



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DOUTORADO EM QUÍMICA EM ASSOCIAÇÃO**

**CONSTRUÇÃO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS
USANDO TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE BAIXO CUSTO:
APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EM
AMOSTRAS DE INTERESSE SOCIOAMBIENTAL**

Elizabete Maria Maximiano

Dourados – MS

2021



**CONSTRUÇÃO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS
USANDO TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE BAIXO CUSTO:
APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EM
AMOSTRAS DE INTERESSE SOCIOAMBIENTAL**

Elizabete Maria Maximiano (Discente)

Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade (Orientador)

“Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Química, Doutorado na forma de Associação Ampla UFGD/UFG/UEG, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Química”.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M464c Maximiano, Elizabete Maria
CONSTRUÇÃO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS USANDO TÉCNICAS
ALTERNATIVAS DE BAIXO CUSTO: APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE
CONTAMINANTES EM AMOSTRAS DE INTERESSE SOCIOAMBIENTAL [recurso
eletrônico] / Elizabete Maria Maximiano. -- 2021.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Magno Aparecido Gonçalves Trindade .
Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Plataforma eletroquímica microfluídica. 2. Polidimetilsiloxano. 3. Célula de fluxo integrada. 4. Separação. 5. Detecção simultânea. I. Trindade, Magno Aparecido Gonçalves. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DOUTORADO EM QUÍMICA ASSOCIAÇÃO
UEG/UFGD/UFCAT

Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer **APROVADO**, para a tese intitulada: "**CONSTRUÇÃO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS USANDO TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE BAIXO CUSTO: APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EM AMOSTRAS DE INTERESSE SOCIOAMBIENTAL**", de autoria de **Elizabeth Maria Maximiano**, apresentada ao Programa de Pós-graduação Doutorado em Química Associação UEG/UFGD/UFCAT, da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade (Orientador-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Daniel Araújo Gonçalves
Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. André Luiz dos Santos
Membro Examinador (UFU)

Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini
Membro Examinador (UFPR)

Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Junior
Membro Examinador (UFPR)

Dourados/MS, 10 de junho de 2021



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DOUTORADO EM QUÍMICA
ASSOCIAÇÃO UEG/UFGD/UFCAT**

ATA Nº 001 DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA POR **ELIZABETE MARIA MAXIMIANO**, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DOUTORADO EM QUÍMICA ASSOCIAÇÃO UEG/UFGD/UFCAT.

Aos dez dias do mês de junho de dois mil e vinte e um, às 12 horas e 30 minutos, em sessão remota, realizou-se a Defesa de Tese de Doutorado intitulada “**CONSTRUÇÃO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS USANDO TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE BAIXO CUSTO: APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EM AMOSTRAS DE INTERESSE SOCIOAMBIENTAL**” apresentada pela doutoranda **Elizabete Maria Maximiano** à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade/UFGD (presidente/orientador), Prof. Dr. Daniel Araújo Gonçalves/UFGD, Prof. Dr. André Luiz dos Santos/UFU, Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini/UFPR, Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Junior/UFPR. Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após a candidata ter apresentado a sua Tese, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada **aprovada**, fazendo jus ao título de **DOUTORA EM QUÍMICA**. Os membros da banca abaixo citados atestam que participaram de forma remota desta defesa de Tese, considerando a candidata **aprovada**, conforme declaração anexa.

Dourados, 10 de junho de 2021.

Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade (participação remota síncrona)

Prof. Dr. Daniel Araújo Gonçalves (participação remota síncrona)

Prof. Dr. André Luiz dos Santos (participação remota síncrona)

Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini (participação remota síncrona)

Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Junior (participação remota síncrona)

ATA HOMOLOGADA EM: __/__/__, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Pró-Reitoria de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

Assinatura e Carimbo



“A melhor maneira de cultivarmos a coragem nas nossas filhas e em outras jovens é sendo um exemplo. Se elas virem as suas mães e outras mulheres nas suas vidas seguindo em frente apesar do medo, elas vão saber que é possível.”

Gloria Steinem



DEDICATÓRIA

Dedico a Deus que até aqui me sustentou e me guardou, á minha família e meu esposo que estiveram ao meu lado durante todo tempo e em especial á minha filha que chegou para dar sentido a tudo.



AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, o único digno de receber toda honra e toda glória, Aquele que me guiou e me fortaleceu estando ao meu lado em todos os momentos da minha vida, sendo meu refúgio e fortaleza, e me ajudando a superar cada desafio proposto.

Aos meus pais Maria e João (*in memorian*), e aos meus irmãos Elza (*in memorian*), Rosenilda, Claudia, Reginaldo e Rosely, por todo esforço e todos os momentos bons e difíceis, pelo amor incondicional e por acreditarem em mim.

Ao meu esposo Wesley, que esteve ao meu lado durante todo esse período sendo uma base que me manteve forte em meio as dificuldades, que me ajudou a perseverar e que foi compreensivo e amoroso comigo em todos os momentos.

À minha filha Hadassa que chegou quase no fim do doutorado transformando minha vida, me tornando uma mulher tão forte que nunca imaginei que seria e me ensinando em todos os sentidos o que é amar incondicionalmente.

Ao meu orientador Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade, pela orientação, pelo apoio, por toda paciência, compreensão, dedicação, por ter me incentivado a me superar cada dia mais e por todos os ensinamentos a mim repassados que sempre ficarão guardados e nunca serão esquecidos.

Aos professores Dr. Gilberto José de Arruda e Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso, pelos anos de convivência e por terem me apresentado ao amor pela pesquisa, me encaminhado e me incentivado a seguir sempre em frente.

Ao professor Daniel Araújo Gonçalves por ter realizado as análises de cromatografia líquida descritas no presente trabalho.

Aos meus amados amigos Érica, Linston, Raquel e Thais, por me ouvirem e me aconselharem não me deixando desistir em momento algum.

As companheiras de LAE&Bio Ana Carolina, Carol, Ingrid e Muriel por cada auxílio e toda palavra de ânimo e apoio.

À UFGD e ao PPGQ pela oportunidade concedida para a realização da presente pesquisa e por todo apoio durante o período da mesma.

À banca examinadora por aceitar nosso convite e pela contribuição a ser dada.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, INCT-DATREM e FINEP pelo apoio concedido.



LISTA DE ABREVIATURAS

ABS= acrilonitrila-butadieno-estireno

AS= ácido salicílico

B-R= Britton-Robinson

CAF= cafeína

CE= contra eletrodo

ECSA= área de superfície eletroquimicamente ativa, do inglês electrochemically active surface área.

ET= eletrodo de trabalho

I_p = corrente de pico

LOD= limite de detecção

LOQ= limite de quantificação

PER= pseudo-eletrodo de referência

PDMS= polidimetilsiloxano

SD= desvio padrão, do inglês standard deviation

Tween 20= do inglês Polyoxyethylene-20-sorbitan monolaurate



RESUMO

Dispositivos microfluídicos baseados em canais têm sido úteis no sistema analítico miniaturizado, no entanto, o ponto mais crítico no desenvolvimento de plataformas microfluídicas continua sendo o sistema de detecção e sua integração no canal. Atualmente, os detectores eletroquímicos são os mais adequados para essas integrações. Existem muitas maneiras de fabricar o canal em plataformas microfluídicas, e, uma das formas, envolve o uso de tecnologias alternativas que permitam o uso de materiais de baixo custo. Isso permite produzir vários designs de dispositivos microfluídicos bem como novas configurações de detectores eletroquímicos diretamente integrados. Neste trabalho foram desenvolvidos procedimentos não convencionais para fabricação de dispositivos microfluídicos baseados em polidimetilsiloxano. Assim, dispositivos microfluídicos com geometrias planares, nos quais o canal interno (em forma de serpentina) e uma nova configuração do sistema de detecção eletroquímica foram montados em um único chip. A técnica de construção desses microdispositivos é simples, de baixo custo e requer o mínimo de conhecimento em microfabricação. As plataformas microfluídicas propostas foram testadas para resolver alguns dos problemas decorrentes do uso de micropipetas durante injeções discretas, bem como do uso de surfactantes na solução carregadora. Os resultados demonstraram o alto desempenho do sistema de detecção eletroquímica integrado, mostrando alta tolerância à presença de bolhas de ar e nenhum distúrbio durante as injeções discretas. Além disso, também mostramos o desempenho analítico do dispositivo microfluídico baseado em PDMS para detecção amperométrica de ácido salicílico (SA) em amostras aquosas. Em seguida, este dispositivo também foi usado para separação de SA e cafeína (CAF) após a ativação das paredes do canal interno com solução de hidróxido de sódio ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) antes de detectar simultaneamente ambos os analitos no modo amperométrico.

PALAVRAS-CHAVE: Plataforma eletroquímica microfluídica; Polidimetilsiloxano; Célula de fluxo integrada; Separação; Detecção simultânea.



ABSTRACT

Channel-based microfluidic devices have been useful in the miniaturized analytical system, however, the most critical part in the development of microfluidic platforms remains the detection system and its integration into the channel. Currently, electrochemical detectors are the most suitable for its integrations. There are many ways to manufacture the channel on microfluidic platforms, and, one way involves the use of alternative technologies that enable use of low-cost materials. This allows to produce several designs of microfluidic devices and new configurations of electrochemical detectors directly integrated. In this work, unconventional protocols were developed for building microfluidic devices based on polydimethylsiloxane (PDMS). As such, microfluidic devices with planar geometries, in which the internal channel (in the form of a serpentine), and a new configuration of electrochemical detection system were mounted onto a single chip. Target technology for produce microdevices is simple, low cost and requires minimal knowledge in microfabrication process. The proposed microfluidic platforms were tested for solve some problems arising from the use of automatic micropipettes during discrete injections as well as the use of surfactants into the carrier solution. The experimental results demonstrated the high performance of the integrated electrochemical detector system, showing high tolerance to the presence of air bubbles and no disturbance during the discrete injections. Also, we also showed the analytical performance of the PDMS-based microfluidic device for amperometric detection of salicylic acid (SA) in some aqueous samples. Then, this device was also used for separation of SA and caffeine (CAF) after activation of the inner channel wall with sodium hydroxide solution (2.0 mol L^{-1}) and further simultaneously detection of both analytes in amperometric mode.

KEYWORDS: Microfluidic electrochemical platform; Polydimethylsiloxane; Integrated flow cell; Separation; Simultaneous detection.



SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	9
OBJETIVOS.....	21
Objetivo Geral.....	21
Objetivos Específicos.....	21
CAPÍTULO II - NOVA CONFIGURAÇÃO DE DETECTOR ELETROQUÍMICO FABRICADO DIRETAMENTE NA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA BASEADA EM POLIDIMETILSILOXANO.....	22
2. Resumo.....	22
2.1 Materiais e métodos.....	23
2.2 Resultados e Discussão.....	29
2.3 Conclusão.....	54
CAPÍTULO III - SEPARAÇÃO E ELETROANÁLISE SIMULTÂNEA EM UMA ÚNICA PLATAFORMA BASEADA EM POLIDIMETILSILOXANO.....	55
3. Resumo.....	55
3.1 Materiais e métodos.....	56
3.2 Resultados e Discussão.....	61
3.3 Conclusão.....	77
4. REFERÊNCIAS.....	78



CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um dispositivo capaz de integrar as etapas de uma análise em uma única plataforma não é um fato recente, uma vez que em 1990 o conceito de sistemas miniaturizados para análises totais (μ TAS, do inglês micro total analysis systems) já havia sido proposto por Manz e colaboradores ¹. Este dispositivo foi capaz de integrar as etapas relacionadas ao preparo ou pré-tratamento da amostra, injeção, separação e detecção, possibilitando que esses processos pudessem ser realizados de forma automatizada em sistemas portáteis e integrados. A partir de então, este sistema despertou muita atenção de forma que muitos pesquisadores se empenharam em propor aplicações desse sistema em diversas áreas, sempre dando ênfase a possibilidade de miniaturização e vantagens, tais como a diminuição na quantidade de reagentes, amostras e espaço, o aumento da frequência analítica além da portabilidade ²⁻⁶. Acompanhando essa evolução, surgiram os dispositivos microfluídicos visando auxiliar no transporte das soluções fluídicas.

A tecnologia microfluídica trabalha em diversas plataformas, sendo estas plataformas aplicadas nos últimos anos como uma alternativa ao processamento em paralelo de uma mesma amostra de forma obter-se análises simultâneas de multicomponentes e também o aumento da frequência analítica ^{2-5,7}. Sendo assim, os chamados “laboratórios em chip” (do inglês Lab-on-a-chip) despontam como alternativas extremamente viáveis para expandir as aplicações em nano e/ou microanálise e ocupar um lugar de destaque nas mais variadas áreas da ciência ^{5,6,8}.

Mesmo com os avanços significativos na tecnologia dos dispositivos miniaturizados (lab-on-a-chip, dispositivos microfluídicos, entre outras adaptações em escalas picométricas), ainda são necessários muitos estudos, principalmente quanto ao desempenho quantitativo ⁵. O desenvolvimento de dispositivos miniaturizados/microfabricados em associação às técnicas eletroanalíticas proporciona vantagens como possibilidade de portabilidade, rapidez e maior frequência analítica, tornando as metodologias mais atrativas e com grande potencial inovador no processo de eletroanálise.

Outro campo muito importante e que precisa ser estudado está relacionado ao conhecimento dos contaminantes emergentes e seus efeitos ^{9,10}, no âmbito das matrizes de interesse socioambiental, como alimentos consumidos pelos humanos, águas fluviais entre outras amostras. No Brasil, ainda há necessidade de novos estudos voltados para a contaminação causada por esses agentes (principalmente medicamentos) como também



sobre seus efeitos toxicológicos, e por isso é de extrema importância o desenvolvimento de novas pesquisas visando auxiliar no desenvolvimento da comunidade quanto às necessidades de mudanças sociais, científicas e tecnológicas, conscientizando-os rumo ao desenvolvimento sustentável.

1.1 Microfluídica

A microfluídica é definida como a ciência e a tecnologia dos sistemas que se encontram dentro de canais integrados em microescala por onde pequenas quantidades de fluidos (geralmente 10^{-18} a 10^{-9} L) podem fluir em configurações projetadas que são controladas e manipuladas sistematicamente. A microfluídica se originou e teve sua primeira aplicação no desenvolvimento de métodos microanalíticos devido a características como: baixo custo, utilização de pequenas quantidades de amostra e reagentes, e curtos tempos de análise ^{6,8,11}. Pesquisas relacionadas a microfluídica tem crescido devido a importância desta técnica em proporcionar maior garantia na manipulação de pequenos volumes de fluidos, homogeneidade na formação de partículas, além de poder ser aplicada em diversas áreas como a farmacêutica, alimentícia e cosméticos, entre outras áreas que possibilite miniaturização dos processos ¹².

O desenvolvimento da microfluídica teve início no começo da década de 1950, com estudos realizados para a manipulação de pequenas quantidades de líquidos, na faixa de nanolitros a picolitros, fornecendo a base para a tecnologia atual de jato de tinta ¹³. Já o primeiro dispositivo analítico miniaturizado foi apresentado em 1979, no entanto não gerou interesse da comunidade científica da época. Dessa forma, a retomada nas pesquisas com dispositivos analíticos em miniatura ocorreu no início da década de 1990, com o desenvolvimento do primeiro sistema microfluídico de cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography - HPLC)¹, sendo que neste mesmo período, surgiu o conceito de micro sistemas para análises totais (micro total analysis systems - μ TAS) ou lab-on-a-chip, os quais tinham como objetivo a integração de várias etapas analíticas em um único dispositivo. Essas descobertas atraíram a atenção dos cientistas e impulsionaram as pesquisas utilizando a microfluídica. Ainda no final da década de 90, foi observada a miniaturização de diversos sistemas de análise, tais como dispositivos responsáveis por μ FIA, eletroforese em microchips planares, sistemas de espectrometria de massas, além do início das pesquisas de amplificação de DNA, metabolismo celular e biomoléculas em geral em sistemas miniaturizados ¹⁴. Por fim, a partir da década de 2000, surgiram os primeiros equipamentos microfluídicos comerciais, permitindo o desenvolvimento de diversos dispositivos utilizados para ensaios clínicos ¹⁵, além de ser observado um crescimento constante até os dias de hoje nos trabalhos que envolvem a microfluídica.



1.2 Dispositivos microfluídicos

Os dispositivos microfluídicos possuem uma grande variedade de configurações que dependem do nível de integração dos componentes e das funções desejadas. As plataformas mais simples são caracterizadas por possuírem canais microfluidicos gravados ou moldados em uma base, que são conectados as regiões de entrada e saída dos líquidos (ou gases) e a outros componentes como reservatórios e câmaras ¹⁶. Já os dispositivos microfluídicos mais complexos, os quais possuem como objetivo realizar todas as etapas que compõem uma análise em uma única plataforma de forma integrada e automatizada, incorporam aos dispositivos simples, diversos outros componentes em microescala, tais como reatores, bombas, misturadores, colunas cromatográficas e detectores ¹⁵.

Os dispositivos miniaturizados permitem também a realização de análises em fluxo de uma maneira mais “verde”, ou seja, mais amigável ao meio ambiente, a qual é uma tendência mundial na Química Analítica, e tem por base o uso de metodologias com consumo reduzido de reagentes e/ou geração de resíduos tóxicos para a saúde humana e para o meio ambiente ¹⁷. Utilizando a microfluídica pode-se construir dispositivos simples ou mais complexos que permitem promover separações e detecções com alta resolução e sensibilidade, menor tempo de análise, e baixo custo ^{18,19}.

Considerando o tipo de análise a ser feita e conseqüentemente as necessidades de seu processamento, os dispositivos microfluídicos devem ser capazes de desempenhar algumas funções ou operações básicas, cujas as principais incluem o preparo de amostra, a separação de compostos, o transporte dos líquidos e a detecção das espécies de interesse. As funções requeridas e o objetivo geral da análise irão definir a configuração, os componentes e a complexidade do dispositivo microfluídico a ser utilizado. Associando processos litográficos à tecnologia microfluídica são executáveis os chamados “lab-on-a-chip”, capazes de unir em um único chip todas as funções de um laboratório, sem ser preciso grande qualificação do operador. Todo procedimento laboratorial, incluindo transferência de amostras, mistura de reagentes e seleção de materiais é realizado em um único dispositivo de poucos centímetros quadrados ^{15,20}.

Fazendo uso da miniaturização, pode-se também integrar os elementos fluídicos com as partes ópticas e elétricas e isso permite usar dispositivos “lab-on-a-chip” em diversas áreas ²¹⁻²⁴, mantendo os benefícios de redução do volume de reagentes e descartes, redução nos custos e aumento das velocidades de reação. Na última década, os dispositivos microfluídicos em papel apresentaram avanços significativos no que diz respeito a sua aplicação real como lab-on-a-chip ²⁸. Nesse caminho, outro tipo de microdispositivo que tem apresentado elevado potencial para a comercialização no mercado é a microfluídica



em canal, ainda que para este persistam alguns desafios a serem superados ^{25,26}.

1.3 Métodos convencionais e alternativos para construção de dispositivos microfluídicos

Inicialmente os métodos de fabricação de dispositivos microfluídicos baseavam-se em adaptar as já conhecidas técnicas de montagem e fabricação de circuitos integrados e de sistemas micro-eleto-mecânicos (“*micro-electro-mechanical systems*”, MEMS) utilizando como base o silício. Dessa forma, a produção se dava pela utilização de técnicas de fotolitografia, de metalização em filme fino, e de corrosão química. Um pouco após essa fase, deu-se a construção de dispositivos à base de vidro, vidro-silício e vidro-polímeros ²⁷⁻³⁰.

Os dispositivos cuja fabricação se dava a partir do vidro apresentavam melhores respostas quando se tratavam de aplicações biomédicas, considerando sua biocompatibilidade. Outra característica muito importante desse material era sua possibilidade em ser utilizado também para aplicações que envolvessem o uso de altas temperaturas ou solventes agressivos, como no caso da análise química por eletroforese capilar ³⁰⁻³².

Todavia o uso tanto do vidro quanto do silício como matrizes para os dispositivos microfluídicos ainda trazia consigo elevadas dificuldades, considerando que estes materiais apresentavam propriedades que ainda limitavam o seu uso em microfluídica. O silício, especificamente, tem como característica não apresentar transparência óptica em comprimentos de onda de interesse, o que pode ser considerado uma questão significativa, além disso apresenta dificuldades relacionadas aos processos de micromanufatura. Quando levado em consideração os custos elevados de fabricação ao se utilizar tanto do vidro quanto do silício, as dificuldades na utilização desses materiais são ainda mais perceptíveis. Dessa forma, se fez extremamente necessária o desenvolvimento de materiais cuja fabricação fosse mais simples e de baixo custo, sem perder a eficiência, fazendo com que se popularizasse o uso de materiais poliméricos em microfluídica ^{30,33}.

Atualmente, diversas técnicas de prototipagem são empregadas para a fabricação destes microdispositivos poliméricos: gravação a quente, ou “*hot embossing*”; moldagem por injeção e litografia macia ³⁰. Existem ainda as chamadas técnicas de fabricação direta de dispositivos microfluídicos, como: a fotoablação a laser ou micromanufatura a laser; a fotolitografia ou litografia óptica e a litografia por raios-X ^{30,34}. Cada método apresenta vantagens e desvantagens, devendo ser escolhido de acordo com as possibilidades técnicas e com as funcionalidades e características desejadas ³⁰.

Comparando os materiais poliméricos conhecidos, destaca-se que o



polidimetilsiloxano (PDMS) é o material mais utilizado para aplicações em microfluídica. Este material elastômero é muito empregado em biomedicina, sendo produzido com rigoroso controle de qualidade e a preço consideravelmente baixo. Outra vantagem significativa do PDMS é sua considerável facilidade em ser moldado e sua possibilidade de soldagem química a outros materiais por oxidação com plasma ^{35,36}. Adicionalmente, outra característica útil deste material é a transparência à luz visível. Assim, o PDMS pode ser integrado a dispositivos ópticos de monitoramento e sensoriamento convencionais, como fibras ópticas e câmeras CCD - “*charge-coupled device*” ³⁶.

Uma desvantagem do uso de PDMS em relação a materiais inertes como o vidro e o silício é a tendência à adsorção de pequenas moléculas hidrofóbicas, o que desfavorece o trabalho com amostras e solventes orgânicos. Portanto, pode haver interação de diversas moléculas de interesse com a superfície do PDMS, o que prejudica a análise dos resultados obtidos para algumas proteínas, enzimas e medicamentos. Porém, é possível modificar estas propriedades de adesão e interação do PDMS por meio de tratamentos superficiais, tais como a deposição superficial de polímeros hidrofílicos ^{36,37}. A literatura possui várias publicações que utilizam procedimentos alternativos para fabricar dispositivos microfluídicos não-planares complexos baseados em canais, nos quais os canais e suas dimensões destacadas são projetados de maneira fácil e rápida ³⁸⁻⁴².

