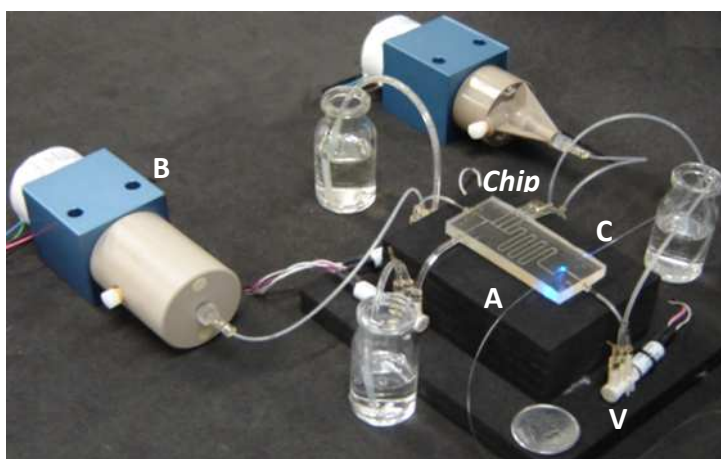


Figura 1.2. *Chip* com fibras ópticas adaptadas para condução (C) e aquisição (A) da radiação. B, bomba-seringa e V, válvula solenóide.

1.2.2. Substratos

Os primeiros *microchips* analíticos resultaram de adaptações da fotolitografia, tecnologia então desenvolvida nas décadas de 70 e 80 pela indústria microeletrônica. Em face ao amplo emprego do silício para a confecção de circuitos integrados, esse material foi o substrato pioneiro em microfluídica. No entanto, em função do seu custo elevado e demais parâmetros (transparência óptica, inércia química e propriedades elétricas) inadequados para esse tipo de aplicação, o silício foi substituído gradualmente por vidro (incluindo sílica fundida) e quartzo.²²

No início da década de 90, silício, vidro e quartzo eram os substratos mais utilizados.²⁶ Tais materiais, embora apresentem propriedades de superfície adequadas para uma série de aplicações, requerem instrumentação de alto custo e salas “limpas” para a fabricação dos microcanais, restringindo, desse modo, o seu uso a poucos grupos de pesquisa.²² Neste contexto, os avanços tecnológicos ocorrentes nas últimas três décadas possibilitaram o desenvolvimento de materiais diversos, entre os quais se destacam os polímeros.³⁰ Para o campo da microfluídica, essas substâncias agregam características significativas, como: custo reduzido, facilidade de microfabricação, transparência óptica, inércia química elevada e permeabilidade aos gases O₂ e CO₂, o que os tornam viáveis para a análise de células biológicas. O poli(dimetilsiloxano) (PDMS) é o material polimérico mais usado na fabricação de microestruturas.³¹ Suas vantagens principais incluem: tempo de vida prolongado, absorção de água e condutividade reduzidas, alta temperatura de distorção e baixa energia superficial (20 erg.cm⁻²), o que facilita o seu desprendimento de moldes em processos de microfabricação por moldagem.³² Com base em parâmetros puramente físicos, o PDMS é classificado como um elastômero,³³ o que vem a permitir a sua vedação contra qualquer superfície plana, reversível ou irreversivelmente, e acarretar em maiores facilidades na integração de válvulas, bombas, reatores e detectores aos *microchips*.³⁴

Pesquisas em microfluídica empregando PDMS como substrato têm crescido exponencialmente desde o ano de 2003.²⁶ Contudo, novos polímeros vêm sendo utilizados visando suplantiar uma limitação intrínseca àquele composto: a sua expansão quando empregados solventes orgânicos, como: hexano, tolueno, diclorometano e acetonitrila.³⁵ Como exemplos de materiais poliméricos alternativos, temos: perfluoropoliéter (PFPE);²⁸ poliuretana (PU);³⁶ uretana-acrilato (UA);³⁷ poli(metilmetacrilato) (PMMA); policarbonato (PC); polietileno (PE); polipropileno (PP);²⁶ poli(cloreto de vinila) (PVC); poli(etileno-

tereftalato) (PET) e poliéster/toner (PT).²² Por outro lado, as principais desvantagens associadas ao uso de polímeros como substratos em microfluídica são: autofluorescência e baixas estabilidades mecânica, térmica e a solventes orgânicos.^{38,39}

Como alternativa aos substratos descritos até o momento, temos os *microchips* híbridos vidro/elastômero.^{40,41} Esses dispositivos aliam vantagens intrínsecas ao vidro [fluxo eletrosmótico (EOF) estável e valores apreciáveis de condutividade térmica e estabilidades mecânica, térmica e química] e aos elastômeros (facilidade de microfabricação).²⁶

1.2.3. Técnicas de Microfabricação

Fotolitografia

A fotolitografia é a técnica mais utilizada na fabricação de *microchips* analíticos.⁴² Ela consiste na gravação de estruturas micrométricas (10-100 μm) em um substrato fotossensível (fotorresiste) mediante a incidência de radiação ultravioleta (UV).²² No processo fotolitográfico são utilizadas máscaras para exposição seletiva do substrato à radiação. A depender da natureza do material empregado, as reações poliméricas que se sucedem nas regiões expostas à radiação podem resultar em substâncias insolúveis ou solúveis, sendo denominadas fotorresistes negativos e positivos, respectivamente. A etapa de remoção das partes solúveis do substrato, conhecida como revelação, é realizada com solventes orgânicos específicos.²⁹

Na **Figura 1.3**, é ilustrado o processo de microfabricação por fotolitografia em fotorresistes negativos e positivos empregando radiação UV. As máscaras para polimerização convencionais, com resolução da ordem de 1 μm , consistem de vidro (transparente para o UV próximo) ou quartzo (transparente para o UV distante), recobertos

por uma camada de Cr que determina o *layout* microfluídico de interesse. Máscaras com resolução da ordem de 30 μm podem ser obtidas a partir do uso de fotolitos,²² cuja tecnologia é mais rápida e economicamente mais atrativa.

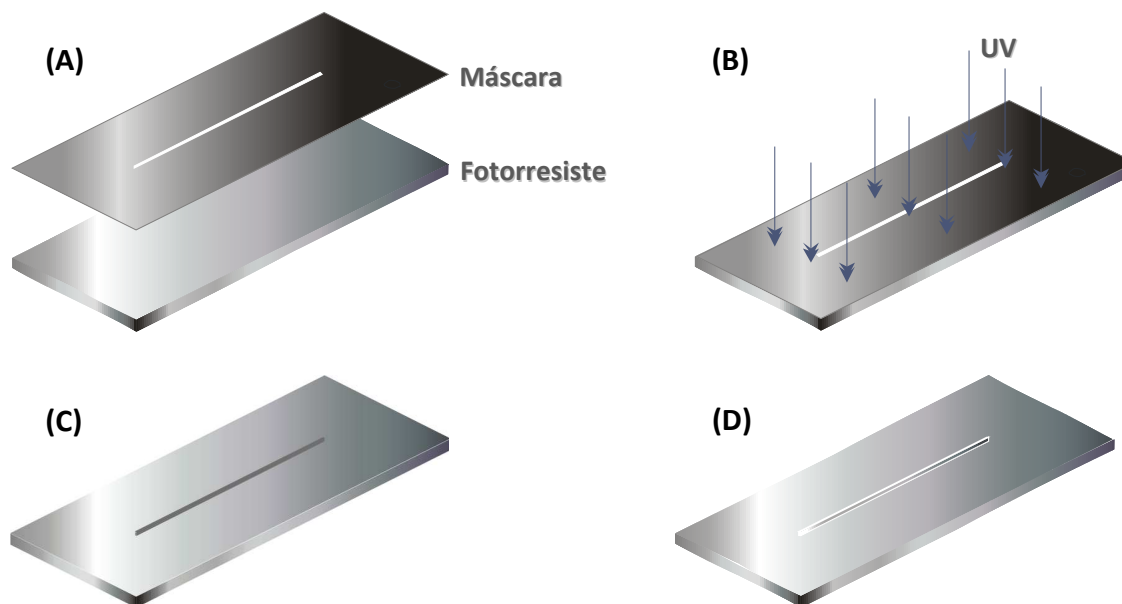


Figura 1.3. Microfabricação por fotolitografia-UV. **(A)** Ajuste do posicionamento do fotorresiste em relação à máscara; **(B)**, exposição à radiação UV; **(C)**, substrato com canal para fotorresistes positivos e **(D)**, substrato com estrutura em alto relevo para fotorresistes negativos.

Para a fabricação de microcanais por fotolitografia em materiais como silício e vidro, se faz necessário um processo subsequente de corrosão. Neste caso, a etapa fotolitográfica visa à formação de máscaras para a reação corrosiva sobre o substrato, as quais podem ser de materiais distintos,²² como: metal/fotorresiste, fotorresiste e demais variantes nas quais não se utiliza a fotolitografia. São exemplos o silício⁴³ e o toner,⁴⁴ depositados sobre a superfície do substrato por processos envolvendo plasma e transferência térmica, respectivamente.

A fotolitografia pode também ser utilizada na microfabricação de eletrodos, processo o qual requer uma etapa posterior de deposição metálica. Para tal, comumente são empregadas técnicas de deposição física em fase vapor, como evaporação térmica e

sputtering. Em ambas, o metal é removido de uma dada superfície fonte, ou por aquecimento (evaporação térmica) ou pelo impacto contra íons altamente energéticos (*sputtering*), e, em seguida, difunde em direção ao substrato onde se condensa na forma de filme com espessuras entre 50 e 250 nm.⁴⁵

Uma outra técnica para microfabricação de eletrodos agrega processos de impressão direta, transferência térmica e corrosão do substrato. Esse método consiste em transferir termicamente camadas de toner impressas em papel vegetal para a superfície de discos compactos regraváveis (CD-R)⁴⁶ ou placas de circuito impresso,⁴⁷ resultando em eletrodos de Au e Cu, respectivamente. As máscaras de toner definem as dimensões dos eletrodos, ao passo que as áreas não protegidas são expostas a reações corrosivas em soluções de KI/I₂, no caso dos CD-Rs, e de FeCl₃, no caso das placas de circuito impresso. Para remoção do toner, são usados algodões umedecidos em acetonitrila.²²

O uso de materiais poliméricos na microfabricação de eletrodos envolve três inconvenientes. Primeiramente, uma vez que os coeficientes de expansão térmica dos polímeros são cerca de uma ordem de grandeza maiores que os dos metais, gradientes de temperatura elevados podem levar a rachaduras dos eletrodos. Ademais, o método limita-se principalmente a polímeros termorrígidos, como o SU-8. Isso ocorre por incompatibilidade química de elastômeros e termoplásticos diante da etapa de revelação. O terceiro obstáculo diz respeito à adesão ineficiente entre metais e polímeros, que pode ser contornado pelo uso de agentes promotores de adesão (usualmente um segundo metal, como Ti ao serem utilizados eletrodos de Au) ou por pré-tratamento da superfície do polímero em plasma de O₂.²⁶

Moldagem

Embora as tecnologias de microfabricação convencionais propiciem a construção de microestruturas com definição e resolução excelentes, as mesmas envolvem alto custo de implementação. Estima-se que para a instalação de um laboratório de microfabricação contendo sala “limpa”, estação fotolitográfica, *spinner* e perfilômetro, dentre outros, se faz necessário um investimento superior a um milhão de reais.⁴⁰

Neste cenário, a pesquisa por métodos de microfabricação alternativos e economicamente viáveis tornou-se um objetivo permanente da comunidade científica, busca a qual fora impulsionada também pelo surgimento de novos substratos em microfluídica. Dentre esses métodos, se destaca o processo de moldagem o qual apresenta duas etapas primárias: a fabricação de um molde rígido contendo a imagem negativa do sistema microfluídico em alto relevo e a replicação do microdispositivo, que consiste em transferir a estrutura do molde para o substrato.⁴⁸

A etapa de fabricação dos moldes é aquela que agrega maiores tempo e custo durante o processo de moldagem.²² No entanto, o mesmo molde pode ser empregado por diversas vezes em procedimentos de replicação. A depender das condições experimentais e da razão de aspecto requerida para os microcanais, os moldes podem ser confeccionados em silício, vidro, quartzo, metal ou fotorresiste. Esse último somente pode ser adotado quando não forem envolvidas pressões e temperaturas elevadas, de modo que não haja deformação dos microcanais.⁴⁹ O fotorresiste e termorrígido SU-8 tem sido o mais empregado para a fabricação de moldes e isso se deve a fatores como: resistência química elevada, possibilidade de deposição de filmes espessos e alta fotossensibilidade, o que requer menor tempo de exposição.⁵⁰

Em termos da etapa de replicação, representada genericamente na **Figura 1.4**, um método bastante utilizado é a moldagem por litografia macia. Neste processo, são

empregados polímeros no estado líquido, de baixa viscosidade, de maneira que os mesmos conseguem recobrir integralmente o molde ao serem despejados. Por conseguinte, neste caso, os moldes podem ser confeccionados em fotorresistes uma vez que não são aplicadas pressões elevadas na etapa de replicação.⁵⁰

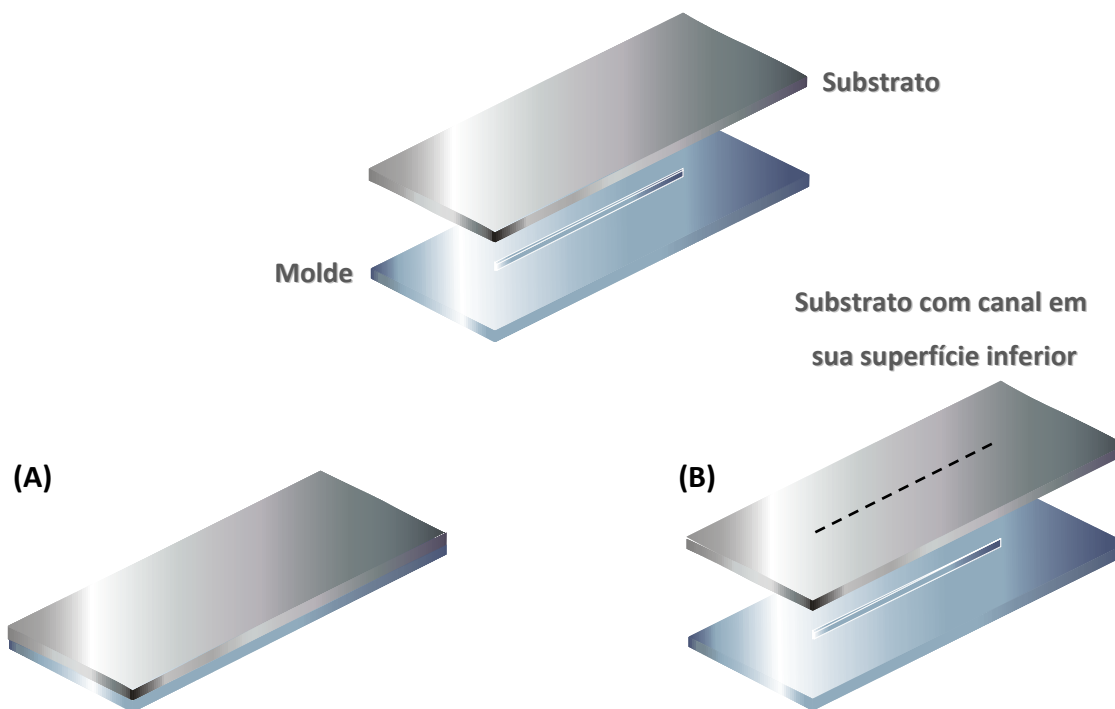


Figura 1.4. Esquema geral do processo de replicação: (A), moldagem e (B), desmoldagem.

Mais especificamente, no processo de moldagem por litografia macia, polímeros lineares são misturados com agentes de reticulação resultando na solidificação dos substratos. Por fim, o conjunto molde/substrato é então desmoldado com consequente obtenção dos microcanais.⁴⁸ O PDMS é o material mais empregado nesse processo.²²

1.2.4. Tipos de Selagem

O processo de selagem designa a vedação entre substrato, contendo os microcanais, e lâmina de cobertura, que pode possuir composição idêntica ou distinta à do substrato.²² As

duas técnicas principais empregadas para esse propósito são a selagem direta e a selagem com camada intermediária.

A selagem direta envolve a aplicação de pressões elevadas em ambiente de alta temperatura, sendo utilizada em microchips de silício/silício, vidro/vidro, silício/metal e vidro/silício.⁵¹ Nesse processo, é imprescindível que ambas as lâminas apresentem superfícies planas (de baixa rugosidade) e estejam extremamente limpas, o que implica em eliminar cuidadosamente todos os resíduos inerentes ao processo de gravação dos canais e operar em ambiente livre de material particulado (sala “limpa”). Um exemplo desse método é a selagem térmica assistida por campo.⁵² Nessa técnica, a vedação é conseguida mediante contato entre as lâminas por pressão a temperaturas entre 200 e 500 °C e sob a aplicação de um campo elétrico, gerado por meio de uma fonte de corrente contínua com tensões da ordem de 0,3 a 1 kV.

Na selagem com camada intermediária, anteriormente ao alinhamento e contato entre as placas, uma camada de ligante (metal ou adesivo) é depositada de maneira uniforme sobre a superfície de uma das lâminas (substrato ou cobertura).⁵¹ Esse procedimento vem a prescindir o uso de pressões e temperaturas muito elevadas. Ademais, o método referente pode ser aplicado à maioria dos substratos e requer, na maioria das vezes, condições menos severas de limpeza com relação à selagem direta, tornando o processo significativamente mais barato. A principal limitação inerente a essa técnica é a possibilidade de obstrução dos microcanais pela própria camada intermediária, o que exige cuidados especiais. Exemplos de selagem com camada intermediária são as denominadas selagens adesivas, nas quais adesivos epóxi ou fotorresistes são utilizados como ligantes intermediários.⁵³

Os processos supracitados envolvem reações irreversíveis entre o substrato e a cobertura. Selagens reversíveis, por outro lado, podem ser obtidas através do emprego de substratos elastoméricos. Neste caso, a vedação decorre de interações de van der Waals, não resistindo à aplicação de pressões superiores a 30 kPa. Seguindo o mesmo procedimento, processos de caráter irreversível podem também ser conseguidos pela simples oxidação da superfície do elastômero em plasma de O₂.²²

1.2.5. Métodos de Detecção Integrados a *Microchips*

Diversas técnicas de detecção têm sido empregadas em microdispositivos, dentre as quais de destacam: fluorescência induzida a laser (LIF),⁵⁴ espectrometria de massas (MS),⁵⁵ espectrometria no ultravioleta-visível (UV-VIS)⁵⁶ e métodos eletroquímicos.⁵⁷ A LIF, embora apresente alta sensibilidade, em casos determinados é aplicada apenas a substâncias fluorescentes. A MS, por sua vez, requer instrumentação de alto custo e de baixa portabilidade ao passo que em absorções na região do UV-VIS, o caminho óptico reduzido afeta adversamente a sensibilidade analítica. As técnicas eletroquímicas surgem então como alternativas em potencial por portarem características como: (i) envolvem transdução direta do sinal elétrico gerado; (ii) requerem instrumentação de baixo custo; (iii) apresentam, em geral, altos níveis de detectabilidade; (iv) não são destrutivas, uma vez que as duplas camadas elétricas que se estabelecem nas superfícies dos eletrodos são negligenciáveis em relação ao volume do seio (*bulk*) da solução, e (iv) apresentam maior capacidade intrínseca de miniaturização, haja vista a possibilidade de integrar condutores e semicondutores à superfície de substratos,⁵⁸ conforme mostra a **Figura 1.5**.

Amperometria e condutometria são os métodos eletroanalíticos usualmente empregados em microfluídica.⁵⁹ Os detectores amperométricos apresentam sensibilidade e

seletividade maiores, pois envolvem processos faradaicos e respondem apenas a espécies eletroativas (embora determinações indiretas também sejam possíveis). Por outro lado, a condutometria é uma técnica universal, de modo que a sua resposta é diretamente dependente da concentração, da mobilidade efetiva e da carga de todas as espécies iônicas presentes na amostra.⁶⁰ Por essas razões, a condutometria, em especial a condutometria sem contato, tem sido bastante utilizada como um método de detecção alternativo em *microchips*.³³

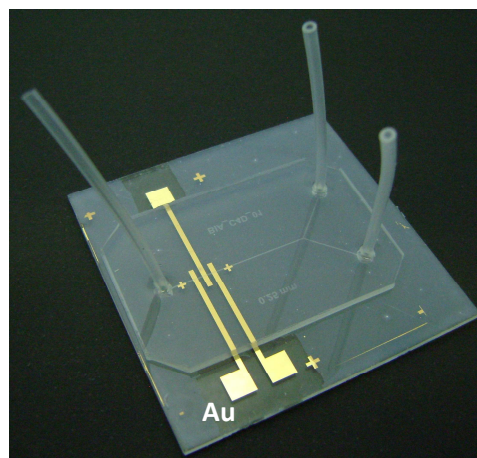


Figura 1.5. *Microchip* contendo ouro (Au) depositado sobre uma lâmina de vidro.

1.3. Biossensores

1.3.1. Fundamentos

Os sensores químicos surgiram com a finalidade de permitir a realização de análises em campo. Com o advento da automatização instrumental durante a década de 70, foram então desenvolvidos os equipamentos modernos de análise, robustos e de fácil operação. Nos experimentos que envolviam coleta de amostras em locais remotos, entretanto, em muitos casos era difícil ou até mesmo impossível transportar as substâncias ao laboratório

sem que houvesse decomposição química das mesmas. Esse episódio provou ser mais simples e conveniente conduzir o instrumento até a amostra, e não a amostra ao laboratório de análise. Por conseguinte, o desenvolvimento de técnicas analíticas portáteis passou a ter grande interesse da comunidade científica, com o decorrente surgimento dos sensores químicos tal como o eletrodo de vidro para medida de pH.⁶¹

Em 1991,⁶² a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) estabeleceu uma definição para sensores químicos: “dispositivos que convertem informação química, desde a concentração de analitos até a composição de amostras, em sinais elétricos (corrente, potencial, condutividade etc.) analiticamente úteis”. A informação química primária, mencionada anteriormente, pode originar-se de fenômenos químicos, bioquímicos ou físicos que envolvam a espécie de interesse. Conforme a IUPAC, um sensor químico é formado por duas unidades funcionais básicas conectadas em série: o receptor, que responde a parâmetros específicos e, em geral, interage com o analito (ligante) transformando a informação química em uma forma de energia determinada capaz de ser transduzida, e o transdutor, responsável exatamente por esse processo de transdução, o qual acarreta em sinais elétricos analiticamente úteis. Os receptores podem atuar sob três modos básicos, a citar: reconhecimento molecular, térmico ou estérico.⁶¹ O primeiro envolve fenômenos de equilíbrio entre analito e receptor em reações de catálise ou afinidade (anticorpo/antígeno, DNA/DNA, proteína/ácido nucléico, proteína/receptor etc.).¹³ O segundo baseia-se em reações fora do equilíbrio que geram alterações significativas de temperatura e, assim, podem ser transduzidas em sinais elétricos. O reconhecimento estérico, por outro lado, é um mecanismo puramente físico, em que a biomolécula é identificada com base nas suas dimensões. Um arranjo típico de sistema analítico contendo fase sensora é mostrado na **Figura 1.6**.

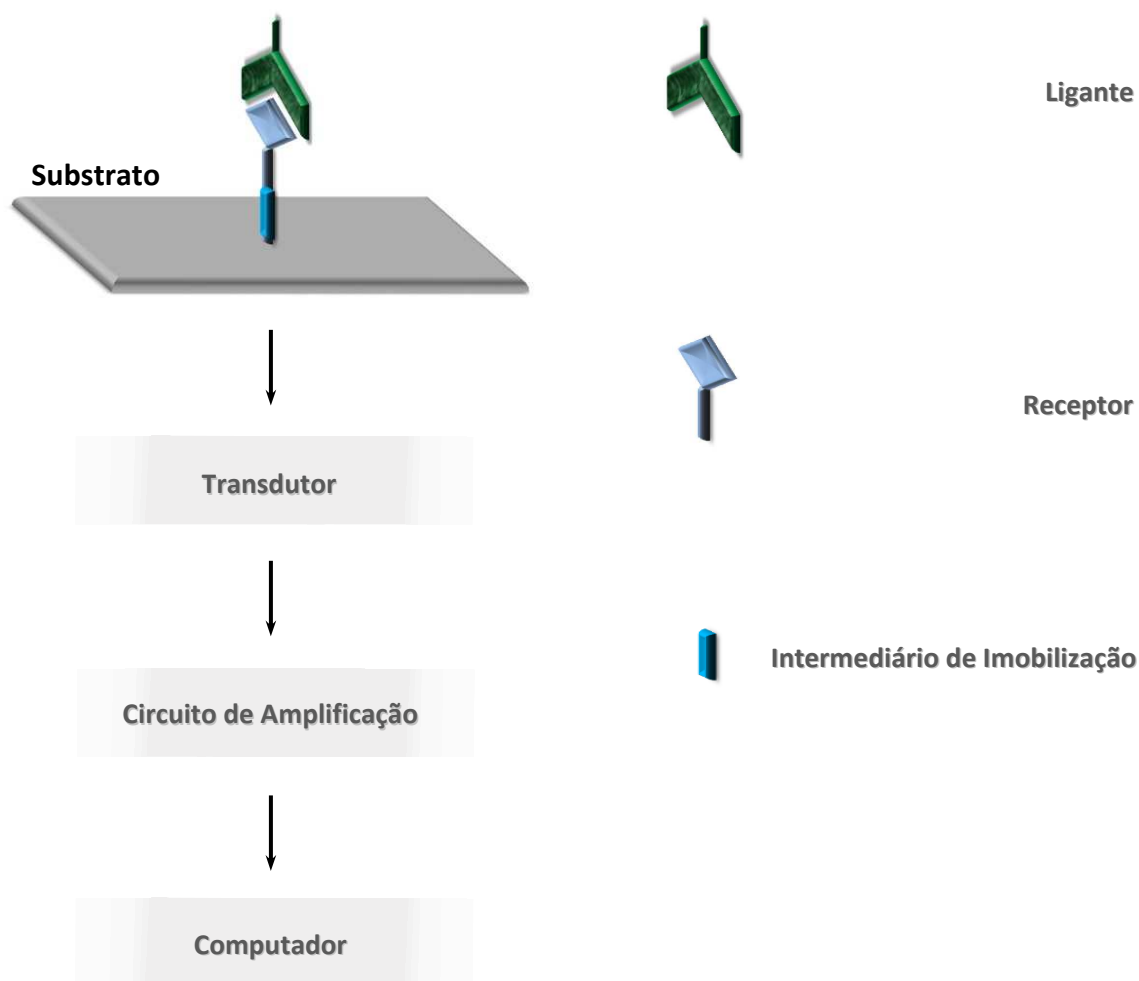


Figura 1.6. Componentes de um sistema analítico contendo sensor em interação com uma biomolécula.

A definição estabelecida pela IUPAC a sensores químicos veio a por fim em uma série de divergências que havia no meio acadêmico. Enquanto que alguns pesquisadores consideravam o termo 'sensor' como incluindo unicamente o elemento receptor, outros seguiam a concepção conceitual na qual receptor e transdutor eram unidades constituintes dos sensores. Neste contexto, é importante destacar que o mesmo componente pode atuar como receptor e transdutor, concomitantemente; é o caso de óxidos metálicos semicondutores, como o SnO_2 . Essa espécie tem sua condutividade alterada quando em contato com gases redutores específicos.⁶¹

Independente da definição pré-estabelecida para o termo ‘sensor químico’, há uma ampla concordância a cerca de suas características “ideais”. São elas: (i) resposta rápida; (ii) baixo custo; (iii) portabilidade; (iv) operação contínua e (v) sensibilidade, (vi) especificidade, (vii) reprodutibilidade e (viii) estabilidade elevadas.⁶¹ Adicionalmente, a depender do parâmetro especificidade, determinado principalmente pela interação receptor/ligante, tornam-se prescindíveis etapas de preparo de amostra e separações cromatográficas.

De acordo com a IUPAC, os sensores químicos são classificados conforme o princípio de transdução.⁶² Consideremos abaixo os casos principais:

Eletroquímicos - Transformam o efeito de interações eletroquímicas entre analito e eletrodo em sinais elétricos. Esses dispositivos envolvem as técnicas: potenciometria, voltametria e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), dentre outras;

Elétricos - Baseiam-se em alterações de propriedades elétricas que ocorrem no seio da solução, as quais podem estar associadas à mobilidade efetiva do analito bem como é verificado em sensores condutométricos e de transistores de efeito de campo;

Ópticos - Convertem variações de fenômenos ópticos, como absorbância, reflectância, luminescência, fluorescência, índice de refração, efeitos fototérmicos e espalhamento da radiação, em sinais elétricos. Sensores contendo ressonância plasmônica de superfície (SPR), dentre outros, figuram como sensores ópticos;

Magnéticos - envolvem medidas de alteração nas propriedades paramagnéticas de matrizes gasosas, como oxigênio;

Termométricos - medem o calor absorvido ou liberado por reações químicas ou adsorções que envolvam o analito;

Sensíveis à massa - transformam variações de massa de uma dada superfície em sinais elétricos. Técnicas de transdução como microbalança de cristal de quartzo (QCM) e AFM

integram essa modalidade de sensor. Sensores piezoelétricos apresentam um cristal de quartzo revestido com eletrodo de Au e são utilizados como microbalanças. Sensores baseados em AFM, por sua vez, respondem a partir de variações na frequência de ressonância de um *microcantilever*, sobre o qual é imobilizado o elemento receptor.