A fabricação de dispositivos microfluídicos usando técnicas convencionais é, em geral, complicada, demorada e requer equipamentos de alto custo bem como instalações de salas limpas e sofisticadas⁴³. No Brasil, ainda há poucos grupos desenvolvendo pesquisas nesta área, especialmente, no que se refere ao uso de tecnologias alternativas de baixo custo. Ademais, existem alguns desafios a serem superados no uso de técnicas alternativas aplicadas na construção de dispositivos microfluídicos com microcanais em arranjos 3D bem como sua integração com técnicas de detecção que possibilitem a miniaturização. A tecnologia de impressão tridimensional (3D) apresenta uma alternativa promissora às técnicas tradicionais, não só por permitir moldar, tanto tecnologicamente quanto manualmente, diferentes designs de microcanais de forma rápida e com custos reduzidos em relação à infraestrutura institucional, instalação de equipamentos e manutenção^{44,45}. Cita-se como exemplo, a tecnologia proposta por Saggiomo & Velders ⁴⁰, na qual os dispositivos microfluídicos são construídos por etapas simples de execução, sem a necessidade de equipamentos sofisticados bem como de experiências em microfabricação como nas tecnologias convencionais. Além disso, os autores apresentam outras possibilidades de fabricação de microdispositivos, as quais envolvem a impressão em impressora 3D (material ABS, acrilonitrila butadieno estireno) de diferentes tipos de canais e microcanais, cujos “*designs*” podem servir de moldes para a fabricação das plataformas



microfluidicas. O design do microcanal formado pelo polímero ABS é, posteriormente, inserido em um molde que recebe o PDMS líquido e, após cura do PDMS, dissolve-se o ABS usando acetona, um solvente em que o PDMS é insolúvel, deixando uma cavidade dentro da plataforma. Com este método, qualquer estrutura de microcanal em arranjos 3D pode ser criada em apenas duas simples etapas, basicamente sem conhecimento ou experiência em microfabricação ou litografia e, mais especificamente, sem a necessidade de laboratórios com salas limpas ou com equipamentos sofisticados. Mesmo que a tecnologia proposta por Saggiomo & Velders ⁴⁰ seja simples e de baixo custo, precebe-se que ainda necessita de adaptações significativas para contornar os desafios de conexão com os sistemas de injeção e de detecção. Portanto, ainda há espaço para aperfeiçoar esta tecnologia propondo novas formas de construção de dispositivos microfluídicos com ajustes nas etapas de injeção — tanto do analito quanto da fase móvel — e de detecção. O PDMS também possui características desejáveis que permitem facilmente manipular e criar uma variedade de microcanais internos projetados, sendo o material polimérico mais popular usado para fabricar os chamados chips baseados em PDMS por meio de tecnologias alternativas ^{8,40,46,47}. No entanto, a maioria dos sistemas microfluídicos baseados em chip compreende dispositivos baseados em canais em microescala acoplados a equipamentos externos em macroescala (por exemplo, bomba fluídica e dispositivos de aquisição de sinal) ²⁵. Portanto, para alcançar os benefícios relacionados ao sistema miniaturizado baseado em PDMS, o sistema interno de canais e os detectores devem ser montados em uma plataforma de chip único além de ser produzidos em massa com materiais de baixo custo ^{25,26,48}. Assim, para consolidar a microfluídica baseada em canal como verdadeiro lab-on-a-chip, ainda são necessários grandes esforços de pesquisas para microfabricar plataformas multifuncionais e interfaces eletrônicas (equipamentos auxiliares portáteis e/ou sistema detector) pelos quais a detecção e a aquisição do sinal são processadas ^{25,49}.

1.4 Detectores eletroquímicos

Mesmo com as vantagens supracitadas dos dispositivos microfluídicos, um dos pontos mais críticos e, ao mesmo tempo crucial, é o sistema de detecção e sua integração ao microcanal, uma vez que muitos são os requisitos necessários para a miniaturização ⁵⁰. Uma grande variedade de detectores tem sido empregada em microfluídicas (por exemplo, ultravioleta visível, fluorescência induzida por laser, espectrometria de massas, entre outros), entretanto, esses dispositivos possuem custo elevado, consomem muita energia e não são realmente portáteis ⁵¹. Levando em consideração esses aspectos é correto afirmar que os detectores eletroquímicos (DE) são os mais adequados para essa integração, pois se



adequam a miniaturização ao mesmo tempo em que permanecem extremamente sensíveis com baixos limites de detecção (LODs), baixo consumo de energia e compatibilidade com sistemas avançados de microusinagem. Outras características que devem ser consideradas desses tipos de detectores são sua fácil portabilidade e seu notável custo-efetividade ^{50,51}.

De uma maneira simplificada, um DE convencional pode ser integrado nas plataformas microfluídicas em duas formas principais: dentro do canal (on channel) ou próximo do final do canal (end-channel), sendo as duas opções suscetíveis aos prós e contras ^{51,49}. Apesar de todas as vantagens já citadas dos DEs, pode ser um desafio utilizá-los em micro e nanosistemas. Embora os conceitos e instrumentação necessários para medidas em tais detectores sejam bem desenvolvidos na escala macroscópica, alguns pequenos ajustes são frequentemente necessários em sistemas miniaturizados e isso muitas vezes pode limitar a precisão e o desempenho desses detectores ⁵¹.

Os DEs provaram ser dispositivos fáceis de se construir, econômicos e adequados para integrar-se como sistemas de eletrodos removíveis em dispositivos microfluídicos ^{49,50,52}. No entanto, enquanto o sistema de detecção eletroquímico permite reduzir o tamanho para viabilizar a portabilidade, também é justo dizer que muitas detecções eletroquímicas são limitadas em sua aplicação eletroanalítica ^{49,50,52,53}. Isso ocorre devido aos requisitos tradicionais, nos quais muitos dispositivos microfluídicos com detectores eletroquímicos são montados — no canal de fluxo — para que os eletrodos (trabalho, referência e contra-eletrodo) sejam colocados em contato direto com solução do fluxo ^{49,50}. Na prática, essa configuração pode ter problemas que inibem a aplicação em caso de fluxo não laminar, no qual podem surgir a formação de bolhas pelo uso de surfactantes ou mesmo por pulsações geradas pelo uso de injeção discreta via pipeta eletrônica ⁴⁹.

Trindade e colaboradores ⁴⁹ mostraram que o aparecimento das bolhas de ar fornece um problema real no bloqueio da superfície do eletrodo de trabalho (ET) e/ou no eletrodo de referência (ER) que surge quando uma célula de fluxo eletroquímica convencional foi usada. Para resolver esses problemas, foi proposta uma nova configuração de célula de fluxo na qual o ER foi colocado em um compartimento separado (isolado do microcanal em fluxo), enquanto o ET e o contra eletrodo (CE) permaneceram em contato direto com ambos os compartimentos. Nesse caso, a célula de fluxo foi montada como um dispositivo externo e, em seguida, conectada a plataforma microfluídica com canal em forma de espiral. No entanto, algumas das principais desvantagens foram relacionadas à montagem do sistema de detector e do canal que não foram na mesma plataforma. Com base nesse trabalho, o objetivo desse trabalho foi aperfeiçoar esta tecnologia propondo novas formas de construção de dispositivos microfluídicos com ajustes nas etapas de injeção — tanto do analito quanto



da fase móvel — e de detecção. Assim, dispositivos inovadores baseados na miniaturização de plataformas eletroquímicas microfluídicas serão construídos de forma a montar as etapas de injeção e detecção em apenas uma plataforma. Outra novidade será a configuração de célula na qual o arranjo dos eletrodos de trabalho, auxiliar e, principalmente, o eletrodo de referência serão montados de forma a não ser afetado por perturbações decorrentes de adaptações do sistema de injeção (ex.: uso de micropipetas automáticas) e presença de bolhas de ar (geradas durante o processo de infusão bem como pelo uso de surfactantes).

1.5 Contaminantes emergentes

O assunto dos contaminantes emergentes (ou contaminantes de preocupação emergente) alcançou notoriedade apenas na década passada, e a partir de então está sendo tratada em diferentes vertentes por vários grupos de pesquisa ao redor do mundo. Entretanto, os primeiros estudos com essas substâncias relacionadas ao meio ambiente são datados de 1980, uma vez que foi nesse período que novas técnicas de extração em conjunto com o grande progresso das técnicas analíticas hífenadas, como cromatografia gasosa ou líquida acoplada a espectrometria de massas (GC-MS e LC-MS), possibilitaram quantificar contaminantes de origem orgânica em matrizes ambientais em valores extremamente baixos ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1})⁵⁴.

Os contaminantes emergentes são centenas de compostos encontrados nos mais diversos compartimentos ambientais como solos, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas⁵⁵. As principais fontes desses contaminantes são as antrópicas (efluentes domésticos, industriais, hospitalares e aqueles resultantes das atividades agrícola e pecuária), entretanto, estes também podem ter origem natural (por exemplo, algumas espécies de plantas)⁵⁶. Dentre as classes de compostos químicos pertencentes aos contaminantes emergentes estão os fármacos e produtos de higiene pessoal e seus metabólitos ou produtos de degradação, drogas ilícitas, nanomateriais, retardantes de chama, plasticizantes, interferentes endócrinos, hormônios, pesticidas, sucralose e outros adoçantes artificiais, subprodutos provenientes de processos de desinfecção de águas, além de alguns microorganismos e toxinas de algas^{55,57,58}.

Como mencionado anteriormente, as principais fontes de introdução dos contaminantes orgânicos no ambiente são oriundas das atividades antrópicas, sendo principalmente originada dos efluentes das estações de tratamento de esgoto (efluentes sanitários e industriais). Outras fontes muito significativas de contaminação do ambiente são os fármacos de uso veterinário, além do escoamento superficial e o vazamento de fossas sépticas e aterros sanitários⁵⁹. As rotas de dispersão dos fármacos e de outros



contaminantes orgânicos no ambiente são complexas ⁶⁰ e necessitam de muitos estudos para serem compreendidas e explicitadas de maneira clara e coerente.

1.6 Contaminantes emergentes encontrados no Brasil

Fármacos: uma das classes mais estudadas em todo o mundo devido ao fato de serem lançados no ambiente em elevadas quantidades e constantemente ⁵⁶. Essa classe inclui todas as drogas consumidas de uso humano ou veterinário, sendo essas descritas ou não por médicos, além de suplementos alimentares. É notável o aumento no consumo desses medicamentos, não só no Brasil, mas também em todo o mundo ⁶¹, principalmente os que não necessitam de prescrição médica (analgésicos e antitérmicos) e os de uso contínuo (reguladores lipídicos, anticoncepcionais e antidepressivos), e por conta disso uma quantidade muito maior desses contaminantes está sendo encontrada em amostras ambientais. Os maiores cuidados devem ser com os fármacos de origem hormonal, uma vez que estes apresentam elevada capacidade de interferência endócrina; e também os fármacos psicoterápicos, já que possuem ação direta no sistema nervoso central; além dos fármacos antimicrobianos, responsáveis por ocasionarem um aumento na proporção de bactérias resistentes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), são fundamentais que se invistam na realização de novas pesquisas visando a elaboração de novos medicamentos antimicrobianos, vacinas e instrumentos de diagnóstico ⁶². No presente estudo serão desenvolvidas metodologias eletroanalíticas para determinação dos fármacos ácido salicílico e cafeína (Figura 1.1) como analitos modelo em diferentes amostras aquosas.

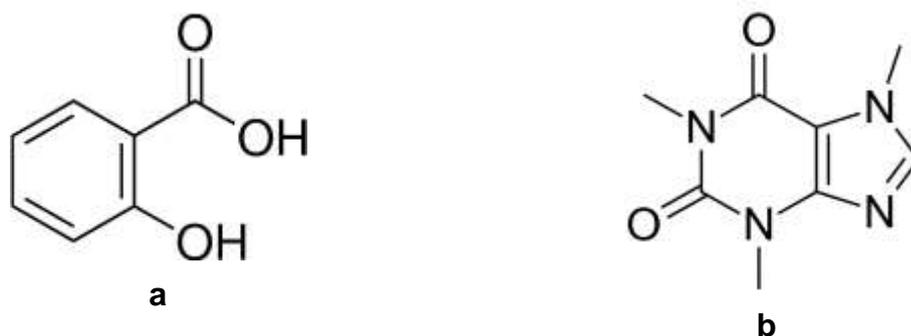


Figura 1.1- Fórmula estrutural dos contaminantes: ácido salicílico (AS, a) e cafeína (CAF, b).

Produtos de higiene pessoal: cosméticos, fragrâncias, compostos antimicrobianos, antioxidantes e cremes preservativos, inseticidas repelentes e os protetores solares (um dos



produtos que teve um consumo mundial muito elevado nos últimos anos). Um fato muito preocupante em relação a esses produtos é que os componentes dos mesmos são em sua maioria lipossolúveis, o que significa um elevado processo de bioacumulação ⁵⁸. Além disso, cita-se o fato que alguns desses componentes não são totalmente eliminados pelos processos de tratamento convencionais de água e esgoto ⁶³. Sendo o Brasil um dos maiores consumidores desses produtos no mundo, é extremamente preocupante e alarmante a atual situação do país em relação a quantidade desses contaminantes no ambiente, principalmente, nas áreas de maior concentração populacional, o que torna extremamente necessários mais estudos nessa área.

Drogas ilícitas: como essas substâncias não tem o uso permitido é praticamente impossível regular a quantidade desses contaminantes no ambiente, pois não se tem sequer uma proporção exata da quantidade que é consumida. Mesmo com os trabalhos descritos na literatura, capazes de detectar quantidades traços desses contaminantes ⁶⁴⁻⁶⁶, ainda existe a necessidade de muitos estudos para conhecer não só o quanto deles é depositado todos os anos no ambiente, más também quais são os seus efeitos toxicológicos.

Compostos de uso industrial: os principais exemplos dessa classe são o bisfenol A, os alquilfenóis, as bifenilas policloradas, os ftalatos, os compostos perfluorados e os retardantes de chama ^{58,63}. Esses compostos foram encontrados em amostras de esgoto, águas superficiais e de abastecimento público no Brasil em concentrações entre 0,040 e 78250 ng L⁻¹. O principal motivo de preocupação está nas quantidades em que esses contaminantes são deixados no ambiente, tendo em vista que na maioria dos casos ainda não são estabelecidos padrões de emissão, logo, ainda não existe um valor máximo específico para o descarte deste tipo de contaminante pelo efluente. Assim como os produtos de higiene pessoal, grande parte desses contaminantes são lipossolúveis, além de que alguns são ainda classificados como poluentes orgânicos persistentes ^{56,58}.

Pesticidas: Uma das classes de contaminantes mais preocupantes, quando se leva em consideração a questão ambiental, sendo a classe de compostos mais estudada no Brasil ⁵⁶. O Brasil é, desde de 2008, o maior consumidor de pesticidas do mundo. Ainda assim, a regulação brasileira é deficiente em seus critérios, principalmente em relação a de qualidade da água, estando estes critérios baseados em agências regulamentadoras de outros países ou na organização mundial da saúde (OMS), sem levar em consideração a quantidade excessiva de pesticidas utilizados e nem mesmo as diferenças regionais do país. São deixados de lado também os possíveis efeitos da exposição crônica a esses pesticidas tanto nos seres vivos quanto no meio ambiente, mesmo que esses se encontrem demasiadamente diluídos ⁵⁶.



Interferentes endócrinos: podem ser definidos como um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento ⁶⁷. Algumas agências ambientais e organizações não-governamentais classificam os interferentes endócrinos em três classes principais: os estrogênios naturais, os estrogênios sintéticos e os xenoestrogênios. Os estrogênios sintéticos apresentam maior capacidade de interferir no sistema endócrino humano em comparação aos demais tipos de estrógenos, enquanto que os xenoestrogênios são menos potentes, porém mais prováveis de serem encontrados no ambiente ⁵⁶.

1.7 O Aspecto Regulatório

O Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP) e a OMS consideram extremamente essencial e urgente ter-se o entendimento das fontes, transformações e destino dos contaminantes emergentes no ambiente. Dessa forma, os legisladores são desafiados a tratar com mais de mil substâncias diferentes que necessitam ser muito bem trabalhadas visando sua regulamentação. Esta decisão foi tomada levando-se em consideração as evidências de inúmeros danos observados às populações silvestres, bem como de possíveis alterações observadas em seres humanos e a ocorrência no meio ⁵⁶. Sendo assim, diversos países implementaram metodologias para a priorização de contaminantes ambientais. Estes métodos têm critérios definidos para avaliar, selecionar e agrupar substâncias.

No Brasil, ainda não são encontrados registros de programas oficiais voltados para a questão dos contaminantes emergentes, muito embora as discussões nos diferentes setores da sociedade têm aumentado significativamente nos últimos anos e as pesquisas acadêmicas têm contribuído expressivamente, fornecendo inúmeros subsídios para tomadas de decisões, o que tem despertado o interesse de reguladores, empresas de saneamento, órgãos governamentais e a população em geral ⁵⁶, entretanto, ainda são necessários muitos estudos para que haja mudanças nesse cenário.

A legislação brasileira ainda é muito incompleta em seus critérios de qualidade. Um exemplo disso é que dentre os milhares de compostos consideradas contaminantes emergentes, apenas cerca de 30 pesticidas (algo em torno de 7,0% de todos os pesticidas autorizados no Brasil) estão contemplados na Portaria MS 2914/2011 e/ou nas Resoluções CONAMA 357/2005 e 396/2008, que tratam da qualidade das águas superficiais e subterrâneas, respectivamente ⁵⁶. Isso mostra o quanto nosso país ainda precisa evoluir no aspecto regulatório dos contaminantes emergentes.

Mesmo o cenário brasileiro evoluindo muito em relação às pesquisas envolvendo



contaminantes emergentes, ainda são necessários muitos estudos. Portanto, existem poucos trabalhos se considerarmos o tamanho e as diferenças socioeconômicas do nosso país. O nosso papel como pesquisadores vai muito além de introduzir os processos regulatórios, precisa-se estar sempre um passo à frente, desenvolvendo trabalhos que visem, acima de tudo, proporcionar a qualidade do ambiente ao qual fazemos parte.



OBJETIVOS

Objetivo Geral

Construir dispositivos microfluídicos baseados em polidimetilsiloxano utilizando procedimentos alternativos e de baixo custo e usá-los na determinação eletroquímica de ácido salicílico e cafeína em amostras ambientais.

Objetivos Específicos

Desenvolver novas configurações de sistemas eletroquímicos de detecção integrados diretamente em plataformas microfluídicas baseada em polidimetilsiloxano.

Modificar a parede interna dos canais da plataforma microfluídica para aplicação na separação de ácido salicílico e cafeína realizando apenas uma etapa de ativação.

Utilizar as plataformas microfluídicas para análise de amostras de águas contaminadas previamente com ácido salicílico e cafeína.



CAPÍTULO II

NOVA CONFIGURAÇÃO DE DETECTOR ELETROQUÍMICO FABRICADO DIRETAMENTE NA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA BASEADA EM POLIDIMETILSILOXANO

2. RESUMO

Neste capítulo foi desenvolvido um dispositivo microfluídico baseado em polidimetilsiloxano, no qual o canal interno (formato de serpentina) e um novo design de célula eletroquímica (sistema detector duplo) foram montados em um único chip. A plataforma contém um reservatório totalmente integrado, no qual o eletrodo de referência foi montado de forma a separá-lo do fluxo da solução. O dispositivo foi devidamente caracterizado visando avaliar a influência da geometria e diâmetro do canal bem como a performance eletroquímica frente à configuração clássica. Com o objetivo de atestar a aplicabilidade do dispositivo microfluídico proposto, foi utilizada a detecção amperométrica para a análise de água de torneira e de lago, bem como amostras de águas subterrâneas para determinação de ácido salicílico — selecionado como analito modelo. Os resultados obtidos foram promissores como detector eletroquímico em microcanal baseado em polidimetilsiloxano, mostrando alta tolerância à presença de bolhas de ar, ausência de perturbação pela ação externa exercida com o uso da micropipeta eletrônica além de nenhuma inativação da superfície dos eletrodos pela interferência da amostra.



2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Reagentes, soluções e amostras.

O ácido salicílico (AS) foi adquirido da Sigma-Aldrich® e a solução padrão foi preparada semanalmente com uma concentração de $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ dissolvendo o reagente sólido em água ultrapura. As soluções de trabalho foram preparadas diluindo-se — na concentração necessária — a solução padrão estoque no eletrólito suporte usado como transportador. O eletrólito suporte que serviu como transportador foi a solução tampão Britton-Robinson (B-R) a $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, e foi preparado misturando-se ácido acético, ácido fosfórico e ácido bórico (todos Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) na concentração de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. O pH necessário foi ajustado usando ácido clorídrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) ou hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), e a força iônica ajustada com cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil). Uma solução de ácido sulfúrico $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) foi utilizada como eletrólito de suporte durante a limpeza dos eletrodos de Pt montados na plataforma microfluídica.

O hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado e o hexacianoferrato (III) de potássio foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil) e utilizados como sonda redox. O polímero elastômetro polidimetilsiloxano (PDMS) e o agente de cura (agente de reticulação) utilizados neste estudo (chamados de cell guard) foram adquiridos na MLSolar (Michigan, Estados Unidos). Amostras de água subterrânea, lago e água da torneira foram coletadas na cidade de Dourados (Dourados, MS, Brasil) e contaminadas com três níveis de concentração ($7,50$; $60,0$ e $110 \mu\text{mol L}^{-1}$) de analito. As amostras de água contaminadas foram preparadas adicionando quantidades necessárias da solução-padrão e, a seguir, ajustando-se o valor de pH requerido. As amostras de água contaminadas foram armazenadas em frascos de vidro e, antes da análise, as alíquotas necessárias foram filtradas com filtro de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore).

2.1.2 Instrumentação e sistema eletroquímico

As medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas usando um bipotentiostato/galvanostato $\mu\text{STAT 400}$ portátil (DropSens®, Oviedo, Espanha), que foi gerenciado pelo Software DropView para controle experimental e tratamento de dados. Os ajustes de pH foram realizados utilizando um eletrodo de vidro combinado (Hanna®, modelo HI 1131B, Texas, Estados Unidos) conectado a um medidor de pH digital (Hanna®, modelo HI 3221, Texas, Estados Unidos). Água deionizada ($R \geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) usada para preparar soluções de trabalho foi obtida em um purificador de água de osmose reversa OS 10 LTXE



(Gehaka[®], São Paulo, Brasil). Quando necessário, uma estufa (Ethik[®] technology, São Paulo, Brasil) foi usada para acelerar o processo de cura do PDMS. Uma micropipeta eletrônica portátil automática (Eppendorf[®], modelo Multipette E3x, Hamburgo, Alemanha) foi usada para realizar uma pressão hidrodinâmica para injeção discreta (na junção em forma de T) do padrão e das amostras. Foram utilizadas pontas de micropipeta de 1000 e 2500 μL para injetar volumes discretos da solução e das amostras. Uma bomba de seringa (SDAMED, modelo SDA400, São Paulo, Brasil) e seringas comuns de 5, 10 e 20 mL foram usadas para conduzir o transportador para o canal microfluídico. Uma bomba de vácuo (Primatec, modelo 131 - Tipo 2 VC, São Paulo, Brasil) e um dessecador foram utilizados para eliminar bolhas do PDMS antes do processo de cura. Uma impressora 3D (modelo CoreH4, GTMAX3D[®], Americana, São Paulo, Brasil) foi usada para impressão dos moldes de canais microfluídicos. As imagens reais dos dispositivos foram coletadas usando uma câmera digital (20,1 MP) super HAD CCD sensor de zoom óptico de 63X (Sony, DSCH400). Ademais, foram obtidas imagens utilizando um microscópio óptico (BEL Photonics[®], modelo B3 T, Monza, Itália) acoplado a uma câmera digital de alta resolução (BEL Photonics[®] HD-CAM light USB 6MP, Monza, Itália). O diâmetro interno dos microcanais foi medido analisando as imagens com o software AxioVision Rel. 4.8 e, a seguir, obtidos histogramas com aproximadamente 50 pontos de medidas.

2.1.3 Design do canal e fabricação da plataforma microfluídica

A Figura 2.1 mostra as principais etapas envolvidas no processo de construção da plataforma baseada em PDMS.

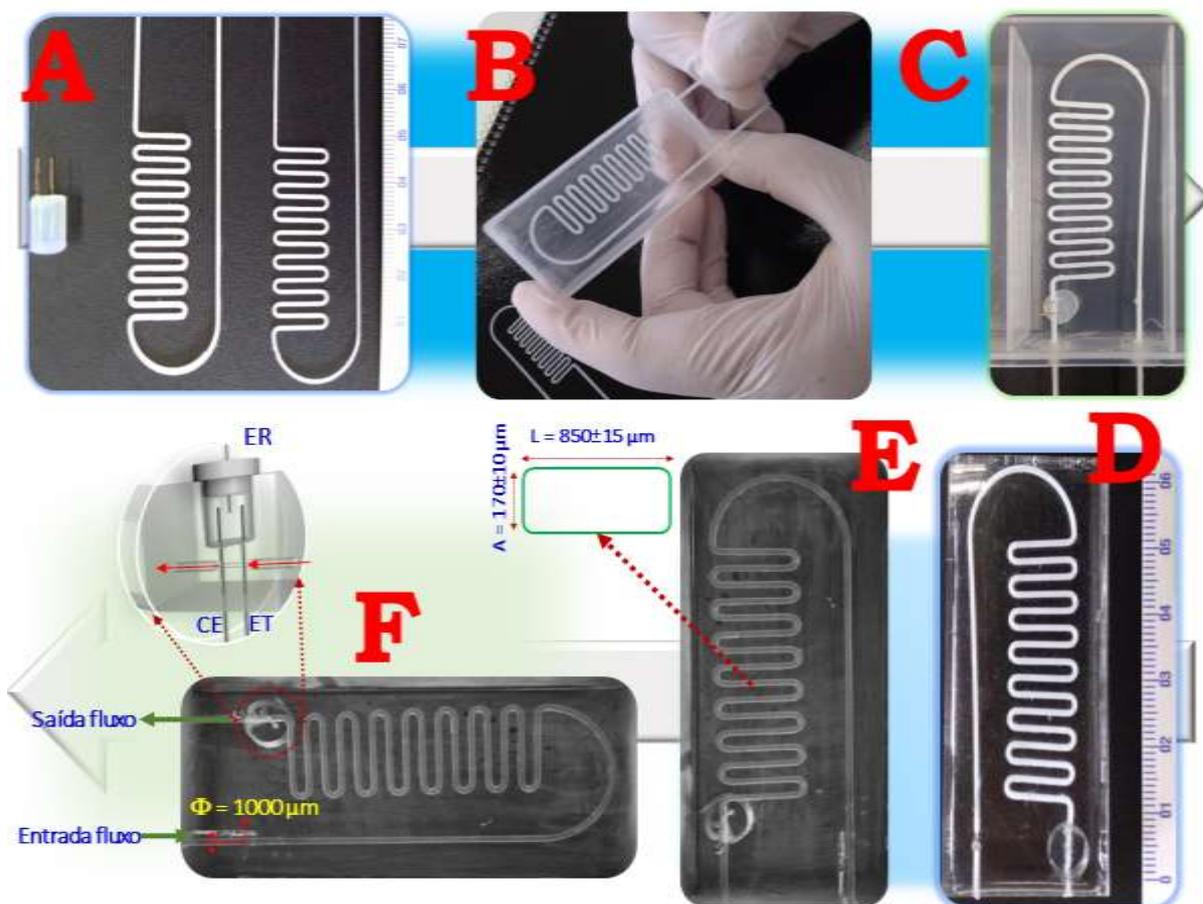


Figura 2.1 - Imagem real mostrando as principais etapas da construção da plataforma baseada em PDMS: (A) molde do canal plano impresso (em forma de serpentina) e o pedaço de bastão de cola quente; (B) o ajuste do molde à base de ABS dentro da caixa de plástico; (C) a mistura desgaseificada no molde da plataforma contendo os canais à base de ABS deixada para cura; (D) a plataforma baseada em PDMS curada com o molde baseado em ABS dentro e a cavidade para projetar o ER; (E) a cavidade vazia projetando o canal na plataforma baseada em PDMS (F) vista lateral da célula eletroquímica integrada no dispositivo microfluídico tendo a matriz PER, ET e CE.

O processo usado para criação dos microcanais consistiu na impressão dos moldes em formato de serpentina (Figura 2.1A), criados usando arquivos de desenho assistido por computador (CAD) (Autodesk® Inventor, Inc., San Rafael, Califórnia, Estados Unidos). A seguir, os moldes foram impressos com filamento de acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) (1,75 mm) usando modelagem de deposição por fusão (FDM) com diâmetro do bico extrusor de 500 μm . O procedimento possibilitou obter moldes de canais com dimensões de 45 mm x 10 mm x 0,8 mm (comprimento x largura x altura), com apenas 5 minutos para impressão. Um pedaço de bastão de cola quente foi usado para fazer o compartimento externo, no qual o pseudo-eletrodo de referência (PER) pôde ser fixado. Fios de cobre (250 μm) foram fixados por cima do bastão de cola quente para criar cavidades vazias, a fim de inserir os



eletrodos de trabalho (ET) e contra eletrodo (CE) (Figura 2.1A). Os canais baseados em ABS foram colocados em uma caixinha plástica (Figura 2.1B) para criar a plataforma com comprimento e o design necessário.

Antes de preencher a caixa com o elastômero (PDMS) e o agente de cura, ambos foram misturados com uma proporção de 10:1 (m/m) por cerca de 10 minutos e desgaseificados em uma bomba de vácuo por aproximadamente 20 minutos para remover as bolhas de ar. Depois disso, a mistura desgaseificada foi vertida no modelo de plataforma contendo os canais à base de ABS e deixada durante a noite para a cura (Figura 2.1C). Após a cura completa do PDMS, o chip foi removido da caixa de plástico (Figura 2.1D) e imerso em acetona à temperatura ambiente para dissolver o molde de canais à base de ABS incorporado. Com a ajuda de uma pipeta Pasteur e/ou uma seringa para forçar a entrada de acetona no canal, a remoção do molde à base de ABS levou menos de duas horas para ser completada. Após essas etapas, a plataforma eletroquímica microfluídica (chip baseado em PDMS) foi criada pela cavidade vazia no interior do PDMS (Figura 2.1E).

Para montar o sistema eletroquímico, fios de platina (420 μm de diâmetro) foram alinhados verticalmente, os quais serviram como ET e CE em contato direto com os dois compartimentos (Figura 2.1F). A seção do compartimento externo é um reservatório de líquido que inclui um fio de platina (420 μm de diâmetro) que serviu para deixar o pseudo-referência separado do fluxo. O microsistema também contém orifícios de entrada e saída para conectar tubos de politetrafluoroetileno (PTFE) e fornecer acesso aos canais microfluídicos (Figura 2.1F). É importante mencionar que os canais de entrada e saída são mais grossos que o canal microfluídico para melhor conexão dos tubos de PTFE e evitar vazamentos. O diâmetro interno do tubo de PTFE foi de 500 μm e externo de 1000 μm . O modo de junção em T — usado para conectar a micropipeta eletrônica automática durante a injeção discreta de analito/amostra — foi criado por um dispositivo com três vias (PEEK Tee, 1/16").

2.1.4 Configuração experimental e estudos eletroquímicos em condições estacionárias e em fluxo

A Figura 2.2 mostra a imagem real esquematizando a configuração do sistema montado, sendo composta por três partes principais.

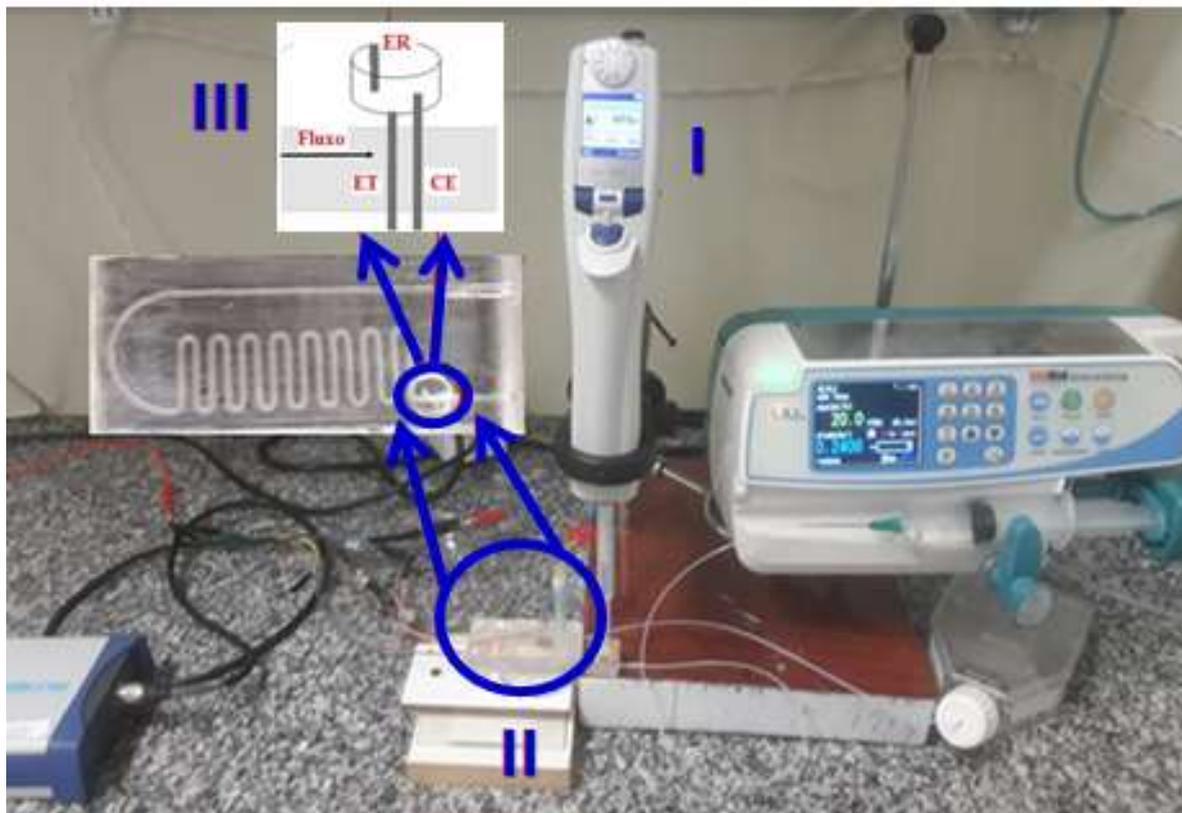


Figura 2.2 - Imagem mostrando a configuração experimental da microfluídica: sistema e dispositivos externos. (I) bomba de seringa, conectores de tubos, suporte do chip e micropipeta eletrônica portátil; (II) plataformas eletroquímicas baseadas em PDMS; e (III) sistema eletroquímico integrado a plataforma microfluídica baseada em PDMS.

A primeira parte do sistema é uma micropipeta eletrônica portátil conectada em uma junção em T para injeções discretas do analito e/ou amostra no fluxo contínuo do transportador (Figura 2.2I). A segunda é a plataforma eletroquímica baseada em PDMS (Figura 2.2II), na qual o canal principal usado neste estudo foi de $170\ \mu\text{m}$ (altura, A) x $850\ \mu\text{m}$ (largura, L). A terceira parte é o sistema eletroquímico diretamente integrado a plataforma microfluídica (Figura 2.2III). Diferentemente do trabalho desenvolvido anteriormente por Trindade e colaboradores,⁴⁹ nessa nova configuração, o sistema eletroquímico foi totalmente integrado ao chip baseado em PDMS. A extremidade linear do canal de fluxo (diâmetro = $1000\ \mu\text{m}$) foi modelada para montar fios de platina ($420\ \mu\text{m}$ de diâmetro) para servir como eletrodo de trabalho (ET) e contra eletrodo (CE), ambos alinhados transversalmente para ter contato direto tanto com o canal (fluxo de solução) quanto com o compartimento superior (Figura 2.2III). O reservatório externo (separado do fluxo) serviu como compartimento para montagem de um sistema eletroquímico clássico contendo os três eletrodos: ET, CE e o pseudo-eletrodo de referência (PER) todos feitos com fio de platina ($420\ \mu\text{m}$ de diâmetro).



As superfícies dos eletrodos foram limpas a partir de registro de voltamogramas cíclicos sucessivos entre -0,50 e +0,9 V (30 ciclos) a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, primeiro em H₂SO₄ (0,50 mol L⁻¹) e em seguida em tampão B-R (0,04 mol L⁻¹). Esse processo de limpeza foi realizado bombeando as soluções no canal a uma vazão de 2,50 μL s⁻¹. Para a caracterização do eletrodo de trabalho em configuração estacionária, a área de superfície eletroquimicamente ativa (ECSA) foi obtida conforme apresentado anteriormente por Trindade e colaboradores ⁴⁹. Em resumo, consideramos 400 μC cm⁻² como a carga envolvida na redução de uma monocamada de óxidos de platina para obter a ECSA dos voltamogramas em solução ácida. Após o preenchimento do canal do fluxo, observou-se os eletrodos e a ausência de bolhas, o fluxo foi interrompido e os voltamogramas cíclicos foram registrados. Para identificar uma área de superfície confiável e o comportamento do transporte de massa, também usamos o par redox de ferri/ferrocianeto em uma concentração total de 2,0 mmol L⁻¹ (razão molar de 1:1) como sonda redox, verificando a influência da superfície dos eletrodos com o uso da equação de Cottrell.

Para as medidas amperométricas na configuração de fluxo, a menos que especificado de outra forma, o transportador apropriado foi bombeado continuamente a uma vazão de 16,7 μL s⁻¹. Para demonstrar o desempenho do detector integrado na plataforma eletroquímica microfluídica, realizamos uma aplicação prática determinando o ácido salicílico (AS) em amostras reais, como água de torneira, água de lago além de águas subterrâneas contaminadas (Seção 2.1.1). Sempre que possível, o desempenho do sistema proposto foi comparado com uma célula de fluxo amperométrica comercial, conectando o sistema de detecção ao fluxo de saída na plataforma.



2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Caracterização da plataforma microfluídica

Conforme mostrado pelas imagens dos dispositivos (Figura 2.3), o molde ABS impresso e o microcanal (criado após a sua solubilização dentro do PDMS) possuem superfícies levemente rugosas e bem definidas. Este processo foi importante para acompanhar as características físicas da plataforma durante a etapa de solubilização do ABS em acetona. O PDMS é susceptível ao intumescimento quando imerso em solventes orgânicos (por exemplo, diclorometano, acetonitrila e outros solventes) ^{68,69} por um longo período, o que poderia alterar o diâmetro inicial do canal. De fato, observamos que os chips baseados em PDMS tendem a intumescer quando deixados durante a noite em acetona para solubilizar o molde de ABS. Por essa razão, neste trabalho, foi controlado o tempo de imersão em acetona para evitar qualquer efeito de intumescimento.

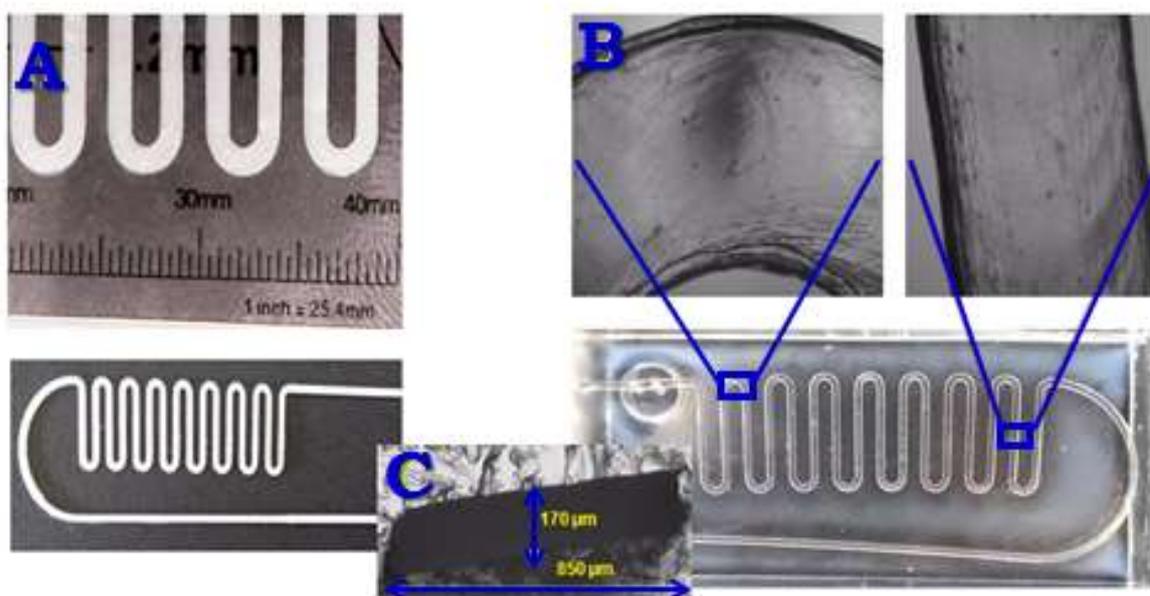


Figura 2.3 - (A) Imagem do molde ABS impresso para mostrar a forma serpentina e a distribuição do diâmetro. (B) Imagem mostrando a rugosidade interna da superfície do canal. (C) Seção transversal da exibição do diâmetro do canal interno.

Os diâmetros internos foram medidos em pontos variados usando imagens de microscópio óptico obtidas para cada plataforma. Aqui, a distribuição de tamanho, a geometria do canal e a rugosidade da superfície foram avaliadas para o microcanal em diferentes pontos do molde impresso em ABS (Figura 2.3A), bem como da plataforma construída com base no PDMS (Figura 2.3B). O microcanal plano tem uma média de $850 \pm 15 \mu\text{m}$ de largura e $170 \pm 10 \mu\text{m}$ de altura (Figura 2.3C). Na Figura 2.3 também podemos ver a rugosidade da superfície do molde de ABS impresso e do microcanal criado após solubilização do molde dentro do PDMS. Pode-se notar que o próprio molde de ABS



impresso (Figura 2.3A) apresenta rugosidade na superfície externa. Isso ocorre porque a impressora 3D imprime o molde camada por camada e a resolução é medida de acordo com o tamanho nominal do bico, produzindo os moldes finais impressos com superfícies rugosas. Ao mesmo tempo, o microcanal baseado em PDMS (Figura 2.3B) — criado a partir do molde impresso em ABS — mostra essa mesma rugosidade na parede interna do canal (Figura 2.3B).

2.2.2 Caracterização eletroquímica dos eletrodos a base de Pt

As características típicas dos eletrodos à base de platina (Pt), como contato elétrico, perfil eletroquímico do eletrodo de trabalho e sua ECSA são essenciais para garantir a confiabilidade do sistema operando em condições de fluxo e estado estacionário. Os voltamogramas cíclicos representativos que mostram o desempenho do eletrodo de trabalho baseado em Pt avaliando o perfil eletroquímico em ácido sulfúrico 0,50 mol L⁻¹ são mostrados na Figura 2.4.

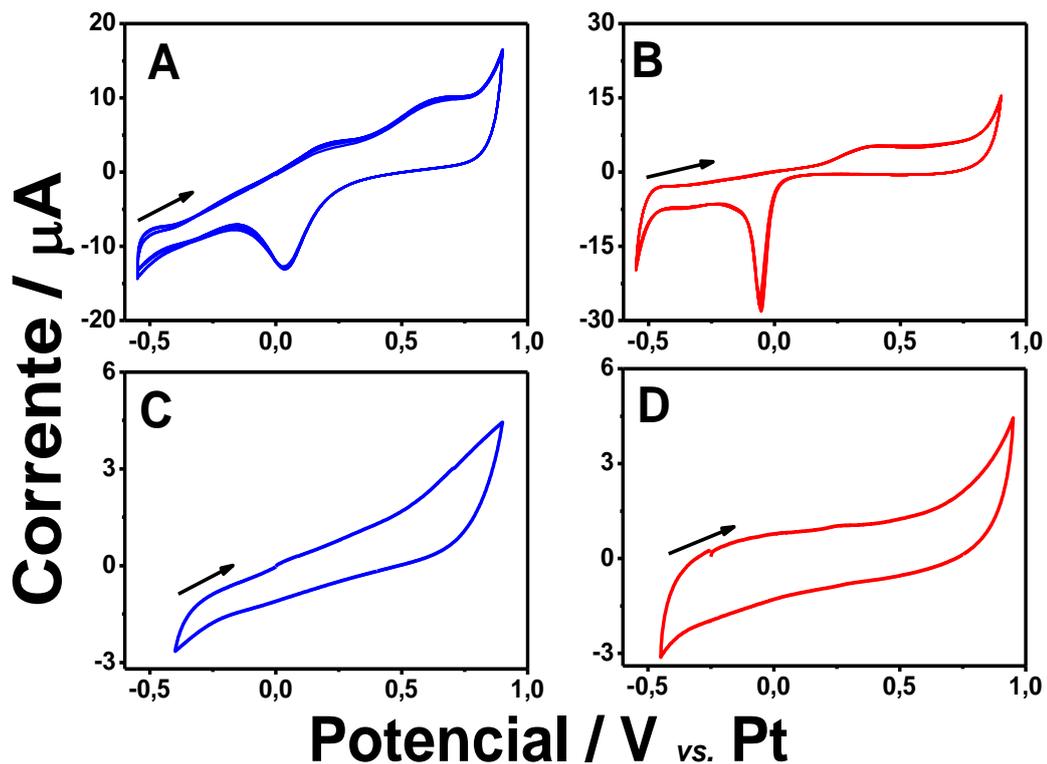


Figura 2.4 - Voltamogramas cíclicos (10 ciclos) registrados no sistema estacionário usando a plataforma microfluídica integrada com uma nova configuração de célula de fluxo — sistema proposto — (A) e a plataforma microfluídica integrada com uma configuração convencional de célula de fluxo — sistema convencional — (B) como sistema de detecção. Condições: Solução desaerada de H₂SO₄ (0,50 mol L⁻¹) como eletrólito de suporte. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹ e incremento de potencial de 2 mV. Voltamogramas cíclicos mostrando a apenas no eletrólito suporte (tampão B-R 0,04 mol L⁻¹) usando o sistema proposto (C) e o sistema convencional (D) também foram registrados.



Utilizou-se uma configuração de célula eletroquímica de três eletrodos para medidas estacionárias, na qual o pseudo-eletrodo de referência foi colocado em um compartimento separado, porém, em contato elétrico com o ET e o CE (Figura 2.1F). O perfil eletroquímico da Pt no sistema microfluídico (Figura 2.4A) foi semelhante ao encontrado em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos (Figura 2.4B). Ambos os voltamogramas mostram regiões bem definidas de formação/redução de óxidos de platina na superfície. A ausência de picos de adsorção/dessorção de hidrogênio na região de potencial é uma consequência da presença de oxigênio em solução aliada ao uso de um potenciostato digital sem módulo analógico, o que não afeta a medida e a interpretação dos dados. O ligeiro deslocamento no pico de redução de PtO em torno de 0,0 V é devido ao uso de um pseudo-eletrodo de referência. Conforme mostrado por Trindade et al.,⁴⁹ os potenciais referentes às reações de superfície na Pt são levemente deslocados para o microdispositivo. A ECSA é uma importante caracterização *in situ*, calculada pela equação de Cottrell e considerando a carga envolvida na redução de uma monocamada de óxidos de platina⁴⁹. A ECSA calculada pela carga envolvida na redução de óxidos de platina coletados no voltamograma estacionário (Figura 2.4A) foi de $0,76 \pm 0,05 \text{ mm}^2$.