Os biossensores são considerados um grupo independente de sensores químicos. Segundo a IUPAC em convenção preconizada no ano de 1999,⁶³ esses dispositivos se caracterizam por mecanismos bioquímicos de reconhecimento da biomolécula alvo via receptor (biorreceptor ou função de reconhecimento). Os biossensores podem ser empregados para monitorar matrizes biológicas e não biológicas. Por outro lado, sensores que não incorporam mecanismo bioquímico de reconhecimento não podem ser designados como biossensores, mesmo que aplicados a processos biológicos; são exemplos os sensores de oxigênio.⁶¹

1.3.2. Funcionalização de Superfície

O processo de funcionalização consiste em modificar quimicamente a superfície sólida de um dado substrato com receptores visando à construção de sensores químicos. As principais técnicas de modificação de superfície são: (i) adsorção física; (ii) adsorção eletroquímica por redissolução; (iii) inclusão em matrizes poliméricas (PU, PVC etc.), polímeros intrinsecamente condutores (polianilina), géis (hidrogéis, sílica gel etc.), pares redox inorgânicos ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ etc.) ou pastas condutoras (pasta de carbono etc.); (iv) formação de ligações covalentes com grupos bifuncionais e (v) deposição de tintas condutoras a partir da tecnologia de *screen-printing*, mais conhecida como *silk-screen*. Essa última comumente substitui o método de inclusão em aplicações comerciais, nas quais técnicas com maior capacidade de produção em massa são requeridas.⁶¹

Recentemente, novas técnicas de funcionalização têm sido desenvolvidas e aplicadas na construção de biossensores, a saber: imobilização em polímeros impressos molecularmente (MIPs)⁶⁴ e em filmes obtidos pela polimerização por plasma (PPFs).⁶⁵ Os MIPs são de fácil preparação, possuem estabilidades térmica e química elevadas e tempo de vida prolongado em condições ambiente de temperatura e umidade. Como limitações principais, a tecnologia de impressão molecular requer moléculas modelo (forma pura do analito) para síntese estereoquímica dos sítios de ligação, o que, em alguns casos, pode demandar um custo considerável, e acarreta em especificidade baixa frente a espécies estruturalmente semelhantes às moléculas modelo.⁶⁶ Os MIPs ainda apresentam afinidade inferior à dos anticorpos no tocante à construção de sensores químicos.⁶⁷ Neste contexto, estudos de modelagem molecular têm sido aplicados na seleção de monômeros funcionais mais sensíveis e específicos.⁶⁸⁻⁷⁰ No que concerne aos PPFs, o processo de polimerização por plasma resulta em filmes contínuos, mecanica e quimicamente estáveis e fortemente aderidos aos substratos, um fator crítico para a reprodutibilidade do biossensor.⁶⁵

O método de funcionalização via formação de ligações covalentes é aquele que confere maior estabilidade à fase sensora. Os grupos bifuncionais mais utilizados para modificação de superfícies com biorreceptores são: glutaraldeído (GA), carbodiimida e monocamadas automontadas (SAMs); esses grupos são também conhecidos como intermediários ou matrizes de imobilização.⁶³ As SAMs são filmes finos que se constituem de moléculas orgânicas com comprimentos em torno de dezenas de nanômetros. Esses filmes se originam de adsorções espontâneas entre tensoativos e a superfície de substratos sólidos, podendo ocorrer em solução ou em fase gasosa. As moléculas de tensoativo vizinhas interagem entre si por forças de van der Waals, o que acarreta em camadas altamente densas e ordenadas.⁷¹ No entanto, algumas dessas camadas podem conter interstícios de

dimensões moleculares, permitindo, desse modo, que moléculas sejam adsorvidas não especificamente pela superfície da amostra.⁶¹ As SAMs apresentam camadas estáveis e de fácil montagem, uma vez que são formadas a partir de um processo espontâneo. Tais propriedades, aliadas à ordenação e densidade de suas camadas, as tornam amplamente atrativas para a construção de sensores químicos.⁷²

Em substratos de SiO₂,⁷³ dentre as SAMs mais empregadas constam as espécies derivadas do SiH₄, denominadas silanos, em especial o 3-aminopropil(trietoxisilano) (APTS). Esse reagente é também utilizado na modificação de superfícies poliméricas; Howarter e Youngblood,⁷⁴ em 2007, reportaram um estudo de caracterização sistemático sobre a silanização (reação com silano) de 14 polímeros com APTS em solventes apolares, próticos e à base de éter.

1.3.3. Biossensores como Plataformas de Análise de Biomarcadores Tumorais

Biomarcadores

Um amplo número de biomarcadores está correlacionado a diferentes tipos de câncer. Dentre esses, se destacam genes (HNPCC, FAP, BRCA ½ etc.) e proteínas (receptores de estrógeno, progesterona etc.), incluindo moléculas do sistema imunológico (antígenos como PSA, CA 125, CEA e CA 15-3).⁶ Na **Tabela 1.1** é apresentada uma lista de cânceres e seus respectivos biomarcadores,⁷⁵⁻⁷⁷ muitos dos quais se encontram em fase de melhoramento das suas sensibilidade e especificidade ante as aplicações clínicas correlacionadas.⁷⁸

Para detecção de genes e anomalias genéticas, frequentemente são empregadas reações em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR)⁷⁹ ou reações de

hibridização,⁸⁰ que ocorrem entre duas cadeias de ácidos nucleicos de fitas simples. Esses procedimentos são lentos e não portam especificidade adequada para aplicações clínicas, o que vem resultando, recentemente, em um aumento considerável no uso de proteínas como biomarcadores de câncer.⁶ Por outro lado, marcadores voláteis têm surgido como uma nova vertente de pesquisa nas áreas de diagnóstico e monitoramento tumoral. Em estudos sobre o câncer de mama, por exemplo, alcanos, alcanos metilados e dienos conjugados têm se mostrado marcadores com especificidade razoável.⁸¹

Tabela 1.1 - Biomarcadores associados ao diagnóstico e prognóstico de câncer

Tipo de Câncer	Biomarcador
Bexiga	FDP, BAT, NMP22, Ha-Hase, BLCA-4, CYFRA 21-1
Colo e Pâncreas	CEA, CA 19-9, CA24-2, p53, HNPCC, FAP
Leucemia	Anormalidades Cromossômicas
Mama	CEA, CA 125, CA 15-3, CEABRCA1, BRCA2, MUC-1, NY-BR-1, ING-1, BRCA ½, Receptores de Estrógeno e Progesterona
Pele	NY-ESO-1, Tirosinase
Próstata	PSA, PAP
Pulmão	CEA, CA 19-9, NY-ESO-1, SCC, CYFRA21-1, NSE
Ovário	CA 125, CEA, AFP, hCG, p53, BRCA ½

Biorreceptores

Os biorreceptores mais amplamente empregados são anticorpos, mono ou policlonais;⁸²⁻⁸⁶ glicoproteínas as quais interagem com antígenos segundo um processo reversível, de segunda ordem do ponto de vista cinético e com afinidade e especificidade elevadas. Os biossensores que se baseiam em reações anticorpo/antígeno são conhecidos

como imunossensores, apresentam sensibilidade elevada e podem operar sob dois modos de medida: direto, quando uma das espécies do sistema imunológico é ativa no que concerne ao princípio de transdução empregado, e indireto, no qual uma terceira substância, ativa, é adicionada ao sistema. No modo indireto, geralmente são empregados catalisadores enzimáticos segundo um método denominado ensaio imunoabsorvente de ligações enzimáticas; mais conhecido como teste ELISA. Nesses testes, a enzima mais utilizada é a peroxidase, que catalisa a reação de desdobramento do H_2O_2 em H_2O mais O_2 .⁶⁰

A limitação principal inerente à utilização de anticorpos como biorreceptores é a sua baixa estabilidade, o que vem a representar um obstáculo à comercialização dos imunossensores. Moléculas sintéticas desse biorreceptor têm sido desenvolvidas visando solucionar a desvantagem mencionada.⁶ Em adição, esses compostos podem ser modificados mais facilmente e eliminam o uso de animais; empregados na obtenção de anticorpos policlonais.

Desde 2001, bibliotecas combinatoriais vêm sendo implementadas como ferramentas de auxílio na seleção de biorreceptores sintéticos, como peptídeos^{87,88} e aptâmeros (DNA ou RNA de cadeia única).⁸⁹ Embora possam ser sintetizadas quimicamente sob quantidades apreciáveis, as moléculas de peptídeos exibem afinidade relativamente baixa frente à analitos específicos [constante de formação (K_f) da ordem de 10^6 a 10^7] quando comparadas aos anticorpos (K_f da ordem de 10^{10}).⁴ Os aptâmeros, os quais são sintetizados a partir da técnica SELEX (evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial), podem ser utilizados na detecção de genes associados a processos tumorais graças à afinidade (K_f da ordem de 10^8 a 10^9) e especificidade (menor à dos anticorpos) elevadas do seu mecanismo de hibridização, verificado apenas entre duas fitas de ácido nucléico precisamente complementares.⁸⁰ Tais ácidos nucléicos podem também ser usados

no reconhecimento de proteínas; ao contrário do que ocorre em complexos anticorpo/antígeno, interações DNA/proteína conduzem a um decréscimo da resistência à transferência de carga em EIS.⁹⁰ Isso se deve ao caráter eletroativo da guanina, o que, por outro lado, torna o DNA perfeitamente adaptável a transdutores eletroquímicos.^{91,92}

Intermediários de Imobilização

No âmbito da detecção de biomarcadores de câncer, técnicas e compostos diferentes são empregados para promover a adesão de biorreceptores aos substratos. São exemplos: inclusão em géis de titânia⁹³ e silicato organicamente modificado,⁹⁴ inclusão em matriz polimérica de quitosana-co-polianilina⁶⁵ e formação de ligações covalentes. Neste último caso, as substâncias bifuncionais seguintes podem ser empregadas: GA,⁹⁵ 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-Hidroxisuccinimida (NHS)⁹⁶ e SAMs constituídas de cistamina/GA⁹⁷ e APTS.⁹⁸ Com o intento de aumentar a quantidade de compostos bifuncionais ancorados à superfície sensora, matrizes porosas como poli(etilenoglicol)/nafion/polipirrol⁹⁹ e filme fino de óxido de irídio (IrO_x)¹⁰⁰ vêm sendo implementadas como materiais suporte. Essas matrizes são geralmente imobilizadas ao substrato por evaporação do solvente ou eletrodeposição.

Transdutores

A **Tabela 1.2** lista exemplos de biossensores empregados na análise de biomarcadores tumorais. Transdutores eletroquímicos faradaicos são os mais amplamente empregados junto à tecnologia de biossensores, fato atribuído às vantagens intrínsecas a esses transdutores descritas no item 1.2.5. Adicionalmente, biossensores eletroquímicos podem ser facilmente fabricados a partir da tecnologia de *silk-screen*.⁶ Revisões recentes sobre o uso dessas plataformas para o diagnóstico de câncer foram reportadas.^{116,117}

Tabela 1.2 - Exemplos de biossensores (imunossensores) para análise de biomarcadores de câncer[†]

Biomarcador	Intermediário de Imobilização	Classificação do Biossensor	Referência
CEA	IrO _x /Proteína A	Impedanciométrico	100
	Gel de Sefarose	Quimiluminescente	101
	Matriz Polimérica de Quitosana	Voltamétrico de Pulso Diferencial	102
	SAMs de Ácido 3-(aminofenil)borônico	Voltamétrico de Pulso Diferencial	103
	Proteína A	Amperométrico	104
	Poli(etilenoglicol)/GA	Voltamétrico de Onda Quadrada	105
	Poli(etilenoglicol)/GA	Voltamétrico de Onda Quadrada	106
	Oligo(etilenoglicol)-COOH/EDC/NHS	Baseado em SPR	107
PSA	SAMs de Calixareno	Baseado em AFM	108
	3-Indoxil Fosfato	Voltamétrico de Varredura Linear	109
hCG	SAMs de Sulfo-LC-SPDP [‡]	Piezoelétrico	110
CA 125	EDC	Conduutométrico	111
Ferritina	Cistamina e Cistamina/GA	Piezoelétrico	112
CEA	Biotina	Fluorescente	113
Angiopietina 1	APTS	Baseado em AFM	114
Quinase Abl	Biotina	Baseado em MS	115

[†] Em todos os casos, anticorpos específicos aos seus respectivos biomarcadores foram usados como biorreceptores.

[‡] Sulfo-LC-SPDP é a sigla utilizada para o reagente: hexanoato de sulfosuccinimida 6-[3-(2-piridilditiol) propilamino].

Em sistemas analíticos contendo sensores químicos, a especificidade é governada majoritariamente pela interação receptor/ligante, de maneira que nos últimos anos técnicas de transdução universais têm sido frequentemente aplicadas na análise de biomarcadores tumorais. São exemplos, dentre essas técnicas: EIS, SPR, QCM e AFM.^{6,76}

Sistemas Miniaturizados

Em aplicações clínicas, sistemas analíticos miniaturizados não apenas acarretam em um maior desempenho analítico, bem como são essenciais para o desenvolvimento de dispositivos *point-of-care*: “sistemas integrados capazes de processar amostras clínicas em

campo (ambulâncias, consultórios, casas dos pacientes etc.) para determinação de diferentes tipos de biomarcadores”.¹³

Em 2003, Kojima e colaboradores⁶⁵ desenvolveram um microchip em substrato de vidro com biossensor voltamétrico integrado para a detecção em batelada de AFP. O dispositivo, de dimensões 17 mm x 17 mm, apresentou canais da ordem de 30 µm x 30 µm. Tsukagoshi e colaboradores,⁹⁸ em 2005, propuseram um µTAS o qual incorporava imunossensor, EOF e transdução por quimiluminescência. O biorreceptor foi imobilizado em um dos reservatórios de injeção, de modo que as biomoléculas alvo complexadas e livres eram separadas pelo EOF após incubação da amostra por um tempo pré-estabelecido. O *microchip* (12,5 mm x 35,0 mm) continha canais com profundidade e largura em torno de 20 e 50 µm, respectivamente. Esse método foi validado mediante aplicação aos complexos: HSA/ANTI-HSA (biorreceptor) e IAP/ANTI-IAP(biorreceptor). Em 2008, Teker¹¹⁸ construiu um transistor de efeito de campo tipo-p incorporando nanotubo de carbono (CNTFET) conjugado com anticorpo monoclonal específico ao biomarcador IGF1R. O nanotubo foi integrado aos eletrodos (separados por 1 a 4 µm) por técnica de auto-montagem eletroforética, sendo os experimentos conduzidos aplicando-se 4 µL de padrão/amostra sobre o CNTFET. Choi e Chae¹¹⁹ desenvolveram em 2009 um dispositivo microfluídico de vidro/PDMS baseado em SPR e reações protéicas competitivas de adsorção/dessorção, as quais ocorriam durante a rotina de análise prescindindo, desse modo, etapas de funcionalização de superfície. A partir das diferentes forças de adsorção das proteínas imunoglobulina G, fibrinogênio e tiroglobulina (Tg) sobre Au (eletrodos depositados em vidro), foi possível a determinação em fluxo de Tg; biomarcador do câncer diferenciado da tireóide (DTC). Os canais (confeccionados em PDMS) apresentaram largura de 2,1mm, ao passo que a vazão variou entre 5 e 10 µL.min⁻¹.

1.4. Detecção Condutométrica Sem Contato

1.4.1. Histórico

Medidas de condutividade baseadas no isolamento elétrico dos eletrodos em relação à solução foram introduzidas por Zahn no ano de 1928 (apud BRITO-NETO et al.).¹²⁰ Surgia então uma técnica inovadora no campo da eletroquímica/eletroanalítica; a detecção condutométrica sem contato (CCD), conhecida também como detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C^4D) ou, simplesmente, detecção oscilométrica (DO), a qual tem representado uma alternativa à detecção condutométrica convencional (com contato). A C^4D foi utilizada exhaustivamente nas décadas de 60 e 70 para determinações não invasivas e titulações em alta frequência. Esforços subsequentes resultaram na miniaturização da cela de detecção para análises em fluxo, permitindo, assim, o uso dessa técnica em cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC) e em analisadores por injeção em fluxo (FIA).

Detectores condutométricos sem contato foram inicialmente integrados a um sistema analítico miniaturizado em 2001.¹²¹ Desde então, acoplada à eletroforese capilar, essa técnica tem se mostrado uma ferramenta útil para determinação de analitos diversos, incluindo biomoléculas e íons orgânicos e inorgânicos. O baixo custo instrumental, a alta compatibilidade de miniaturização, a detecção universal, a facilidade de integração com eletroforese capilar e demais características intrínsecas à C^4D , como isolamento elétrico dos eletrodos e simplicidade instrumental, foram sumamente primordiais para o seu sucesso em microfluídica.³³

1.4.2. Teoria

Posicionamento dos Eletrodos

Em C^4D os eletrodos são isolados da solução eletrolítica por um dielétrico, de forma que esses eletrodos podem ser posicionados sob dois modos: no mesmo plano ou fora do plano com relação aos microcanais. No primeiro caso, os eletrodos são fabricados por processos que envolvem fotolitografia e deposição metálica. O modo fora do plano apresenta maior simplicidade, pois os eletrodos podem ser confeccionados com fitas adesivas metálicas e fixados em uma das partes constituintes do microsistema (sobre a lâmina de cobertura ou sob o substrato).¹²² A **Figura 1.7** apresenta as camadas que compõem um microdispositivo C^4D contendo eletrodos fora do plano dos microcanais.

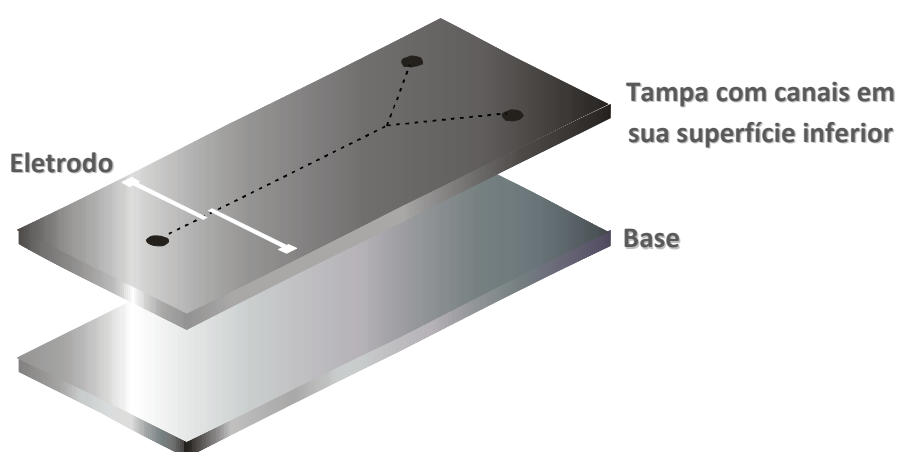


Figura 1.7. Ilustração de um *microchip* C^4D com eletrodos fixados sobre a sua lâmina de cobertura.

Princípio de Transdução

Bem como ocorre na condutometria convencional, em C^4D há a ausência de corrente faradaica de maneira que o sistema eletrodo/dielétrico/solução apresenta comportamento similar ao de um capacitor de placas paralelas, entretanto com capacitância dependente do potencial aplicado.¹²³ Neste contexto, os eletrodos formam capacitores planares com a solução eletrolítica bem como mostra a **Figura 1.8**, na qual estão presentes os seguintes

elementos: resistência associada ao fluido eletrolítico (R_s), dois capacitores referentes aos sistemas eletrodo/solução (C_1 e C_2) e um terceiro capacitor relacionado à capacitância de fuga (C_0), a qual decorre do acoplamento capacitivo direto entre os eletrodos.¹²⁴ Esse fenômeno atrai uma parcela (i_o) do fluxo de carga proveniente de e_r (i), reduzindo a corrente elétrica que se direciona ao detector (i_d) e, assim, afetando adversamente o desempenho analítico, sendo: $i_d = i - i_o$. Em linhas gerais, a C^4D consiste na aplicação de um sinal alternado de alta frequência a um dos eletrodos na cela de detecção (eletrodo de excitação, e_{exc}), o qual gera a polarização dos centros de carga do dielétrico. Esse fenômeno induz uma carga na solução eletrolítica mediante a formação de uma diferença de potencial interfacial. Na região do segundo eletrodo (eletrodo receptor, e_r), ocorre um processo análogo ao supracitado, com indução de corrente elétrica em e_r .¹²⁰ Essa corrente encontra-se relacionada diretamente à concentração e à condutância dos íons presentes em solução.

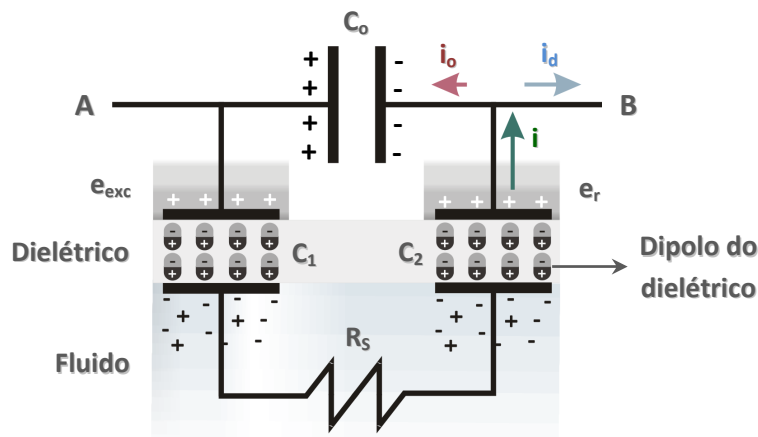


Figura 1.8. Modelo elétrico referente ao sistema de detecção C^4D . A, aplicação de sinal alternado de alta frequência sobre e_{exc} e B, aquisição, amplificação e armazenamento do sinal analítico.

O sinal analítico em C^4D está associado aos acoplamentos capacitivos que se estabelecem entre as duplas camadas de capacitância da solução e os eletrodos, fenômenos

os quais dependem diretamente da constante dielétrica da camada isolante dos eletrodos. A constante dielétrica de um material expressa a capacidade de polarização de seus centros de carga, para a qual é imposta uma resistência em função do efeito de assimetria de carga conforme ilustra a **Figura 1.9(A)**.⁶⁰ Esse efeito é consequência do alinhamento gradual das densidades de carga dos dipolos do dielétrico com relação ao campo elétrico externo e tende a reduzir a mobilidade desses dipolos, inibindo o processo de polarização. Por outro lado, o fenômeno de polarização intrínseco ao dielétrico gera um campo elétrico (\vec{E}_D) oposto ao campo do sistema eletrodo/dielétrico/solução (\vec{E}_S) que, por sua vez, se opõe ao processo de carregamento desse sistema como mostra a **Figura 1.9(B)**. Por conseguinte, uma maior constante dielétrica vem a resultar em um menor valor de \vec{E}_S , promovendo um aumento na capacitância (C) e, logo, da condutância (L) referente ao acoplamento capacitivo entre eletrodo e solução (ver abaixo a relação matemática entre L e C).¹²⁵

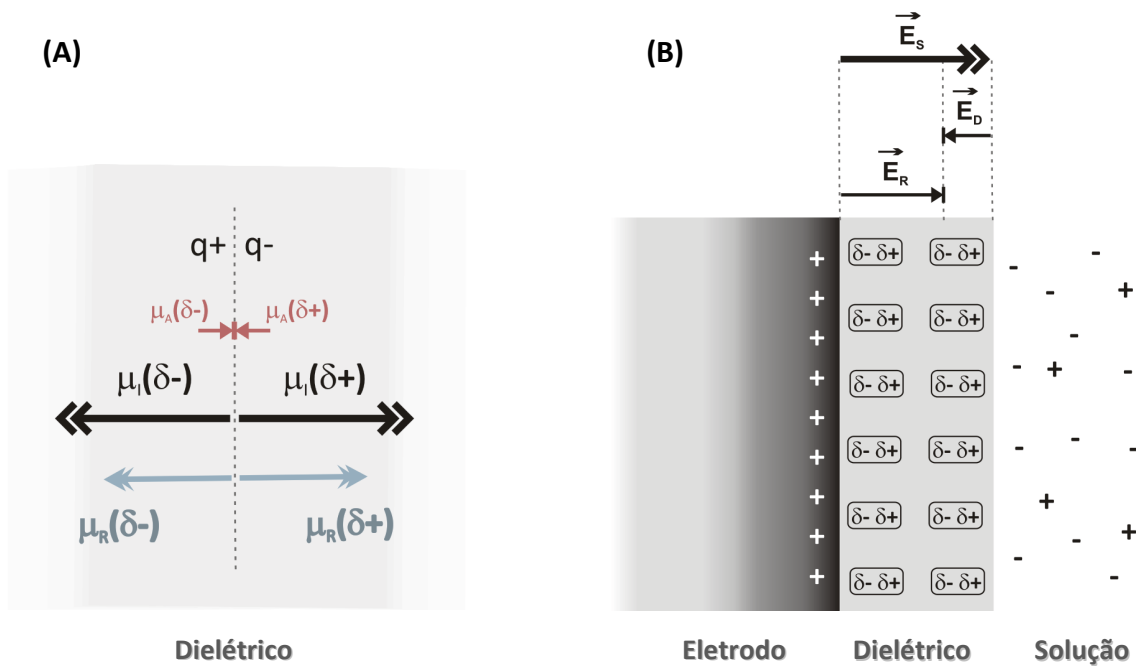


Figura 1.9. Efeito de assimetria de carga originando a resistência dielétrica **(A)** e acoplamento capacitivo eletrodo/dielétrico/solução em C^4D **(B)**. $q+$ e $q-$, cargas consequentes da assimetria de carga; δ , densidade de carga e μ_i , μ_A e μ_R , mobilidades ideal, decorrente do efeito de assimetria e resultante, respectivamente.

No âmbito matemático, L varia diretamente com os parâmetros: área dos eletrodos (A), distância entre eletrodo e solução (d), concentração (c_i), carga (z_i) e mobilidade efetiva (u_i) das espécies iônicas presentes na amostra como demonstra a Equação 1.1:⁶⁰

$$L = F \cdot (A/d) \cdot \sum c_i z_i u_i \quad (1.1)$$

em que F é a constante de Faraday. Conforme apresentado anteriormente, em C^4D o sistema eletrodo/solução exibe comportamento similar a de um capacitor de placas paralelas (ver **Figura 1.8**). Em microdispositivos contendo C^4D , a espessura do dielétrico (usualmente menor que $50 \mu\text{m}$) é pequena o suficiente a ponto de podermos negligenciar os efeitos de borda do campo elétrico. Assim, esse campo será constante por todo o volume de detecção. Nessas circunstâncias, aplicando-se a lei de Gauss encontramos:¹²⁵

$$C = \epsilon_0 A/d \quad (1.2)$$

sendo ϵ_0 a constante de permissividade ($8,85 \text{ pF} \cdot \text{m}^{-1}$). Adicionalmente, na presença de dielétricos entre eletrodo e solução C aumenta segundo um fator de proporcionalidade κ , a constante dielétrica.

Substituindo (1.2) em (1.1):

$$L = FC/\epsilon_0 \cdot \sum c_i z_i u_i \quad (1.3)$$

A Equação (1.3) mostra a dependência entre resposta analítica em C^4D (L) e capacitância (C).

Sinal Alternado

A aplicação de um sinal alternado de alta frequência, em geral com ondas senoidais,¹²⁶ visa à anulação do fluxo de difusão (J_D) das espécies iônicas presentes na solução, de maneira que a condutividade esteja correlacionada diretamente com o fluxo de migração dessas espécies. Nessas condições, as partículas oscilam em torno de uma dada posição média, não gerando gradiente de concentração resultante (∇c) com consequente ausência de transporte difusional conforme a primeira lei de Fick,⁶⁰ apresentada a seguir:

$$J_D = D \cdot \nabla c \quad (\text{Equação 1.4})$$

em que D representa o coeficiente de difusão da espécie.

Frequência e Espessura do Dielétrico

Os capacitores formados em C⁴D caracterizam-se por uma impedância (X_C), também denominada reatância capacitiva, a qual é inversamente dependente da frequência (f) do sinal de excitação, contudo aumenta com a espessura da camada de isolamento dos eletrodos (d) como apresentado na Equação 1.2.¹²² Dessa maneira, em sendo aplicados sinais de alta frequência e utilizadas camadas de isolamento não muito espessas (há uma redução de aproximadamente 75 % do sinal analítico quando d é elevado de 125 a 425 μm),³³ a impedância imposta ao fluxo de carga no interior dos microcanais será pequena o suficiente para que as variações de condutividade sejam mensuráveis.

$$X_C = d/2\pi f \epsilon_e \epsilon_c A \quad (\text{Equação 1.5})$$

sendo ϵ_e e ϵ_c as permissividades elétricas do eletrodo e da camada de isolamento, respectivamente.

Condutância e Concentração

O parâmetro u_i diminui com a viscosidade da solução (η) segundo a relação matemática:⁶⁰

$$u_i = |z_i|e/6\pi\eta r_i \quad (\text{Equação 1.6})$$

cujas constantes envolvidas representam a carga elementar (e) e o raio iônico da partícula considerada (r_i).

Substituindo (1.6) em (1.1), temos:

$$L = FeA_e/6\pi\eta d \cdot \sum c_i z_i^2 / r_i \quad (\text{Equação 1.7})$$

Considerando-se um dado analito i e desde que A , d , e η mantenha-se constante, L irá variar linearmente em função da concentração desse composto (c_i) como se segue:

$$L = k' \cdot c_i \quad (\text{Equação 1.8})$$

em que temos:

$$k' = FeAz_i^2/6\pi\eta dr_i = Faz_i u_i / d \quad (\text{Equação 1.9})$$

1.4.3. Vantagens em Relação à Condutometria Convencional

Sistemas C^4D conferem vantagens significativas em relação à condutometria convencional. São exemplos o uso de micro/nanocanais sem perda significativa da sensibilidade e a ausência de inconvenientes relacionados ao contato eletrodo/solução, quais sejam: passivação, degradação e formação de bolhas na superfície dos eletrodos. Adicionalmente, o não contato entre eletrodo e solução eletrolítica vem a permitir o uso de uma ampla variedade de substratos para microfabricação e prescindir a etapa de limpeza

dos eletrodos; usualmente uma etapa lenta, que exige o uso de reagentes adicionais à análise e que pode interferir no desempenho analítico.¹²⁷

1.4.4. Tendências

Aplicações a amostras biológicas são bastante promissoras, bem como a comercialização de microsistemas C⁴D destinados a esse propósito. No âmbito teórico, é necessário aprofundar nossos conhecimentos sobre os fatores que governam a resposta analítica desses detectores. Adicionalmente, modificações na geometria e configuração dos eletrodos devem ser implementadas de modo a solucionar aquele que figura como o fator limitante principal da C⁴D: seu baixo nível de detectabilidade. Dentre as alternativas já propostas objetivando melhorias na sensibilidade dessa técnica, temos: sinais de excitação de alta tensão (centenas de volts); plano-terra para redução de C_o, a qual é proveniente do acoplamento capacitivo direto entre os eletrodos;⁵⁷ eletrodos semicirculares;¹²⁸ novos materiais como dielétrico;¹²⁹ geometrias distintas para cela de detecção,¹³⁰ detecção condutométrica híbrida (HCD),¹³¹ em que e_{exc} é mantido em contato com a solução eletrolítica, e dopagem da camada dielétrica com TiO₂ (em fase de elaboração).[†]

1.5. Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto é desenvolver um sistema microfluídico integrando biossensor condutométrico sem contato para análise de interações biomoleculares (μ BIA-C⁴D) contendo o biorreceptor FA. Pretende-se, assim, a construção de uma nova alternativa para a análise do biomarcador de câncer FR- α .

[†] LIMA, R. S.; SEGATO, T. P.; GOBBI, A. L.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E. **Dielectric Layer Doping: A New Alternative for Increasing Sensibility of Contactless Conductivity Detection in Microchips**. A ser submetido ao periódico *Analytical Chemistry*, 2010.