As curvas de carga (Q) versus tempo (t) relacionadas às medidas cronocoulométricas na presença de um par redox de ferri/ferrocianeto são mostradas na Figura 2.5, as quais foram obtidas com o pseudo-eletrodo de referência colocado separadamente (Figura 2.5A).

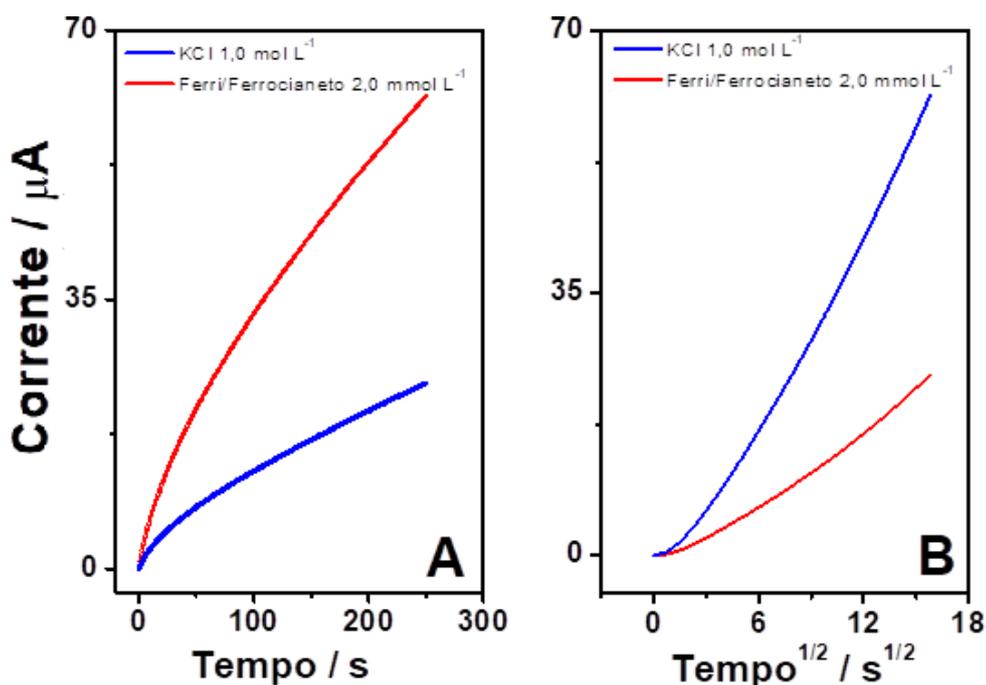




Figura 2.5 - Cronocoulogramas registrados (configuração estacionária) usando $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferri/ferrocianeto (razão molar 1:1) em solução de KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ saturada com N_2 . (A) Sistema proposto operando com o eletrodo de referência (fio Pt) colocado no compartimento separado e (B) o gráfico linear da resposta cronocoulométrica para dados de (A). Potencial aplicado $0,55 \text{ vs. Pt}$ como PER.

O cálculo da ECSA também foi obtido via equação de Cottrell (equação 2.1) usando a inclinação do gráfico de Q vs. $t^{1/2}$ (Figura 2.5B), excluindo a carga resultante da dupla camada (Q_{dl}) e das espécies adsorvidas ($Q_{ads.}$), obtidas pelo valor do intercepto.

$$Q = \frac{2nFAD^{1/2}C^*t^{1/2}}{\pi^{1/2}}$$

Equação 2.1

O valor da ECSA obtido por esse método foi de $0,20 \pm 0,010 \text{ mm}^2$ quando os experimentos cronocoulométricos foram realizados em condições estacionárias e a plataforma eletroquímica microfluídica operada com o pseudo-eletrodo de referência colocado no compartimento separado. Este valor foi significativamente diferente quando comparado com o ECSA calculado pela carga de redução de óxidos. Isso deve-se ao fato de que, no caso anterior, (Figura 2.4A), os dados coletados levam em consideração a carga formada na superfície da Pt contida nos dois compartimentos, enquanto que na Equação 2.1, considera-se apenas a carga envolvida no processo sobre a superfície da Pt no compartimento do fluxo. Por um lado, o método que utiliza a redução da carga de óxidos parece ser uma maneira confiável de calcular a área de superfície, uma vez que não há necessidade de sonda adicional, mas sim os prótons e as hidroxilas em solução. O método baseado no par redox de ferri/ferrocianeto depende da dinâmica eletroquímica da sonda adicional e do gradiente de concentração na interface eletrodo/solução. Consequentemente, também depende da distribuição homogênea dos íons na superfície do eletrodo, na qual a transferência de elétrons deve ocorrer e a taxa controlada pela difusão deve ser considerada. Por outro lado, é difícil conseguir exatamente isso — especialmente na célula de fluxo proposta, onde há duas interfaces diferentes de eletrodo/solução — e isso significa que o cálculo da ECSA pode não ser semelhante ao que utiliza apenas a carga redução de óxidos (ou seja, prótons/hidroxilas em solução). Portanto, optamos por usar $0,76 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ como ECSA para normalizar a corrente quando pertinente.

2.2.3 Medidas Voltamétricas

Voltamogramas de varredura linear (Figura 2.6) foram registrados para o AS $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e usados para comparar o desempenho da plataforma microfluídica integrada com:



a nova configuração de célula eletroquímica e uma configuração convencional de célula de fluxo.

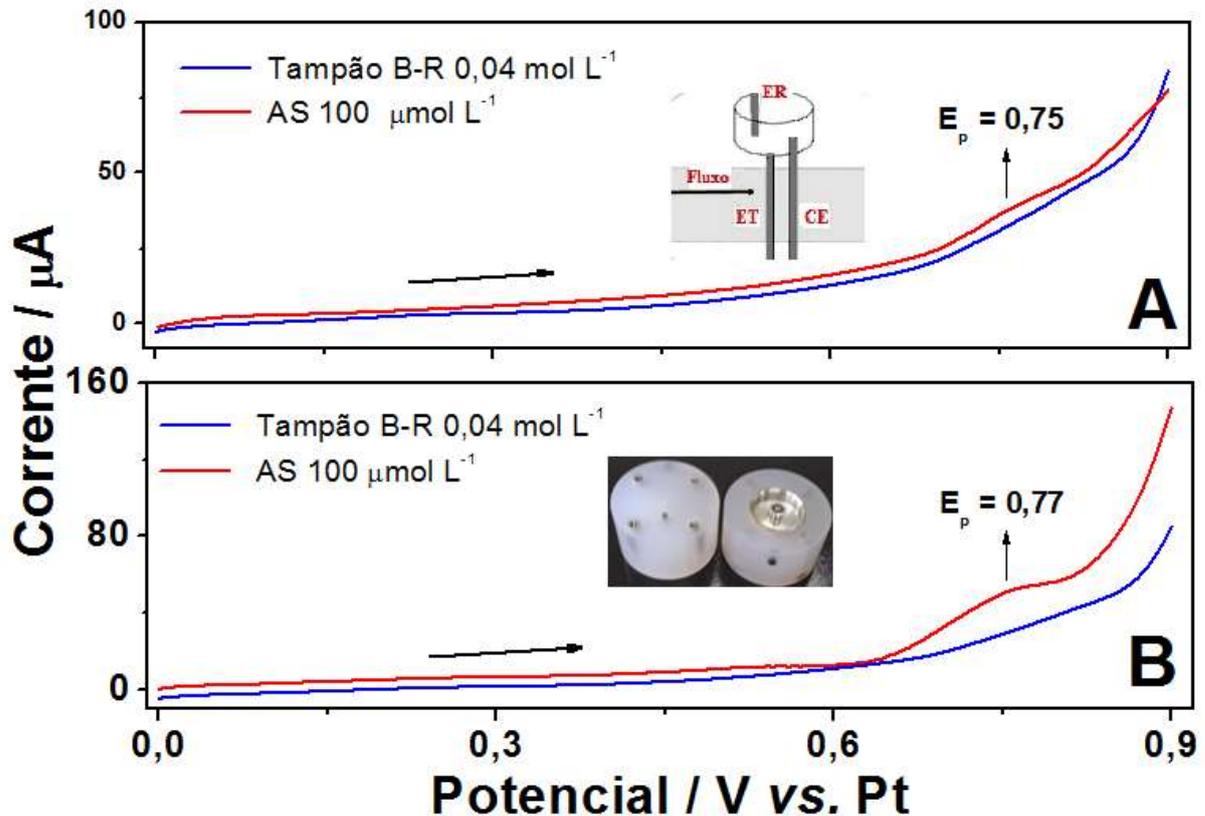


Figura 2.6 - Voltamogramas de varredura linear registrados para a oxidação de AS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) na plataforma microfluídica contendo: **(A)** nova configuração de célula eletroquímica e **(B)** célula de fluxo com sistema clássico de detecção. Tampão B-R ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 3,0 (com KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ para ajuste de força iônica) como eletrólito de suporte. Condições: Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} e incremento de potencial de $2,0 \text{ mV}$.

Os voltamogramas obtidos mostraram a mesma tendência, com a presença de um pico de oxidação em potencial em aproximadamente $0,75 \text{ V}$ (Figura 2.6A e B). Pode-se notar que esse valor de potencial corresponde à janela restrita de potencial para a Pt, como mostrado anteriormente na Figura 2.4 (voltamograma A e B). A presença do pico de oxidação para o AS observado nas duas células garantiu que o dispositivo proposto contendo a nova configuração pudesse ser utilizado como detector eletroquímico. Pode-se concluir ainda que, o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho, controlado no compartimento superior, é bastante semelhante ao potencial aplicado no canal de fluxo, garantindo medidas confiáveis. Portanto, a medida do sinal analítico de um transiente anódico em termos de carga ou altura do pico pode ser claramente interpretada quando o pseudo-eletrodo de referência é colocado no compartimento separado e isolado do fluxo de solução.



2.2.4 Medidas Amperométricas

Foi mostrado anteriormente ⁴⁹ uma série de estudos em que a preferência da célula de fluxo eletroquímica convencional (trabalhando em uma condição de estado estacionário) com a configuração de três eletrodos fixados no canal do fluxo. No entanto, essa configuração não permite medidas amperométricas em condições nas quais o fluxo turbulento e/ou bolhas de ar estão presentes. Portanto, no presente trabalho apresentamos uma nova plataforma eletroquímica baseada em PDMS, na qual contém um novo sistema eletroquímico de detecção. Nesse sistema, a configuração permite inserir dois eletrodos (ET e CE) diretamente em contato com os dois compartimentos bem como um sistema de três eletrodos (ET, CE e PER), no qual apenas o compartimento superior é parcialmente referenciado. Usando a configuração experimental (Figura 2.2), propomos alguns estudos para demonstrar o alto desempenho do dispositivo microfluídico proposto, conectando os cabos do potenciostato da seguinte maneira: ET e CE na parte inferior do chip (Figura 2.2), que ficou em contato com os dois compartimentos e com o pseudo-eletrodo de referência ajustado fora do fluxo (no reservatório superior) contendo 200 μL do eletrólito suporte (transportador). Para obtenção de resultados comparativos, também alteramos o sistema de detecção conectando uma célula convencional no final do canal de fluxo. O AS foi escolhido como sonda eletroquímica devido à sua importância ambiental, pois é frequentemente listado como contaminante de preocupação emergente. O potencial de oxidação (Figura 2.6) ocorreu em 0,75V (sistema proposto) e 0,77V (sistema convencional), respectivamente. Após o uso do procedimento descrito na parte experimental (seção 2.1.4), foram realizadas medidas amperométricas. A Figura 2.7 mostra o voltamograma hidrodinâmico típico (para o sistema proposto) gerado para três injeções discretas (60 μL) de AS (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) após variar o potencial aplicado na faixa de 0,10 V a 0,65V. O voltamograma hidrodinâmico (Figura 2.7) atinge o platô, limitante da corrente em potenciais superiores a 0,60 V vs. Pt como pseudo-eletrodo de referência, que, de acordo com o mostrado na Figura 2.6, é a janela de potencial na qual a Pt é polarizada. Portanto, o potencial de 0,55 V foi escolhido para medidas posteriores usando esse novo sistema de detecção eletroquímica.

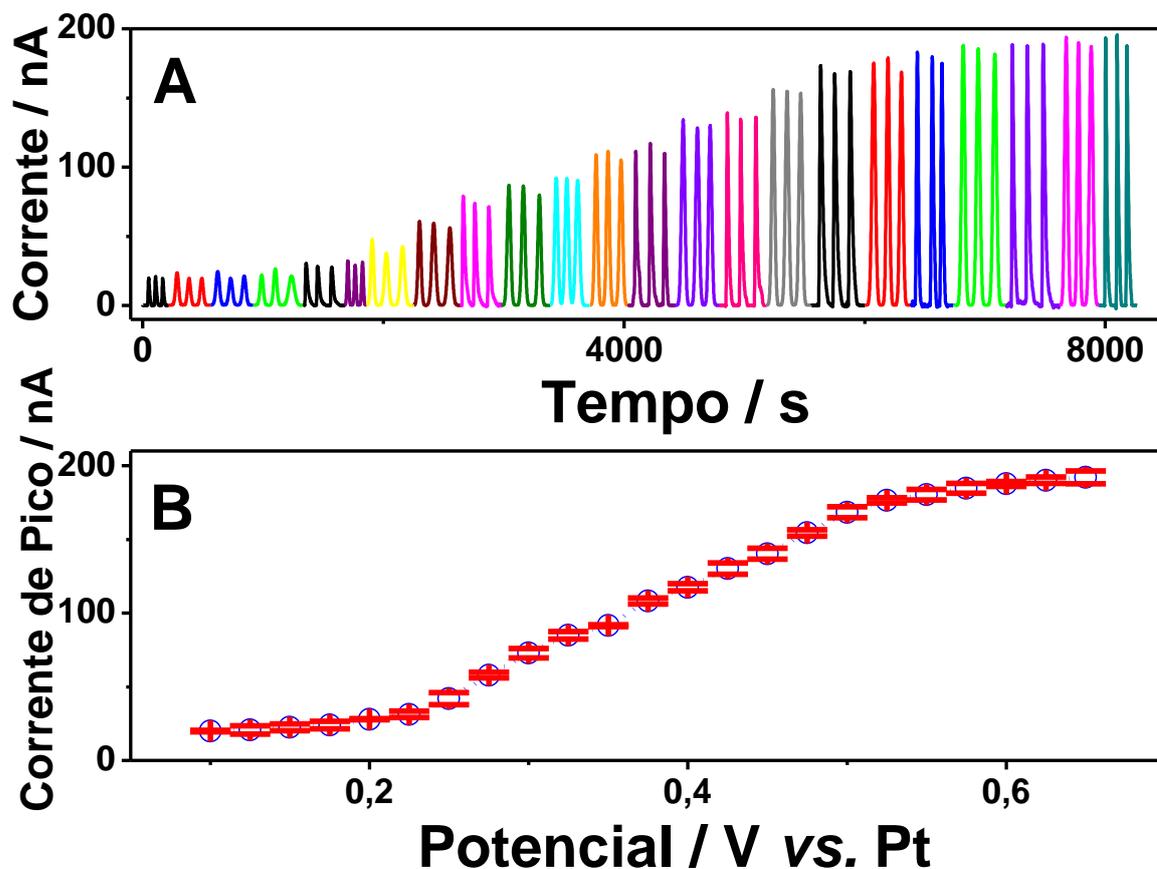


Figura 2.7 - A) Cronoamperogramas e **B)** Voltamograma hidrodinâmico registrado para injeções em triplicata (60 μL) de AS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) comparando o desempenho do sistema proposto sob diferentes potenciais aplicados (0,10 a 0,65 V). Tampão B-R ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 3,0 (com KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ para ajuste de força iônica) como eletrólito suporte e transportador. Vazão de $16,67 \mu\text{L s}^{-1}$.

Oito injeções de AS foram realizadas em três níveis de concentração: 5,00; 50,0 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para o dispositivo proposto com a nova configuração de eletrodos, os cronoamperogramas são caracterizados por intensidade de corrente de picos (I_p) reproduzíveis (Figura 2.8A, $I_p = 13,3 \pm 0,30 \text{ nA}$) para $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 2.8B, $I_p = 95,5 \pm 1,5 \text{ nA}$) para $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (Figura 2.8C, $I_p = 179 \pm 2,3 \text{ nA}$) para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. O perfil amperométrico, permaneceu praticamente constante em todos os casos estudados, mesmo em baixas concentrações ou sem a correção da linha de base (Figura 2.8A). Um dado importante, nessa nova configuração de célula eletroquímica, é que o melhor desempenho na detecção foi devido ao menor nível de ruído. Isso garante melhor controle da flutuação da linha de base, o que, por sua vez, permite uma medida mais precisa da intensidade da corrente de pico. Além disso, o reservatório construído na parte superior e no mesmo microdispositivo permite separar o pseudo-eletrodo de referência do canal do fluxo de solução bem como a sua superfície limpa durante as medidas. Isso também garante um



melhor controle do potencial de trabalho, evitando variabilidade indesejável da intensidade da corrente de pico ao longo das medidas.

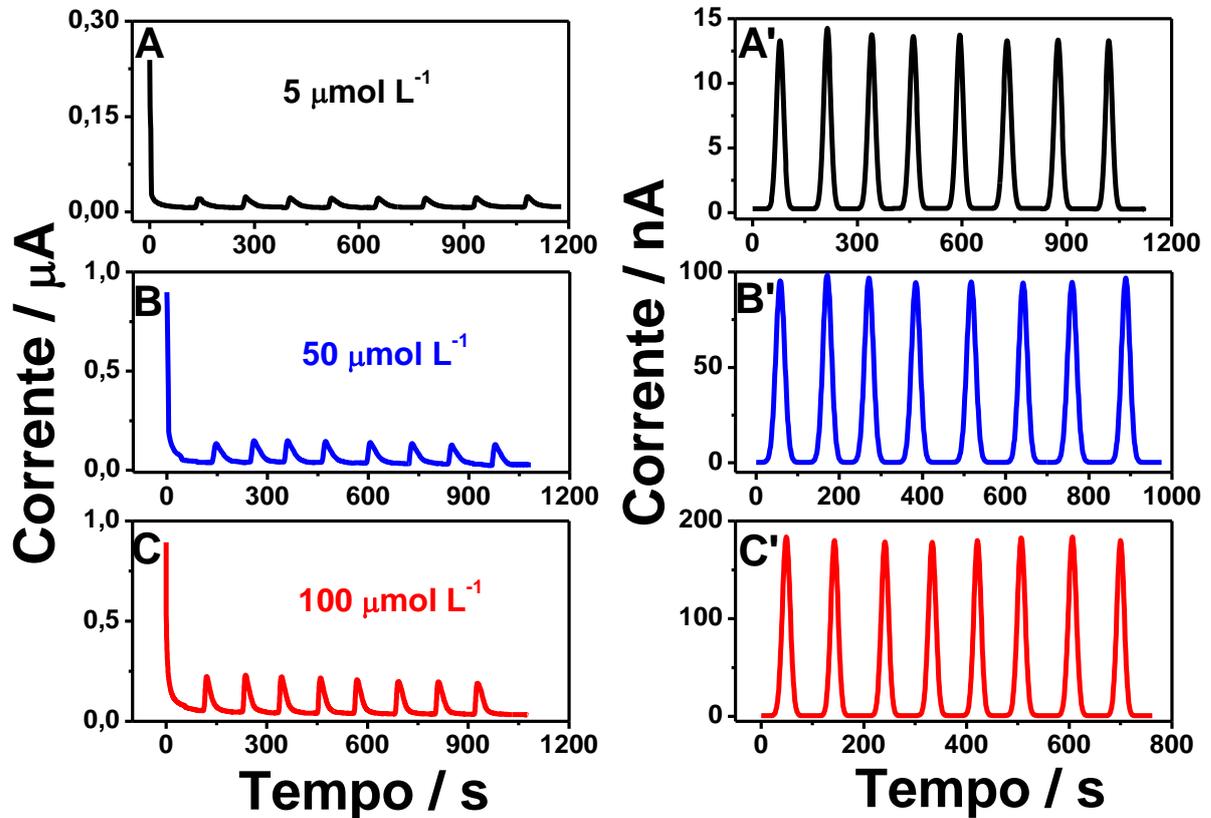


Figura 2.8 - Cronoamperogramas registrados para injeções discretas (60 μL) de AS, na ausência (A, B, C) e presença (A', B', C') de correção da linha de base, comparando o desempenho do sistema eletroquímico proposto em diferentes concentrações de analito. (A, A') 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (B, B') 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (C, C') 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Transportador: tampão B-R (0,04 mol L^{-1}) a pH 3,0 (com KCl 0,50 mol L^{-1} para ajuste de força iônica), potencial aplicado de 0,55 V vs. Pt como pseudo-referência e vazão de 16,7 $\mu\text{L s}^{-1}$.

A resposta obtida com o sistema de detecção eletroquímico convencional (Figura 2.9) apresentou uma qualidade significativamente inferior à obtida com o sistema proposto. Para o sistema convencional, houve grande variabilidade na intensidade da corrente de pico tanto para concentração de 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 2.9A, $I_p = 3,3 \pm 1,8$ nA) quanto para 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 2.9B, $I_p = 39 \pm 12$ nA) e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 2.9C, $I_p = 92 \pm 30$ nA). Isso pode ser destacado pela presença de ruídos intensos — especialmente em baixas concentrações (Figura 2.9A). Tais variabilidades devem-se ao arranjo de três eletrodos em contato direto com o fluxo de solução, no qual o ET e pseudo-eletródo de referência são mais suscetíveis ao bloqueio de suas superfícies, seja pela formação de bolhas ou até pelas impurezas do próprio transportador. Esse fenômeno pode gerar variações no potencial aplicado aos eletrodos e, conseqüentemente, na intensidade dos picos. Assim, nossos resultados estão de acordo com os relatados anteriormente por Trindade e colaboradores,⁴⁹ no qual a



configuração convencional da célula de fluxo foi afetada pela variação na resposta amperométrica e pela intensidade de corrente de pico, o que dificultou a precisão da medida. Neste trabalho, além da célula de fluxo eletroquímica proposta anteriormente por Trindade e colaboradores, a principal diferença é a incorporação de todas as principais partes diretamente em uma única plataforma. Destaca-se que, a integração do sistema de detecção eletroquímica ainda é um desafio, pois os eletrodos (especialmente o ET) são expostos ao fluxo de solução e/ou às impurezas da amostra/solução causando o bloqueio das atividades da superfície e esses problemas refletem diretamente em seu desempenho. Assim, a configuração proposta parece não ser afetada por esses efeitos, o que pode torná-la um tipo de lab-on-a-chip que pode ser usado de maneira confiável em experimentos eletroquímicos operando com fluxo de solução.

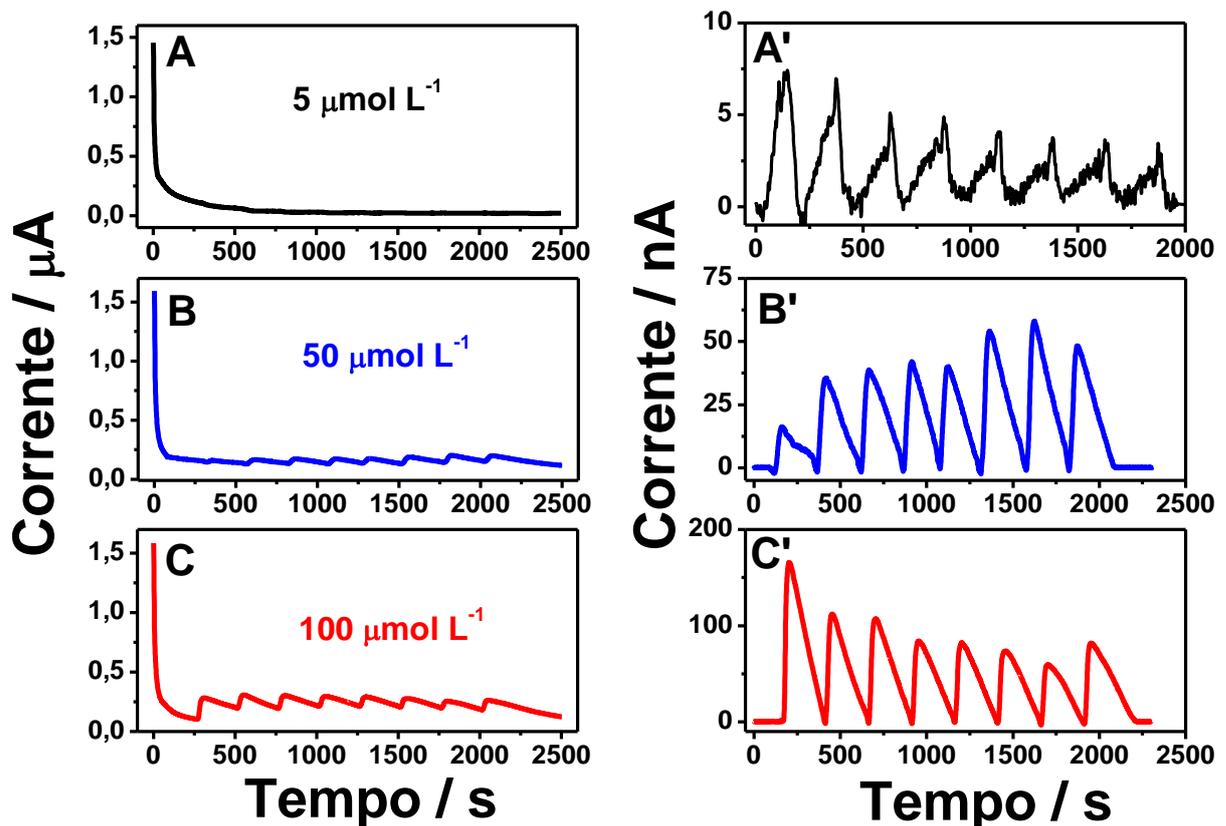


Figura 2.9 - Cronoamperogramas registrados para injeções discretas (60 μL) de AS, na ausência (A, B, C) e presença (A', B', C') de correção da linha de base, comparando o desempenho do sistema eletroquímico convencional para uma série de concentrações de analito: (A, A') 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (B, B') 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (C, C') 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Transportador: tampão B-R (0,04 mol L^{-1}) em pH 3,0 (com KCl 0,50 mol L^{-1} para ajuste de força iônica), potencial aplicado de 0,55 V vs. Ag e vazão de 22,1 $\mu\text{L s}^{-1}$.

O alto desempenho da configuração proposta pode ser observado também na Figura 2.10, a qual compara os dois sistemas de detecção acoplados ao dispositivo microfluídico



em oito injeções discretas. O perfil amperométrico gera picos com a mesma ordem de magnitude, garantindo medidas confiáveis da intensidade da corrente de pico (Figura 2.10A e B) e mostrando claramente a superioridade sobre a configuração convencional (Figura 2.10C e D).

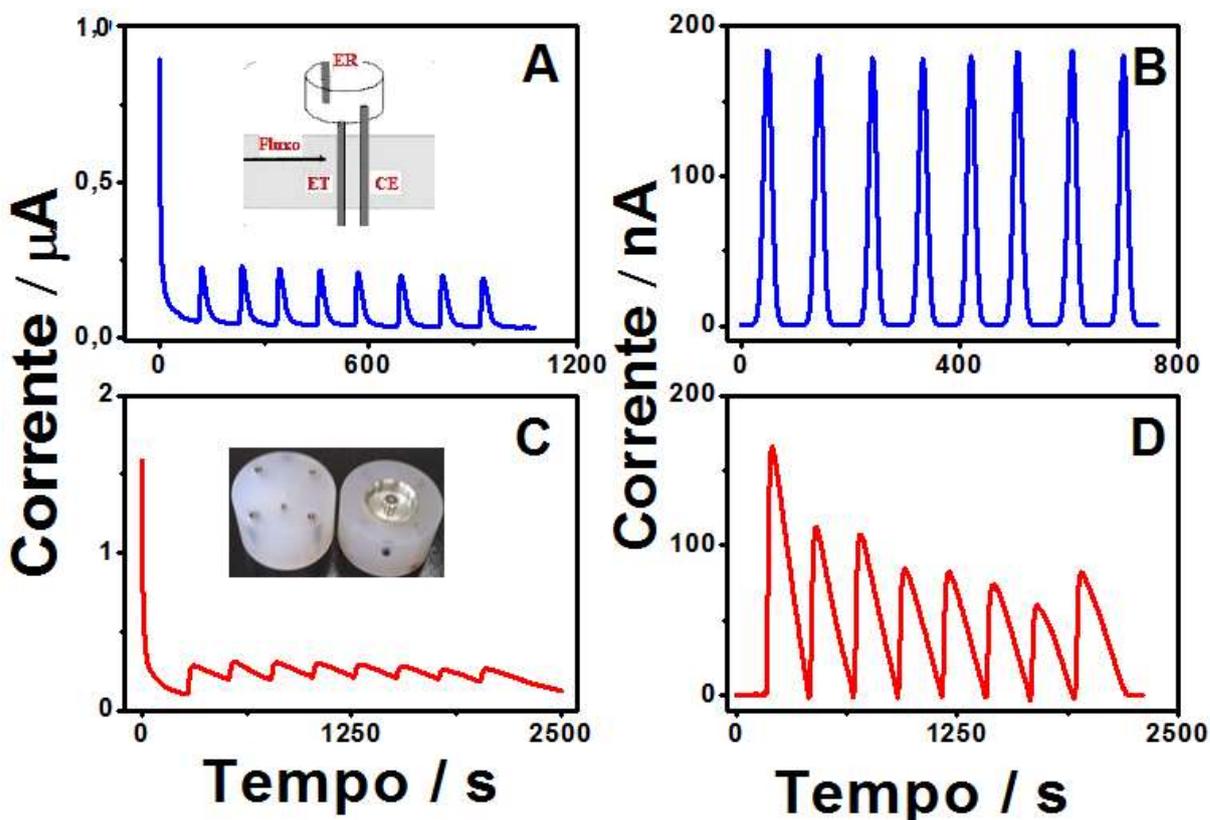


Figura 2.10 - Cronoamperogramas registrados para injeções discretas (60 μL) de AS na ausência (A e C) e presença (B e D) de correção da linha de base, comparando o desempenho das células eletroquímicas: proposta (A e B) e convencional (C e D). Tampão B-R (0,04 mol L^{-1}) em pH 3,0 (com KCl 0,50 mol L^{-1} para ajuste de força iônica) como transportador, potencial aplicado de 0,55 V vs. Pt como pseudo-referência, vazão de 16,67 $\mu\text{L s}^{-1}$ para o sistema proposto e 22,13 $\mu\text{L s}^{-1}$ para o sistema convencional.

Ao avaliar um conjunto de oito injeções discretas (60 μL) para comparar a reprodutibilidade inter-dias, pode-se comprovar que a microfluídica proposta (Figura 2.11) contendo a nova configuração do detector eletroquímico totalmente integrado oferece vantagens significativas sobre o sistema convencional (Figura 2.12). O sistema proposto gera corrente de picos bem definidas e reprodutíveis, os quais são facilmente medidas com precisão tanto para diferentes dias ($I_p = 180 \pm 2,0$ nA) quanto para as medidas intra-dia ($I_p = 178 \pm 4,0$ nA) (Figura 2.11). No entanto, na Figura 2.12 observa-se que o sistema convencional foi caracterizado por elevada variabilidade nas correntes de pico, o que dificultou a medida precisa da intensidade, uma vez que os valores foram variados durante o primeiro dia ($I_p = 97 \pm 33$ nA) até no terceiro dia ($I_p = 89 \pm 47$ nA). Estes estudos reforçam a



hipótese de que, em medidas eletroquímicas, a configuração tradicional é altamente afetada na condição em que o fluxo turbulento e/ou bolhas de ar estão presentes.

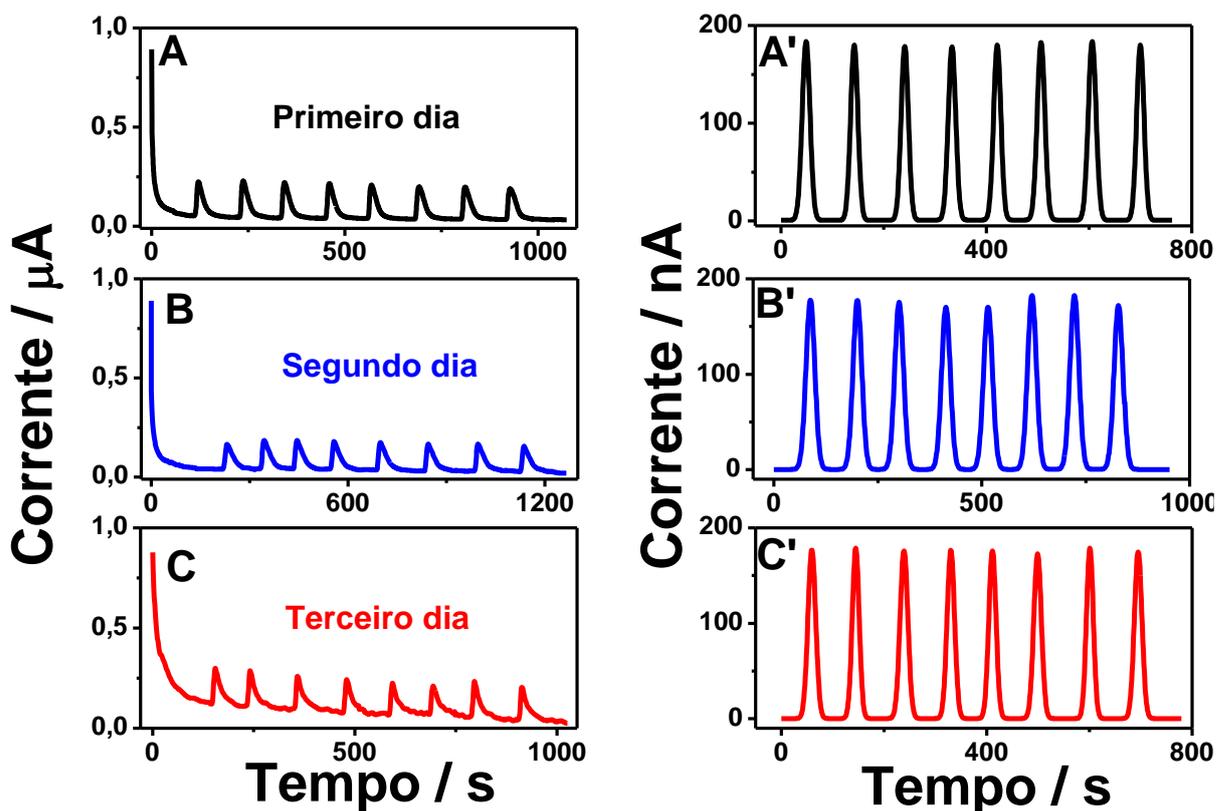


Figura 2.11 – Cronoamperogramas registrados para injeções discretas (60 μL) de AS 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na ausência (A, B, C) e presença (A', B', C') de correção da linha de base, comparando o desempenho do sistema proposto para a reprodutibilidade inter-dias. (A e A') O primeiro dia, (B e B') segundo dia e (C e C') terceiro dia. Transportador, tampão B-R (0,04 mol L^{-1}) a pH 3,0 (com KCl 0,50 mol L^{-1} para ajuste de força iônica), potencial aplicado de 0,55 V vs. Pt e vazão de 16,7 $\mu\text{L s}^{-1}$. Inserção: correção da linha de base.

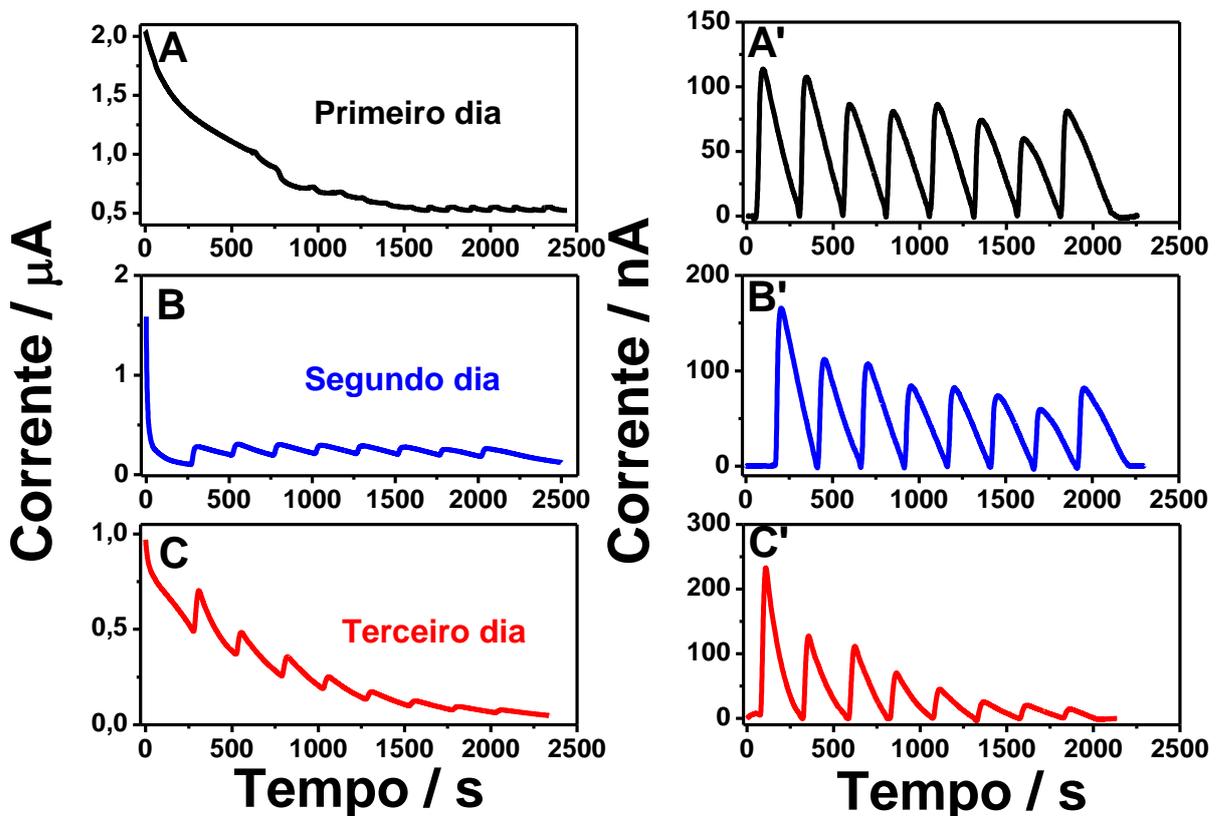


Figura 2.12 - Cronoamperogramas registrados para injeções discretas ($60 \mu\text{L}$) de AS $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, na ausência (A, B, C) e presença (A', B', C') de correção da linha de base, comparando o desempenho do sistema convencional para a reprodutibilidade inter-dias. (A e A') O primeiro dia, (B e B') segundo dia e (C e C') terceiro dia. Transportador, tampão B-R ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 3,0 (com KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ para ajuste de força iônica), potencial aplicado de $0,55 \text{ V vs. Pt}$ e vazão de $22,1 \mu\text{L s}^{-1}$. Inserção: correção da linha de base.

Também foi possível mostrar que o sistema detector proposto funciona adequadamente sem nenhum problema associado ao uso de micropipeta automática para introduzir volumes discretos de analito/amostra na fase contínua. Além disso, o dispositivo proposto demonstrou ser a melhor configuração para controlar o potencial no eletrodo de trabalho durante os estudos amperométricos para análises em fluxo. Avaliando os dados obtidos com esse sistema é possível inferir que a alta performance está associada ao fato de que o potencial aplicado no eletrodo de trabalho poder ser satisfatoriamente controlado tanto no compartimento superior quanto no canal de fluxo. A Figura 2.13 mostra uma série de oito injeções discretas ($60 \mu\text{L}$) de AS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ar realizadas para avaliar o efeito de bolhas de ar sobre a performance desse sistema e verificar a viabilidade de uso do pseudo-referência fora do canal do fluxo. Nesse estudo, a informação mais significativa foi que o uso do pseudo-referência no compartimento superior criou uma condição mais estável. Sob condições extremas em que bolhas de ar possam surgir como bloqueadoras das superfícies do ET e/ou do pseudo-referência, as correntes de pico



foram bem definidas e reprodutíveis (Figura 2.13C). Por sua vez, a resposta obtida com o sistema convencional foi novamente afetada pela alta variabilidade na intensidade da corrente de pico (Figura 2.13D). Essa perturbação é facilmente detectada pelo ET e o pseudo-referência, quando ambos são colocados no canal de fluxo, possivelmente, pelo bloqueio momentâneo de suas superfícies. Isso induz o potenciostato a buscar uma nova condição que satisfaça a diferença de potencial previamente estabelecida, dando origem à ruídos intensos e picos mal definidos.

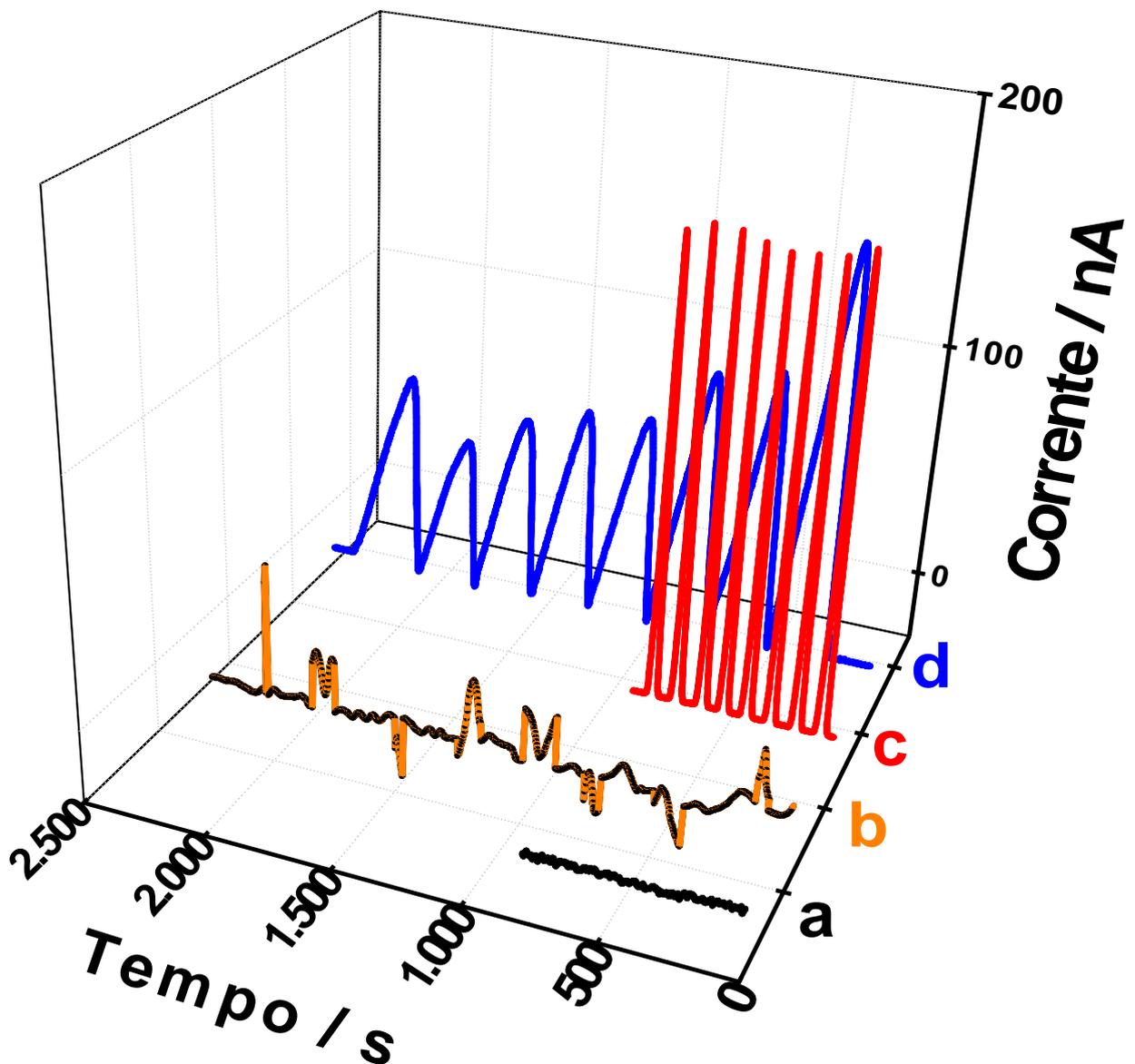


Figura 2.13 - Injeções discretas ($60 \mu\text{L}$) para comparar o desempenho do sistema eletroquímico proposto com o sistema convencional sob diferentes condições. (a) injeção de ar no transportador no sistema proposto (b) injeção de ar no transportador no sistema convencional. Injeção de AS $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em: (c) proposto e (d) convencional. Tampão B-R ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 3,0 (com KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ para ajuste da força iônica) como transportador, potencial aplicado $0,55 \text{ V vs. Pt}$ (proposto) e Ag (convencional), vazão de $16,67 \mu\text{L s}^{-1}$ para o sistema proposto e $22,13 \mu\text{L s}^{-1}$ para sistema convencional.



Recentemente, foi demonstrado que o uso de micropipeta automática para injeção discreta de analito/amostra na fase contínua (transportadora) provou ser uma alternativa prática e de baixo custo para sistemas microfluídicos baseados em canal ⁴⁹. Entretanto, seu uso na detecção eletroquímica convencional (principalmente na configuração de três eletrodos) causa algumas dificuldades experimentais, como perturbar o equilíbrio na fase contínua, a qual é estável devido ao bombeado por uma bomba de seringa. Aqui, ficou claro esse efeito quando três injeções (em um intervalo de 50, 285 e 525 s) são realizadas para comparar a configuração proposta (Figura 2.14A) com a convencional (Figura 2.14B). Nessa condição de análise, não foi detectada qualquer alteração que comprometesse o uso do sistema proposto (Figura 2.14A). Entretanto, para o sistema convencional, a resposta do detector foi muito afetada por perturbação do sinal quando cada injeção discreta foi realizada. Esse comportamento pode ser explicado pelo movimento do pistão para executar a injeção discreta, o que aumenta a pressão e, por sua vez, perturba o equilíbrio da fase contínua (transportadora).