CAPÍTULO 2

Microfabricação do μ BIA-C⁴D

As etapas principais para microfabricação do μ BIA-C⁴D, as quais serão abordadas a seguir, são: (i) confecção dos microcanais em PDMS; (ii) deposição dos eletrodos sobre vidro; (iii) isolamento elétrico desses eletrodos com filme de SiO₂; (iv) construção da fase biossensora sobre SiO₂ e (v) selagem PDMS/SiO₂/vidro. Todas as etapas supracitadas foram realizadas nos Laboratórios de Microfabricação (LMF) e Filmes Finos (LFF), ambos instalados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP). Na **Figura 2.1** são apresentadas as camadas constituintes do microdispositivo.

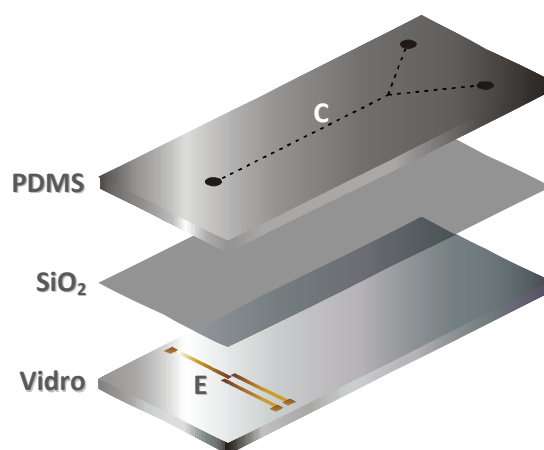


Figura 2.1. Camadas constituintes do μ BIA-C⁴D. C, canal e E, eletrodo.

2.1. Confecção dos Microcanais

Os microcanais foram confeccionados em PDMS empregando-se moldagem por litografia macia. O molde consistiu de estruturas em alto relevo do fotorresiste negativo SU-8 “impressas” sobre uma placa circular de vidro (5,0 cm de diâmetro). Para sua fabricação, o fotorresiste (Clariant Corporation) foi depositado por *spinner* (Headway Research Inc., mod. EC101DT) a uma velocidade de 1.000 rpm e tempo de 30 s, resultando em uma espessura aproximada de 40 μ m. A etapa de pré-cura do SU-8 foi feita em chapa aquecedora (Tecnal,

mod. TE-038) sob três ciclos, quais sejam: 65°C por 5 min, 95°C por 15 min e 65°C por 5 min. Em seguida, o fotorresiste foi exposto à radiação UV durante 55 s utilizando-se uma fotoalinhadora da Karl Suss America Inc., mod. MJB 3 UV 200 (radiação com potência de 10 $mW.cm^{-2}$), e máscara impressa em fotolito[‡] com configuração e dimensões conforme discrimina a **Figura 2.2**. Posteriormente, foram conduzidas as etapas de pós-cura (sob os mesmos ciclos da pré-cura) e revelação do SU-8 em solução de 1-metóxi-2-acetato 98 % (MicroChem Corporation) durante 1 min sob agitação; após lavagem com isopropanol (Labsynth), obteve-se estrutura em alto-relevo (ver **Figura 1.3**) contendo largura igual a 250 μm e altura em torno de 50 μm , segundo dados obtidos por um perfilômetro da Veeco, mod. dektak 3ST.

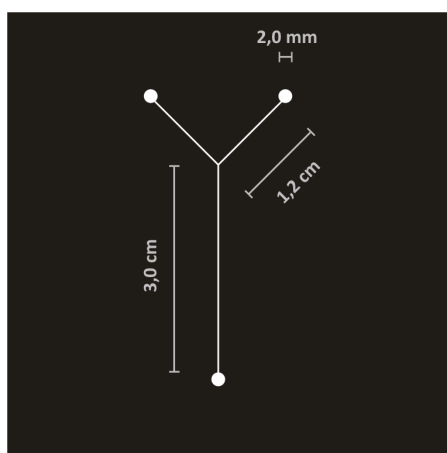


Figura 2.2. *Layout* para construção do molde vidro/SU-8.

Para a etapa de replicação, monômeros de PDMS (Sylgard 184 Elastomer) foram misturados a um agente de cura específico (Sylgard 184 Elastomer) na proporção 10:1 (m/m). Visando remover bolhas, a mistura foi mantida por 40 min em dessecador de vidro (Hexasystems) adaptado a uma bomba de vácuo (Tecnal, Mod. TE-058). Em seguida, o substrato foi despejado sobre o molde (foram usadas estruturas metálicas para delimitar a área de dispersão do oligômero e peças de acrílico com vista a alinhar mangueiras de

[‡] Fotoplotagem de layers em fotolito realizada pela empresa DGM Design, Curitiba-PR.

silicone para acesso aos reservatórios), procedendo-se a polimerização em chapa aquecedora a uma temperatura de 100°C e tempo de 45 min. Uma vez que o PDMS apresenta baixa energia de superfície e caráter elastomérico, o substrato contendo os microcanais pôde ser desmoldado facilmente sem danificação do molde (ver **Figura 1.4**).

Na **Figura 2.3** é ilustrada uma foto da camada de PDMS incorporando os microcanais (localizados em sua superfície inferior), os quais apresentaram 250 μ m de largura e 50 μ m de profundidade, e mangueiras de silicone contendo 1,0 mm de diâmetro interno.

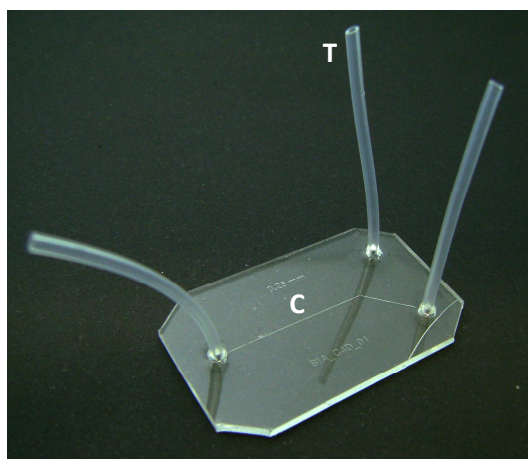


Figura 2.3. Camada de PDMS contendo canais (C) e tubos de silicone (T) para acesso aos reservatórios.

2.2. Fabricação dos Eletrodos

Os eletrodos foram fabricados em substrato de vidro usando os processos de fotolitografia e deposição metálica via *sputtering*. A etapa fotolitográfica visou-se à construção de uma máscara em fotorresiste positivo AZ 4210 (Clariant Corporation) para o subsequente processo de deposição dos metais.

O fotorresiste foi depositado sobre uma placa de vidro de dimensões 6,2 cm x 6,2 cm (Glass Técnica) por *spinner* a 3.000 rpm durante 30 s, gerando uma espessura aproximada de 2,4 μ m. A pré-cura foi feita a 90°C por 10 min em chapa aquecedora, seguida do processo

fotolitográfico o qual perdurou por 55 s sendo utilizada máscara em fotolito[£] contendo *layout* tal como mostra a **Figura 2.4**. A etapa de pós-cura do fotorresiste foi procedida sob a mesma condição de sua pré-cura. Por fim, as partes solúveis do AZ 4210 foram removidas usando-se borato de potássio (MicroChem Corporation) 33% em água (v/v) por 1 min sob agitação (ver **Figura 1.3**). A lavagem foi feita com água deionizada (Milli-Q, obtida com resistividade maior que 17 M Ω ·cm). Os eletrodos apresentaram espaçamento e largura iguais a 1,0 mm e configuração antiparalela, tendo por objetivo reduzir os efeitos de C_0 ; suas extremidades excederam em 5,0 mm com relação ao centro da placa de vidro visando facilitar o alinhamento da lâmina de PDMS na etapa de selagem.

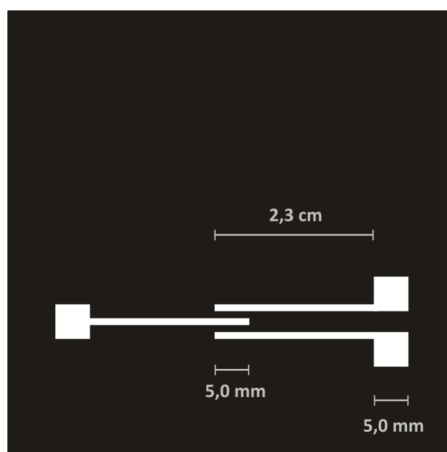


Figura 2.4. *Layout* para deposição dos metais por *sputtering*.

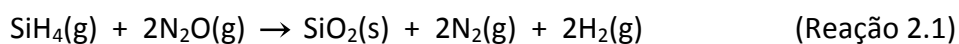
Realizada a fotogração em fotorresiste positivo, procedeu-se a remoção de resíduos orgânicos em plasma de O_2 (Plasma Technology Inc., mod. PE 80); os valores de potência, pressão e tempo foram de 100 W, 50 mTorr e 5 min, respectivamente. Em seguida, foram realizadas deposições sequenciais dos metais Ti/Au/Ti por *sputtering* (Oerlikon Balzers, mod. BA510, com sistema de bombeamento criogênico), os quais apresentaram, respectivamente, as espessuras: 20, 100 e 5 nm. Adotamos os parâmetros seguintes: pressão inicial de 20 nBar, pressão parcial de Ar igual a 4 μ Bar e tempo de pré-*sputtering*

[£] Fotoplotação de *layers* em fotolito realizada pela empresa DGM Design, Curitiba-PR.

equivalente a 2 min. As camadas de Ti tiveram por finalidade conferir aderência dos eletrodos ao vidro e à SiO_2 (dielétrico depositado posteriormente para isolamento desses eletrodos), dado que o Au exibe aderência baixa frente a tais materiais.⁴¹ A etapa de *lift-off* foi feita em acetona (Labsynth).

2.3. Isolamento Elétrico dos Eletrodos

Para isolamento dos eletrodos, um filme fino de SiO_2 foi depositado por processo químico em fase vapor assistido por plasma (PECVD) sobre a placa de vidro. Foi utilizado um equipamento da Vacutec®, mod. VPS1500. Nesse processo, os gases SiH_4 e N_2O são expostos a um campo de radiofrequência do qual resultam os radicais $Si\bullet$ e $O\bullet$, que reagem entre si formando camada(s) de SiO_2 . Abaixo, segue a reação global associada ao processo referente:



Os gases reagentes SiH_4 (diluído em He 2%) e N_2O foram introduzidos na câmara reacional com vazões de 150 e 70 $cm^3 \cdot min^{-1}$, respectivamente, a uma pressão de 1 Torr e temperatura igual a 350 °C. No interior do reator, o campo de radiofrequência foi aplicado sob uma potência de 20 W e 13,56 MHz de frequência. Com base em medidas perfilométricas, o dielétrico apresentou espessura em torno de 50 nm.

É importante ressaltar que os óxidos depositados em fase vapor apresentam maior uniformidade quando comparados aos compostos crescidos termica ou quimicamente, o que vem a representar uma vantagem no que concerne ao seu uso como substrato em fases sensoras. O óxido metálico formado a partir de reações químicas em fase vapor exibe baixo

grau de hidratação, prevenindo a formação de espécies protonadas (NH_3^+ no caso do APTS) as quais resultam de interações com o grupo $-OH$ presente na superfície do substrato. Essas espécies propiciam a ocorrência de polimerizações e/ou oligomerizações homogêneas (no seio da solução) com conseqüente depósito de aglomerados coloidais sobre o substrato, inibindo a formação de camadas moleculares organizadas e reduzindo a reprodutibilidade do processo de modificação de superfície.¹³²

Na **Figura 2.5**, é ilustrada uma foto da placa de vidro contendo os eletrodos. De modo a permitir a conexão elétrica do transdutor à instrumentação utilizada, as extremidades dos eletrodos foram expostas a soluções de HF (Mallinckrodt Baker Inc.), 10% (v/v) em água, por cerca de 20 s com vista a remover as camadas de SiO_2 e Ti, que apresentam condutividades inferiores ao Au (mantido para conexões elétricas).



Figura 2.5. Placa de vidro com eletrodos depositados por *sputtering*.

2.4. Construção da Fase Biossensora

Neste projeto, são utilizados três eletrodos (ver **Figura 2.5**); além de e_{exc} , através do qual é aplicado o sinal alternado (neste trabalho, foram utilizados sinais com onda senoidal) de alta frequência, há dois eletrodos receptores (eletrodo receptor de referência, e_{rr} , e

moléculas de FA. O APTS apresenta em sua estrutura três grupos etóxi ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$); espécies lábeis que sofrem reações de substituição nucleofílica de segunda ordem do ponto de vista cinético. A água figura como um dos nucleófilos possíveis, gerando grupos silanóis ($-\text{SiOH}$) por reação de hidrólise os quais sofrem posterior condensação em superfícies de óxidos metálicos segundo uma reação denominada sililação ou silanização, conforme mostra a **Figura 2.7**.^{73,133} Esse mecanismo ocorre de forma majoritária na presença de solventes não anidros (como é o caso do etanol, acetonitrila e acetona), ao passo que em solventes anidros grupos $-\text{OH}$ presentes na superfície hidratada do óxido atuam como nucleófilos ante aos grupos etóxi do silano resultando na reação de silanização.⁷⁴

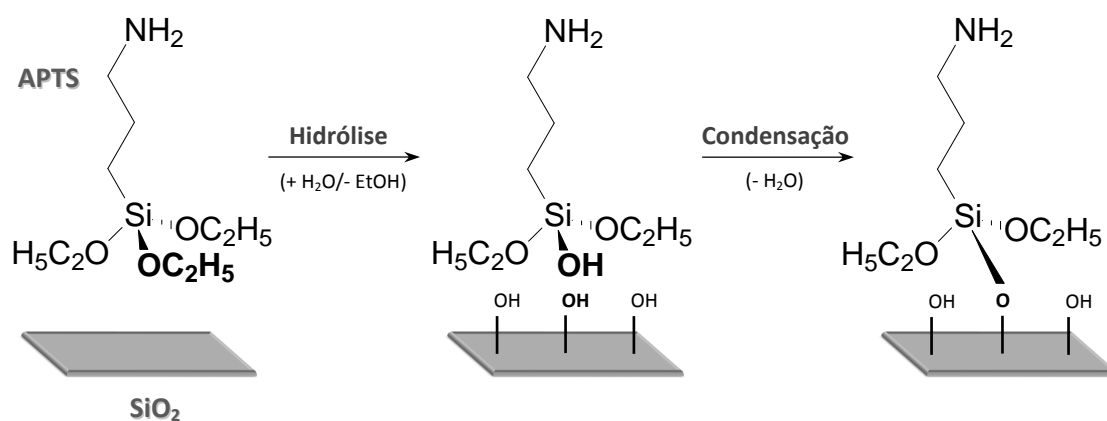


Figura 2.7. Formação de APTS-SAM sobre superfície de SiO_2 em solventes anidros.

Funcionalização com Biorreceptor

O APTS apresenta em uma de suas extremidades o grupo organofuncional $-\text{NH}_2$, a partir do qual o silano liga-se ao FA como ilustra a **Figura 2.8**. O principal obstáculo referente à modificação de superfícies via ligações covalentes está relacionado a uma possível perda da atividade biológica dos biorreceptores, que decorre de impedimentos estéricos do componente bioativo desses compostos. Contudo, estudos mostram que quando a ligação APTS/FA ocorre via o grupo carboxila do C_γ desse último, o grupo $-\text{NH}_2$ da 6-metilpterina

(espécie bioativa do FA) mantém-se livre para interação com ligantes específicos como os FRs- α .¹³⁴

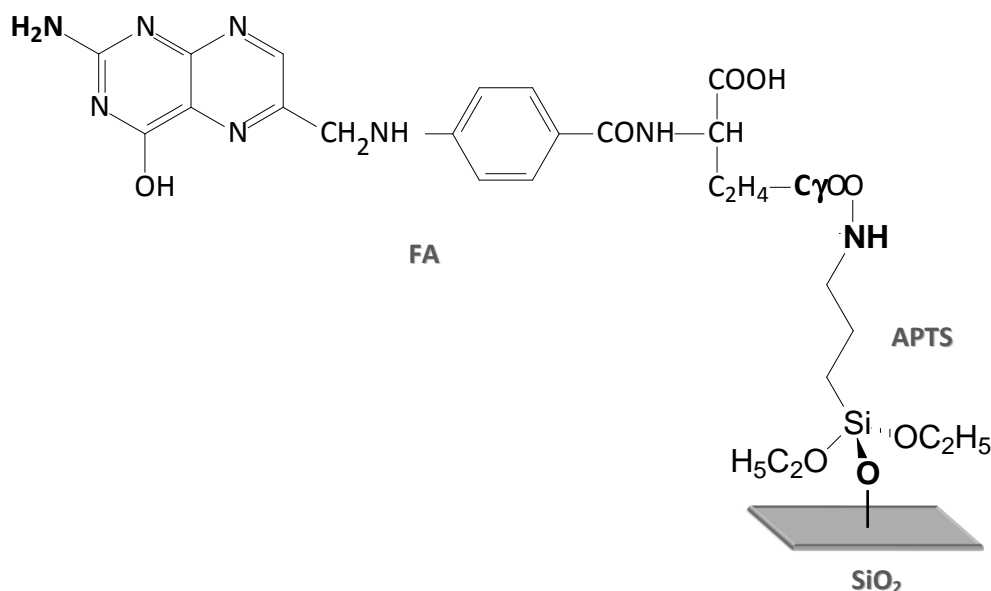


Figura 2.8. Ligações SiO₂/APTS/FA.

Seguimos protocolo experimental semelhante ao relatado por Bhalerao e colaboradores para funcionalização com FA.²⁰ Brevemente, um excesso de FA (aproximadamente 515 mg) foi dissolvido em DMSO (50 mL) a temperaturas entre 40 e 45°C. A essa mistura, foram adicionados os catalisadores piridina (515 mL) e N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (412 mL). DCC funciona como um agente reticulante heterobifuncional entre o grupo amino do silano e o carbono C_γ do FA. Todos os reagentes utilizados para funcionalização com FA foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. Finalmente, a superfície de SiO₂ silanizada foi incubada na solução de FA mediante um tempo de 3 h sob 40 a 45°C, empregando-se um ultrassom da Unique Group, mod. 1450. As etapas de limpeza e secagem do substrato se deram, respectivamente, em etanol e fluxo de N₂.

Considerações Gerais

Todas as reações de superfície foram realizadas em ambiente fechado com relação à vizinhança, evitando possíveis contaminações do meio reacional e interferências da radiação externa sobre os processos de silanização. Para tal, foram utilizados reatores de teflon[‡], os quais consistiram de tampa e base. Os reatores, bem como todas as vidrarias utilizadas, foram limpos utilizando-se solução piranha [H_2SO_4 (Quemis)/ H_2O_2 (Shynth) 3:1, v/v] por 30 min e água deionizada em abundância. Adicionalmente, a secagem de reatores e vidrarias em fluxo de N_2 foi imprescindível; pois a presença de água em excesso no meio reacional durante as silanizações pode acarretar em hidrólises homogêneas. Tais reações possibilitam a ocorrência de polimerizações e/ou oligomerizações, o que inibe a formação de camadas moleculares organizadas e reduz a reprodutibilidade do processo de modificação de superfície conforme supracitado.^{74,135}

2.5. Selagem

A etapa de selagem consistiu em integrar as lâminas: vidro/eletrodos/ SiO_2 /fase biossensora e PDMS/microcanais/mangueiras de silicone. Neste projeto, empregamos bombeamento com pressão positiva para movimentação dos microfluidos, o que redundou na necessidade de uma selagem irreversível de modo a evitar possíveis vazamentos nos microcanais. Para isso, previamente ao contato entre as lâminas, a superfície de PDMS foi exposta a um processo oxidativo em plasma de O_2 (condições iguais às descritas no item 2.2) durante um período de 12 s. Nessas condições, são gerados grupos silanóis que passam a estabelecer ligações covalentes com o Si.²² Uma foto do μ BIA- C^4D é apresentada na **Figura**

2.9.

[‡] Confeccionados na Oficina Mecânica do IQSC/USP.

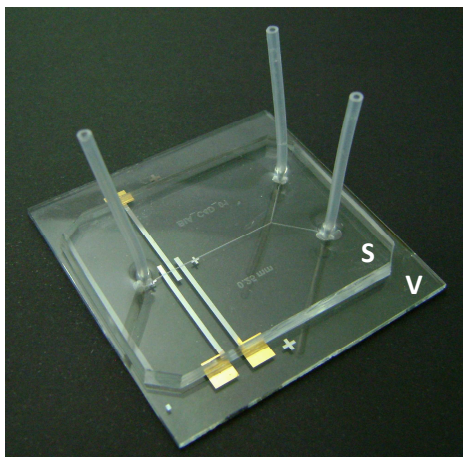


Figura 2.9. Foto do μ BIA-C⁴D. S, substrato de PDMS contendo canais e mangueiras de silicone, e V, vidro incorporando eletrodos, filme fino de SiO₂ e fase biosensora.

CAPÍTULO 3



Ferramentas e Rotina de Análise

3.1. Instrumentação e Software

Em linhas gerais, a instrumentação analítica empregada constitui-se de quatro componentes: (i) gerador de sinal alternado; (ii) transdutor condutométrico sem contato, incluindo os circuitos de aquisição e amplificação elétrica; (iii) bombas-seringa para bombeamento hidrodinâmico dos fluidos e (iv) computador para armazenamento e manipulação dos dados gerados durante os experimentos. Na **Figura 3.1** é mostrada uma foto contemplando os componentes que integram o sistema de análise.

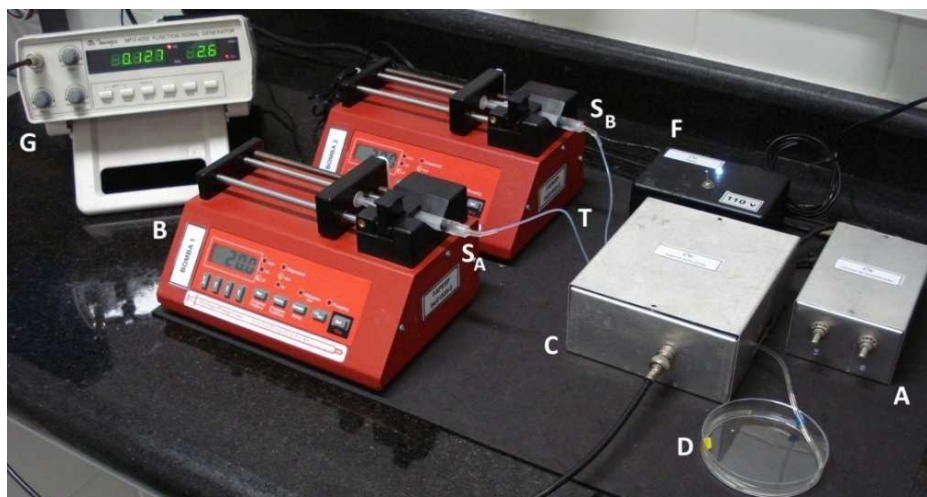


Figura 3.1. Instrumentação analítica suporte ao $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$. G, gerador de sinal; B, bomba-seringa; S_A e S_B , seringas contendo amostra e tampão, respectivamente; T, mangueira de teflon (adaptada ao tubo de silicone presente no *chip*); F, fonte de alimentação; C, caixa de Al com microdispositivo e circuito de recepção [ver **Figura 3.2(A)**]; A, circuito de amplificação de sinais em caixa de Al e D, descartê.

O sinal de excitação para o circuito oscilométrico foi aplicado a partir de um gerador de funções da Minipa, mod. MFG 4202. Para o bombeamento dos fluidos, foram utilizadas bombas-seringas da SyringePump, mod. NE 300. Em termos do transdutor, foi empregado um circuito eletrônico similar ao desenvolvido por Fracassi da Silva e do Lago.¹³⁶ Para a aquisição dos dados gerados pelo $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$, foram empregados uma interface da National Instruments e *software* programado em ambiente LabView[®] (detalhes sobre *hardware* e *software* descritos na referência 122).

3.2. Rotina de Análise

Na **Figura 3.2** são ilustrados uma foto do porta-amostra, contendo o microdispositivo e o circuito de recepção, diagramas de fluxo e exemplos de resposta obtidos pelo $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$. O transdutor C^4D é sensível a perturbações físicas externas que venham a interferir no campo elétrico estabelecido pelos eletrodos; dessa maneira, o porta-amostra foi isolado do meio externo utilizando-se uma caixa de Al. O $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$ possuiu dois canais de entrada (para amostra e tampão) e um de saída (para descarte) [**Figura 3.2(A)**], sendo amostra e tampão transportados hidrodinamicamente por bombas-seringa. Monitoramos as variações de condutância em tempo real sob um regime de análise em fluxo, baseado na simples comutação entre as bombas. A princípio, uma vez preenchidos os microcanais, a solução tampão é bombeada por tempo necessário para a estabilização do sinal (aproximadamente 2 min). Em seguida, inicia-se a aquisição de potencial registrado pelos eletrodos receptores [**Figura 3.2(B)**]. Decorridos alguns segundos, a amostra é bombeada gerando alteração de sinal em ambos os eletrodos [**Figura 3.2(C)**]. Após as interações biomoleculares alcançarem o equilíbrio, adiciona-se tampão em condições tais que possibilitem a regeneração da fase biossensora [**Figura 3.2(D)**], acarretando em redução gradual da resposta analítica praticamente ao seu valor inicial. O sinal de e_{rr} (S_r) está correlacionado com a concentração e a condutância da solução eletrolítica, enquanto que a resposta de e_{wr} (S_w) também se encontra intimamente associada às interações biorreceptor/ligante. Segundo estudos realizados por EIS,¹²² observa-se um aumento na capacitância do sistema $e_{wr}/\text{SiO}_2/\text{solução}$ na presença de macromoléculas ancoradas ao dielétrico, o que vem a redundar em uma elevação de S_w [**Figura 3.2(E)**]. Em tais condições, a diferença $S_w - S_r$ passa a estar relacionada diretamente às interações biomoleculares, representando o sinal analítico em $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$ [**Figura 3.2(F)**] (no Capítulo 4 é apresentada uma hipótese sobre o princípio de transdução).

As respostas analíticas em C^4D e $\mu BIA-C^4D$ foram estimadas mediante o cálculo da altura de potencial média registrada previamente ao término da etapa de amostragem.

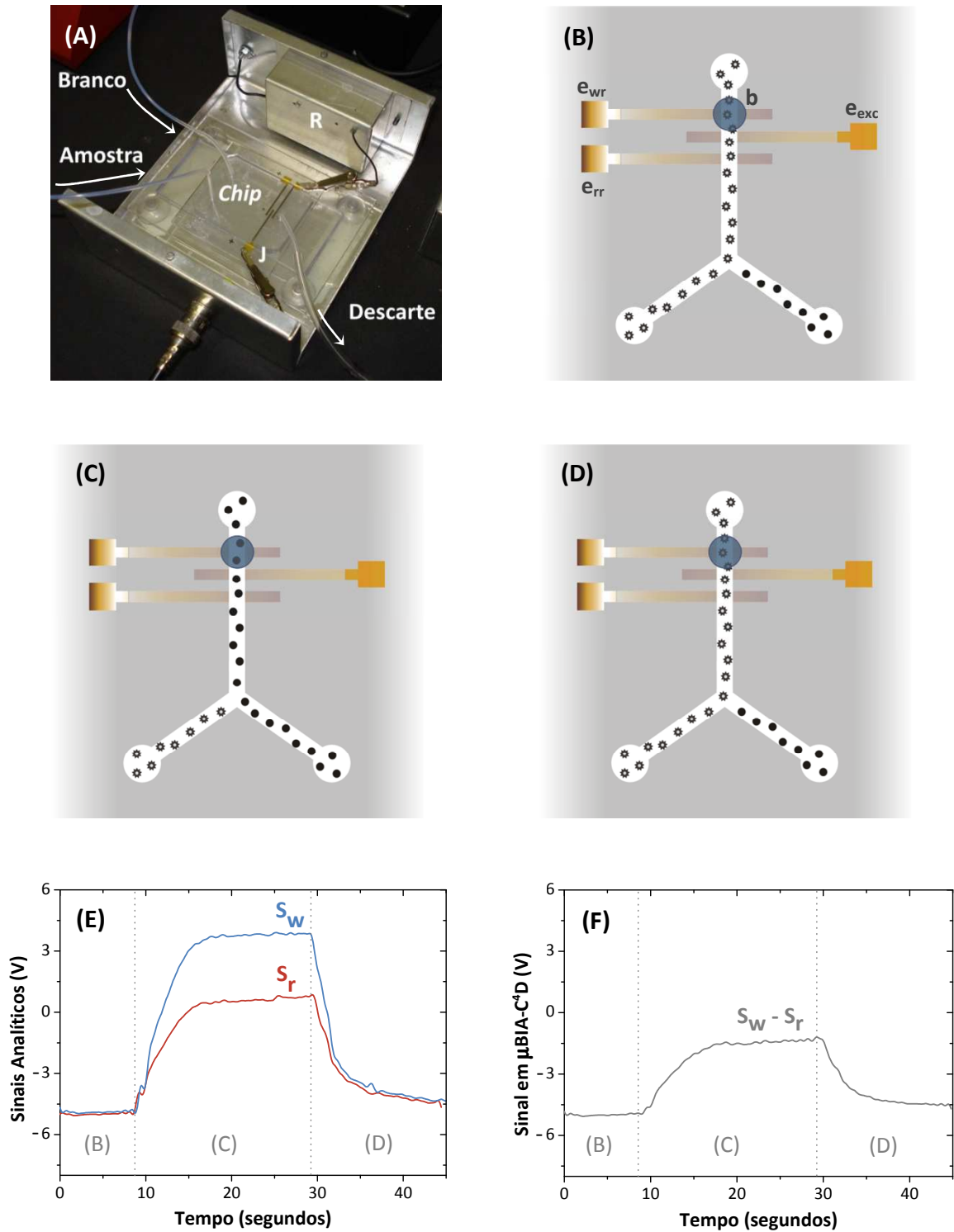


Figura 3.2. Foto do porta-amostra (A), diagramas de fluxo (B-D) e sinais analíticos típicos (E,F). J, jacarés para conexões elétricas; R, circuito de recepção de sinais; b, fase biossensora e S_r e S_w , respostas obtidas por e_{rr} e e_{wr} , respectivamente.

CAPÍTULO 4



Estudos de Sensibilidade do Detector

Alterações na natureza do dielétrico e na configuração e geometria dos eletrodos foram avaliadas visando uma melhoria nos níveis de detectabilidade do transdutor. Nesta etapa do projeto, os *microchips* não apresentaram fase biossensora, sendo apenas um dos eletrodos receptores utilizados durante os experimentos de condutância envolvendo padrões de um eletrólito determinado. A análise estatística dos dados foi realizada a partir de uma planilha de validação desenvolvida por Ribeiro e colaboradores,¹³⁷ disponível no endereço: lqta.iqm.unicamp.br. Nessa planilha, os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) são calculados com base em parâmetros da curva de calibração a 95,0, 99,0 e 99,9% de confiança. Esse método apresenta maior confiabilidade estatística quando comparado às demais técnicas (visual e da relação sinal/ruído), pois não se relaciona a fatores qualitativos, mas ao intervalo de confiança da regressão. Como estimativas da precisão e da sensibilidade intrínsecas ao microdispositivos, consideramos o desvio padrão relativo (RSD) e os valores de LOD e LOQ, respectivamente.