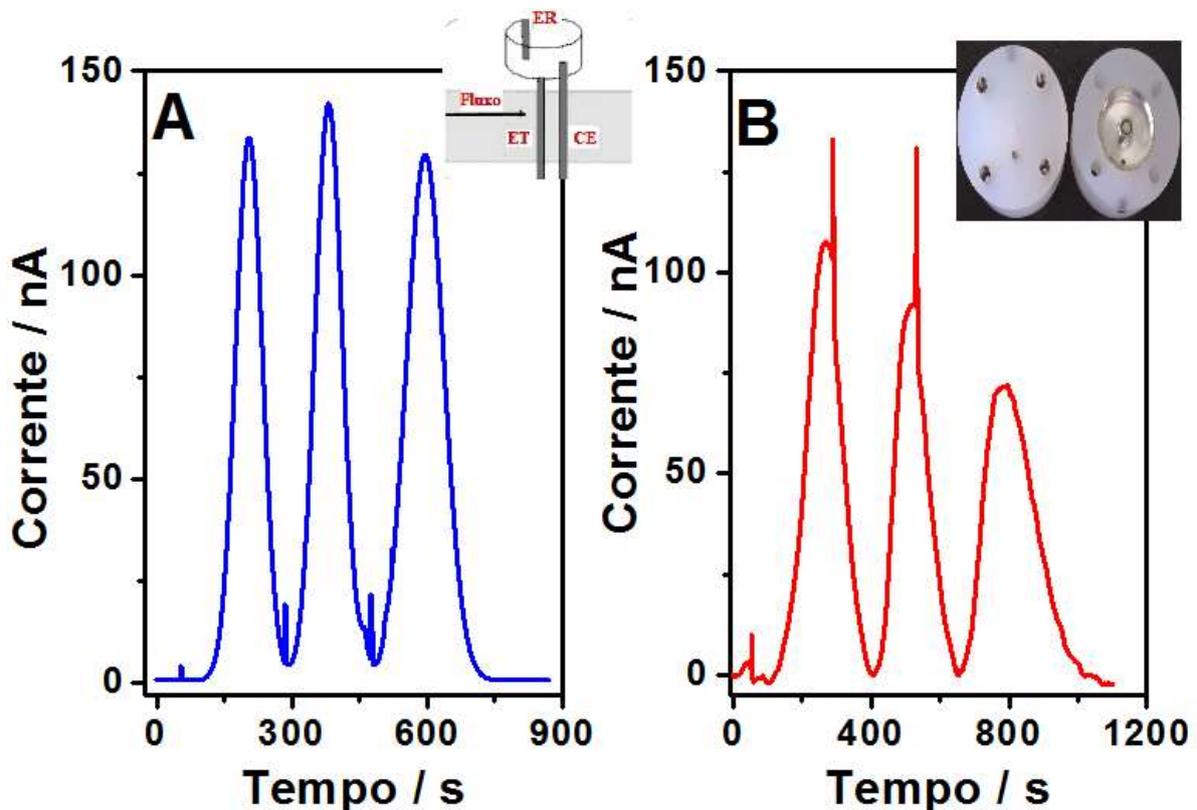


Figura 2.14 - Cronoamperogramas registrados para injeções de AS $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($60 \mu\text{L}$) em 50, 285 e 525s usando o sistema proposto (A) e convencional (B) como detectores eletroquímicos. Tampão B-R ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) pH 3,0 (com KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ para ajuste da força iônica) como transportador, potencial aplicado de $0,55 \text{ V vs. Pt}$ (proposto) e Ag (convencional) e vazão de $2,78 \mu\text{L s}^{-1}$.



Para justificar a necessidade de um canal em forma de serpentina na plataforma microfluídica, realizamos alguns experimentos usando a detecção eletroquímica convencional de três eletrodos. O desempenho do canal em forma de serpentina (Figura 2.15A) foi comparado com um sistema linear baseado em um tubo de PTFE (Figura 2.15B) com o mesmo diâmetro interno (850 μm) e o mesmo comprimento do microcanal (aproximadamente 300 mm). Os resultados foram afetados por um ruído sobreposto no pico principal com o sistema microfluídico montado no canal baseado em serpentina (Figura 2.15A), indicando que o sistema de detecção eletroquímica convencional é suscetível a essa perturbação. Esse efeito foi mais perceptível ao usar o canal de forma maneira linear (Figura 2.15B), atestando a necessidade de um canal em forma de serpentina para amortecer os impactos da injeção discreta realizada por micropipeta. Sendo assim, nosso estudo sugere que o modelo de canal desenvolvido e a nova configuração de detector eletroquímico integrados em uma mesma plataforma microfluídica funcionaram adequadamente na redução dos efeitos indesejáveis causado tanto pela micropipeta (durante a injeção discreta de analito/amostra) quanto pela presença de bolhas de ar.

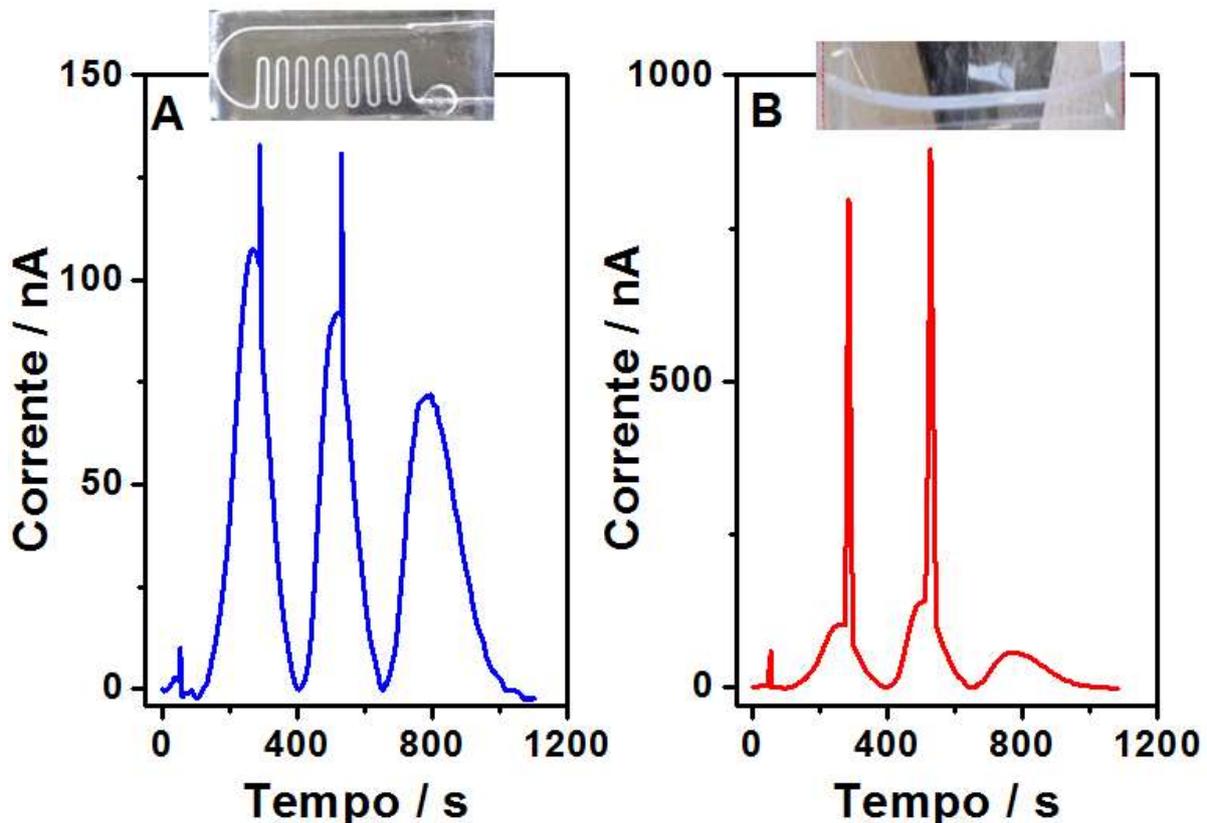


Figura 2.15 - Cronoamperogramas registrados para injeções (60 μL) de AS 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema convencional como detector eletroquímico. Comparação de três injeções discretas (50, 285 e 525 s). **A**) plataforma microfluídica com canal em forma de serpentina e **B**) uma tubulação de PTFE com o mesmo diâmetro interno (850 μm) e comprimento de microcanal (300 mm). Tampão B-R (0,04 mol L^{-1}) pH 3,0 (com KCl 0,50 mol L^{-1} para ajuste da força iônica) como transportador, vazão de 2,78 $\mu\text{L s}^{-1}$ e potencial aplicado de 0,55 V vs. Ag.



Os parâmetros experimentais referentes ao eletrólito suporte utilizado como solução transportadora, como o melhor tipo e sua concentração (Figura 2.16), o ajuste da força iônica (Figura 2.17), bem como o efeito do pH (Figura 2.18) para a solução de tampão B-R também foi avaliada e as melhores condições estão resumidas na Tabela 2.1. O desempenho analítico do sistema eletroquímico proposto foi caracterizado por produzir picos simétricos e com maior intensidade (considerando o baixo grau de dispersão do analito através do canal de fluxo), assim como uma menor variabilidade em sua intensidade. Considerando o melhor desempenho da solução tampão B-R (em pH 3,0) como eletrólito suporte (solução transportadora) a $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ — quando comparado à solução de ácido sulfúrico a $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 2.16) — e o ajuste da força iônica com KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$, essa foi a condição otimizada para demonstrar a utilidade do dispositivo microfluídico proposto em aplicações analíticas.

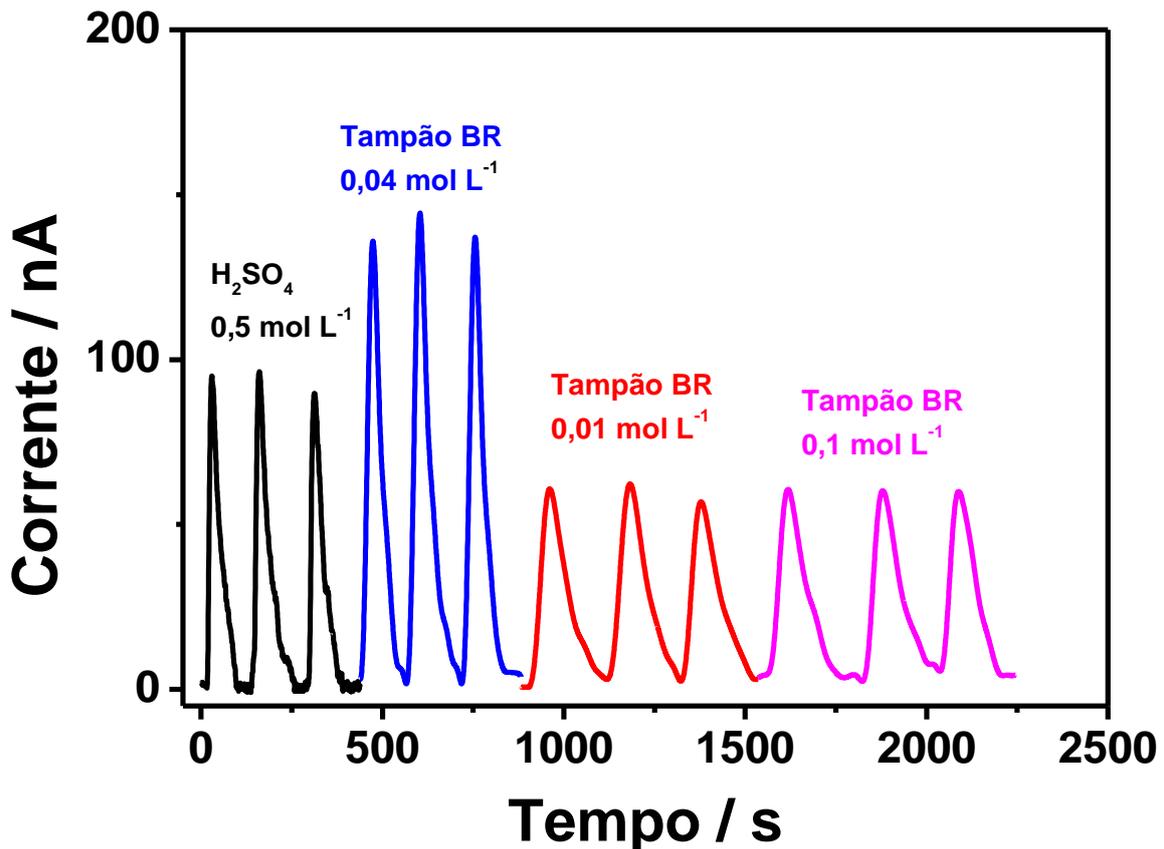


Figura 2.16 - Cronoamperogramas registrados para injeções em triplicata ($50 \mu\text{L}$) de AS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) comparando o desempenho do sistema eletroquímico proposto sob diferentes transportadores e diferentes concentrações de tampão B-R. Vazão de $16,67 \mu\text{L s}^{-1}$ e potencial aplicado de $0,55 \text{ V vs. Pt}$.

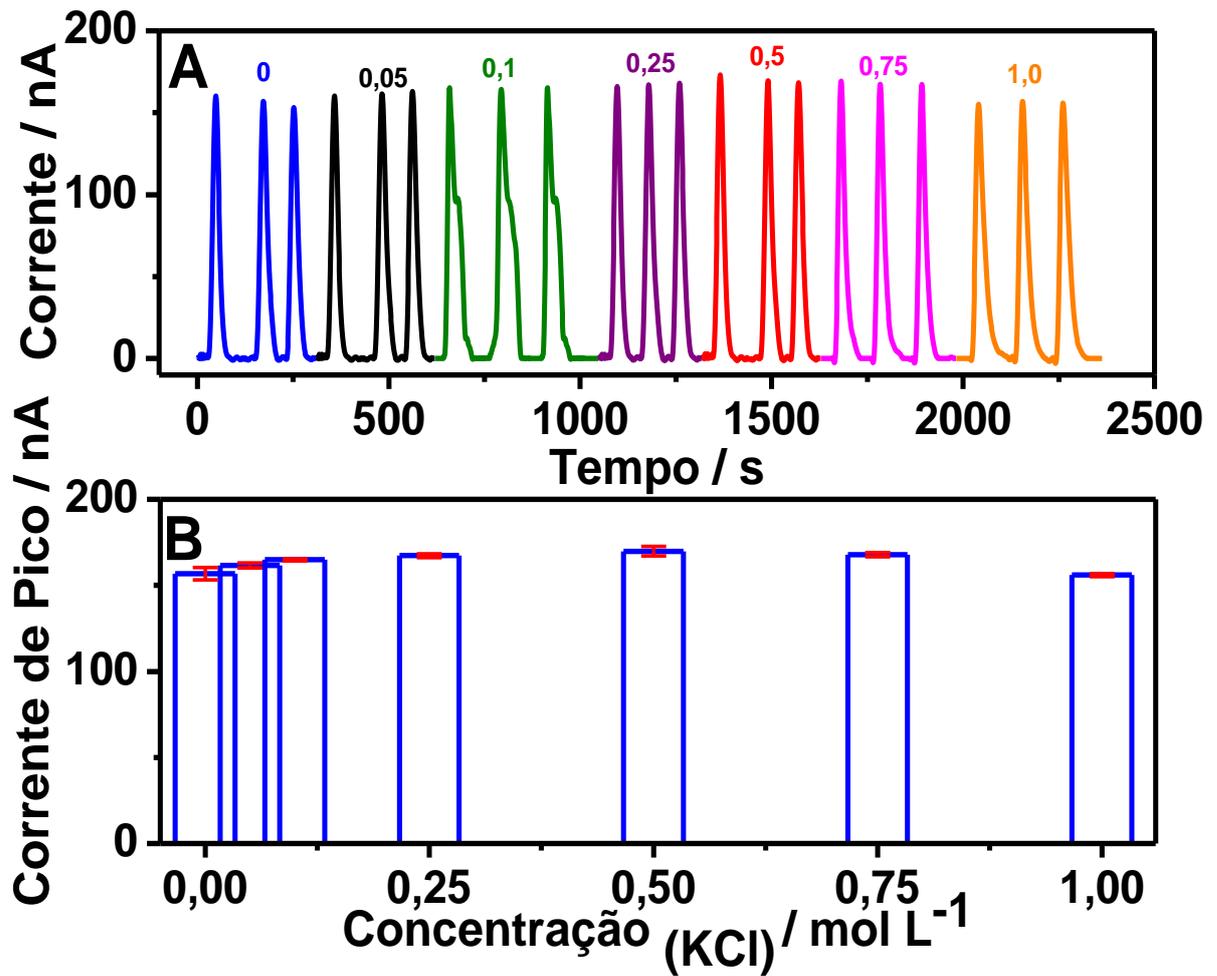


Figura 2.17- A) Cronoamperogramas e B) Gráficos de corrente *versus* concentração de KCl (mol L⁻¹) obtidos para injeções em triplicata (50 μL) de AS (100 μmol L⁻¹) para comparar o desempenho do sistema eletroquímico proposto sob diferentes valores de concentração de KCl como o ajuste da força iônica do tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ (pH 3,0). Vazão de 16,67 μL s⁻¹ e potencial aplicado de 0,55 V vs. Pt.

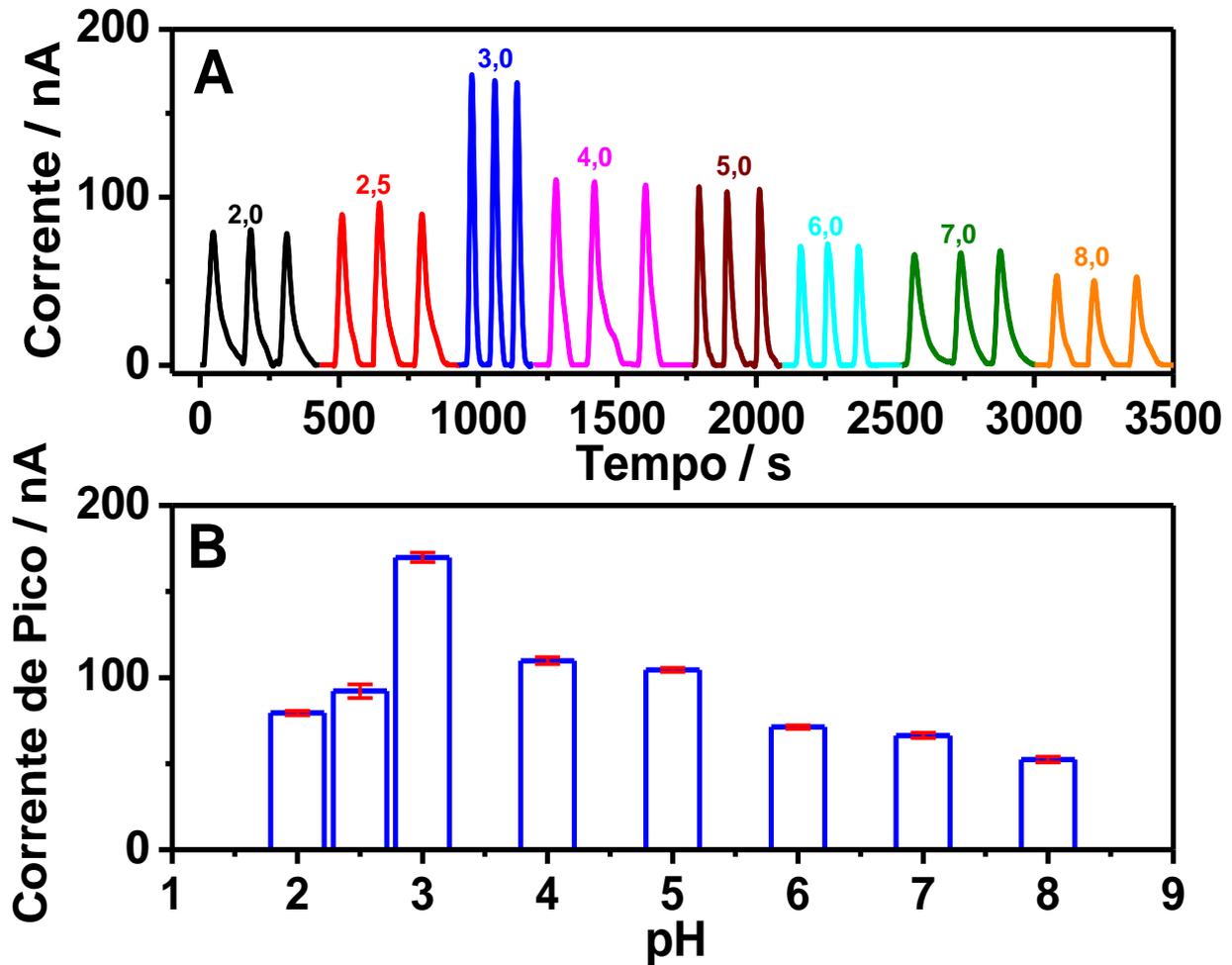


Figura 2.18 - A) Cronoamperogramas e **B)** Corrente *versus* valores de pH, com força iônica corrigida com $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, obtidos para injeções em triplicata ($50 \mu\text{L}$) de AS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) para comparar o desempenho do sistema eletroquímico proposto sob diferentes valores de pH do Tampão B-R ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$). Vazão de $16,67 \mu\text{L s}^{-1}$ e potencial aplicado de $0,55 \text{ V vs. Pt}$.

2.2.5 Avaliação da velocidade de dispensa da micropipeta, volume de injeção de amostra e vazão do transportador

O requisito para o uso de dispositivos microfluídicos baseados em canal é a necessidade de uma vazão muito estável através do microcanal, necessitando do uso de bombas de seringa externas para direcionar fluxos⁷⁰. No entanto, fluxos com bombeamento contínuos, mesmo quando executados com bombas de seringa, são perturbados pelo uso de processo de injeções discretas e esse efeito pode causar turbulência e ser detectado pelos eletrodos (ET e ER). Como mencionado anteriormente, o uso da micropipeta automática como um injetor discreto, apesar de ser uma alternativa adequada às bombas de seringa padrão, também pode causar turbulências devido ao movimento do pistão no ato de injeção. No entanto, nesse estudo, propomos a integração direta — em uma única plataforma microfluídica — do canal desenhado em forma de serpentina e do novo arranjo de eletrodos para montar um sistema que funcionará



adequadamente para resolver os problemas supramencionados. Para esse propósito, avaliamos alguns parâmetros — velocidade de dispensa, volume de injeção de amostra e vazão do transportador — que podem introduzir mais perturbações na solução transportadora, a qual é relativamente estável. Na Figura 2.19, o efeito da velocidade de dispensação para injeção discreta da amostra (AS a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) é evidenciado pela ocorrência de um ruído abrupto nos cronoamperogramas em velocidades maiores (por exemplo, de $167 \mu\text{L s}^{-1}$). Isso pode ser associado ao aumento da turbulência em altas velocidades de dispensa quando a amostra é injetada rapidamente pela micropipeta automática. Portanto, $33 \mu\text{L s}^{-1}$ foi atribuído como sendo uma velocidade de dispensa aceitável e foi selecionado para estudos futuros.