Para construção das curvas de calibração, foram realizadas sete medidas para cada nível de concentração, sendo adotado o método dos mínimos quadrados (MMQ) para obtenção das retas de regressão. Por conseguinte, os padrões foram preparados com rigor analítico de modo que os erros associados às suas concentrações (erros sistemáticos) fossem desprezíveis em relação aos erros decorrentes das flutuações dos sinais (erros aleatórios). Adicionalmente, as soluções padrão foram preparadas de forma semelhante em cada nível de concentração, tendo por finalidade evitar variâncias sistemáticas as quais comprometeriam a hipótese da variância constante (homocedasticidade) ao longo de toda a faixa de trabalho. Por fim, os sinais analíticos foram medidos segundo uma ordem não sistemática visando-se, assim, a não-correlação entre os erros aleatórios.^{137,138} Todos os fatores de correlação das curvas analíticas (R^2) foram inferiores a 1,0, implicando que

parcelas determinadas das variações totais dos dados em torno das médias não foram explicadas pelos modelos de calibração. Dado que essas parcelas podem afetar adversamente o ajuste das curvas analíticas, estudos adicionais foram efetuados de maneira a avaliar a adequação do modelo linear às retas de regressão, quais sejam, análise de resíduos e teste F de linearidade. A análise do gráfico de resíduos permite detectar problemas no ajuste da curva, como: desvios da linearidade, presença de amostras atípicas, heterocedastidade (variância não constante) e correlação entre os erros. Uma curva bem ajustada deverá apresentar erros homocedásticos, com distribuição uniforme e média zero. O teste F, por sua vez, baseia-se na comparação entre os resíduos do ajuste linear e do ajuste quadrático. O modelo de regressão mais adequado é aquele que resultar em um menor valor para a soma quadrática dos resíduos.¹³⁷

4.1. Microdispositivos

Microsistemas contendo C^4D foram fabricados utilizando-se dois isolantes elétricos dos eletrodos: filme de SiO_2 ($C^4D_{SiO_2}$), depositado por PECVD, e membrana de PDMS (C^4D_{PDMS}), depositada por *spinner*. Em ambos os casos, foram empregadas celas de detecção de dimensões idênticas, descritas no CAPÍTULO 2. No que concerne à deposição de PDMS, monômeros do polímero e seu agente de cura foram dispersos sobre vidro por *spinner* a 1.000 rpm durante 10 s e, em seguida, curados a 90°C em chapa aquecedora por 5 min. Esse processo resultou em uma camada com espessura aproximada de 50 μm .

Posteriormente aos estudos envolvendo os dielétricos SiO_2 e PDMS, configurações e geometrias distintas do transdutor foram avaliadas, a saber: cela de detecção reportada no CAPÍTULO 2 seletiva a medidas de (i) C^4D e (ii) HCD, e (iii) cela C^4D alternativa, segundo as

dimensões e geometria propostas por Kubaň e Hauser em estudos recentes (C^4D^{alt}).¹³⁰ Todos esses microdispositivos apresentaram filme de SiO_2 como dielétrico. Na **Figura 4.1** são ilustrados os microssistemas contendo HCD e C^4D^{alt} .

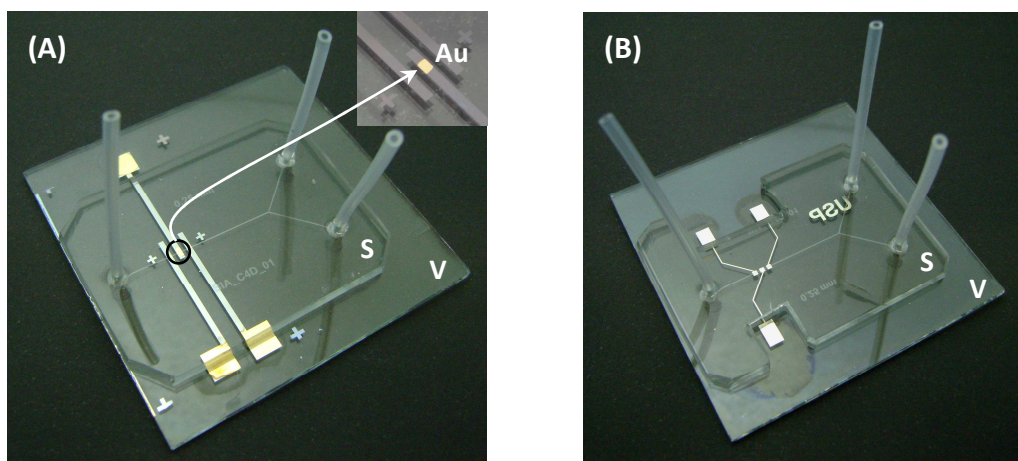


Figura 4.1. Microchips HCD (A) e C^4D^{alt} (B). S, substrato de PDMS contendo canais e mangueiras de silicone, e V, vidro incorporando eletrodos e filme fino de SiO_2 .

O modo de transdução híbrida [**Figura 4.1(A)**] foi estudado objetivando uma redução na resistência ao acoplamento capacitivo $e_{exc}/solução$. Para fabricação do microssistema incorporando HCD, uma pequena região localizada sobre e_{exc} foi exposta a HF, 10% (v/v) em água, por cerca de 20 s para remover as camadas de SiO_2 e Ti, mantendo-se o Au. Em sequência, durante a etapa de selagem, o PDMS foi alinhado ao vidro de forma a posicionar o canal sobre a região supracitada, estabelecendo-se, assim, um acoplamento capacitivo direto entre o metal Au e os fluidos eletrolíticos. O fotorresiste AZ 4210 foi empregado para limitar a ação corrosiva sobre a área do metal selecionada. No que concerne à C^4D^{alt} [**Figura 4.1(B)**], adotada a fim de se reduzir os efeitos de C_o , os eletrodos consistiram dos materiais Ti/Pt/Ti; a natureza do material condutor não afeta a resposta obtida em C^4D .¹²²

Na **Figura 4.2** é mostrado o *layout* da máscara em fotolito[€] usada para deposição dos metais. Os eletrodos exibiram espaçamento de 0,6 mm entre si e suas extremidades, interconectadas por linhas (0,2 mm de largura) inclinadas a um ângulo de 45° na região do

[€] Fotoplatação de layers em fotolito realizada pela empresa DGM Design, Curitiba-PR.

microcanal, foram separadas por 10 mm de comprimento. As dimensões reduzidas dos eletrodos na zona de transdução (1,0 mm x 1,0 mm) dificultaram o alinhamento da lâmina de PDMS com relação ao vidro durante a etapa de selagem, o que requereu o uso de uma lupa eletrônica (Coleman) com vista a ampliar a região.

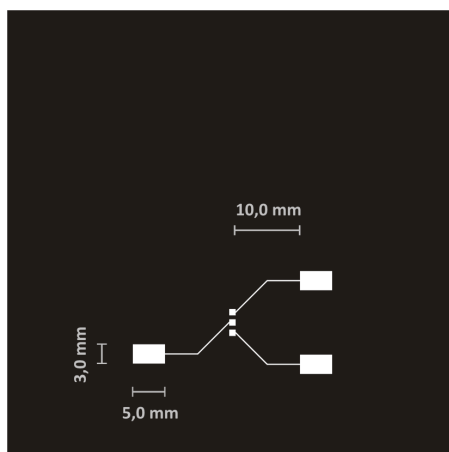


Figura 4.2. Layout para deposição dos metais por *sputtering* em C^4D^{alt} . Os *pads* localizados no centro da máscara apresentaram espaçamento de 0,6 mm e dimensões iguais a 1,0 x 1,0 mm.

4.2. Natureza do Dielétrico: Experimental, Resultados e Discussão

Medidas a padrões de $LiClO_4$ (Sigma-Aldrich Chemical Co) com os *chips* $C^4D_{SiO_2}$ e C^4D_{PDMS} foram realizadas a fim de obter um estudo comparativo entre os dielétricos SiO_2 e PDMS (água deionizada foi usada como branco). Foram adotadas as condições experimentais seguintes: 400 kHz; 2,5 V_{p-p} ; vazão de $100 \mu L \cdot min^{-1}$ para H_2O e amostra e tempo de amostragem em 15 s. A partir dos dados de RSD, dispostos na **Tabela 4.1**, concluiu-se que os dispositivos apresentaram precisão interensaio (medidas a um único *chip*) satisfatória; os sinais foram homocedásticos em toda a faixa de trabalho. A **Figura 4.3** corresponde às respostas e curvas de calibração obtidas para $C^4D_{SiO_2}$ e C^4D_{PDMS} . O gráfico de resíduos e o teste de linearidade validaram o ajuste linear para os modelos de calibração. Os valores de LOD e LOQ são discriminados na **Tabela 4.2**.

Tabela 4.1 - Valores de RSD (%) para a faixa de trabalho adotada

Nível ($C^4D_{SiO_2}$, $\mu\text{mol.L}^{-1}$)	SiO_2 (dielétrico)	Nível (C^4D_{PDMS} , mmol.L^{-1})	PDMS (dielétrico)
25	3,76	1,0	3,90
50	3,32	2,5	3,55
75	3,44	4,0	2,25
100	3,78	5,5	3,77

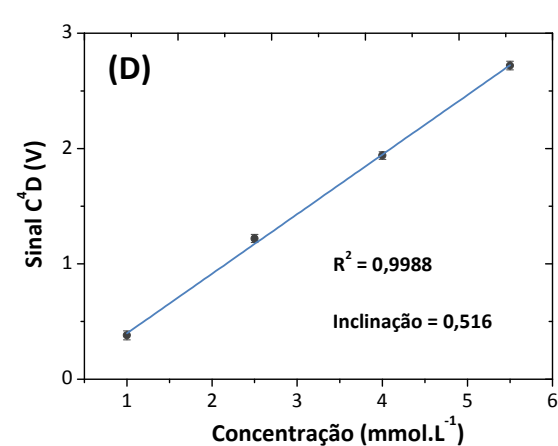
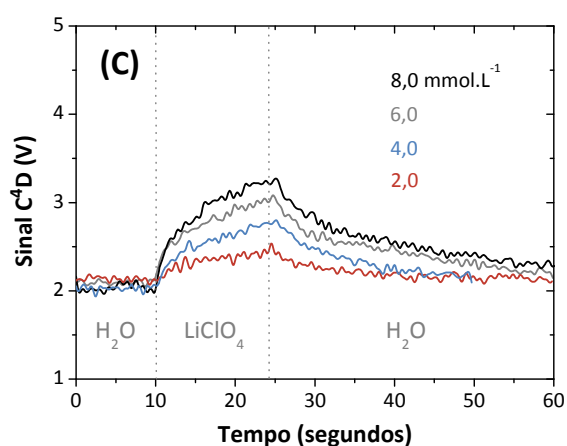
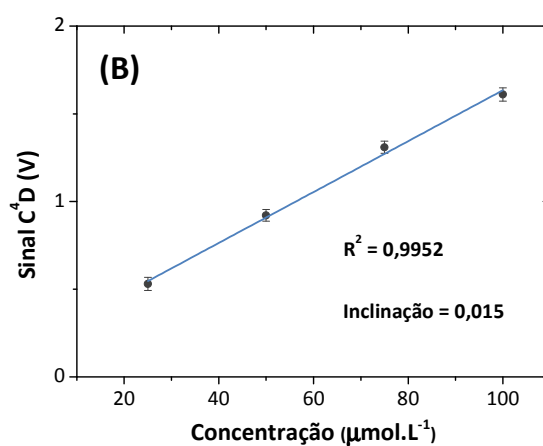
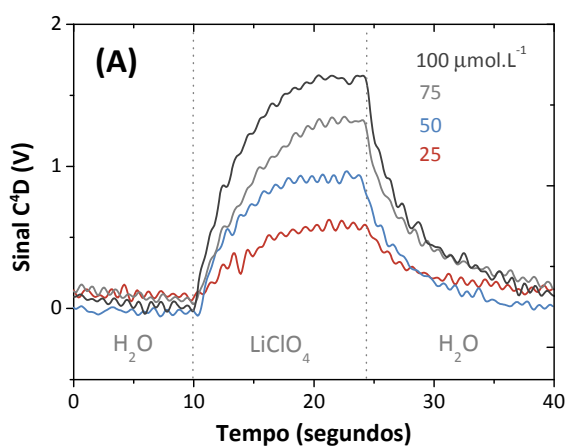


Figura 4.3. Sinais e curvas analíticas correspondentes aos microsistemas $C^4D_{SiO_2}$ (A,B) e C^4D_{PDMS} (C,D). Condições experimentais: 400 kHz, 2,5 V_{p-p}, vazão de $100 \mu\text{L.min}^{-1}$ para H_2O e amostra e tempo de amostragem em 15 s.

Tabela 4.2 - Valores de LOD e LOQ estimados para 95,0, 99,0 e 99,9% de confiança

	LOD ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)			LOQ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		
	95,0%	9,0%	99,9%	95,0%	99,0%	99,9%
$\text{C}^4\text{D}_{\text{SiO}_2}$	8,51	11,60	15,77	12,87	14,55	16,81
$\text{C}^4\text{D}_{\text{PDMS}}$	640,00	870,00	1.170,00	950,00	1.070,00	1.230,00

O *microchip* $\text{C}^4\text{D}_{\text{SiO}_2}$ exibiu níveis de detectabilidade consideravelmente inferiores àqueles registrados para $\text{C}^4\text{D}_{\text{PDMS}}$. Esses sistemas diferiram entre si somente em termos da natureza e espessura do dielétrico. SiO_2 e PDMS possuem valores de κ similares (em torno de 2,5),^{139,140} de maneira que a diferença de sensibilidade observada deve-se, presumivelmente, à menor espessura do filme de SiO_2 (50 nm para SiO_2 e 50 μm para PDMS). Isso acarreta em redução da resistência dielétrica imposta ao acoplamento capacitivo eletrodo/solução.

Os dados expressos na **Tabela 4.2** confirmam a relevância da espessura do dielétrico sobre a sensibilidade em C^4D . Neste contexto, o uso de um filme de SiO_2 com 50 nm de espessura para isolamento dos eletrodos representa uma vantagem substancial frente aos *microchips* que incorporam C^4D citados na literatura. Nesses, a distância eletrodo/solução apresenta usualmente valores de 40 μm , para eletrodos semicirculares no mesmo plano, e 100 μm , para eletrodos planares fora do plano.

4.3. Configurações do Transdutor: Experimental, Resultados e Discussão

Para esse estudo, adotamos condições experimentais idênticas àquelas citadas no item 4.2, com tempo de amostragem de 20 s. Os valores de RSD, calculados para padrões de NH_4Cl (Labsynth) e expressos na **Tabela 4.3**, evidenciaram uma precisão interessante satisfatória para os microdispositivos (água deionizada foi usada como branco). Para 150

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ de eletrólito, houve saturação da resposta obtida por $\text{C}^4\text{D}^{\text{alt}}$; a janela de potenciais considerada pelo software de aquisição de sinais foi igual a 10 V. Ademais, as respostas analíticas inerentes aos transdutores C^4D e HCD apresentaram-se homocedásticas ao longo da faixa de trabalho (exceto em $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para C^4D), enquanto que em $\text{C}^4\text{D}^{\text{alt}}$ a variância aumentou gradualmente com a redução nos níveis de concentração.

Tabela 4.3 - Valores de RSD (%) para a faixa de trabalho adotada

Nível ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	C^4D	$\text{C}^4\text{D}^{\text{alt}}$	HCD
50	3,86	6,47	3,40
75	3,48	3,09	2,23
100	3,68	2,44	2,42
125	3,37	1,44	2,71
150	1,61	-	3,95

A **Figura 4.4** corresponde aos sinais analíticos e suas respectivas curvas de calibração obtidas para os três transdutores. O gráfico de resíduos e o teste de linearidade validaram o ajuste linear para os modelos de calibração. Os valores de LOD e LOQ, por sua vez, são apresentados na **Tabela 4.4**. Embora a $\text{C}^4\text{D}^{\text{alt}}$ tenha exibido os menores limites de detectabilidade, seguida da HCD, observa-se que as alterações na configuração e geometria da cela condutométrica sem contato não resultaram em um aumento estatisticamente efetivo da sensibilidade a níveis de significância de 95,0, 99,0 e 99,9%. Conclui-se, logo, que a geometria da cela de detecção adotada em $\text{C}^4\text{D}^{\text{alt}}$ não reduziu de forma eficiente o acoplamento capacitivo direto entre os eletrodos (C_0). Para o caso da detecção híbrida, propomos uma base teórica fundamentada em leis da física elétrica de modo a explicar os resultados ocorrentes.

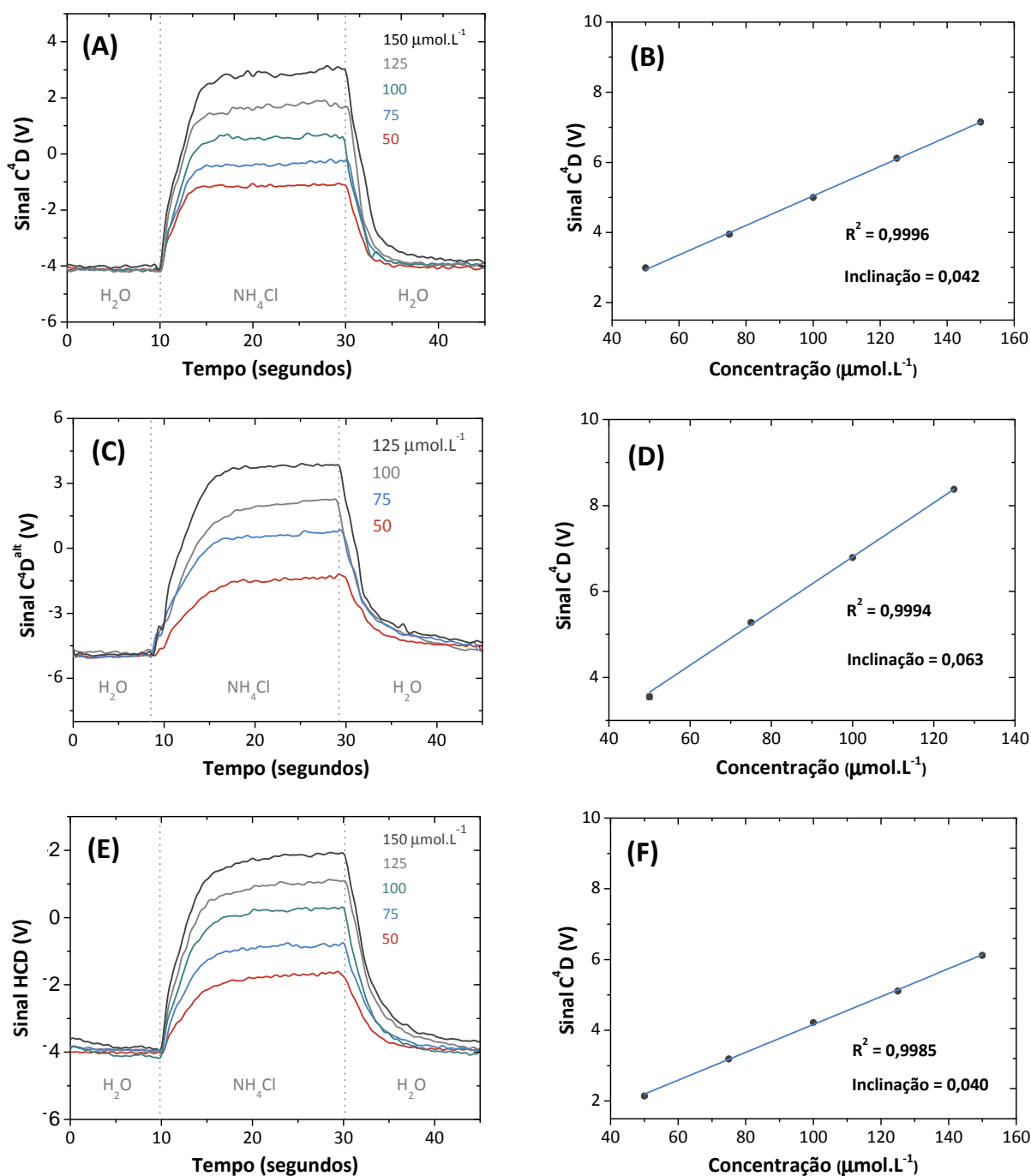


Figura 4.4. Sinais e curvas analíticas obtidos para os microdispositivos contendo C^4D (A,B), C^4D^{alt} (C,D) e HCD (E,F). Condições experimentais: 400 kHz, 2,5 V_{p-p} e vazão de $100 \mu L \cdot min^{-1}$ para H_2O e amostra.

Tabela 4.4 - Valores de LOD e LOQ estimados para 95,0, 99,0 e 99,9 % de confiança

	LOD ($\mu mol \cdot L^{-1}$)			LOQ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)		
	95,0%	99,0%	99,9%	95,0%	99,0%	99,9%
C^4D	18,33	24,68	36,09	27,95	31,49	65,73

Tabela 4.4 - Valores de LOD e LOQ estimados para 95,0, 99,0 e 99,9 % de confiança (**Continua**)

	LOD ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)			LOQ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		
	95,0%	99,0%	99,9%	95,0%	99,0%	99,9%
C^4D^{alt}	14,05	18,96	27,41	21,46	24,04	41,94
HCD	16,02	21,60	30,79	24,02	26,97	49,98

Em HCD, as capacitâncias referentes aos sistemas $e_{\text{exc}}/\text{solução}$ (C_{exc}) e $e_r/\text{SiO}_2/\text{solução}$ (C_r) são dadas pelas equações:¹²⁵

$$C_{\text{exc}} = \epsilon_o A_e / d \quad (\text{Equação 4.1})$$

e

$$C_r = \kappa_{\text{SiO}_2} \epsilon_o A_e / d \quad (\text{Equação 4.2})$$

sendo κ_{SiO_2} igual a 4,2 considerando-se o processo de deposição do dielétrico utilizado.¹³⁹

Em relação aos demais parâmetros, C_{exc} e C_r diferem entre si apenas em termos de d ; enquanto que para o sistema $e_r/\text{SiO}_2/\text{solução}$ esse valor equivale a 50 nm, para o conjunto $e_{\text{exc}}/\text{solução}$ d tende a zero. Como consequência, temos que C_{exc} é infinitamente superior a C_r . Por outro lado, considerando-se o modelo elétrico que descreve o sistema de transdução (ver **Figura 1.8**), as capacitâncias associadas aos eletrodos se combinam em série. Por conseguinte, a capacitância equivalente (C_{eq}) é dada pela equação:¹²⁵

$$C_{\text{eq}} = C_{\text{exc}} \cdot C_r / (C_{\text{exc}} + C_r) \quad (\text{Equação 4.3})$$

Em sendo C_{exc} infinitamente superior a C_r , obtém-se:

$$C_{\text{eq}} \approx C_r \quad (\text{Equação 4.4})$$

de modo que em HCD a capacitância equivalente relacionada aos sistemas eletrodo/solução é uma função somente de C_r , variável intrínseca à região: $e_r/\text{SiO}_2/\text{solução}$. Fato semelhante é observado em celas eletroquímicas contendo microeletrodos polarizados ideais imersos em eletrólito suporte. Nesses casos, em consequência da maior área do eletrodo de referência, a capacitância intrínseca a esse eletrodo é infinitamente superior àquela inerente ao eletrodo de trabalho.¹²³ Por fim, a Equação 4.4, aliada ao fato de que as celas de detecção seletivas à C^4D e HCD não diferiram entre si em termos dos parâmetros intervenientes em C_r , justificam os resultados ocorrentes, ilustrados na **Tabela 4.4**.

4.4. Conclusões

O protocolo de microfabricação mostrou-se efetivo, sem ocorrência de vazamento de fluidos ou obstrução dos canais. O uso de filme de SiO_2 como dielétrico em C^4D redundou em níveis de detectabilidade apreciavelmente menores com relação aos valores obtidos empregando-se membrana de PDMS, sendo pois utilizado nos experimentos subsequentes. Em relação às alterações na configuração e geometria da cela de detecção, essas não resultaram em aumento significativo da sensibilidade a níveis de significância de 95,0, 99,0 e 99,9%. Neste contexto, para os estudos de interações biomoleculares, foram utilizados *microchips* contendo C^4D convencional, haja vista que esse transdutor apresenta maior facilidade de selagem com relação à C^4D^{alt} e prescinde a etapa de limpeza dos eletrodos, ao contrário do que ocorre em HCD.

CAPÍTULO 5



Estudo das Condições de Silanização

As condições reacionais adotadas para modificação química (silanização) com o intermediário de imobilização foram investigadas mediante um processo de caracterização de superfícies, no qual empregamos as técnicas: microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS).

5.1. Preâmbulo

As condições de silanização investigadas são compiladas na **Tabela 5.1**.

Tabela 5.1 - Condições reacionais para silanização de SiO₂ estudadas

Condição	Silano	Concentração	Fase Solvente	Tempo de Reação (min)
SAM A.1	ButCN	1 mmol.L ⁻¹	Acetonitrila	15
SAM A.2	ButCN	1 mmol.L ⁻¹	Acetonitrila	30
SAM A.3	ButCN	1 mmol.L ⁻¹	Acetonitrila	60
SAM A.4	ButCN	1 mmol.L ⁻¹	Acetonitrila	150
SAM A.5	ButCN	1 mmol.L ⁻¹	Acetonitrila	300
SAM B.1	APTS	1 mmol.L ⁻¹	Acetona	60
SAM B.2	APTS	1 mmol.L ⁻¹	Acetona	120
SAM B.3	APTS	1 mmol.L ⁻¹	Acetona	180
SAM C.1	APTS	3% (v/v)	Etanol	180
SAM C.2	APTS	3% (v/v)	Etanol	300

As reações de superfície foram conduzidas empregando-se os reagentes 4-(trietoxisilil)butironitrila (ButCN) (Sigma-Aldrich Chemical Co) e APTS, solventes anidros e tempos que variaram entre 15 e 300 min. Os organossilanos ButCN e APTS tendem a formar SAMs sobre a superfície de SiO₂, de maneira que concentrações e tempos reacionais excessivos contribuem para a ocorrência de dois fenômenos: (i) hidrólises seguidas de

condensações homogêneas de grupos silanóis, que levam à formação de oligômeros e/ou polímeros e sua posterior adsorção sobre a superfície do substrato, e (ii) polimerizações heterogêneas, verticais ou horizontais, que decorrem de condensações entre grupos silanóis do próprio reagente conforme ilustra a **Figura 5.1**. Ambos os fenômenos geram superfícies mais porosas, com camadas de silano altamente desordenadas (aglomerados), inibindo a formação de SAMs. Concentrações e tempos de reação muito baixos, por outro lado, acarretam em redução da área de recobrimento efetivo do substrato pelo organossilano. Em adição, uma vez que a água presente nos solventes pode atuar como nucleófilo na etapa de hidrólise, essas substâncias também interferem no grau de adsorção dos reagentes.⁷³

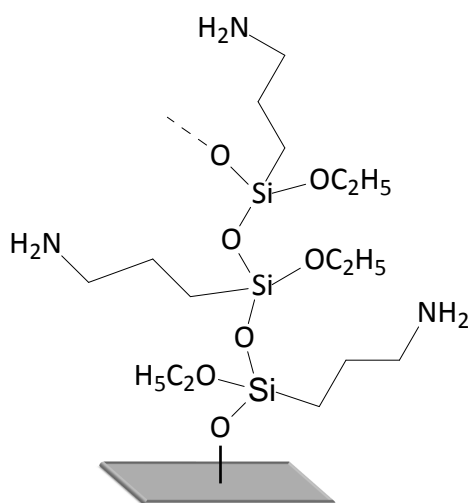


Figura 5.1. Produto de polimerizações verticais envolvendo moléculas de APTS.

Os compostos ButCN e APTS diferem entre si apenas em termos dos seus respectivos grupos organofuncionais, nitrila ($-\text{CN}$) e $-\text{NH}_2$, respectivamente. Desse modo, ligações ButCN/FA somente são conseguidas após conversão do grupo $-\text{CN}$ do organossilano em $-\text{NH}_2$. A escolha do ButCN como possível matriz para modificação com FA está relacionada à menor reatividade da espécie $-\text{CN}$ frente ao grupo amino, o que vem a representar, teoricamente, uma menor possibilidade de alterações químicas não específicas do sítio ativo do intermediário de imobilização.

5.2. Experimental

Como substratos para as subseqüentes reações de silanização, filmes de SiO₂ foram depositados por PECVD sobre placas de Si(100) de 1 cm² empregando-se o mesmo equipamento e as mesmas condições adotadas para o isolamento elétrico dos eletrodos. Os procedimentos de limpeza e modificação de superfície foram realizados conforme descritos no item 2.4. Na **Figura 5.2** são mostrados o reator de teflon, utilizado para as silanizações (6,5 cm de diâmetro interno e 4,2 cm de profundidade), e uma placa de Si(100) contendo SiO₂ imersa em solução de APTS.



Figura 5.2. Reator utilizado para modificações químicas e substrato imerso em solução de silano.

As análises de MEV foram realizadas em um equipamento da Zeiss, mod. LEO 440, disponível na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (CAQI/IQSC/USP). Esse instrumento opera com filamento termiônico de tungstênio, câmara da amostra em alto vácuo com pressão de 10⁻⁵ Bar e detector de elétrons secundários como modo analítico. Para promover aumento no contraste das micrografias, as amostras foram inicialmente metalizadas com Au em um *sputter* da Bal-Tec, mod. MCS 010. As medidas de XPS, por sua vez, foram feitas no Centro

de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais, instalado no Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (CCDM/DEM/UFSCar), para as quais empregamos um espectromicroscópio de superfícies da Kratos, mod. XSAM HS. Os experimentos foram conduzidos em ambiente de ultra-alto vácuo (pressão em torno de 7,5 nTorr) e utilizando-se radiação não-monocromática $K\alpha$ do Mg como fonte excitadora, com energia de 1.253,6 eV e potência de 50 W. Para subtração do sinal de fundo, utilizou-se o método de Shirley.

5.3. MEV: Resultados e Discussão

As micrografias eletrônicas de varredura tiveram por finalidade registrar a possível formação de aglomerados, como mostra a **Figura 5.3**. Nessa figura são ilustradas micrografias de uma superfície de SiO_2 modificada com o reagente 3-imidazolilundeciltrimetoxissilano.¹⁴¹ Tais imagens demonstram a formação de filmes porosos, contendo poros com tamanho médio de 5 a 10 μm e dispersos por toda a superfície, os quais, possivelmente, são conseqüências de condensações homogêneas ou polimerizações heterogêneas, conforme discutido anteriormente.

Micrografias com aumentos de 2.000, 10.000 e 30.000 vezes foram obtidas em quatro pontos distintos e aleatórios para cada amostra. A níveis de resolução de 3 μm , 1 μm e 200 nm, as imagens indicaram não haver formação de aglomerados sob todas as condições de reação investigadas. Nas **Figuras 5.4, 5.5 e 5.6**, são apresentadas micrografias referentes às silanizações com SAM **A.3, B.2 e C.2**, respectivamente.

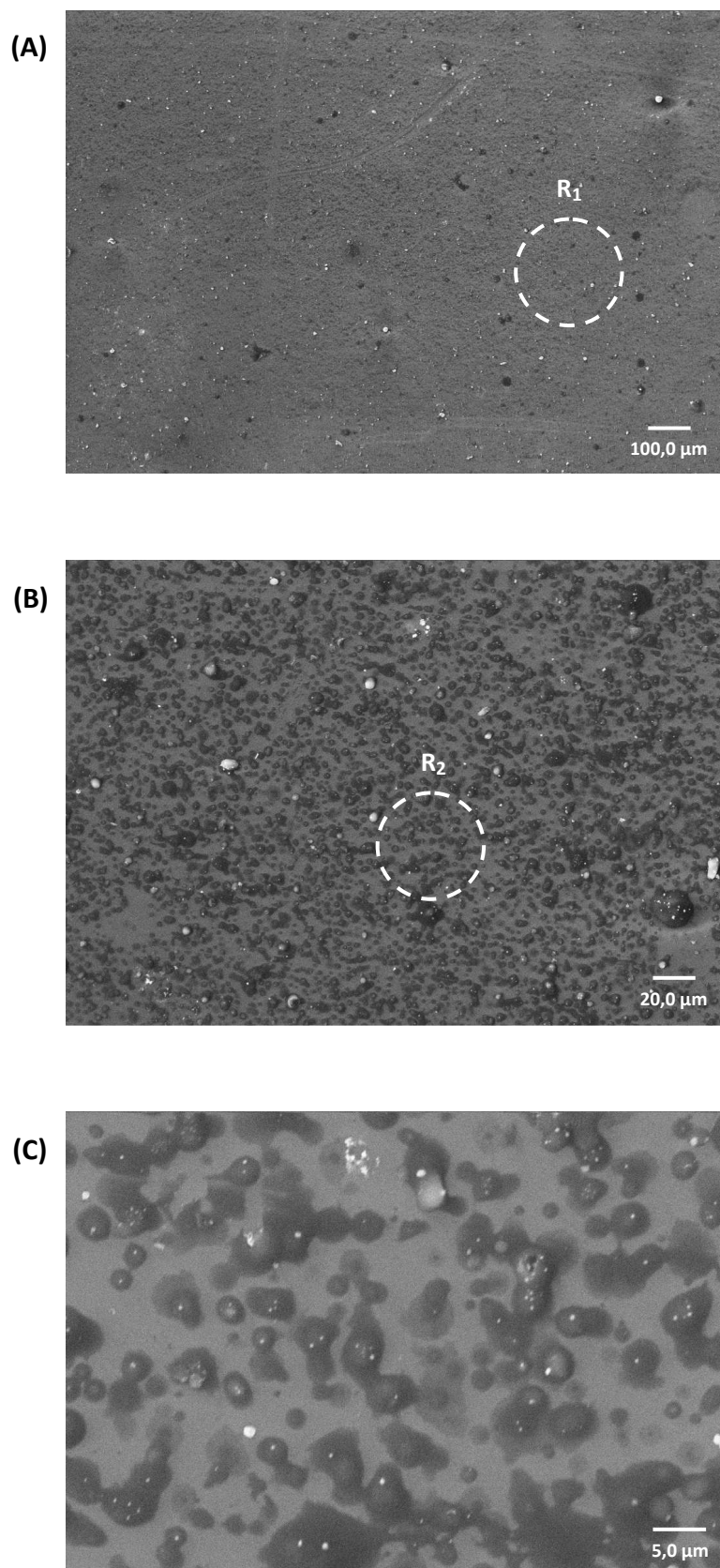


Figura 5.3. Micrografias do 3-imidazolilundeciltrimetoxissilano formado a partir de soluções de tolueno sobre SiO_2 por 150 min com 200 (A), 1.000 (B) (registrada para região R_1) e 5.000 (C) (registrada para região R_2) vezes de aumento. Imagens reproduzidas da referência 141.

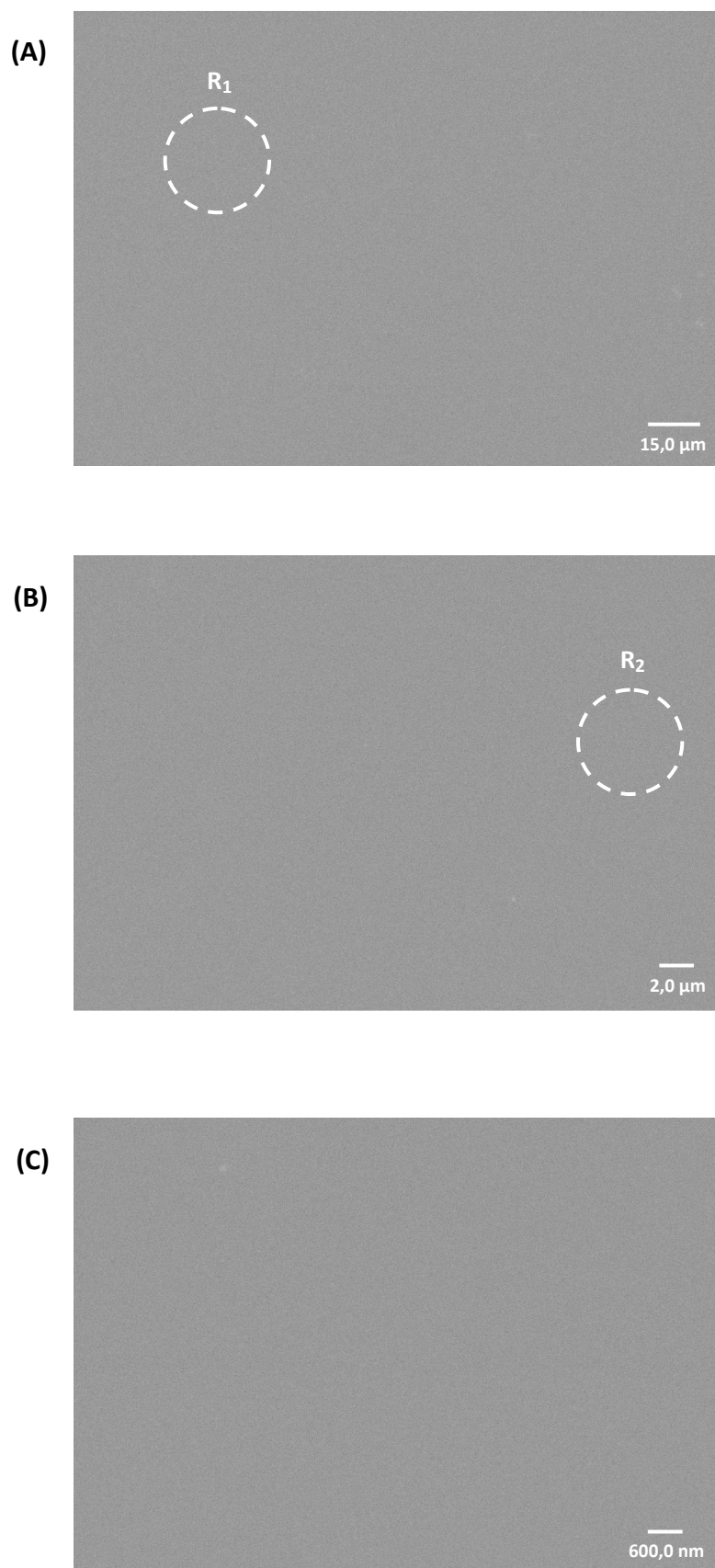


Figura 5.4. Micrografias obtidas para SAM **A.3** com 2.000 **(A)**, 10.000 **(B)** (registrada para região R_1) e 30.000 **(C)** (registrada para região R_2) vezes de aumento.

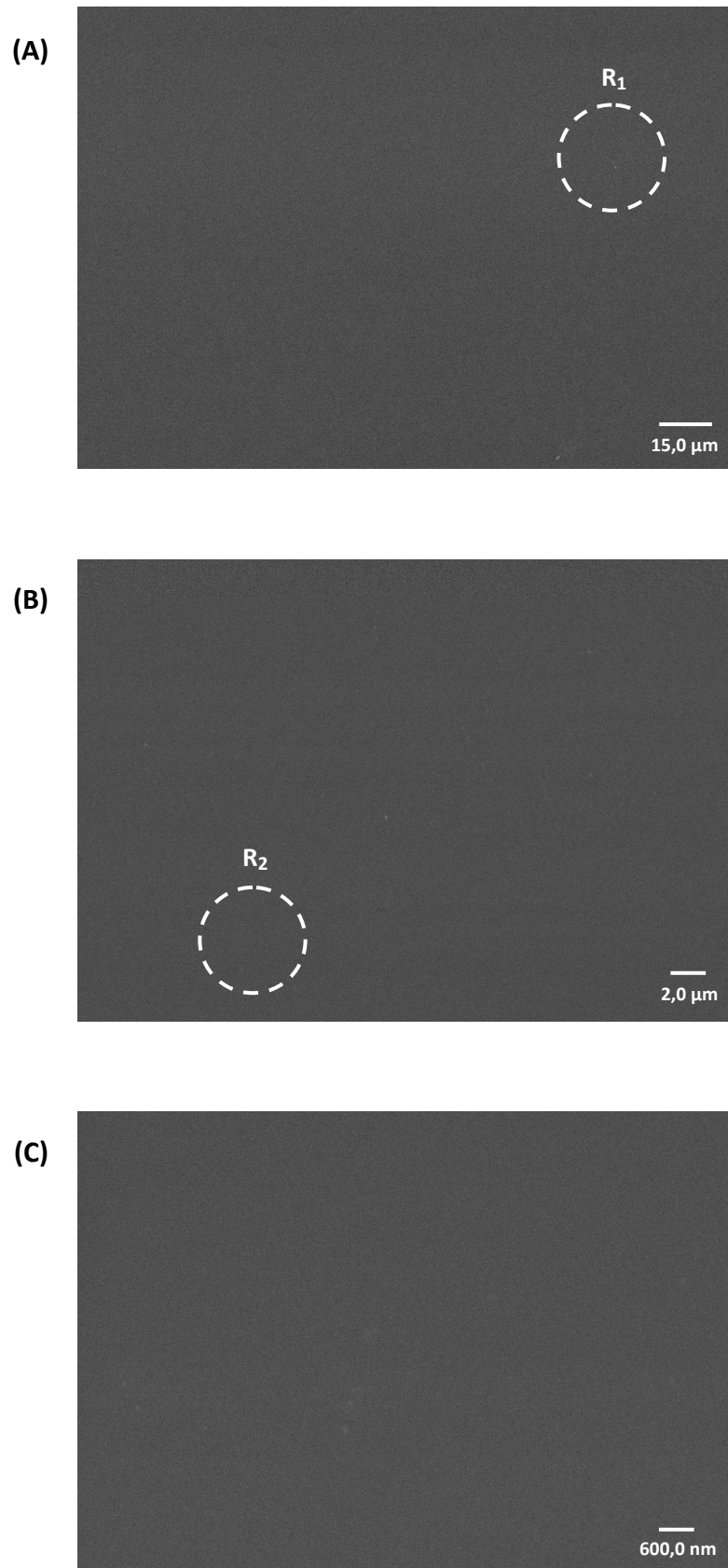


Figura 5.5. Micrografias obtidas para SAM **B.2** com 2.000 **(A)**, 10.000 **(B)** (registrada para região R_1) e 30.000 **(C)** (registrada para região R_2) vezes de aumento.

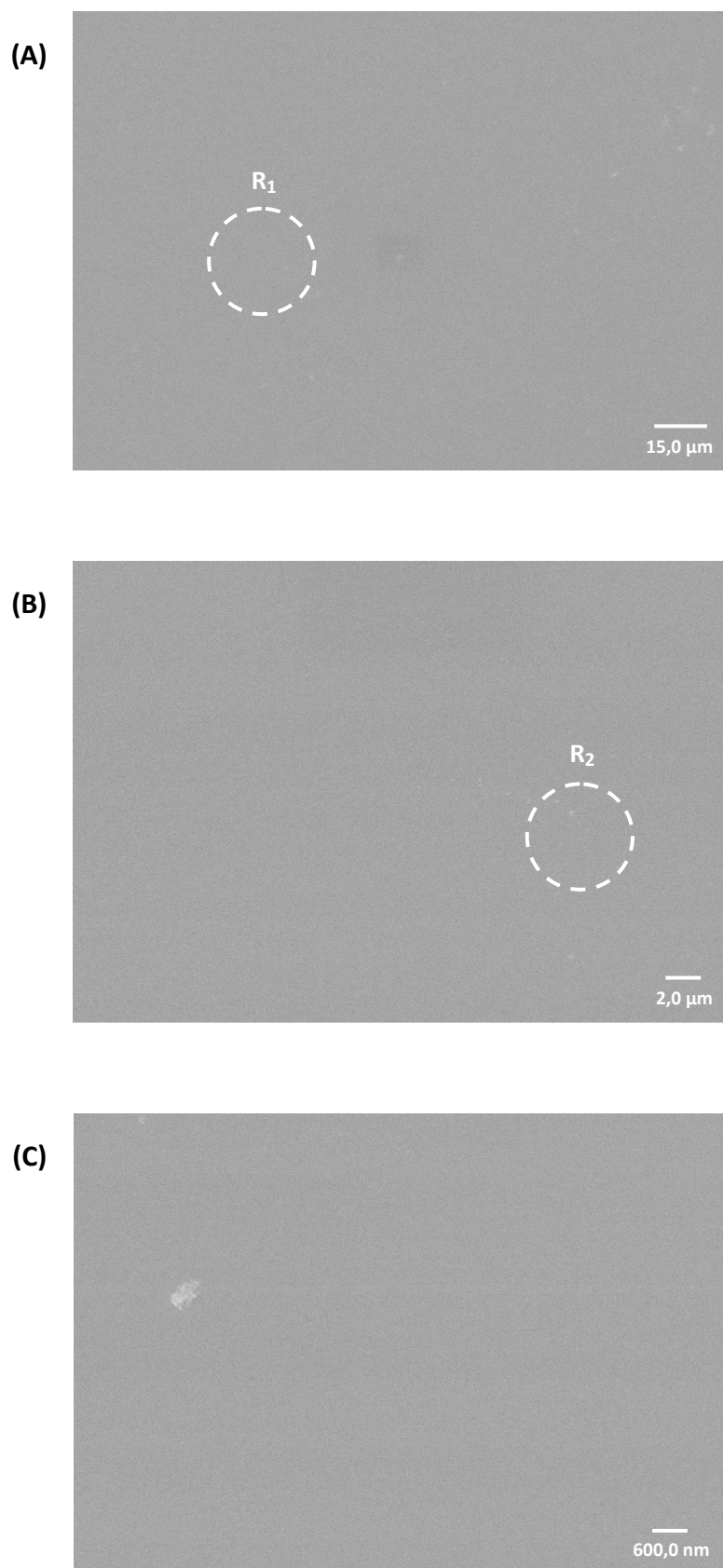


Figura 5.6. Micrografias obtidas para SAM C.2 com 2.000 (A), 10.000 (B) (registrada para região R₁) e 30.000 (C) (registrada para região R₂) vezes de aumento.

5.4. XPS: Resultados e Discussão

A técnica de XPS foi utilizada para determinações qualitativas e quantitativas sobre as composições químicas das superfícies modificadas com organossilano, como o grau de contaminação dos substratos obtidos por PECVD e a taxa de adsorção dos reagentes.

Em substratos não condutores como SiO_2 pode ocorrer carregamento da amostra devido ao efeito fotoelétrico, fenômeno no qual se baseia a técnica de XPS. Nesses casos, são formadas lacunas as quais geram um potencial eletrostático maior sobre os fotoelétrons vizinhos, resultando em deslocamentos homogêneos das linhas espectrais em até 3 eV para maiores valores de energia de ligação (E_L). Paralelamente, o efeito de carregamento pode conduzir a um alargamento dos picos e ligeira assimetria na região de menor E_L , o que vêm a afetar adversamente a resolução das medidas.¹⁴²

Para correção de E_L em decorrência do carregamento das amostras, utilizou-se a linha Si 2p de SiO_2 (E_L teórica igual a 103,3 eV) como referência uma vez que sofre pouca influência em relação ao ambiente químico do óxido.¹⁴³ Para todas as condições reacionais investigadas, não foram observados deslocamentos sendo a energia de ligação obtida para a linha supracitada concordante com o valor teórico. Presumivelmente, quatro fatores principais contribuíram para esse fenômeno, a saber: (i) *flood-gun* (acessório neutralizador de cargas do equipamento); (ii) radiação fonte não-monocromática; (iii) constituição apresentada pelas amostras (filme de silano sobre SiO_2) e (iv) posicionamento das placas de Si/ SiO_2 em relação ao feixe incidente de raios-X. O *flood-gun* consiste de um dispositivo de injeção de elétrons e íons Ag^+ sobre a superfície da amostra; visa-se, assim, a neutralização das lacunas e do excesso de carga negativa decorrente dos elétrons injetados pelo acessório, respectivamente.¹⁴³ O emprego de radiações não-monocromáticas contribui para a neutralização da amostra em função do fluxo de elétrons de baixa energia que emana da

fonte de raios-X e é consequente da ionização causada pela linha $k\beta$ do feixe. A constituição apresentada pelas amostras também acarreta em neutralização parcial das lacunas presentes no substrato. Nesse caso, o processo se dá a partir de elétrons secundários oriundos do dielétrico SiO_2 . Por fim, as placas de $\text{Si}(100)/\text{SiO}_2$ foram posicionadas a um ângulo de 90° em relação ao feixe incidente de radiação com vista a reduzir os níveis de polarização.¹⁴⁴

Embora não houve deslocamentos espectrais, fez-se necessária a realização de ajustes das curvas devido à baixa resolução experimental dos espectros ($1,2 \text{ eV} \pm 0,1 \text{ eV}$). Tais ajustes, que tiveram por finalidade auxiliar na interpretação e caracterização dos picos espectrais, foram feitos com o *software* Winspec, cedido gentilmente pelo *Laboratoire Interdisciplinaire de Spectroscopie Électronique*, instalado na *Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix* (LISE/FUNDP). As concentrações atômicas percentuais obtidas para as linhas N 1s, Si 2p, O 1s e C 1s são expostas na **Tabela 5.2**. As análises semi-quantitativas exibiram precisão igual a $\pm 15\%$. Nas **Figuras 5.7 a 5.16**, são discriminados os espectros exploratórios e linhas de fotoemissão específicas (N 1s, Si 2p, O 1s e C 1s) registrados para os reagentes ButCN e APTS. Visando correlacionar os picos ajustados aos átomos constituintes das amostras, foram utilizados valores de E_L referenciais descritos na literatura.^{135,145-148}

Tabela 5.2 - Concentrações atômicas percentuais

Condição	N 1s	Si 2p	O 1s	C 1s
SAM A.1	0,0	8,4	17,1	74,5
SAM A.2	1,6	26,7	55,7	16,1
SAM A3	1,4	27,7	59,1	11,8
SAM A.4	1,3	29,1	60,4	9,1
SAM A.5	1,5	27,7	58,9	11,9

Tabela 5.2 - Concentrações atômicas percentuais (Continua)

Condição	N 1s	Si 2p	O 1s	C 1s
SAM B.1	1,6	27,1	53,0	18,4
SAM B.2	1,6	28,1	53,4	17,0
SAM B3	1,7	28,4	56,3	13,6
SAM C.1	2,0	21,3	49,4	27,3
SAM C.2	2,2	21,6	48,3	27,9

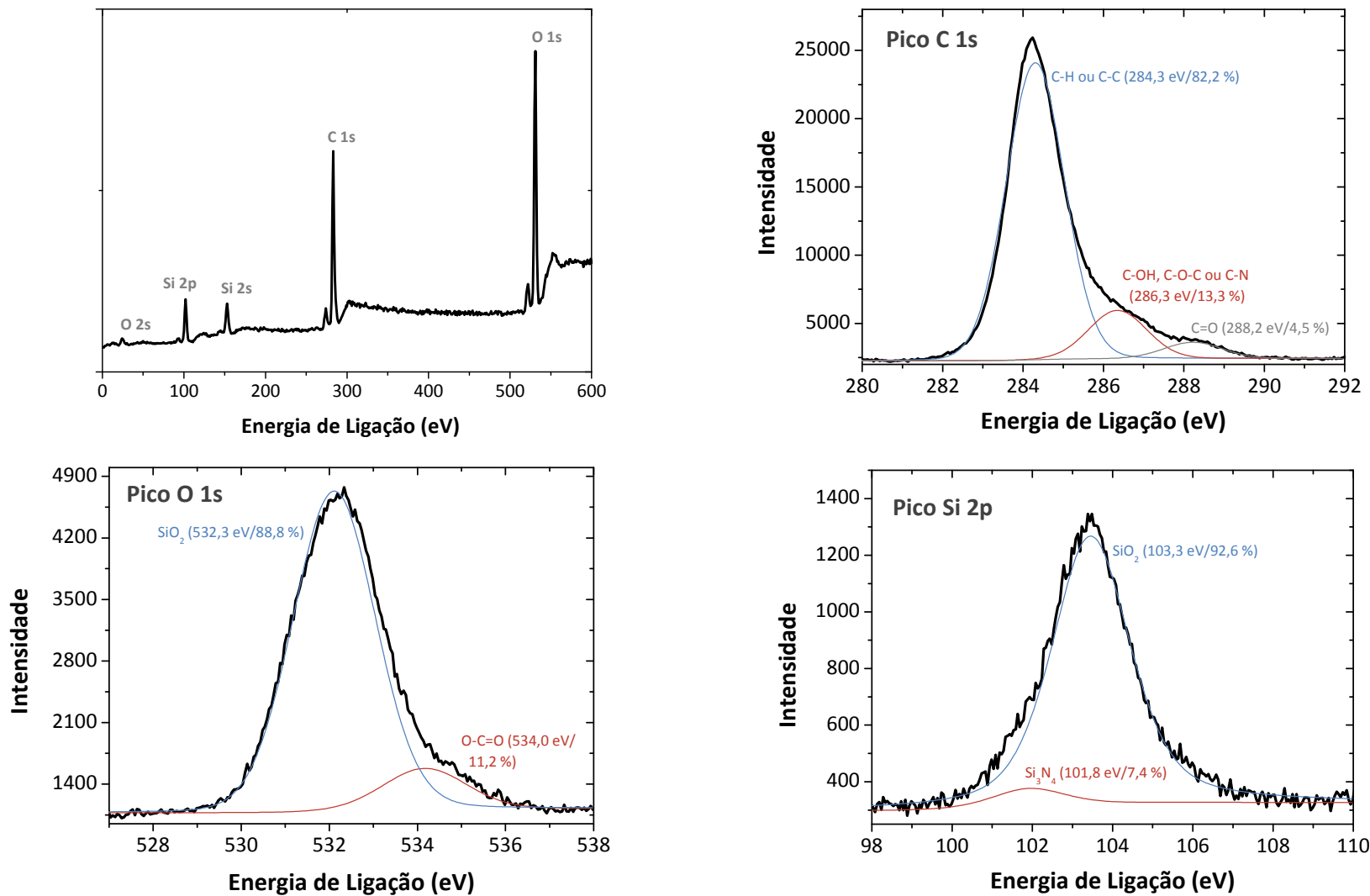


Figura 5.7. Espectros obtidos para SiO₂ modificada com SAM A.1. Para cada componente, são informados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.

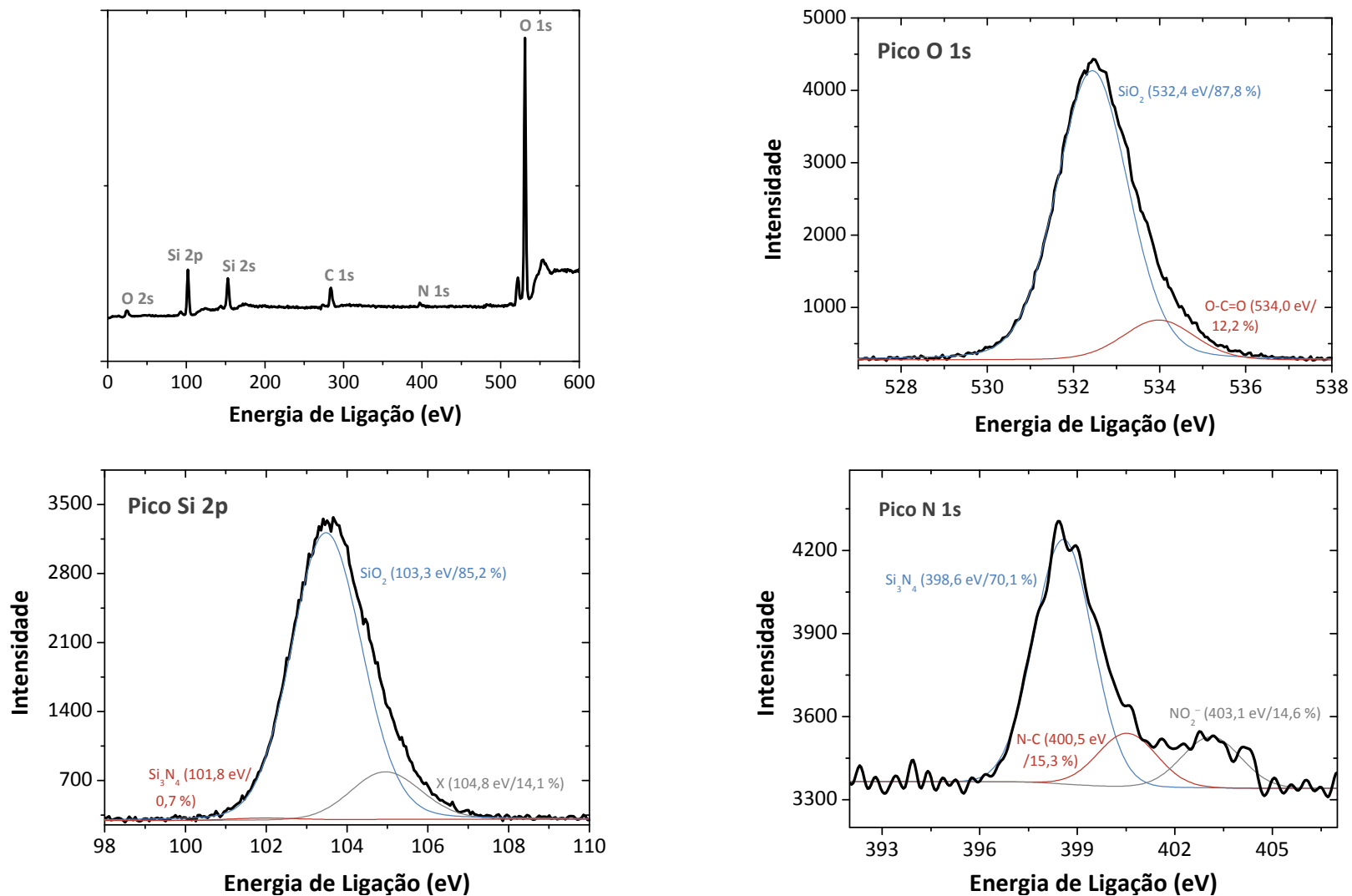


Figura 5.8. Espectros obtidos para SiO₂ modificada com SAM A.2. Para cada componente, são informados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.

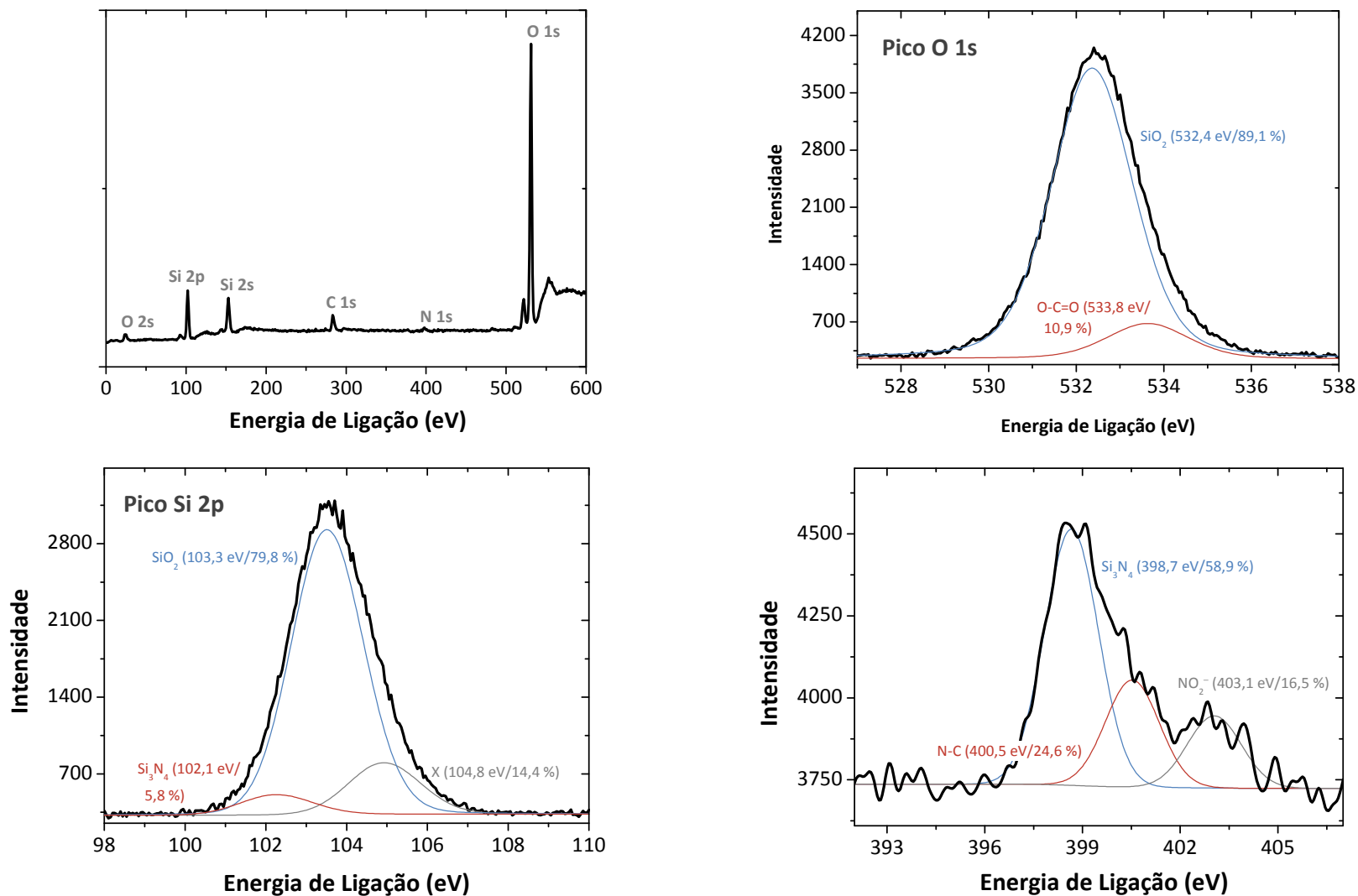


Figura 5.9. Espectros obtidos para SiO₂ modificada com SAM A.3. Para cada componente, são informados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.