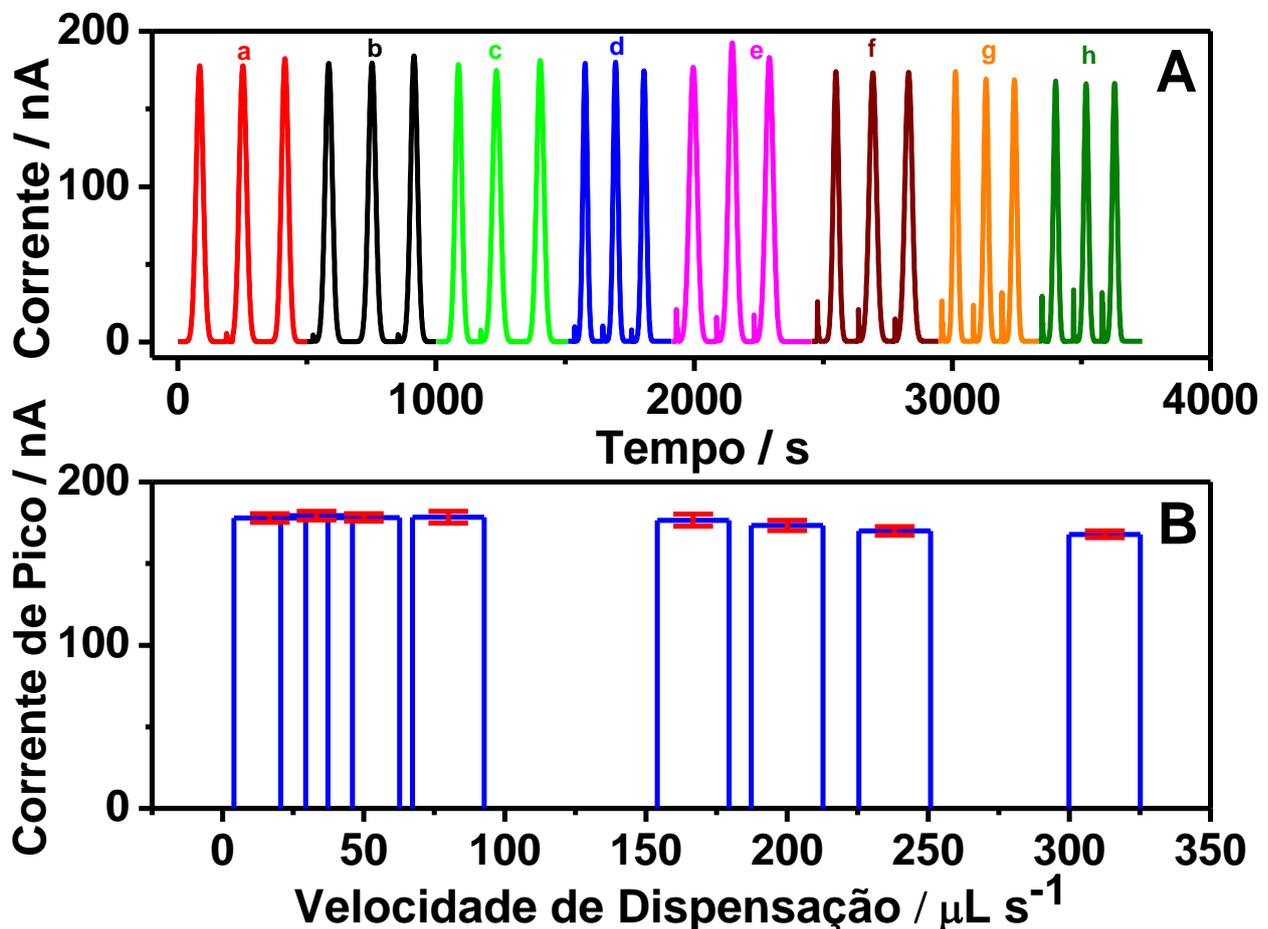


Figura 2.19 - A) Cronoamperogramas e **B)** Valores de corrente *versus* velocidade de dispensa da micropipeta ($\mu\text{L s}^{-1}$), registradas para injeções triplicatas ($50 \mu\text{L}$) de AS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) para comparar o desempenho do sistema eletroquímico proposto sob diferentes velocidades de dispensação da micropipeta. Tampão B-R ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) pH 3,0 (com KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ para ajuste da força iônica) como transportador, vazão de $17 \mu\text{L s}^{-1}$ e potencial aplicado de $0,55 \text{ V vs. Pt}$. Velocidade de distribuição (a) 17; (b) 33; (c) 50; (d) 80; (e) 167; (f) 200; (g) 238; e (h) $313 \mu\text{L s}^{-1}$.

A resposta amperométrica em relação ao volume usado para as injeções discretas (Figura 2.20) também aumentou em relação ao volume estudado, possibilitando uma medida



precisa da intensidade da corrente de pico. Embora a proporção das fases transportadora/amostra varie significativamente com a variação do volume injetado, não foram observados problemas significativos relacionados a questão do equilíbrio entre as duas fases, e isso se deve principalmente a configuração dos canais que permitem uma melhor homogeneização. Assim, o volume de 60 μL foi escolhido para continuar os experimentos.

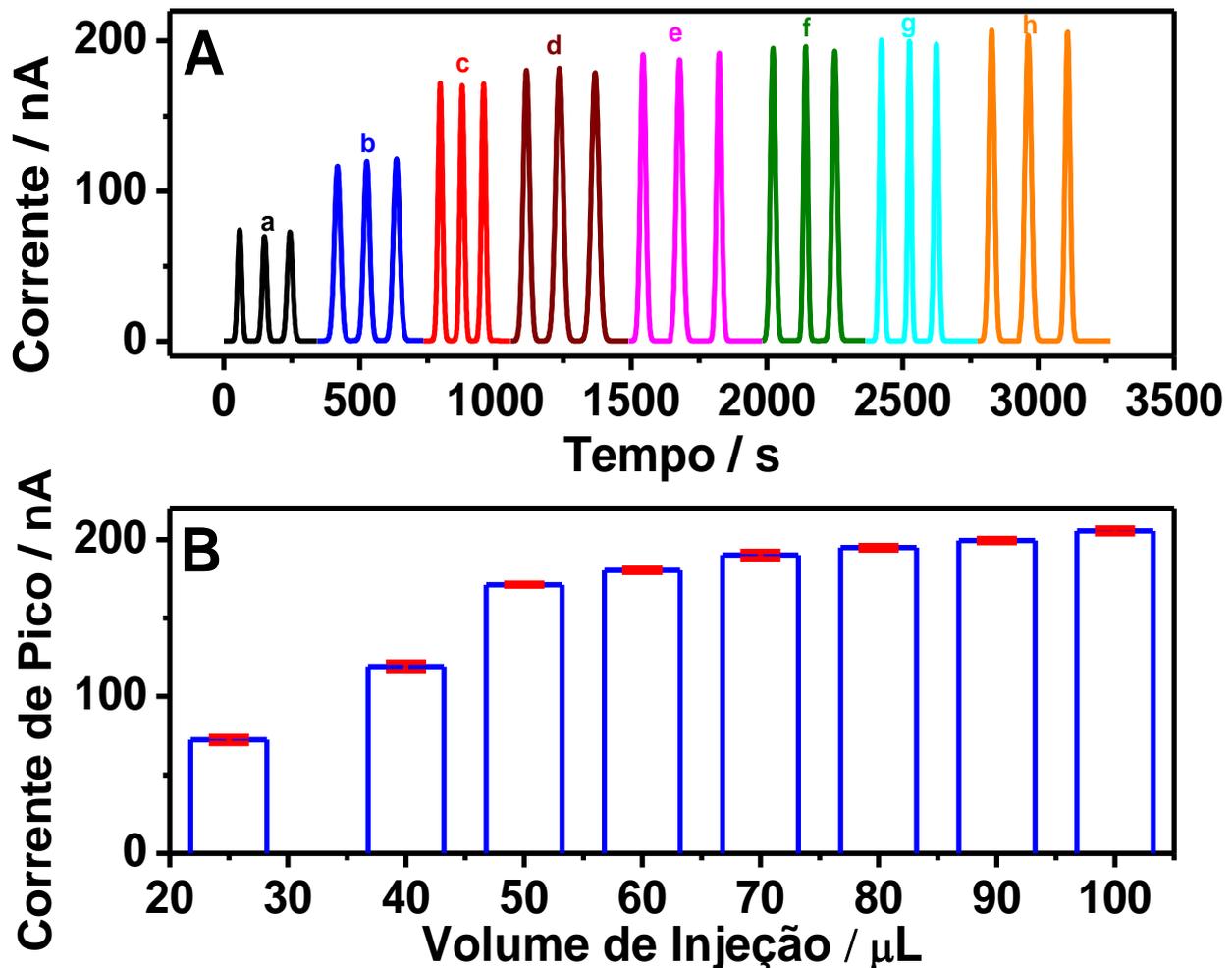


Figura 2.20 - A) Cronoamperogramas e B) Valores de corrente *versus* volume de injeção (μL), registradas para injeções em triplicata de AS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) para comparar o desempenho de sistema eletroquímico proposto sob a variação do volume de injeção. Tampão B-R ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) pH 3,0 (com KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ para ajuste de força iônica) como transportador, vazão de $16,7 \mu\text{L s}^{-1}$, potencial aplicado de $0,55 \text{ V vs. Pt}$ e velocidade de dispensação de $33 \mu\text{L s}^{-1}$. Volume de injeção: (a) 25; (b) 40; (c) 50; (d) 60; (e) 70; (f) 80; (g) 90; e (h) 100 μL .

Finalmente, a Figura 2.21 mostra a resposta dos cronoamperogramas para o estudo da vazão do transportador (de $1,70$ a $38,7 \mu\text{L s}^{-1}$). Neste caso, não há variação na intensidade da corrente de pico de acordo com a faixa estudada. No entanto, destaca-se que em vazão baixa, o formato do pico é assimétrico. Esse perfil de concentração (resposta do detector) é uma resposta ao alto grau de dispersão do analito (em baixas vazões) antes de atingir o detector. Como a



maior vazão tende a reduzir o grau de dispersão do analito durante o bombeamento contínuo, o pico parece mais simétrico com a medida de largura de pico bem definida. Levando em consideração esses resultados, a vazão de $16,7 \mu\text{L s}^{-1}$ foi selecionada para experimentos posteriores. Novamente, foi provado que todos os problemas mencionados anteriormente podem ser resolvidos usando o novo sistema eletroquímico com o arranjo de eletrodos configurado de forma não convencional na plataforma baseada em PDMS. Além disso, a micropipeta automática pode ser usada com sucesso como um injetor discreto, mesmo em condições extremas, o que permite substituir uma bomba de seringa padrão de alto custo para injetar o analito no transportador (bombeado continuamente).

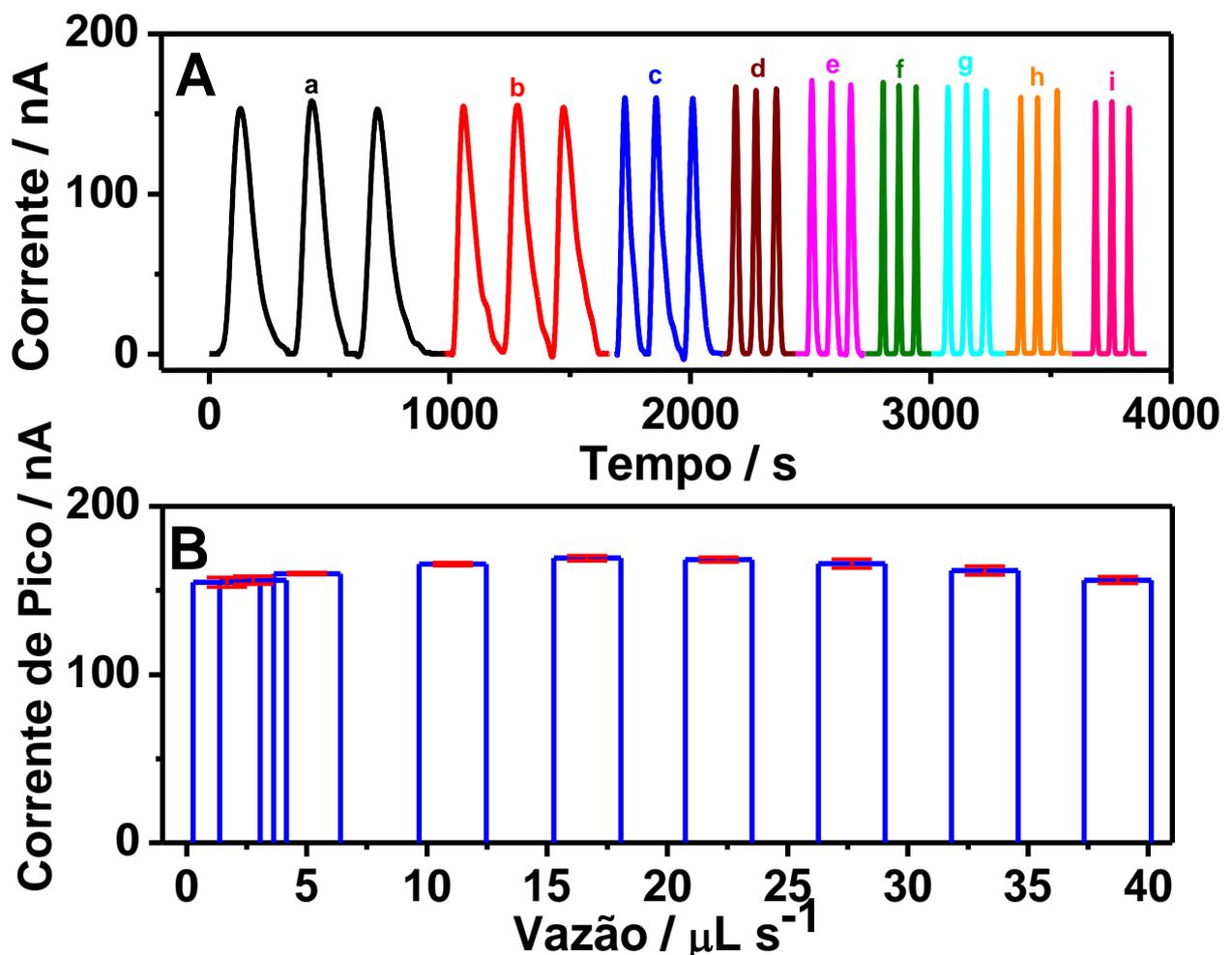


Figura 2.21 - A) Cronoamperogramas e **B)** Valores de corrente *versus* vazão ($\mu\text{L s}^{-1}$), registradas para injeções em triplicatas ($50 \mu\text{L}$) de AS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) para comparar o desempenho do sistema eletroquímico proposto sob diferentes vazões. Tampão B-R ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0 (com KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$) para ajuste de força iônica) como transportador, potencial aplicado de $0,55 \text{ V vs. Pt}$ e velocidade de dispensação de $33 \mu\text{L s}^{-1}$. Vazões: (a) 1,7; (b) 2,8; (c) 5,0; (d) 11,1; (e) 16,7; (f) 22,1; (g) 27,7; (h) 33,2; e (i) $38,7 \mu\text{L s}^{-1}$.



Tabela 2.1 - Resumo dos parâmetros avaliados e otimizados para a integração do sistema eletroquímico proposto como sistema de detecção no dispositivo microfluídico.

Parâmetro	Estudado	Otimizado
Transportador	T-BR; H ₂ SO ₄	T-BR
Concentração do transportador (mol L ⁻¹)	0,010; 0,040 e 0,10	0,040
Concentração do KCl no ajuste da força iônica (mol L ⁻¹)	0,05 – 1,0	0,50
pH do transportador	2,0 – 8,0	3,0
Potencial aplicado (V)	0,10 – 0,70	0,55
Vazão (μL s ⁻¹)	1,7 – 38,7	16,7
Volume de Injeção (μL)	25 - 100	60
Velocidade de dispensação (μL s ⁻¹)	17 - 313	33

2.2.6 Estudos de confiabilidade analítica e exemplos de aplicação sistema eletroquímico proposto

O próximo passo consistiu em avaliar o desempenho analítico do sistema eletroquímico proposto para demonstrar sua aplicação na análise quantitativa. Os parâmetros que afetaram o desempenho analítico foram caracterizados por parâmetros como: linearidade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação obtidos com uma curva analítica (Figura 2.22 e Tabela 2.2). A resposta amperométrica foi linear em todo intervalo de concentração de AS (1,00-150 μmol L⁻¹) estudado, além de apresentar alta repetibilidade (Figura 2.22B). Os limites de detecção e quantificação (LOQ e LOD) foram calculados de acordo com o método proposto por Ruggieri e colaboradores⁷¹. Quinze injeções discretas das amostras de água de lago contaminada (em três níveis de concentração: baixa, média e alta) foram realizadas para estudar a influência da matriz. A Tabela 2.2 resume os valores obtidos para a curva analítica, a qual demonstra o alto desempenho do sistema de detecção amperométrica proposto na geração de respostas precisas e confiáveis. Para confirmar a aplicação analítica do dispositivo proposto, a análise quantitativa de AS foi realizada em diferentes amostras de água contaminada. Os três níveis de contaminação (baixa, média e alta) foram escolhidos de acordo com a faixa de concentração analisada na curva analítica (Tabela 2.3). Assim, a concentração de AS foi determinada para todas as amostras analisadas e foi próximo da concentração esperada, mostrando um alto nível de recuperação (entre 95,7 e 101%), demonstrando um alto grau de exatidão.



Tabela 2.2 - Especificação das características de calibração.

Parâmetro	Encontrado
Intervalo linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,00 - 150
Slope ($\text{nA } \mu\text{mol L}^{-1}$)	1,78
Intercept (nA)	4,77
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9986
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^[a]	0,290
LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^[b]	0,960

^[a] Limite de detecção e ^[b] Limite de quantificação: $\text{LoD} = \frac{3 \times S}{\sqrt{n}}$ e $\text{LoQ} = \frac{10 \times S}{\sqrt{n}}$, em que S = desvio padrão de quinze réplicas de amostras reais em três níveis de contaminação (baixo, médio e alto) e n = número de réplicas.

Tabela 2.3 - Parâmetros analíticos obtidos para determinação de AS em diferentes amostras de água.

Amostras	Solução preparada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ^a \pm SD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Água subterrânea	7,50	7,30 \pm 1,9	97,4
	60,0	60,5 \pm 0,70	101
	110	105 \pm 1,8	95,7
Água de torneira	7,50	7,49 \pm 1,2	99,8
	60,0	59,1 \pm 0,50	98,5
	110	108 \pm 3,7	98,4
Água de lago	7,50	7,58 \pm 0,60	101
	60,0	58,9 \pm 0,50	98,2
	110	108 \pm 1,3	98,4

^[a] Média de três determinações e cinco injeções para cada determinação.

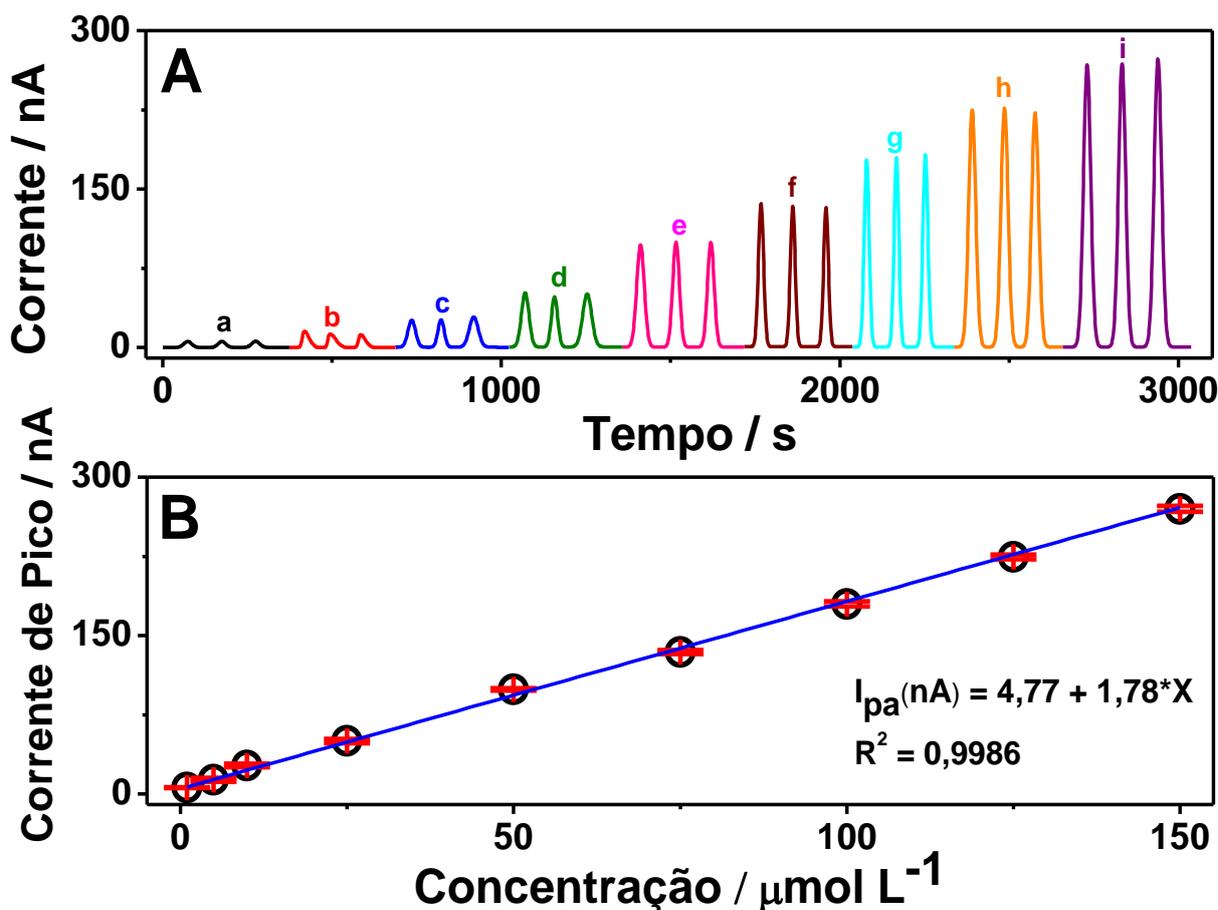


Figura 2.22- A) Cronoamperogramas e B) Curva de calibração para uma série de concentrações de AS. Injeções em triplicata (60 μL) de AS na faixa de concentração: (a) 1,00; (b) 5,00; (c) 10,0; (d) 25,0; (e) 50,0; (f) 75,0; (g) 100; (h) 125 e (i) 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial aplicado de 0,55 V vs. Pt. Outras condições como na Tabela 2.1.

A Figura 2.23 mostra uma comparação entre a análise quantitativa de AS usando o sistema eletroquímico proposto (Figura 2.23A, B e C) e o sistema eletroquímico convencional (Figura 2.23A', B' e C') em diferentes amostras aquosas. Novamente, ressalta-se que o sistema proposto apresenta melhor desempenho analítico, com picos bem definidos e simétricos, mesmo em baixas concentrações (Figura 2.23A). O sistema eletroquímico convencional gerou picos mal definidos, especialmente, em baixa concentração, os quais são suprimidos por ruídos intensos (Figura 2.23A'). Esses resultados também comprovam o melhor desempenho do arranjo de eletrodos proposto neste estudo quando comparado com o sistema de detecção eletroquímico convencional. Assim, mostramos que a separação do pseudo-referência do fluxo de solução no microcanal garante seu alto desempenho mesmo em condições extremas — especialmente em condições problemáticas em que as bolhas de ar podem servir como isolantes ou até mesmo quando os eletrodos estão em contato direto com os contaminantes da amostra real.