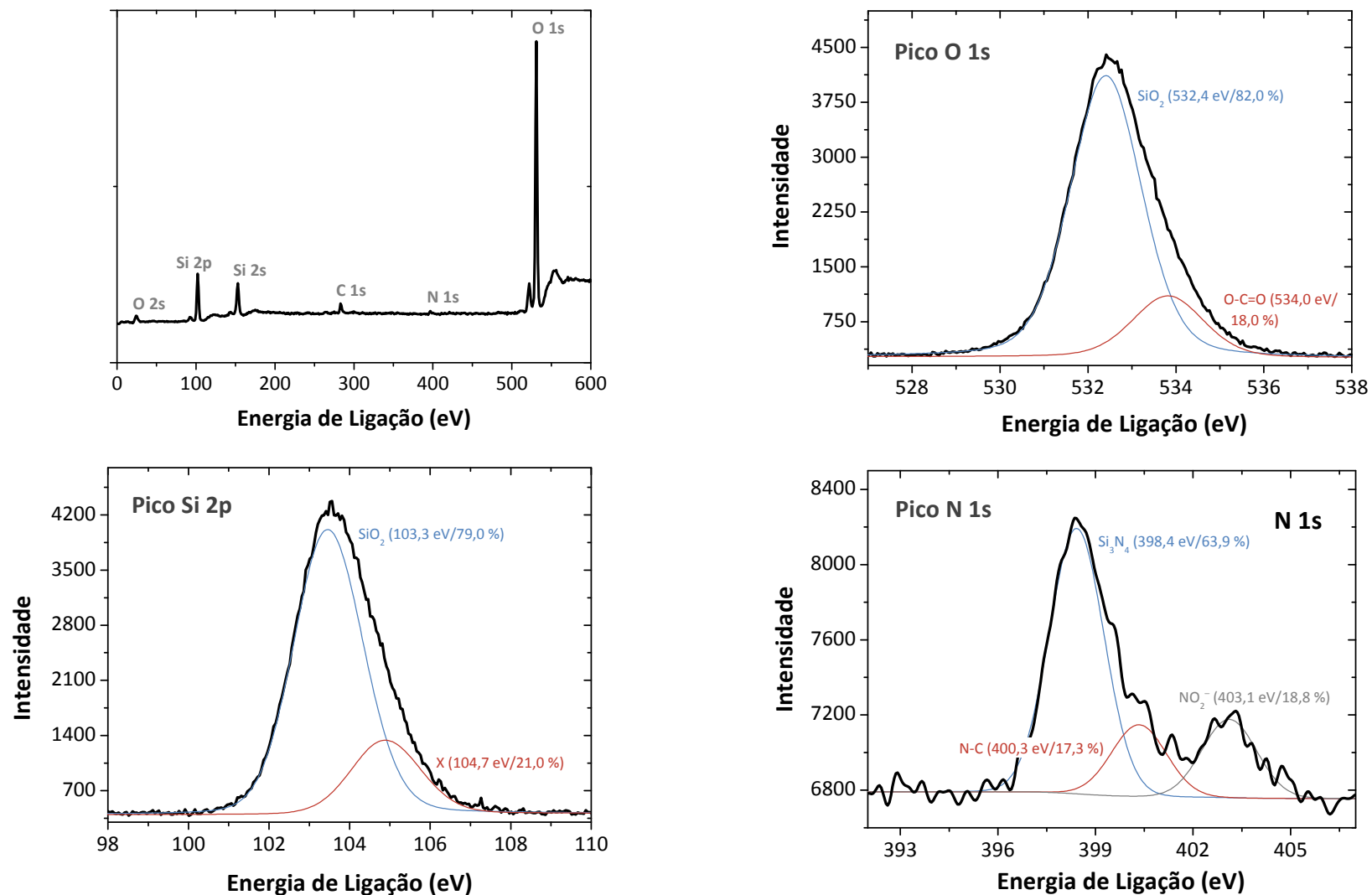


Figura 5.10. Espectros obtidos para SiO₂ modificada com SAM A.4. Para cada componente, são mostrados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.

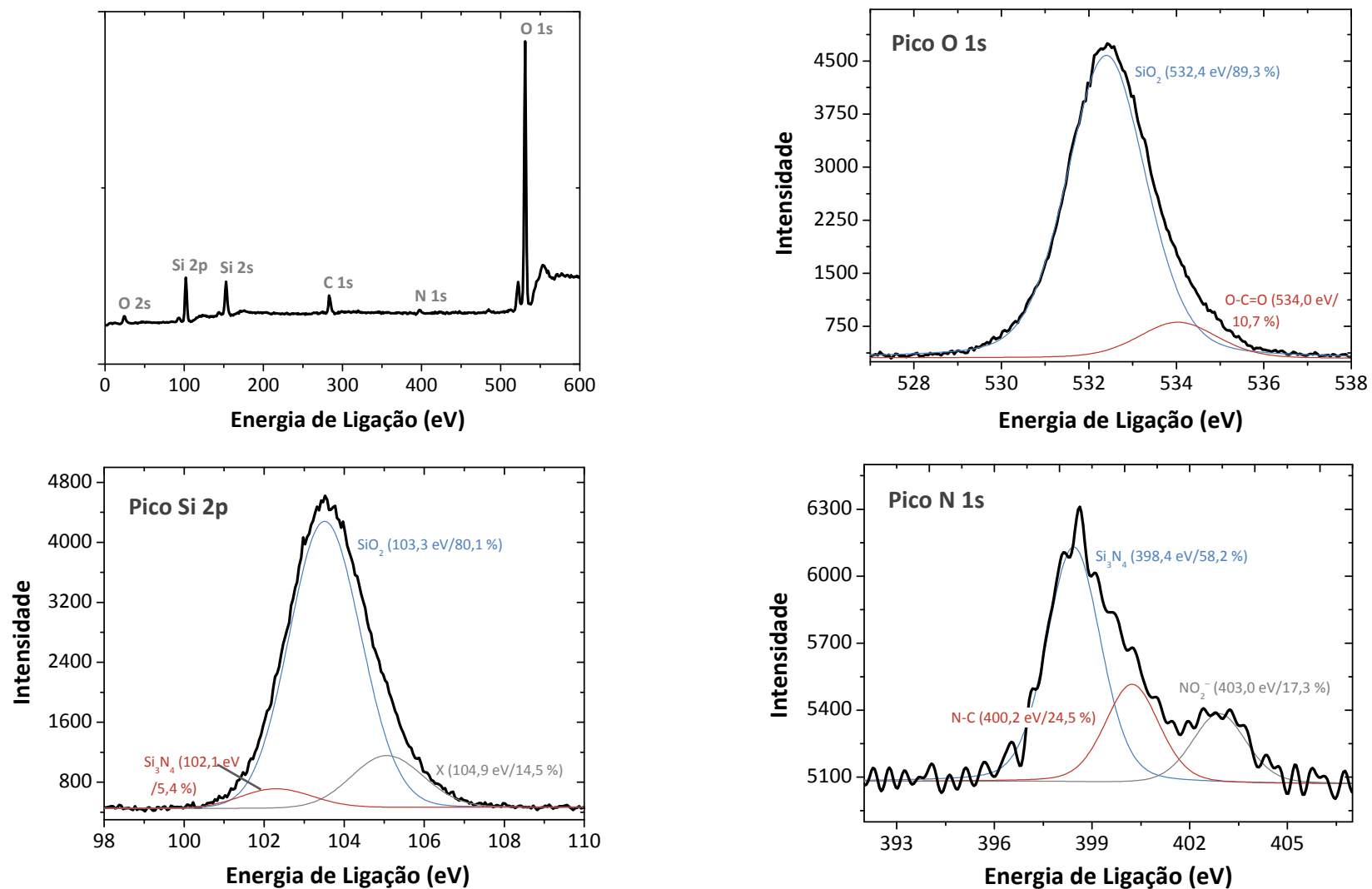


Figura 5.11. Espectros obtidos para SiO₂ modificada com SAM A.5. Para cada componente, são mostrados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.

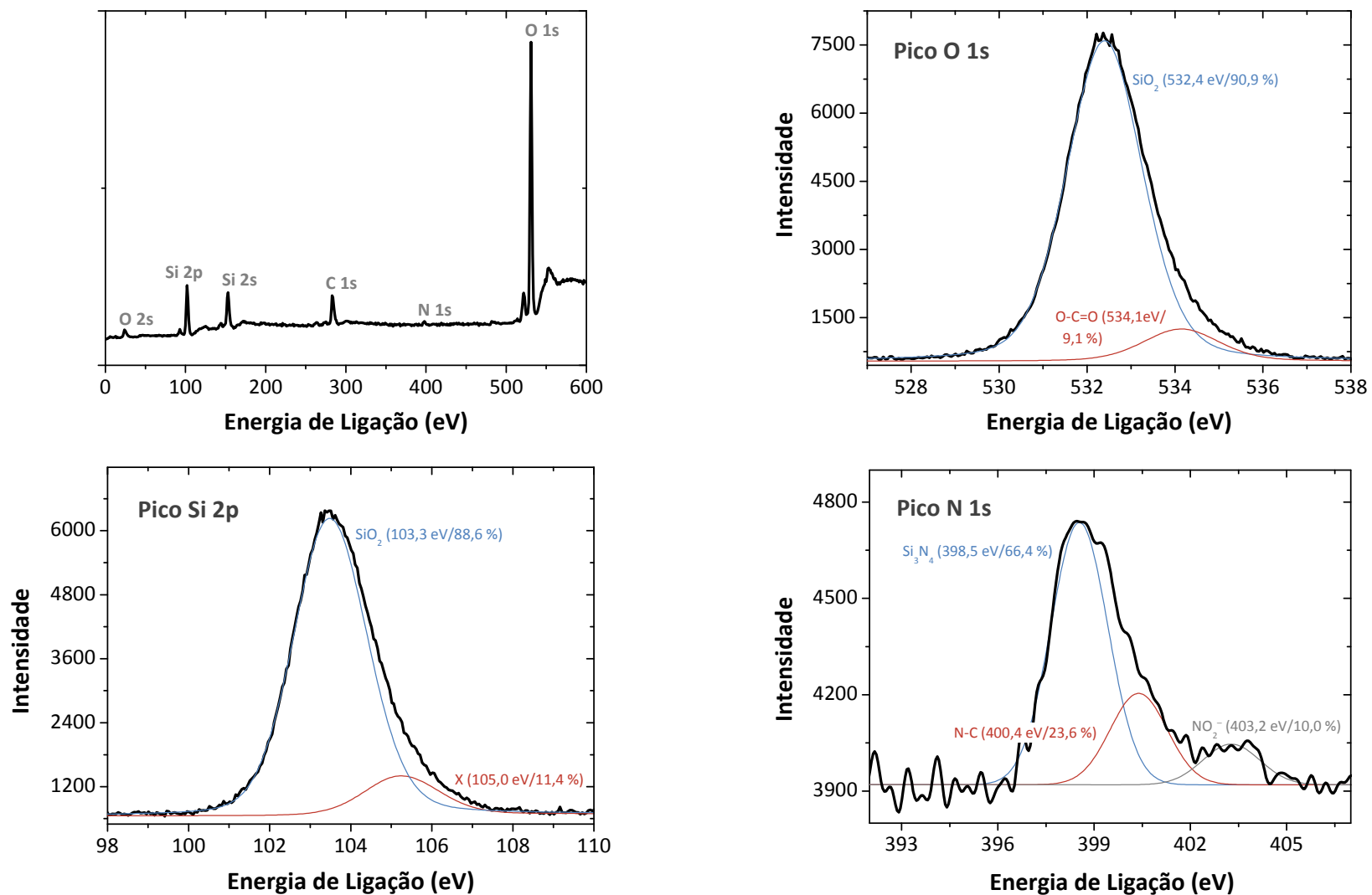


Figura 5.12. Espectros obtidos para SiO₂ modificada com SAM B.1. Para cada componente, são mostrados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.

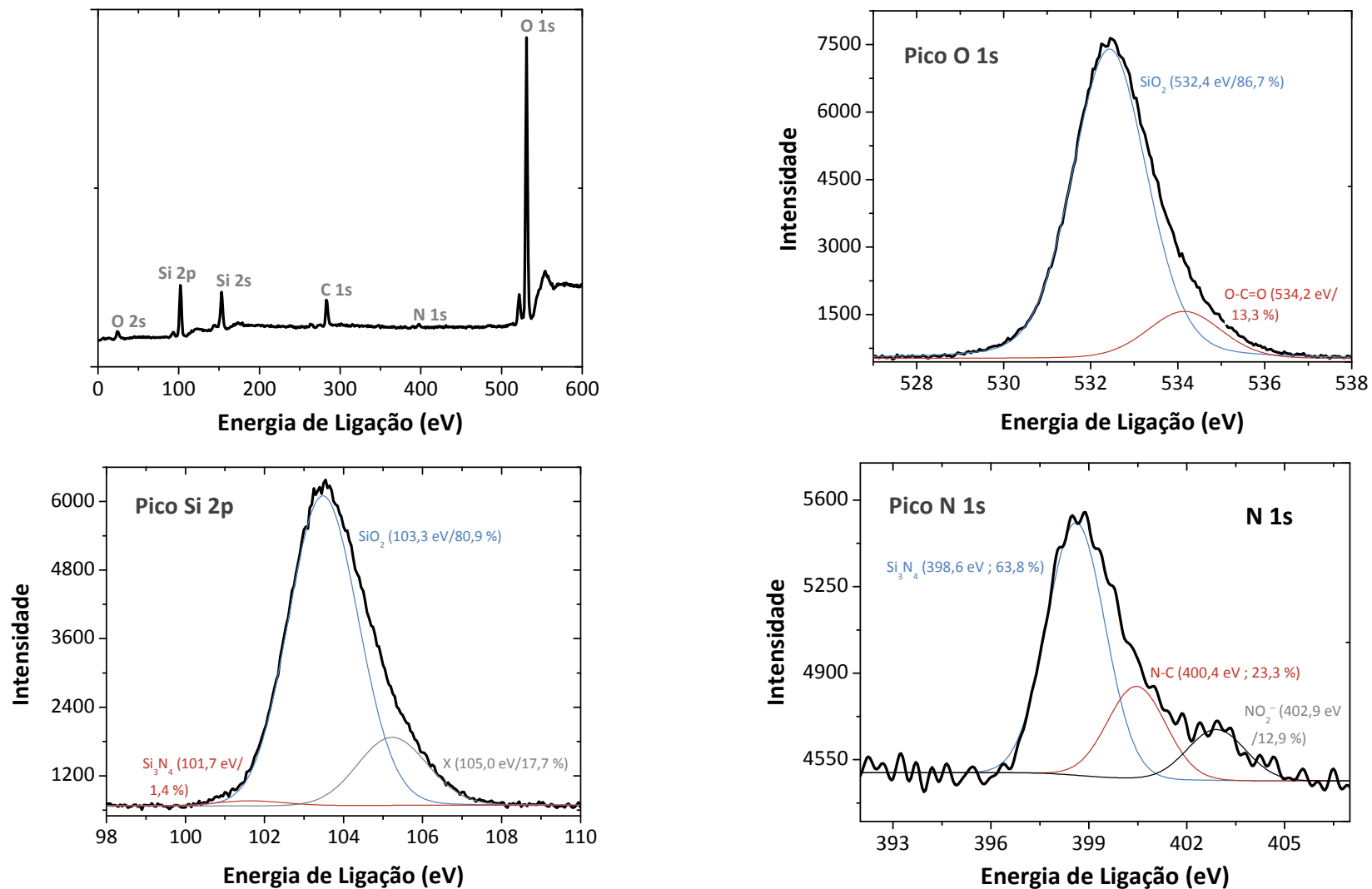


Figura 5.13. Espectros obtidos para SiO₂ modificada com SAM B.2. Para cada componente, são mostrados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.

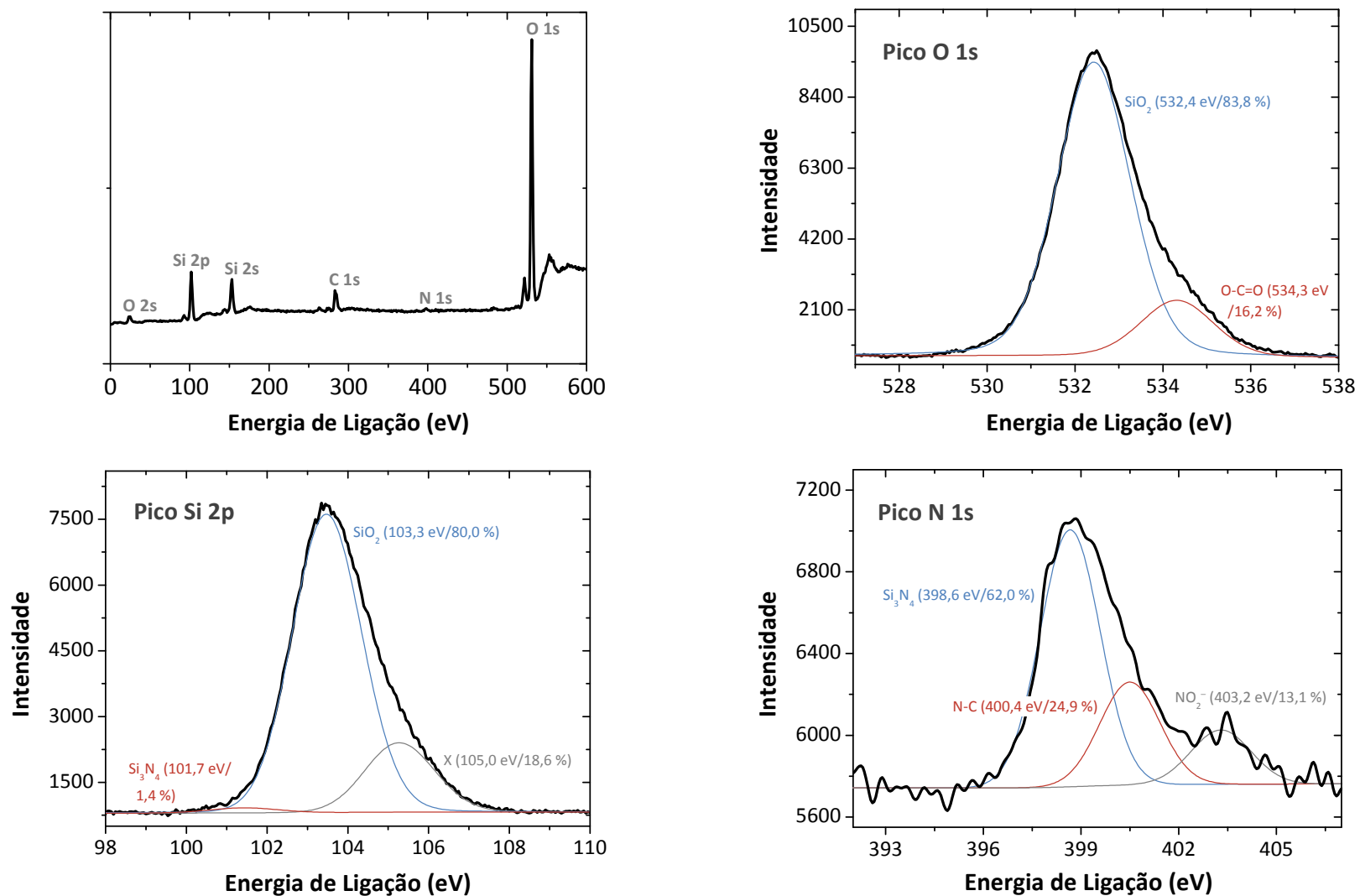


Figura 5.14. Espectros obtidos para SiO₂ modificada com SAM B.3. Para cada componente, são mostrados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.

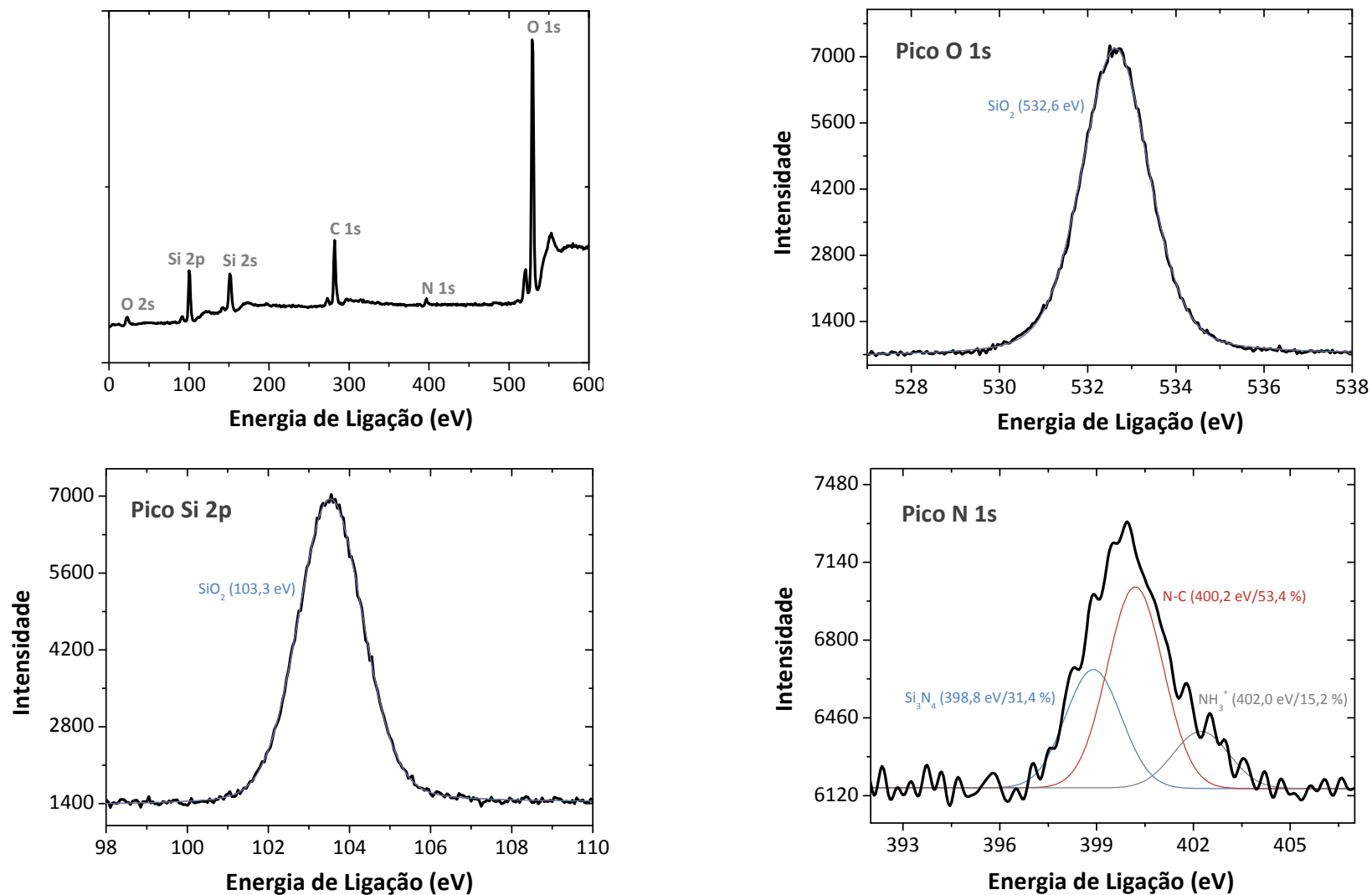


Figura 5.15. Espectros obtidos para SiO₂ modificada com SAM C.1. Para cada componente, são mostrados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.

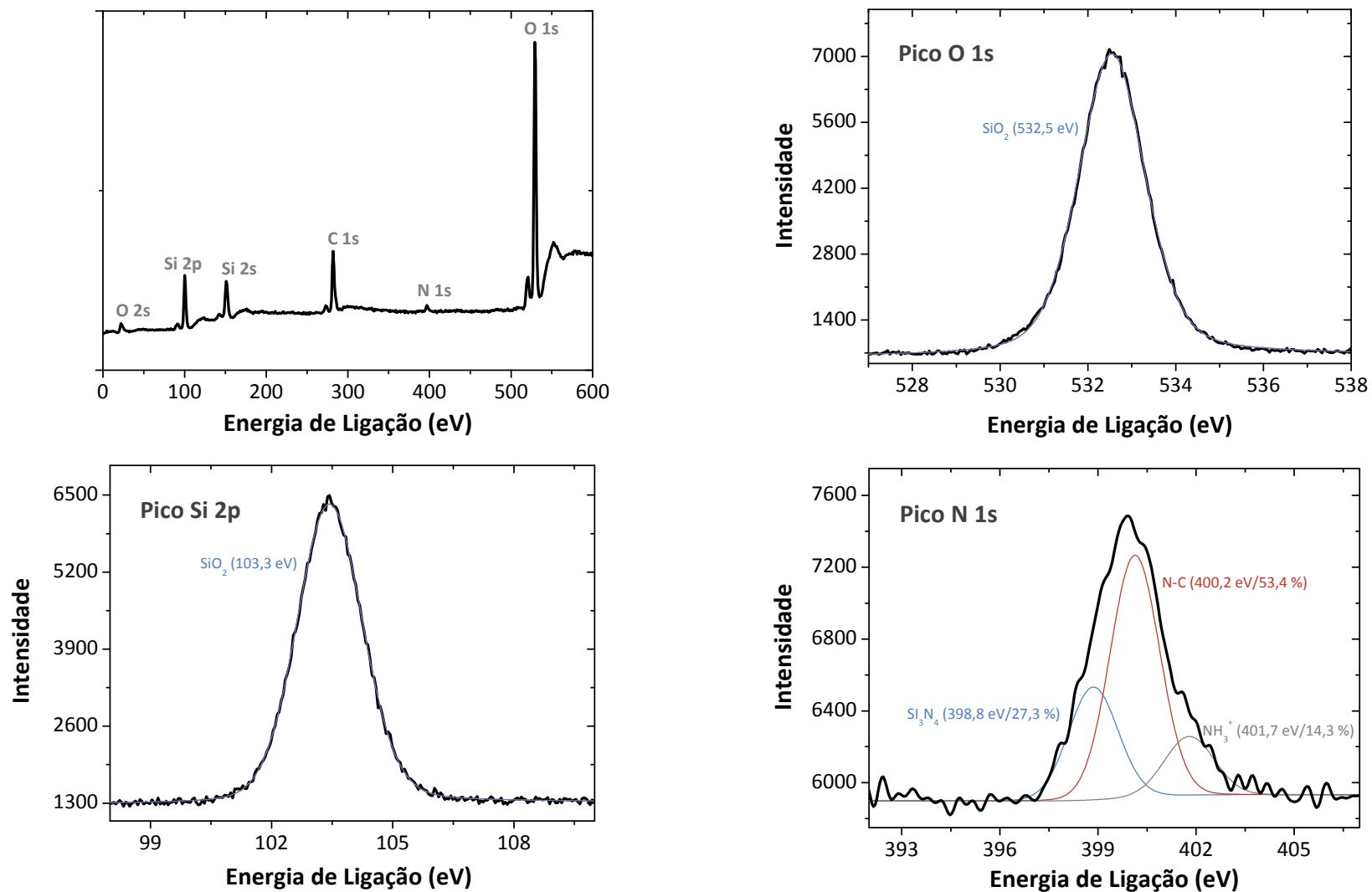


Figura 5.16. Espectros obtidos para SiO₂ modificada com SAM C.2. Para cada componente, são mostrados o valor de E_L e a quantidade relativa percentual entre parênteses.

Com base nos dados de concentração atômica e espectros de XPS, nota-se que a amostra modificada com SAM **A.1** apresentou uma quantidade excessiva de carbono. Uma explicação para o fato ocorrido está relacionada à manutenção da amostra durante 18 dias na câmara de inserção (pré-câmara) do espectromicroscópio, o que pode ter induzido à sua contaminação pelo vapor do óleo da bomba de difusão. Os picos N 1s apresentaram forma de linha assimétrica, sendo ajustados com três componentes dois dos quais representam as espécies: N-C (400,2 a 400,5 eV), que veio a confirmar a adsorção dos organossilanos pelo óxido SiO₂, e Si₃N₄ (398,4 a 398,8 eV). Para os substratos modificados com SAMs **A** e **B**, fez-se presente a espécie NO₂⁻ (402,9 a 403,2 eV), ao passo que as superfícies imersas em SAMs **C** exibiram um componente relacionado ao íon NH₃⁺ (401,7 a 402,0 eV), resultado de interações entre os grupos -SiOH e -NH₂ do organossilano.¹³⁵ A presença de Si₃N₄ e NO₂⁻ é atribuída ao processo de deposição do dielétrico por PECVD, que gera nitrogênio como produto das reações em plasma (ver Reação 2.1). Adicionalmente, algumas linhas Si 2p obtidas para SAMs **A** e **B** caracterizaram traços de nitreto metálico (Si₃N₄) em 101,7 a 102,1 eV. Nesses mesmos picos, por fim, fez-se presente uma espécie (X) em 104,7 a 105,0 eV, cuja identidade química ainda é desconhecida requerendo maiores estudos na literatura para sua elucidação.

A partir dos dados de ajuste dos espectros de XPS, foi possível calcular as razões atômicas N(1s)_{N-C}/Si(2p)_{SiO₂}, sendo considerados os componentes N-C (caracterizam as adsorções dos reagentes) e SiO₂ (inerente à natureza do substrato). Os valores dessas razões permitiram avaliar a eficiência das taxas de adsorção dos organossilanos, após cálculo utilizando-se a Equação 5.1.

$$N(1s)_{N-C}/Si(2p)_{SiO_2} = A_p [N(1s)_{N-C}]/A_p [Si(2p)_{SiO_2}] \cdot \sigma [Si(2p)_{SiO_2}]/\sigma [N(1s)_{N-C}] \cdot$$

$$\lambda [Si(2p)_{SiO_2}]/\lambda [N(1s)_{N-C}]$$

$$(Equação 5.1)$$

em que A_p representa a área integrada de pico (proporcional ao número de átomos no volume analisado), σ a seção de choque de fotoionização e λ o percurso livre médio para as linhas de fotoemissão citadas entre colchetes. Esse parâmetro foi determinado como se segue:

$$\lambda_i = [49/E_{Ci}^2 + 0,11(E_{Ci})^{1/2}]/\rho_{SiO_2} \quad (\text{Equação 5.2})$$

sendo E_{Ci} a energia cinética de pico e ρ_{SiO_2} a densidade do substrato SiO_2 .¹³⁵ Na **Figura 5.17** são mostradas as relações percentuais $N(1s)_{N-C}/Si(2p)_{SiO_2}$.

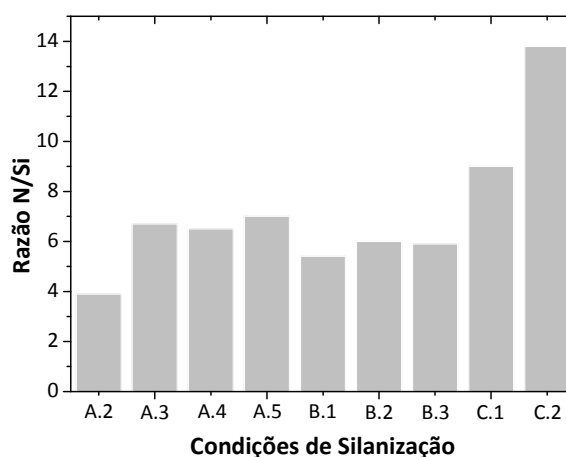


Figura 5.17. Relações N/Si para as condições de silanização investigadas.

A partir dos resultados expostos na **Figura 5.17**, verifica-se que a relação N/Si se manteve aproximadamente constante para as SAMs **A** e **B** após 1 (**A.3**) e 2 (**B.2**) h de reação, respectivamente. Esse fato pode ser atribuído à saturação dos grupos $-SiOH$ presentes na superfície de SiO_2 disponíveis para silanização. No que concerne às amostras modificadas com SAMs **C**, houve um aumento razoável na eficiência de silanização quando comparadas as condições **C.1** e **C.2**.

5.5. Conclusões

As técnicas de caracterização de superfície empregadas indicaram uma adsorção efetiva dos organossilanos pela superfície de SiO₂. Para todas as condições de modificação investigadas, não foram observados aglomerados coloidais a níveis de resolução espacial de 3 μm, 1 μm e 200 nm. Por outro lado, os substratos imersos em SAM **C.2** exibiram uma taxa de adsorção superior. Em adição, ao contrário do que ocorre com o APTS, para a ligação ButCN/FA se faz necessária uma conversão do grupo –CN do silano em –NH₂. Esse fato tende a reduzir ainda mais a densidade de sítios ativos da matriz para fixação das moléculas de FA à superfície do substrato. Logo, com base nos fatos apresentados, optou-se por utilizar APTS-SAM sob a condição **C.2** (etanol como fase solvente e 5 h de reação) para imobilização das moléculas de FA nos estudos de interações biomoleculares subsequentes.

CAPÍTULO 6



Estudo das Condições de Funcionalização e
Caracterização da Fase Biossensora

Concluído o estudo das condições de silanização, a etapa de funcionalização com FA foi investigada. Com base em protocolo experimental reportado na literatura (item 2.4),²⁰ *microchips* contendo eletrodos retangulares antiparalelos (CAPÍTULO 4) e o dielétrico SiO₂ com superfície silanizada segundo a condição SAM C.2 (CAPÍTULO 5), foram fabricados utilizando-se tempos de funcionalização distintos. Devido à ausência de padrões de FR- α para compra, os *microchips* foram aplicados a um padrão de anticorpo monoclonal específico ao biorreceptor FA (α -FA); as intensidades dos sinais analíticos em μ BIA-C⁴D foram consideradas como parâmetro de referência na escolha do tempo a ser adotado. Por fim, visando uma caracterização eletroquímica da fase biossensora, medidas de C⁴D foram conduzidas com os sistemas: e_r/SiO₂, e_r/SiO₂/APTS-SAM e e_r/SiO₂/APTS-SAM/FA. Ademais, as superfícies SiO₂, SiO₂/APTS-SAM e SiO₂/APTS-SAM/FA foram analisadas por AFM para caracterização morfológica dessas. Procedeu-se a silanização sob a condição SAM C.2 nos experimentos de caracterização supracitados.

6.1. Estudo das Condições de Funcionalização: Experimental, Resultados e Discussão

Anteriormente aos ensaios biomoleculares, valores absolutos do potencial de linha de base (V_B) foram obtidos preenchendo-se um microchip com MES 100 mmol.L⁻¹ pH 2,3 (tampão utilizado no monitoramento α -FA) tendo por finalidade a seleção dos parâmetros ótimos de transdução, quais sejam: frequência e potencial pico-a-pico. Na **Figura 6.1** são expressas as variações de V_B em função da frequência, entre 20 e 900 kHz, sob os potenciais de 2,5, 6,0 e 9,5 V_{p-p}, as quais se mostram similares àquelas obtidas com dispositivo convencional¹⁴⁹ e microchip PT contendo C⁴D.¹⁵⁰ Conforme pode ser observado na **Figura 6.1**, há um V_B máximo ($V_B^{\text{máx}}$) indicando o valor ótimo de frequência de trabalho. Esse ponto é deslocado para menores valores de frequências com o aumento do potencial pico-a-pico.

Ademais, para medidas que antecedem o $V_B^{\text{máx}}$, são observados dois aspectos em comum frente aos dados reportados na literatura à medida que eleva-se o potencial: (i) redução da faixa linear e (ii) aumento da sensibilidade de V_B (inclinação da reta) com relação às variações de frequência. Para 2,5, 6,0 e 9,5 V_{p-p} , os níveis de $V_B^{\text{máx}}$ foram registrados em 340 (7,7 V), 220-300 (8,3 V) e 180-260 kHz (8,5 V), respectivamente. Neste contexto, uma vez que o aumento de potencial de 6,0 para 9,5 V_{p-p} não acarretou em variações significativas de $V_B^{\text{máx}}$, os ensaios biomoleculares subsequentes foram realizados aplicando-se 300 kHz de frequência e potencial pico-a-pico igual a 6,0 V_{p-p} .

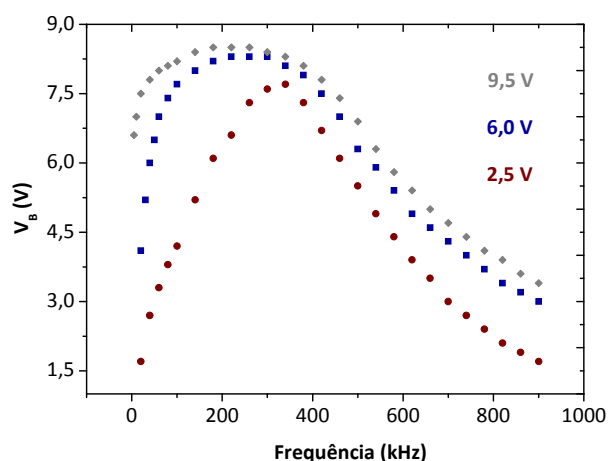


Figura 6.1. Otimização dos parâmetros da C^4D .

Posteriormente, dispositivos $\mu BIA-C^4D$ foram microfabricados imergindo as superfícies de SiO_2 silanizadas em solução de FA mediante tempos de 3, 5 e 7 h. Os *microchips* foram aplicados a ensaios de interações biomoleculares envolvendo o biorreceptor FA e padrão do ligante α -FA, $100 \mu g \cdot mL^{-1}$ em tampão TRIS salino (TBS), pH 7,3.¹⁵¹ MES foi utilizado como tampão sob as condições: $100 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ e pH 2,3. As condições experimentais seguintes foram usadas: 300 kHz, 6,0 V_{p-p} , vazão de $20 \mu L \cdot \text{min}^{-1}$ para tampão e amostra e tempo de amostragem igual a 20 s. α -FA, TBS e MES foram adquiridos da Sigma-

Aldrich Chemical Co. Na **Figura 6.2** são mostradas as respostas obtidas pelos microssistemas. O decréscimo do sinal analítico verificado após a etapa de amostragem (30 s) deve-se à regeneração da fase biossensora, que consiste em quebrar a ligação receptor/ligante possibilitando, assim, novas interações biomoleculares em uma análise subsequente. O fenômeno de regeneração foi realizado mediante a desnaturação (modificação estrutural) da proteína α -FA, utilizando-se o pH como agente desnaturante; o ligante foi preparado em um meio próximo da neutralidade, ao passo que a solução tampão foi ajustada para pH 2,3. Valores extremos de pH alteram a carga líquida da proteína, causando repulsões eletrostáticas entre suas cadeias de aminoácidos e quebra de algumas ligações de hidrogênio internas.¹⁵²

Os sinais expressos na **Figura 6.2** indicam uma modificação efetiva das superfícies de SiO₂ pelo FA, sendo verificadas elevações em S_w com relação a S_r conforme esperado. Admitindo-se que a concentração 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de α -FA situa-se entre os limites de quantificação e linearidade (faixa dinâmica), a sensibilidade de calibração do método pôde ser estimada. Isso veio a permitir o cálculo do LOD para os microssistemas,¹⁵³ cujos valores foram: 16,9 (3 h), 22,6 (5 h) e 27,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (7 h de funcionalização). As percentagens de RSD obtidas considerando-se 7 medidas para cada *microchip* foram de 5,69 (3 h), 7,86 (5 h) e 5,42 % (7 h de funcionalização). A maior sensibilidade verificada para o tempo de 3 h pode ser atribuída a questões de ordem estérica relacionadas a tempos reacionais superiores. Embora acarretem em um número maior de biorreceptores ancorados ao intermediário, tempos prolongados de funcionalização podem gerar impedimentos estéricos do componente bioativo dessas espécies os quais decorrem da alta densidade de moléculas junto à superfície da fase sensora.⁶¹ A partir dos sensorgramas da **Figura 6.2**, observa-se

também que S_w exibe taxas de acréscimo maiores quando comparado a S_r . O aumento em κ consequente das interações FA/ α -FA responde, presumivelmente, por esse fenômeno.

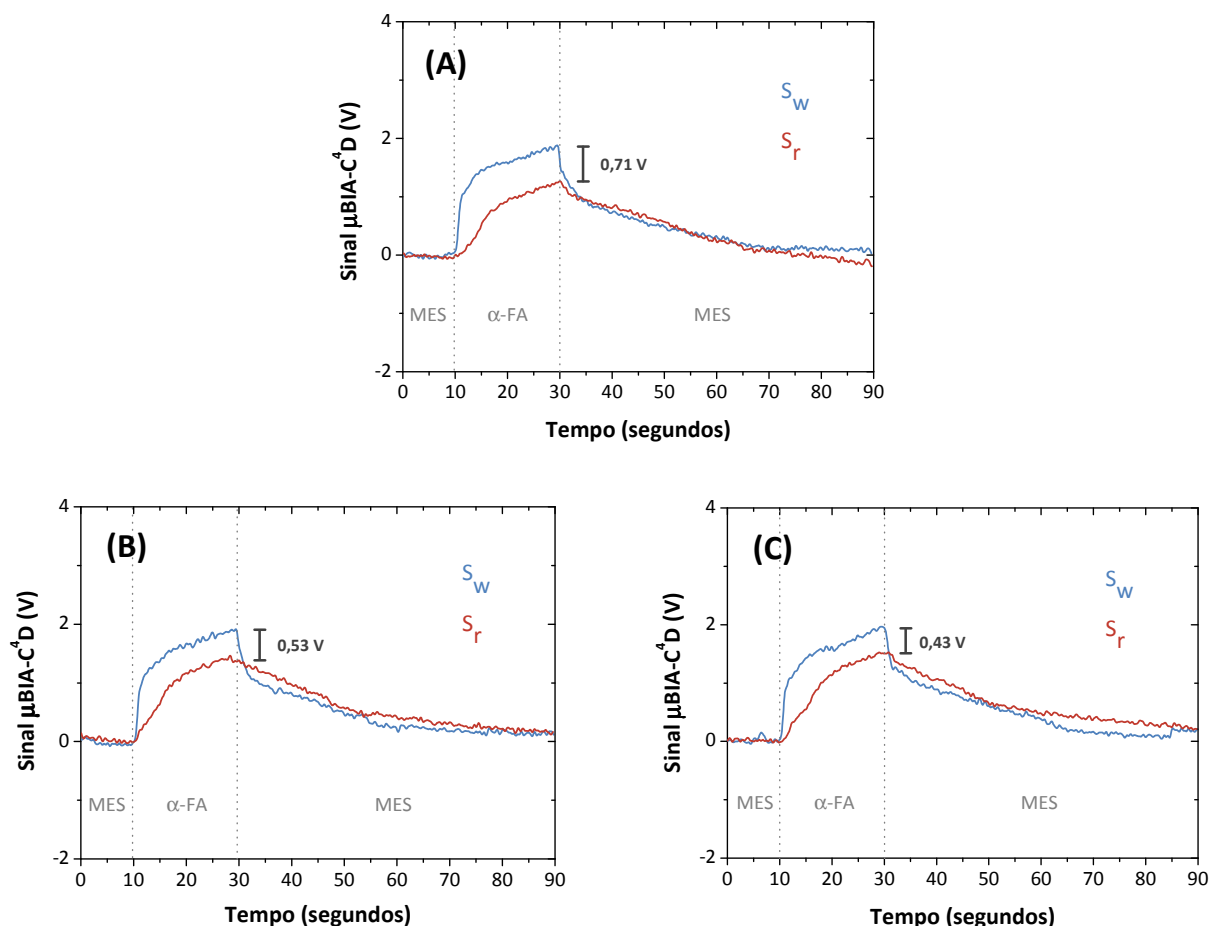


Figura 6.2. Sinais analíticos registrados para os dispositivos $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$ s microfabricados segundo os tempos de funcionalização de 3 (A), 5 (B) e 7 h (C). Condições experimentais: 300 kHz, 6,0 V_{p-p}, vazão de 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para tampão (MES) e amostra (α -FA) e tempo de amostragem em 20 s.

Hipótese sobre o Princípio de Transdução do $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$

Dado que todos os demais fatores intervenientes na resposta analíticas foram os mesmos para e_{rr} e e_{wr} , o aumento em S_w com relação a S_r deve-se ao fenômeno das interações biorrecetor/ligante. Abaixo, segue uma hipótese sobre a causa que leva a essa elevação do sinal.

APTS-SAM e FA apresentam em sua estrutura o grupo $-\text{NH}_x$ (doador de elétrons), o qual promove transferências eletrônicas entre o substrato e o ligante em fases sensoras.¹¹⁸

Esse fenômeno tende a gerar, em C^4D , uma maior polarização das moléculas do dielétrico, reduzindo \bar{E}_s e, por conseguinte, aumentando a capacitância do sistema $e_{wr}/SiO_2/solução$ (item 1.4.2) conforme mostram medidas de EIS.¹²² Com base nessas observações, segue nossa hipótese sobre o princípio de transdução do método: “em $\mu BIA-C^4D$, o sinal analítico deve-se à presença de grupo(s) doador(es) de elétrons dentre os constituintes da fase sensora, o(s) qual(is) possibilita(m) transferências eletrônicas entre o substrato e o ligante gerando uma maior polarização das moléculas do dielétrico. Como consequência, o campo elétrico estabelecido pelo sistema capacitivo $e_{wr}/solução$ é reduzido elevando-se, assim, a sua capacitância”. O fenômeno de transferência de carga supracitado interfere nas respostas obtidas por sensores baseados em transistores de efeito de campo.¹¹⁸

6.2. Caracterização da Fase Biossensora: Experimental, Resultados e Discussão

6.2.1. Caracterização Eletroquímica

Em adição aos experimentos de condutometria utilizando-se os sistemas e_{rr}/SiO_2 e $e_{wr}/SiO_2/APTS-SAM/FA$ (tempo de funcionalização de 3 h), medidas foram realizadas sob as mesmas condições a um *microchip* C^4D incorporando somente o intermediário de imobilização ($e_r/SiO_2/APTS-SAM$), cujos resultados são dispostos na **Figura 6.3**. Não foram observadas variações nas respostas obtidas pelos sistemas e_r/SiO_2 e $e_r/SiO_2/APTS-SAM$, para os quais não há interações com α -FA haja vista a ausência do biorreceptor FA. Neste contexto, os dados de caracterização obtidos se mostraram concordantes no que tange à correlação entre sinal analítico em $\mu BIA-C^4D$ ($S_w - S_r$) e a ocorrência de interações biomoleculares, sendo registradas elevações de potencial para $e_{wr}/SiO_2/APTS-SAM/FA$.

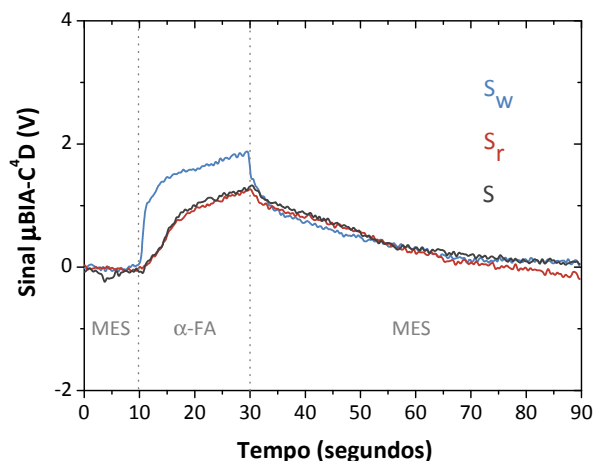


Figura 6.3. Sinais obtidos pelos sistemas: e_{rr}/SiO_2 (S_r), $e_r/\text{SiO}_2/\text{APTS-SAM}$ (S) e $e_{wr}/\text{SiO}_2/\text{APTS-SAM}/\text{FA}$ (S_w). Condições experimentais: 300 kHz, 6,0 V_{p-p}, vazão de 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para tampão (MES) e amostra (α -FA) e tempo de amostragem em 20 s.

6.2.2. Caracterização Morfológica

Os experimentos de AFM foram realizados no modo *tapping* (oscilante) com força constante em um instrumento da Digital Instrument, mod. MultiModeTM SPM, presente no Laboratório de Microscopia e Tunelamento (LMT) do LNILS. O mesmo possui resolução máxima de 512x512 *pixels* e detecção por feixe de laser. Empregamos pontas cônicas de Si da NSG10, com ângulo $\leq 22^\circ$, raio e altura iguais a 10 nm e 10-15 μm , respectivamente, e *cantilever* retangular integrado. Varreduras de 2,5 μm x 2,5 μm foram efetuadas a temperatura ambiente com velocidade de 1,0 Hz, sendo registrado o valor de 17,52 Hz para a constante de mola do *cantilever* usado. A técnica de AFM possibilitou uma análise morfológica detalhada das superfícies SiO_2 , $\text{SiO}_2/\text{APTS-SAM}$ e $\text{SiO}_2/\text{APTS-SAM}/\text{FA}$, para a qual utilizou-se um tempo de 3 h para funcionalização com FA. Parâmetros de rugosidade e gráficos fractais foram determinados a partir do software Nanoscope 6.11 (programa fornecido pelo fabricante do equipamento). Os parâmetros de rugosidade estimados foram: rugosidade média quadrática (RMS, medida estatística da magnitude de variação de uma

quantidade variável), razão da área superficial (S_{ar} , incremento da área superficial relativa à área do plano x,y projetado) e densidade de picos (S_{dp} , número de máximos locais por área).

As micrografias obtidas para as superfícies analisadas são expostas na **Figura 6.4**. Com base nessas imagens, podemos concluir que não houve alterações na topografia das superfícies modificadas, indicando que o reagente APTS-SAM cresceu seguindo a morfologia do dielétrico. Os valores de RMS, S_{ar} e S_{dp} calculados são apresentados na **Tabela 6.1**, a partir dos quais se verifica a formação de superfícies levemente mais rugosas e com área superficial e densidade de picos maiores com os processos de silanização e funcionalização. Os gráficos fractais evidenciaram uma distribuição de matéria uniforme para todas as superfícies analisadas.

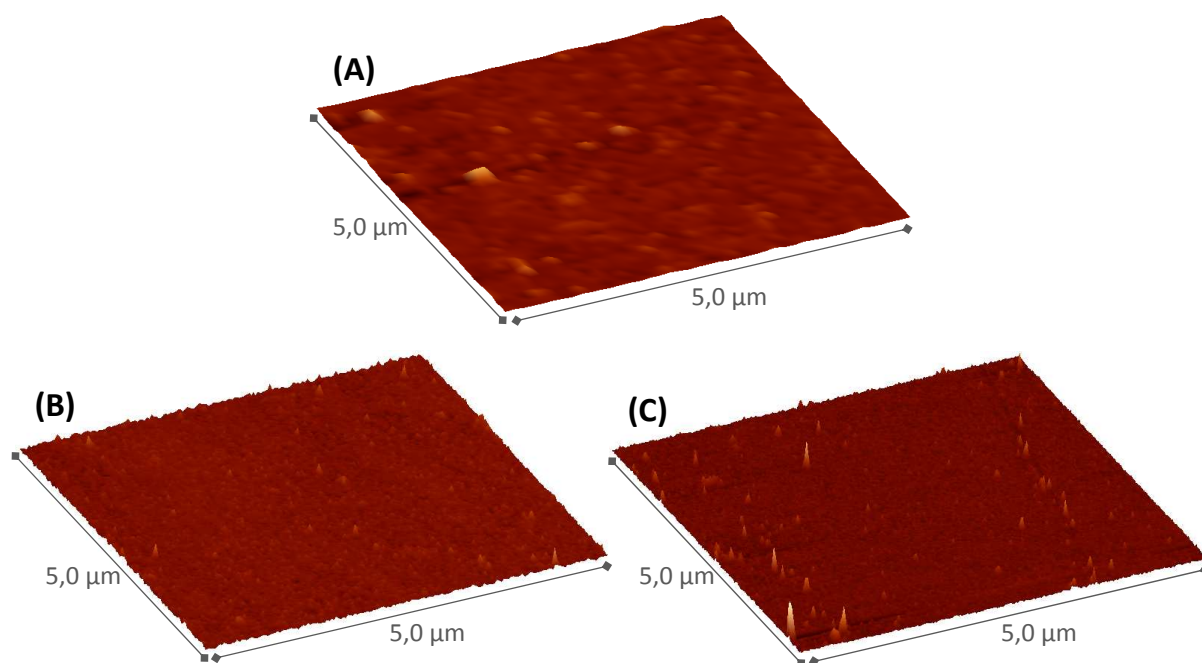


Figura 6.4. Micrografias de 5 μm x 5 μm das superfícies: SiO_2 (A), $\text{SiO}_2/\text{APTS-SAM}$ (B) e $\text{SiO}_2/\text{APTS-SAM}/\text{FA}$ (C).

Tabela 6.1. Valores de RMS, S_{ar} e S_{dp} calculados para as superfícies SiO_2 , $\text{SiO}_2/\text{APTS-SAM}$ e $\text{SiO}_2/\text{APTS-SAM}/\text{FA}$

Superfície	RMS (nm)	S_{ar} (%)	S_{dp} (μm^{-2})
SiO_2	0,4	0,8	5.621,7

Tabela 6.1. Valores de RMS, S_{ar} e S_{dp} calculados para as superfícies SiO_2 , $SiO_2/APTS-SAM$ e $SiO_2/APTS-SAM/FA$ (Continua)

Superfície	RMS (nm)	S_{ar} (%)	S_{dp} (μm^{-2})
$SiO_2/APTS-SAM$	0,8	5,1	7.055,3
$SiO_2/APTS-SAM/FA$	1,0	6,3	9.034,6

6.3. Conclusões

Os ensaios envolvendo FA e α -FA indicaram uma adsorção efetiva de FA junto às superfícies de SiO_2 silanizadas, sem a ocorrência (ao menos em níveis significativos) de impedimentos estéricos de sua espécie bioativa. Dentre os tempos de funcionalização investigados, 3 h foi aquele que resultou em uma maior sensibilidade do método. Em termos da etapa de caracterização eletroquímica da fase biossensora, seus resultados mostraram haver correlação entre a resposta analítica em $\mu BIA-C^4D$ e as interações biomoleculares. Por fim, conforme indicaram as medidas de AFM, não houve alterações drásticas na morfologia do substrato (SiO_2) em função dos processos de silanização e funcionalização.

CAPÍTULO 7



Conclusões Gerais

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um biossensor contendo transdução condutométrica sem contato e FA como biorreceptor em *microchip*, uma nova alternativa que poderá ser utilizada na determinação do biomarcador de câncer FR- α . Recentemente, o grupo estabeleceu colaborações com a Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, as quais nos permitirão realizar análises com amostras reais (plasma sanguíneo) e, assim, avaliar a especificidade e a viabilidade do μ BIA-C⁴D para ensaios de rotina.

Como vantagens intrínsecas ao método desenvolvido, consideradas a partir dos resultados e discussões presentes nos capítulos anteriores, incluem: (i) consumo de reagentes e amostras reduzido (da ordem de μ L); (ii) análises rápidas (< 2 min); (iii) rotina de ensaios simples; (iv) instrumentação de baixo custo e portátil; (v) possibilidade de fabricação dos *chips* sem o uso de salas “limpas” e (vi) monitoramento das interações biomoleculares em tempo real. Em termos do transdutor condutométrico sem contato, esse exibe duas características sumamente relevantes, quais sejam: (i) permite determinações diretas, dispensando o uso de mediadores redox bem como ocorre em técnicas eletroquímicas faradaicas, e (ii) ausência de inconvenientes relacionados ao contato entre eletrodo e solução eletrolítica, como passivação, contaminação, formação de bolhas e necessidade de limpeza dos eletrodos. Adicionalmente, a técnica de transdução utilizada possibilita a determinação simultânea de multianálitos em μ BIA-C⁴D mediante a simples implementação de pares e_{exc}/e_{wr} contendo biorreceptores específicos para cada ligante de interesse.

Os baixos níveis de detectabilidade (da ordem de $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)¹²² representam o fator limitante do método para determinações analíticas diversas. Como parâmetro de referência, Acharya e colaboradores obtiveram LOD de $20\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para interações FA/FR- α empregando difratometria imunomagnética como transdutor.²¹ Neste contexto, o grupo vem desenvolvendo pesquisas objetivando melhorias nos limites de detecção e quantificação da

C^4D , como a dopagem da camada dielétrica com semicondutores em microsistemas vidro/PDMS_{Dielétrico}/PDMS. No que concerne a microdispositivos $\mu BIA-C^4D$, um novo procedimento será investigado o qual consistirá em integrar eletrodos nanoestruturados seletivos à C^4D . Visa-se, assim, elevar significativamente a área superficial dos eletrodos promovendo um aumento no número de portadores de carga e, logo, nos valores de condutância obtidos. O uso de eletrodos nanoestruturados em C^4D é inédito, contemplando conceitos prévios e propondo um método inovador para o desenvolvimento de detectores condutométricos ultrasensíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. SALAZAR, M. D.; RATNAM, M. The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics? **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 26, p. 141-152, 2007.
2. BAZZANO, L. A. Folic acid supplementation and cardiovascular disease: the state of the art. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 338, p. 48-49, 2009.
3. ANTONY, A. C. The biological chemistry of folate receptors. **Blood**, v. 79, p. 2807-28220, 1992.
4. ATTOLINI, C. S. O.; MICHOR, F. Evolutionary Theory of Cancer. Immunological Investigations. **The Year in Evolutionary Biology 2009: Annals of the New York of Academy Sciences**, v. 1168, p. 23-51, 2009.
5. Magnitude do Câncer no Brasil. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos/ocorrencia_magnitude_cancerbrasil.pdf>.
Acesso em: 01 agosto 2009.
6. TOTHILL, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, p. 55-62, 2009.
7. SKAANE, P. Studies comparing screen-film mammography and full-field digital mammography in breast cancer screening: updated review. **Acta Radiologica**, v. 500, p. 3-14, 2009.
8. WILSON, M. S.; NIE, W. Multiplex measurement of seven tumor markers using an electrochemical protein chip. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 6476-6483, 2006.
9. WU, J.; YAN, F.; TANG, J.; ZHAI, C.; JU, H. A disposable multianalyte electrochemical immunosensor array for automated simultaneous determination of tumor markers. **Clinical Chemistry**, v. 53, p. 1495-1502, 2007.
10. WILSON, M. S. Electrochemical immunosensors for the simultaneous detection of two tumor markers. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 1496-1502, 2005.
11. FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C.; McNEIL, C. J.; RAWSON, K.; NILSSON, O. Disposable noncompetitive immunosensor for free and total prostate-specific antigen based on capacitance measurement. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 5649-5656, 2004.
12. ESCAMILLA-GÓMEZA, V.; HERNÁNDEZ-SANTOSB, D.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B.; PINGARRÓN-CARRAZÓNA, J. M.; COSTA-GARCÍA, A. Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2678-2683, 2009.
13. MASCINI, M.; TOMBELLI, S. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. **Biomarkers**, v. 13, p. 637-657, 2008.
14. MAKAROV, D. V.; LOEB, S.; GETZENBERG, R. H.; PARTIN, A. W. Biomarkers for prostate cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 650, p. 139-151, 2009.

15. HU, X. C.; WANG, Y.; SHI, D. R.; LOO, T. Y.; CHOW, L. W. Immunomagnetic tumor cell enrichment is promising in detecting circulating breast cancer cells. **Oncology**, v. 64, p. 160-165, 2003.
16. LARA, O.; TONG, X. D.; ZBOROWSKI, M. Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 891-904, 2004.
17. ZIEGLSCHMID, V.; HOLLMANN, C.; GUTIERREZ, B.; ALBERT, W.; STROTHOFF, D.; GROSS, E. BOCHER, O. Combination of immunomagnetic enrichment with multiplex RT-PCR analysis for the detection of disseminated tumor cells. **Anticancer Research**, v. 25, p. 1803-1810, 2005.
18. CHOESMEL, V.; PIERGA, J. Y.; NOS, C.; VINCENT-SALOMON, A.; SIGAL-ZAFRANI, B.; THIERY, J. P.; BLIN, N. Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. R556-570, 2004.
19. LIU, L.; ZHU, X.; ZHANG, D.; HUANG, J.; LI, G. An electrochemical method to detect folate receptor positive tumor cells. **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 2547-2550, 2007.
20. BHALERAO, K. D.; LEE, S. C.; SOBOYEJO, W. O.; SOBOYEJO, A. B. O. A folic acid-based functionalized surface for biosensor systems. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, p. 3-8, 2007.
21. ACHARYA, G.; CHANG, C. L.; DOORNEWEERD, D. D.; VLASHI, E.; HENNE, W. A.; HARTMANN, L. C.; LOW, P. S.; SAVRAN, C. A. Immunomagnetic diffractometry for detection of diagnostic serum markers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 15824-15829, 2007.
22. COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; CARRILHO, E.; JESUS, D. P.; DA SILVA, J. A. F.; SILVA, H. D. T.; DO LAGO, C. L. Microsistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, p. 1986-2000, 2007.
23. TERRY, S. C.; JERMAN, J. H.; ANGELL, J. B. Gas-Chromatographic air analyzer fabricated on a silicon-wafer. **IEEE Transactions on Electron Devices**, v. ED-26, p. 1880-1886, 1979.
24. DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3887-3907, 2006.
25. CREVILLÉN, A. G.; HERVÁS, M.; LÓPEZ, M. A.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Real sample analysis on microfluidic devices. **Talanta**, v. 74, p. 342-357, 2007.
26. BECKER, H.; GÄRTNER, C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 89-111, 2008.
27. MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H.M. Miniaturized total chemical-analysis systems - a novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuators B**, v. 1, p. 244-248, 1990.

28. RÍOS, A.; ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C.; CREVILLÉN, A. G. Challenges of analytical microsystems. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 467-479, 2006.
29. VALCÁRCEL, M.; CÁRDEDNAS, N. S., **Automatización y Miniaturización em Química Analítica**. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica S.A., 2000.
30. VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Recent developments. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 3373-3385, 2004.
31. DUFFY, D.C.; MCDONALD, J.C.; SCHUELLER, O.J.A. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 4974-4984, 1998.
32. ROLLAND, J. P.; Van DAM, R. M.; Schorzman, D. A.; Quake, S. R.; DeSimone, J. M. Solvent-resistant photocurable "liquid teflon" for microfluidic device fabrication. **Journal of American Chemical Society**, v. 126, p. 2322-2323, 2004.
33. KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 15-29, 2008.
34. MCDONALD, J.C.; DUFFY, D.C.; ANDERSON, J. R.; CHIU, D. T.; WU, H.; SCHUELLER, O.J.A.; WHITESIDES, G. M. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Electrophoresis**, v. 21, p. 27-40, 2000.
35. LEE, J. N.; PARK, C.; WHITESIDES, G. M. Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 6544-6554, 2003.
36. PICCIN, E.; COLTRO, W. K. T; DA SILVA, J. A. F.; NETO, S. C.; MAZO, L. H.; CARRILHO, E. Polyurethane from biosource as a new material for fabrication of microfluidic devices by rapid prototyping. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, p. 151-158, 2007.
37. FONSECA, A.; RAIMUNDO I. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; LIMA, R. S.; ARAÚJO, M. C. U. A microfluidic device with integrated fluorimetric detection for flow injection analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 7155-723, 2010.
38. PIRUSKA, A.; NIKCEVIC, I.; LEE, S. H.; AHN, C.; HEINEMAN, W. R.; LIMBACH, P. A.; SELISKAR, C. J. The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation. **Lab on a Chip**, v. 5, p. 1348-1354, 2005.
39. SHADPOUR, H.; MUSYIMI H.; CHEN, J.; SOPER, S. A. Physicochemical properties of various polymer substrates and their effects on microchip electrophoresis performance. **Journal of Chromatography A**, v. 1111, p. 238-251, 2006.
40. LI, O. L.; TONG, Y. L.; CHEN, Z. G.; LIU, C.; ZHAO, S.; MO, J. Y. A glass/PDMS hybrid microfluidic chip embedded with integrated electrodes for contactless conductometric detection. **Chromatographia**, v. 68, p. 1039-1044, 2008.
41. MOREIRA, N. H.; ALMEIDA, A. L. J.; PIAZZETA, M. H. O.; DE JESUS, D. P.; DEBLIRE, A.; GOBBI, A. L.; DA SILVA, J. A. F. Fabrication of a multichannel PDMS/glass analytical

microsystem with integrated lectrodes for amperometric detection. **Lab on a Chip**, v. 9, p. 115-121, 2009.

42. WEST, J.; BECKER, M.; TOMBRINK, S.; MANZ, A. Micro total analysis systems: latest achievements. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 4403-4419, 2008.

43. ERICSON, C.; HOLM, J.; ERICSON, T.; HJERTÉN, S. Electroosmosis- and pressure-driven chromatography in chips using continuous beds. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 81-87, 2000.

44. COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L.; CARRILHO, E. A toner-mediated lithographic technology for rapid prototyping of glass microchannels. **Lab on a Chip**, v. 7, p. 931-934, 2007.

45. TATSCH, P.J. **Deposição de Filmes Finos. V Oficina de Microeletrônica da Universidade Estadual de Campinas**. Campinas, 1999 (Relatório Técnico).

46. DANIEL, D.; GUTZ, I. G. R. Quick production of gold electrode sets or arrays and of microfluidic flow cells based on heat transfer of laser printed toner masks onto compact discs. **Electrochemistry Communication**, v. 5, p. 782-786, 2003.

47. COLTRO, W. K. T. **Fabricação e Avaliação de Microdispositivos para Eletroforese com Detecção Eletroquímica**. 2004. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

48. BECKER, H.; GARTNER, C. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. **Electrophoresis**, v. 21, p. 12-26, 2000.

49. QUIST, A. P.; PAVLOVIC, E.; OSCARSSON, S. Recent advances in microcontact printing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 591-600, 2005.

50. STEIGERT, J.; HAEBERLE, S.; BRENNER, T.; MÜLLER, C.; STEINERT, C. P.; KOLTAY, P.; N GOTTSCHLICH, N.; REINECKE, H.; RÜHE, J.; ZENGERLE, R.; DUCRÉE, J. Rapid prototyping of microfluidic chips in COC. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 17, p. 333-341, 2007.

51. FONSECA, A. **Construção e Avaliação de Microssistemas para Análise em Fluxo**. 2008. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

52. SCHLAUTMANN, S.; BESSELINK, G. A. J.; RADHAKRISHNA, P. G.; SCHASFOORT, R. B. M. Fabrication of a microfluidic chip by UV bonding at room temperature for integration of temperature-sensitive layers. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 13, p. S81-84, 2003.

53. SATYANARAYANA, S.; KARNIK, R. N.; MAJUMDAR, A. Stamp-and-stick room-temperature bonding technique for microdevices. **Journal of Microelectromechanical Systems**, v. 14, p. 392-399, 2005.

54. KROGMEIER, J. R.; SCHAEFER, I.; SEWARD, G.; YANTZ, G. R.; LARSON, J. W. An integrated optics microfluidic device for detecting single DNA molecules. **Lab on a Chip**, v. 7, p. 1767-1774, 2007.
55. DODGE, A.; BRUNET, E.; CHEN, S. L.; GOULPEAU, J.; LABAS, V.; VINH, J.; TABELING, P. PDMS-based microfluidics for proteomic analysis. **Analyst**, v. 131, p. 1122-1128, 2006.
56. ZHU, L.; LEE, C. S.; DEVOE, D. L. Integrated microfluidic UV absorbance detector with attomol-level sensitivity for BSA. **Lab on a Chip**, v. 6, p. 115-120, 2006.
57. TANYANYIWA, J.; HAUSER, P. C. High-voltage capacitively coupled contactless conductivity detection for microchip capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 6378-6382, 2002.
58. PUMERA, M. Contactless conductivity detection for microfluidics: designs and applications. **Talanta**, v. 74, p. 358-364, 2007.
59. MATYSIK, F. M. Advances in amperometric and conductometric detection in capillary and chip-based electrophoresis. **Microchimica Acta**, v. 160, p. 1-14, 2008.
60. DAMASKIN, B.; PETRI, O. **Fundamentos da electroquímica teórica**. Moscovo: MIR, 1985.
61. GRÜNDLER, P. **Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers**. Berlin: Springer, 2007.
62. HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors: definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, p. 1247-1250, 1991.
63. THÉVENOT, D.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p. 2333-2348, 1999.
64. JÉGOURED, D.; DELÉPÉE, R.; BRETON, F.; ROLLAND, A.; VIDAL, R.; AGROFOGLIO, L. A. Molecularly imprinted polymer of 5-methyluridine for solid-phase extraction of pyrimidine nucleoside cancer markers in urine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 8932-8939, 2008.
65. KOJIMA, K.; HIRATSUKA, A.; SUZUKI, H.; YANO, K.; IKEBUKURO, K.; KARUBE, I. Electrochemical protein chip with arrayed immunosensors with antibodies immobilized in a plasma-polymerized film. **Analytical Biochemistry**, v. 75, p. 1116-1122, 2003.
66. PIETRZYK, A.; KUTNER, W.; CHITTA, R.; ZANDLER, M. E.; D'SOUZA, F.; SANNICOLÒ, F.; MUSSINI, P. R. Melamine acoustic chemosensor based on molecularly imprinted film. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 10061-10070, 2009.
67. CHIANELLA, I.; LOTIERZO, M.; PILETSKY, S.; TOTHILL, I. E.; CHEN, B.; TURNER, A. P. F. Rational design of a polymer specific formicrocystin-LR using a computational approach. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 1288-1293, 2002.

68. CHIANELLA, I.; PILETSKY, S. A.; TOTHILL, I. E.; CHEN, B.; Turner, A. P. F. Combination of solid phase extraction cartridges and MIP-based sensor for detection of microcystin-LR. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 119-127, 2003.
69. CHIANELLA, I.; KARIM, K.; PILETSKA, E. V.; PRESTON, C.; PILETSKY, S. A. Computational design and synthesis of molecularly imprinted polymers with high binding capacity for pharmaceutical applications-model case: adsorbent for abacavir. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, p. 73-78, 2006.
70. LOTIERZO, M.; HENRY, O. Y. F.; PILETSKY, S. A.; TOTHILL, I.; CULLEN, D.; KANJA, M.; HOCK, B.; TURNER, A. P. F. Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 145-152, 2004.
71. ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 1533-1554, 1996.
72. ARYA, S. K.; SOLANKI, P. R.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2810-2817, 2009.
73. PALLANDRE, A.; de LAMBERT, B.; ATTIA, R.; JONAS, A. M.; VIOVY, J. L. Surface treatment and characterization: perspectives to electrophoresis and lab-on-chips. **Electrophoresis**, v. 27, p. 584-610, 2006.
74. HOWARTER, J. A.; YOUNGBLOOD, J. P. Surface modification of polymers with 3-aminopropyltriethoxysilane as a general pretreatment for controlled wettability. **Macromolecules**, v. 40, p. 1128-1132, 2007.
75. SOPER, S. A.; BROWN, K.; ELLINGTON, A.; GARCIA-MANERO, G.; GAU, V.; GUTMAN, S. I.; HAYES, D. F.; KORTE, B.; LANDERS, J. L.; LARSON, D.; LIGLER, F.; MAJUMDAR, A.; MASCINI, M.; NOLTE, D.; ROSENSWEIG, G.; WANG, J.; WILSON, D. Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/ prognostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 1932-1942, 2006.
76. WU, J.; FU, Z.; YAN, F.; JU, H. Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 679-688, 2007.
77. WU, J.; ZHANG, Z.; FU, Z.; JU, H. A disposable two-throughput electrochemical immunosensor chip for simultaneous multianalyte determination of tumor markers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 114-120, 2007.
78. SANCHEZ-CARBAYO, M. Recent advances in bladder cancer diagnostics. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 562-571, 2004.
79. PAIK, S.; SHAK, S.; TANG, G.; KIM, C.; BAKER, J.; CRONTIN, M.; BAEHNER, F. L.; WALKNER, M. G.; WATSON, D.; PARK, T.; HILLER, W.; FISHER, E. R.; WICKERHAM, D. L.; BRYANT, J.; WOLMARK, N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 2817-2826, 2004.

80. TIWARI, A.; GONG, S. Electrochemical detection of a breast cancer susceptible gene using cDNA immobilized chitosan-co-polyaniline electrode. **Talanta**, v. 77, p. 1217-1222, 2009.
81. PHILLIPS, M.; CATANEO, R. N.; CUMMIN, A. R. C.; GAGLIARD, A. J.; GLEESON, K.; GREENBERG, J.; MAXFIELD, R. A.; ROM, W. N. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. **Chest**, v. 123, p. 2115-2123, 2003.
82. MEYERHOFF, M. E.; DUAN, C. M.; MEUSEL, M. Novel non-separation sandwich-type electrochemical enzyme immunoassay system for detecting marker proteins in undiluted blood. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 1378-1384, 1995.
83. HE, Z.; GAO, N.; JIN, W. Determination of tumor marker CA125 by capillary electrophoretic enzyme immunoassay with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 497, p. 75-81, 2003.
84. DU, D.; YAN, F.; LIU, S. L.; JU, H. X. Immunological assay for carbohydrate antigen 19-9 using an electrochemical immunosensor and antigen immobilization in titania sol-gel matrix. **Journal of Immunological Methods**, v. 283, p. 67-75, 2003.
85. LIANG, R. P.; QIU, J. D.; ZOU, X. Y.; CAI, P. X. Breast cancer antigen immunosensor based on the functional sol-gel film. **Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese**, v. 25, p. 425-429, 2004.
86. ZHU, Q.; CHAI, Y. Q.; YUAN, R.; WANG, N.; LI, X. L. Development of a biosensor for the detection of carcinoembryonic antigen using Faradic impedance spectroscopy. **Chemistry Letters**, v. 34, p. 1682-1683, 2005.
87. DEROCK, I. B.; PENNINGTON, M. E.; SROKA, T. C.; LAM, R. S.; BOWDEN, G. T.; BAIR, E. L.; CRESS, A. E. Synthetic peptides inhibit adhesion of human tumor cells to extracellular matrix proteins. **Cancer Research**, v. 61, p. 3308-3313, 2001.
88. BROWN, K. C. New approaches for cell-specific targeting: identification of cell-selective peptides from combinatorial libraries. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 16-21, 2000.
89. O'SULLIVAN, C. K. Aptasensors - The future of biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, p. 44-48, 2002.
90. RODRIGUEZ, M. C.; KAWDE, A. N.; WANG, J. Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of surface change. **Chemical Communications**, v. 34, p. 4267-4269, 2005.
91. WANG, J.; KAWDE, A. Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. **Analytica Chimica Acta**, v. 431, p. 219-224, 2001.
92. TANSIL, N. C.; XIE, F.; XIE, H.; GAO, Z. An ultrasensitive nucleic acid biosensor based on the catalytic oxidation of guanine by a novel redox threading intercalator. **Chemical Communication**, v. 8, p. 1064-1066, 2005.

93. DAI, Z.; YAN, F.; CHEN, J.; JU, H. Reagentless amperometric immunosensors based on direct electrochemistry of horseradish peroxidase for determination of carcinoma antigen-125. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 5429-5434, 2003.
94. TAN, F.; YAN, F.; JU, H. A designer ormosil gel for preparation of sensitive immunosensor for carcinoembryonic antigen based on simple direct electron transfer. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 1835-1839, 2006.
95. GUAN, J. G.; MIAO, Y. Q.; CHEN, J. R. Prussian blue modified amperometric FIA biosensor: one-step immunoassay for α -fetoprotein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 789-794, 2004.
96. BESSELINK, G. A. J.; KOOYAMAN, R. P. H.; van OS, P. J. H. J.; ENGBERS, G. H. M.; SCHASFOORT, R. B. M. Signal Amplification on planar and gel-type sensor surfaces in surface Plasmon resonance-based detection of prostate-specific antigen **Analytical Biochemistry**, v. 333, p. 165-173, 2004.
97. CHOU, S. F.; HSU, W. L.; HWANG, J. M.; CHEN, C. Y. Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on surface plasmon resonance. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 999-1005, 2004.
98. TSUKAGOSHI, K.; JINNO, N.; NAKAJIMA, R. Development of a micro total analysis system incorporating chemiluminescence detection and application to detection of cancer markers. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 1684-1688, 2005.
99. SARKAR, P.; PAL, P. S.; GHOSH, D.; SETFORD, S. J.; TOTHILL, I. E. Amperometric biosensors for detection of the prostate cancer marker (PSA). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 238, p. 1-9, 2002.
100. YAN-JUN, D.; HUA, W.; JIAN-HUI, J.; GUO-LI, S.; RU-QIN, Y. Iridium oxide film-enhanced impedance immunosensor for rapid detection of carcinoembryonic antigen. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 25, p. 1288-1293, 2007.
101. LIN, J. H.; YAN, F.; JU, H. X. Simple noncompetitive enzyme immunoassay for carcinoembryonic antigen by flow injection chemiluminescence. **Clinica Chimica Acta**, v. 341, p. 109-115, 2004.
102. LIN, J.; QU, W.; ZHANG, S. Electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on antigen immobilization in gold nanoparticles modified chitosan membrane. **Analytical Sciences**, v. 23, p. 1059-1063, 2007.
103. ZHANG, X.; WU, Y.; TU, Y.; LIU, S. A reusable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen *via* molecular recognition of glycoprotein antibody by phenylboronic acid self-assembly layer on gold. **The Analyst**, v. 133, p. 485-492, 2008.
104. TANG, D. P.; YUAN, R.; CHAI, Y. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for clinical immunoassay using thionine-doped magnetic gold nanospheres as labels and horseradish peroxidase as enhancer. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 1582-1588, 2008.

105. HO, J. A.; LIN, Y. C.; WANG, L. S.; HWANG, K. C.; CHOU, P. T. Carbon nanoparticle-enhanced immunoelectrochemical detection for protein tumor marker with cadmium sulfide biotracers. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 1340-1346, 2009.
106. VISWANATHAN, S.; RANI, C.; ANAND, A. V.; HO, J. A. Disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen using ferrocene liposomes and MWCNT screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 1984-1989, 2009.
107. LADD, J.; LU, H.; TAYLOR, A. D.; GOODELL, V.; DISIS, M. L.; JIANG, S. Direct detection of carcinoembryonic antigen autoantibodies in clinical human serum samples using a surface plasmon resonance sensor. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 70, p. 1-6, 2009.
108. WEE, K. W.; KANG, G. Y.; PARK, J.; KANG, J. Y.; YOON, D. S.; PARK, J. H.; KIM, T. S. Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing microcantilevers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 1932-1938, 2005.
109. ESCAMILLA-GÓMEZ, V.; HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B.; PINGARRÓN-CARRAZÓN, J. M.; COSTA-GARCÍA, A. Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2678-2683, 2009.
110. ZHANG, B.; MAO, Q. G.; ZHANG, X.; JIANG, T. L.; CHEN, M.; YU, F.; FU, W. A novel piezoelectric quartz micro-array immunosensor based on self-assembled monolayer for determination of human chorionic gonadotropin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 711-720, 2004.
111. BANGAR, M. A.; SHIRALE, D. J.; CHEN, W.; MYUNG, N. V.; MULCHANDANI, A. Single conducting polymer nanowire chemiresistive label-free immunosensor for cancer biomarker. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 2168-2175, 2009.
112. CHOU, S. F.; HSU, W. L.; HWANG, J. M.; CHEN, C. Y. Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on a quartz crystal microbalance. **Analytica Chimica Acta**, v. 453, p. 181-189, 2002.
113. MUKUNDAN, H.; KUBICEK, J. Z.; HOLT, A.; SHIVELY, J. E.; MARTINEZ, J. S.; GRACE, K.; GRACE, W. K.; SWANSON, B. I. Planar optical waveguide-based biosensor for the quantitative detection of tumor markers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 138, p. 453-460, 2009.
114. RICCIARDI, C.; FIORILLI, S.; BIANCO, S.; CANAVESE, G.; CASTAGNA, R.; FERRANTE, I.; DIGREGORIO, G.; MARASSO, S. L.; NAPIONE, L.; BUSSOLINO, F. Development of microcantilever-based biosensor array to detect Angiopoietin-1, a marker of tumor angiogenesis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 1193-1198, 2010.
115. PLACZEK, E. A.; PLEBANEK, M. P.; LIPCHIK, A. M.; KIDD, S. R.; PARKER, L. L. A peptide biosensor for detecting intracellular Abl kinase activity using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 397, p. 73-78, 2010.

116. WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point of care cancer diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 1887-1892, 2006.
117. SADIK, O. A.; ALUOCH, A. O.; ZHOU, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2749-2765, 2009.
118. TEKER, K. Bioconjugated carbon nanotubes for targeting cancer biomarkers. **Materials Science and Engineering B**, v. 153, p. 83-87, 2008.
119. CHOI, S.; CHAE, J. A microfluidic biosensor based on competitive protein adsorption for thyroglobulin detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 118-123, 2009.
120. BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA, J. A. F.; BLANES, L.; DO LAGO, C. L. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, v. 17, p. 1198-1206, 2005.
121. GUIJT, R. M.; BALTUSSEN, E.; VAN DER STEEN, G.; FRANK, H.; BILLIET, H.; SCHALKHAMMER, T.; LAUGERE, F.; VELLEKOOP, M.; BERTHOLD, A.; SARRO, L.; VAN DEDEDM, G. W. K. Capillary lectrophoresis with on-chip four-electrode capacitively coupled conductivity detection for application in bioanalysis. **Electrophoresis**, v. 22, p. 2537-2541, 2001.
122. COLTRO, W. K. T. **Deteção condutométrica sem contato: uma nova ferramenta para monitoramento de interações biomoleculares**. 2008. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
123. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. New York: John Wiley & Sons, 2001.
124. KUBAÑ, P.; HAUSER, P. C. Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part II: signal-to-noise ratio and stray capacitance. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3398-3405, 2004.
125. HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentals of Physics**. New York: John Wiley & Sons, 2001.
126. WANG, J.; PUMERA, M.; COLLINS, G. E.; MULCHANDANI, A. Measurements of chemical warfare agent degradation products using an electrophoresis microchip with contactless conductivity. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 6121-6125, 2002.
127. KUBAÑ, P.; HAUSER, P. C. A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 15-29, 2008.
128. LEE, C. Y.; CHEN, C. M.; CHANG, G. L.; LIN, C. H.; FU, L. M. Fabrication and characterization of semicircular detection electrodes for contactless conductivity detector – CE microchips. **Electrophoresis**, v. 27, p. 5043-5050, 2006.

129. FERCHER, G.; SMETANA, W.; VELLEKOOP, M. J. Microchip electrophoresis in low-temperature co-fired ceramics technology with contactless conductivity measurement. **Electrophoresis**, v. 30, p. 2516-2522, 2009.
130. KUBAŇ, P.; HAUSER, P. C. Evaluation of microchip capillary electrophoresis with external contactless conductivity detection for the determination of major inorganic ions and lithium in serum and urine samples. **Lab on a Chip**, v. 8, p. 1829-1836, 2009.
131. WANG, J.; CHEN, G.; MUCK, A. Wall-jet conductivity detector for microchip capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 78, p. 207-211, 2009.
132. FIORILLI, S.; RIVOLO, P.; DESCROVI, E.; RICCIARDI, C.; PASQUARDINI, L.; LUNELLI, L.; VANZETTI, L.; PEDERZOLLI, C.; ONIDA, B.; GARRONE, E. Vapor-phase self-assembled monolayers of aminosilane on plasma-activated silicon substrates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, p. 235-241, 2008.
133. OLIVEIRA, D. A. L. **Estudo de energia superficial e adesão celular em superfícies quimicamente heterogêneas de silanos sobre vidro**. 2008. Monografia (Bacharelado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
134. LEE, J. W.; LU, J. Y.; LOW, P. S.; FUCHS, P. L. Synthesis and evaluation of taxol-folic acid conjugates as targeted antineoplastics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2397-2414, 2002.
135. MAGALHÃES, J. L.; MOREIRA, L. M.; RODRIGUES-FILHO, U. P.; GIZ, M. J.; PEREIRA-DASILVA, M. A.; LANDERS, R.; VINHAS, R. C. G.; NASCENTE, P. A. P. Surface chemistry of the iron tetraazamacrocycle on the aminopropyl-modified surface of oxidized n-Si(100) by AFM and XPS. **Surface and Interface Analysis**, v. 33, p. 293-298, 2002.
136. DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 4339-4343, 1998.
137. RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; DA SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 174-171, 2008.
138. PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.
139. KIM, H. J.; SHAO, Q.; KIM, Y. H. Characterization of low-dielectric-constant SiOC thin films Deposited by PECVD for interlayer dielectrics of multilevel interconnection. **Surface and Coatings Technology**, v. 171, p. 39-45, 2003.
140. FARCICH, N. J.; SALONEN, J.; ASBECK, P. M. Single-Length Method Used to Determine the Dielectric Constant of Polydimethylsiloxane. **IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques**, v. 56, p. 2963-2971, 2008.

141. ANDRESA, J. S. **Formação e Reatividade de Filmes Finos de Macrocíclicos de Ferro sobre Silício Monocristalino**. 2007. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
142. REHR, J. J.; ALBERS, R. C. Theoretical Approaches to X-Ray Absorption Fine Structure. **Reviews of Modern Physics**, v. 72, p. 621-654, 2000.
143. BEAMSON, G.; BRIGGS, D. **High Resolution XPS of Organic Polymers – The Scienta ESCA300 Database**. West Sussex: John Wiley & Sons, 1992.
144. NASCENTE, P. A. P. Materials characterization by X-ray photoelectron spectroscopy. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, v. 228, p. 145-150, 2005.
145. MOULDER, J. F.; STICKLE, W. F.; SOBOL, P. E.; BOMBEN, K. D. **Handbook of x-ray photoelectron spectroscopy**. New York: Perkin-Elmer Corporation, 1992.
146. GUERROANI, N.; BALDO, A.; MAAROUF, T.; BELU, A. M.; KASSIS, C. M.; MAS, A. Fluorinated-plasma coating on polyhydroxyalcanoate PHBV effect on the biodegradation. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 128, p. 925-930, 2007.
147. NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database. 05 June 2006. Produced by WAGNER, C. D.; NAUMKIN, A. V.; KRAUT-VASS, A.; ALLISON, J. W.; POWELL, C. J.; RUMBLE, J. R. Disponível em: <<http://srdata.nist.gov/xps/selectEnergyType.aspx>>. Acesso em: 22 out. 2009.
148. MARTIN, H. J.; SCHULZ, K. H.; BUMGARDNER, J. D.; WALTERS, K. B. XPS study on the use of 3-aminopropyltriethoxysilane to bond chitosan to a titanium surface. **Langmuir**, v. 23, p. 6645-6651, 2007.
149. DA SILVA, J. A. F.; GUZMAN, N.; DO LAGO, C. L. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis – Hardware improvements and optimization of the input-signal amplitude and frequency. **Journal of Chromatography A**, v. 942, p. 249-258, 2002.
150. COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E. Fabrication and integration of planar electrodes for contactless conductivity detection on polyester-toner electrophoresis microchips. **Electrophoresis**, v. 29, p. 2260-2265, 2008.
151. LEAMON, C. P.; PASTAN, I.; LOW, P. S. Cytotoxicity of folate-pseudomonas exotoxin conjugates toward tumor cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 24847-24854, 1993.
152. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2000.
153. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. São Paulo: Bookman, 2005.

SÚMULA CURRICULAR



1. DADOS PESSOAIS

Nome: Renato Sousa Lima.

Endereço: Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos;
Av. Trabalhador São Carlense, 400/Grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações;
CEP 13560-970, São Carlos-SP, Brasil, Caixa-Postal: 780. Telefone: (16) 3373 8279.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Doutorado em Química;
Universidade de São Paulo/Instituto de Química de São Carlos, USP/IQSC, Brasil;
2010: Título: Condutometria Nanoestruturada Sem Contato em Microchips: Fabricação, Validação e Aplicação em Biossensores Tumoraes;
Orientador: Emanuel Carrilho.

Mestrado em Química (Química Analítica);
Universidade de São Paulo/Instituto de Química de São Carlos, USP/IQSC, Brasil;
2008 - 2010: Título: Biossensor Condutométrico Sem Contato em Microchip Contendo Ácido Fólico como Biorreceptor, Ano de obtenção: 2010;
Orientador: Emanuel Carrilho;
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Graduação em Química Industrial;
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil;
2003 - 2008: Título: Desenvolvimento de um Sistema em Escala Piloto para o Monitoramento Remoto e Contínuo da Qualidade de Águas;
Orientador: José Soares;
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

3. PRÊMIOS

- 2010:** Trabalho premiado como melhor pôster na 20^a Reunião Anual de Usuários (RAU) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP.
- 2008:** Reconhecimento como melhor aluno no curso de Química Industrial do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, Conselho Regional de Química da Paraíba (CRQ-PB).
- 2004:** Primeiro colocado no processo seletivo para admissão na Graduação em Química Industrial pelo Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba - CT/UFPB - em Abril de 2004.

4. ARTIGOS PUBLICADOS

1. Alexandre Fonseca; Raimundo Júnior, I. M.; Rohwedder, J. J. R.; Lima, R. S.; Araújo, M. C. U. A microfluidic device with integrated fluorimetric detection for flow injection analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 715, 2010.
2. Gambarra Neto, F. F.; Glimaldo Marino; Araújo, M. C. U.; Galvão, R. K. H.; Pontes, M. J. C.; Medeiros, E. P.; Lima, R. S. Classification of edible vegetable oils using square wave voltammetry with multivariate data analysis. **Talanta**, v. 77, p. 1660, 2009.
3. Gaião, E. N.; Santos, S. R. B.; Santos, V. B.; Lima, R. S.; Araújo, M. C. U. An inexpensive, portable and microcontrolled near infrared LED-photometer for screening analysis of gasoline. **Talanta**, v. 75, p. 792, 2008.
4. Almeida, L. F.; Vale, M. G. R.; Dessuy, M. B.; Silva, M. M.; Lima, R. S.; Santos, V. B.; Diniz, P. H. D.; Araújo, M. C. U. A flow-batch analyzer with piston propulsion applied to automatic preparation of calibration solutions for Mn determination in mineral waters by ET AAS. **Talanta**, v. 73, p. 906, 2007.

5. Gambarra Neto, F. F.; Lima, R. S.; Lira, W. S.; Glimaldo Marino, Araújo, M. C. U.; Medeiros, E. P.; Nascimento, V. B. Biamperometric Determination of Tetracycline in Pharmaceuticals. **Analytical Letters**, v. 40, p. 3070, 2007.

5. ARTIGOS SUBMETIDOS/EM FASE DE ELABORAÇÃO

1. Santos, V. B.; Nascimento, E. C. L.; Lima, R. S.; Araújo, M. C. U.; Santos, S. R. B.; Fragoso, W. D.; Azevedo, W. M. An optical pH-meter based on LED and polyaniline film. **Talanta**.
2. Lima, R. S.; Santos, V. B.; Guerreiro, T. B.; Araújo, M. C. U.; Gaião, E. N. Um sistema microcontrolado para o monitoramento on-line, in situ e remoto de pH, Condutividade e Temperatura de águas. **Química Nova**.
3. Coltro, W. K. T.; Segato, T. P.; Lima, R. S.; Silva, J. A. F.; Emanuel Carrilho. Detecção Condutométrica Sem Contato: Fundamentos, Configurações e Aplicações. **Química Nova**.
4. Lima, R. S.; Coltro, W. K. T.; Rodrigues Filho, U. P.; Gobbi, A. L.; Emanuel Carrilho. Contactless Conductivity Biosensor in Microchip Containing Folic Acid as Bioreceptor. **Analytical Chemistry**.
5. Lima, R. S.; Segato, T. P.; Coltro, W. K. T.; Emanuel Carrilho. Dielectric Layer Doping: A New Alternative for Increasing Sensitivity of Contactless Conductivity Detection in Microchips. **Analytical Chemistry**.