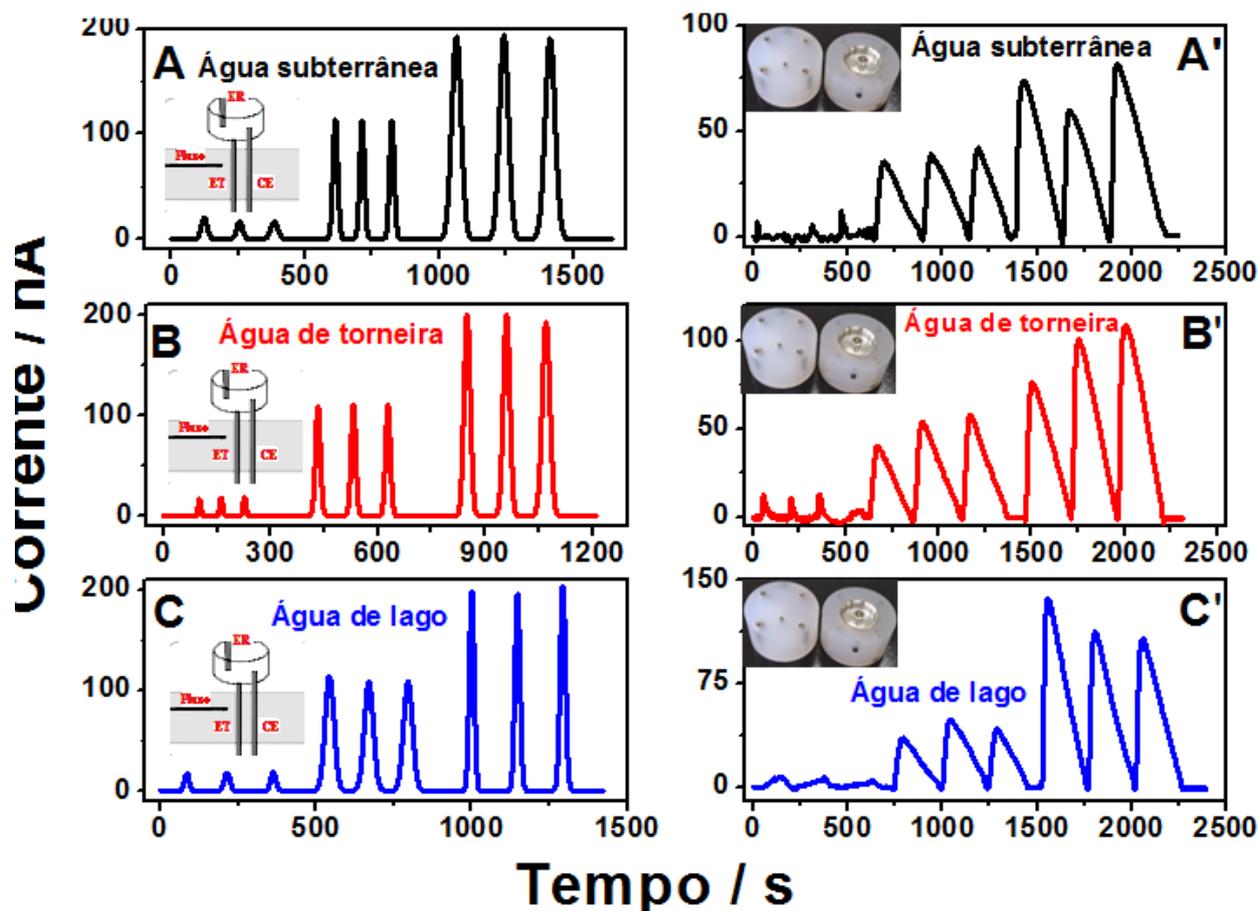


Figura 2.23 - Cronoamperogramas registrados para injeções discretas em triplicado ($60 \mu\text{L}$) de AS para comparar o desempenho do sistema eletroquímico proposto (A, B e C) e sistema eletroquímico convencional (A', B' e C') durante análise de amostras aquosas. Análise de amostra de água subterrânea (A e A'), água da torneira (B e B') e água do lago (C e C') contaminadas com AS em $7,50$; $60,0$ e $110 \mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial aplicado de $0,55 \text{ V vs. Pt}$ (proposto) e Ag (convencional), vazão de $16,7 \mu\text{L s}^{-1}$ para sistema eletroquímico proposto e $22,1 \mu\text{L s}^{-1}$ para sistema eletroquímico convencional. Outras condições como na Tabela 2.1.



2.3 CONCLUSÃO

Foi demonstrado um método alternativo e de baixo custo para a fabricação de plataforma microfluídica — baseada em PDMS — contendo o canal em formato de serpentina e o sistema de detecção eletroquímica totalmente integrados em apenas em um dispositivo. Este dispositivo microfluídico totalmente integrado teve como objetivo melhorar a detecção eletroquímica devido ao reservatório construído para inserir o eletrodo de pseudo-referência estar separado do canal do fluxo de solução. Também foi mostrado como o desempenho do dispositivo desenvolvido pode melhorar a detecção amperométrica de contaminantes emergentes (o que seria de grande valor na aplicação ambiental) em amostras aquosas mesmo em condições drásticas; como uso de sistema de injeção hidrodinâmica (que pode aumentar a pressão e gerar turbulência) e presença de contaminantes nas amostras reais. Esse método de baixo custo pode ser uma alternativa as tecnologias clássicas de fabricação de microfluídica baseada em PDMS, nas quais a integração do sistema de detecção eletroquímica diretamente no chip não é trivial. Ademais, nossa proposta também pode ser usada com sucesso em sistemas amperométricos de detecção eletroquímica, especialmente em condições problemáticas em que as bolhas de ar podem surgir e tornar-se isolantes da superfície tanto do eletrodo de trabalho quanto do eletrodo de referência.



CAPÍTULO III

SEPARAÇÃO E ELETROANÁLISE SIMULTÂNEA EM UMA ÚNICA PLATAFORMA BASEADA EM POLIDIMETILSILOXANO

3. RESUMO

Dispositivos microfluídicos baseados em canal que integram a etapa de separação e o sistema de detecção são fundamentais para expandir a aplicação em microanálise. No entanto, esses dispositivos ainda dependem de equipamentos externos tais como dispositivos para pré-tratamento da amostra, etapa de separação bem como o sistema de detecção. A integração de todas as etapas (ou partes delas) em apenas uma plataforma microfluídica ainda é um desafio e sua viabilidade requer alguns estudos. Neste capítulo, apresentamos um protocolo de baixo custo para resolver parte do desafio supracitado, desenvolvendo um sistema de detecção (em modo duplo) em uma única plataforma baseada em polidimetilsiloxano (PDMS) para separação e detecção simultânea do ácido salicílico e a cafeína sem que houvesse a necessidade do uso de colunas ou uso de fases estacionárias empacotadas no canal. Para a separação da mistura utilizou-se a convecção forçada em um microcanal quimicamente tratado enquanto os analitos puderam ser posteriormente detectados com o modo amperométrico. Sendo assim, no presente estudo serão relatados novos desafios sobre a integração da etapa de separação e posterior eletroanálise de dois analitos em um dispositivo miniaturizado.



3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Reagente, soluções e preparo de amostras.

Soluções padrão estoque ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) de ácido salicílico (AS) e cafeína (CAF) (Sigma Aldrich®, São Paulo, Brasil) foram utilizadas no preparo das soluções de trabalho, realizando-se a diluição das soluções padrão em tampão Britton-Robinson (B-R) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. O tampão B-R foi utilizado como solução transportadora e eletrólito suporte, sendo o seu preparo realizado conforme citado anteriormente (item 2.1.1). O ajuste de força iônica foi efetuado utilizando-se uma solução de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ (Sigma Aldrich®, São Paulo, Brasil). Com o objetivo de melhorar a interação entre os analitos na parede interna do canal durante o estudo de separação, foi utilizado o Tween® 20 (Sigma Aldrich®, São Paulo, Brasil) após testes com diferentes surfactantes. Para limpeza dos eletrodos de Pt no dispositivo microfluídico utilizou-se uma solução de ácido sulfúrico ($0,50 \text{ mol L}^{-1}$) (Sigma Aldrich®, São Paulo, Brasil). O elastômero Polidimetilsiloxano (PDMS) e o agente de cura (agente de reticulação) foram adquiridos na MLSolar (Michigan, Estados Unidos). Para análise em cromatográfica líquida, foram usados Metanol (grau HPLC, $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich®, São Paulo, Brasil) e ácido acético (Glacial, Regent Plus®, $\geq 99\%$, Sigma Aldrich®, São Paulo, Brasil).

Água de torneira, água subterrânea e água de lago foram coletadas na cidade de Dourados (Dourados, MS, Brasil) e utilizadas no preparo de amostras contaminadas durante experimentos de adição-recuperação. As alíquotas preparadas para cada análise foram previamente filtradas em um disco de filtro de náilon de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore, São Paulo, Brasil). As amostras de água foram contaminadas nas concentrações de $7,50$; $60,0$ e $110 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos analitos, ajustando-se o pH para $3,0$ e, posteriormente, armazenadas em frascos de vidro. Para as análises amperométricas foi utilizado o método de adição de padrão em todas as determinações dos analitos e as soluções de calibração foram preparadas em tampão B-R (pH $3,0$) e Tween 20 ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) na faixa de concentração de $5,00$ a $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para as análises com cromatografia líquida foi utilizado o método de calibração externa em todas as determinações dos analitos e as soluções de calibração foram preparadas em água/ metanol/ ácido acético ($69/27/3\%$, v/v) na faixa de concentração de $5,00$ a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.1.2 Instrumentação e configuração experimental.

Um purificador de água por osmose reversa OS 10 LTXE O (Gehaka®, São Paulo, Brasil) foi utilizado na obtenção da água deionizada ($R \geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) para preparo de todas as soluções de trabalho. Um bipotenciostato/galvanostato portátil $\mu\text{STAT 400}$ (DropSens®, Oviedo, Espanha) foi utilizado na realização das medidas voltamétricas e amperométricas e para o controle experimental e tratamento dos dados foi utilizado o Software DropView. Um eletrodo de



vidro combinado (Hanna®, modelo HI 1131B, Texas, Estados Unidos) conectado a um medidor de pH digital (Hanna®, modelo HI 3221, Texas, Estados Unidos) foi utilizado no ajuste dos valores de pH. Uma estufa (Ethik® technology, São Paulo, Brasil) foi usada para acelerar o processo de cura na construção da plataforma baseada em PDMS. Uma micropipeta automática (Eppendorf®, modelo Multipette E3X, Hamburgo, Alemanha) foi usada para injeção discreta (do padrão e das amostras) na matriz de junção T. Uma bomba de seringa (KDSscientific, modelo legato 210P) e seringas de 10 e 20 mL foram usadas para conduzir a solução transportadora para o canal. A bomba de vácuo (Prismatec, modelo 131 - Tipo 2 VC, São Paulo, Brasil) e um dessecador foram utilizados para eliminar as bolhas no PDMS antes do processo de cura.

Para os estudos iniciais utilizou-se o sistema microfluídico desenvolvido com a célula de fluxo amperométrica comercial equipada com a configuração tradicional de três eletrodos bem como com medidas cromatográficas. Usou-se um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UHPLC) (modelo 1220 Infinity LC System, Agilent Technologies, Inc. Waldbronn, Alemanha) equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD) operando entre 200 e 350 nm. Uma coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 Agilent (100 × 3,0 mm id, 3,5 μm) e uma pré-coluna da mesma fase (conectada em um Holder, Phenomenex®, C-18, 4,0 × 3,0 mm) foram usados na separação de AS e CAF.

3.1.3 Construção da plataforma baseada em PDMS.

A plataforma baseada em PDMS foi preparada seguindo os mesmos procedimentos anteriormente apresentados (item 2.1.3). Conforme mostrado na Figura 3.1A os moldes baseados em ABS são bem definidos. Isso foi confirmado por imagens de microscópio óptico (microscópio óptico BEL Photonics®, modelo B3T, Monza, Itália) para os dispositivos fabricados (com medidas em torno de 30 pontos), usando imagens (Figura 3.1B) obtidas no software (AxioVision). Esta etapa foi essencial para confirmar a distribuição do tamanho do canal, uma vez que o PDMS é suscetível a intumescer se deixado em acetona por um longo tempo^{69,72}, o que poderia alterar as dimensões do canal. Assim, para evitar qualquer efeito de intumescimento, reduzimos o tempo de imersão durante a etapa de solubilização para 2,0 horas, seguido de injeção de acetona com uma seringa até que todo o ABS fosse dissolvido de dentro do canal. Ficou comprovado que esta etapa funcionou apropriadamente uma vez que as imagens não mostraram mudanças significativas no diâmetro interno da plataforma de PDMS (Figuras 3.1A e 3.1B). O diâmetro interno com menores dimensões ($297 \pm 10 \times 605 \pm 19$) bem como o formato de serpentina possibilita uma expansão das aplicações desses dispositivos, visando melhorar o comportamento da mistura durante o estudo de separação e posterior eletroanálise simultânea de dois analitos.

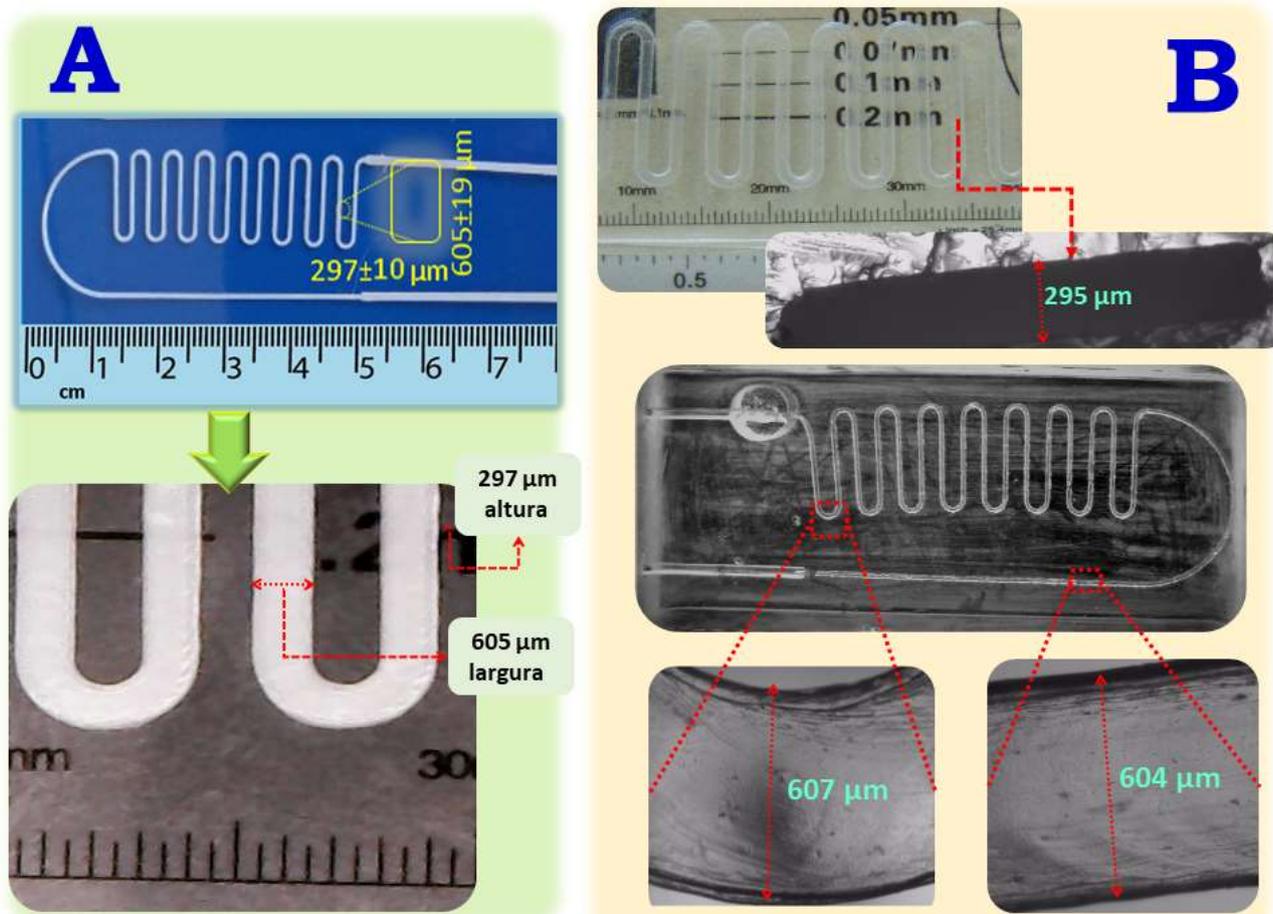


Figura 3.1 - (A) Imagem real mostrando o molde do canal impresso com filamento de ABS e seu desenho geométrico. **(B)** Imagens reais mostrando o canal micrométrico - criado após a solubilização do molde à base de ABS - para medir os diâmetros internos e a rugosidade de sua superfície. Ambas as imagens foram obtidas por imagens de microscópio óptico e a dimensão do canal foi medida por imagens de software (AxioVision).

3.1.4 Configuração experimental e estudos eletroquímicos.

A Figura 3.2 apresenta detalhadamente a configuração experimental, incluindo a bomba de seringa (Figura 3.2A) utilizada para bombear no sistema microfluídico (Figura 3.2B) as soluções de NaOH usada na ativação e o eletrólito suporte usado como transportador, o potenciostato para detecção amperométrica (Figura 3.2C), uma micropipeta eletrônica para injeção de amostra (Figura 3.2D), a junção em T (Figura 3.2E) e, por fim, o design da célula eletroquímica mostrando a configuração dos eletrodos (Figura 3.2E).

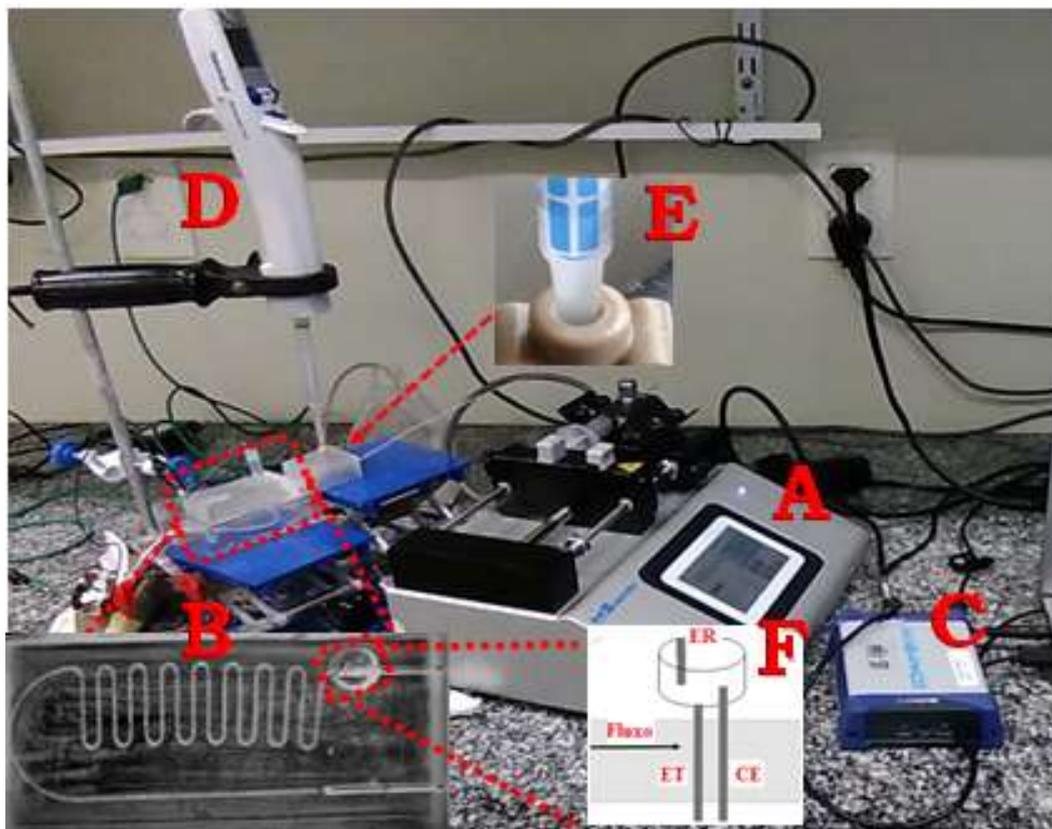


Figura 3.2 - Imagem real do sistema microfluídico usado. (A) bomba de seringa utilizada para conduzir a solução de ativação e a transportadora pelo canal; (B) plataforma baseada em PDMS com sistema detector de modo duplo integrado; (C) bipotenciostato/galvanostato; (D) micropipeta eletrônica automática utilizada para injeções discretas de analito/amostra; (E) imagem mostrando o sistema de junção em T e a ponta conectada diretamente no dispositivo de junção em T e; (F) visão lateral do sistema detector eletroquímico de modo duplo (mostrando ER, CE e ET) integrado a plataforma.

Destaca-se que a plataforma foi projetada para ter dois sistemas eletroquímicos, que funcionam no mesmo conjunto de eletrodos de platina (Pt) (Figura 3.2B e F). O primeiro é uma cavidade vazia ($V = 100 \text{ mm}^3$) no lado superior (próximo ao final do canal) que funciona como a primeira célula eletroquímica (operando em estado estacionário) contendo ET, CE e ER (separados do fluxo) em um reservatório de líquido. Nesse caso, um fio de Pt (420 μm de diâmetro) foi usado como um eletrodo de pseudo-referência (EPR) em todos os testes para demonstrar a viabilidade da plataforma baseada em PDMS. A segunda configuração consiste no modo tradicional de célula de fluxo fornecida com apenas dois eletrodos, que está diretamente em contato com os dois compartimentos. Os fios de Pt são alinhados verticalmente através do canal para servir como ET e CE e em contato direto com ambas as células eletroquímicas (Figura 3.2F). Dessa forma, quando o sistema eletroquímico requer uma configuração de um sistema tradicional de três eletrodos, este pode ser um protocolo simples para fabricar duas configurações de detector eletroquímico em uma única plataforma baseada em PDMS. Também é possível, nesta configuração, controlar o potencial aplicado apenas no compartimento superior



o que evita alguns problemas indesejáveis como observado em análise tradicional com células de fluxo (como descrito anteriormente, ítem 2.2.3). No entanto, mesmo nesses sistemas, mostramos anteriormente que o potencial aplicado no ET pode ser controlado de forma satisfatória em ambos os sistemas eletroquímicos. Um sistema de junção em T contendo três vias (PEEK Tee, 1/16 ") foi usado para direcionar e administrar volumes discretos de amostras no fluxo contínuo, gerando uma conexão precisa da micropipeta eletrônica (Figura 3.2E).

3.1.5 Ativação da superfície do PDMS e medidas eletroquímicas.

A superfície dos eletrodos (Figura 3.2.F) — ET, ER e CE no canal do fluxo — foram limpas com uma solução de H_2SO_4 ($0,50 \text{ mol L}^{-1}$) seguido por injeção de eletrólito suporte (tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3,0) por aproximadamente 30 minutos sob ciclagem com potencial entre -0,50 e 0,90 V vs. Pt (como EPR) em uma vazão de $0,10 \mu\text{L s}^{-1}$ e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Ao fim da etapa de limpeza da superfície dos eletrodos, a parede do canal de PDMS foi funcionalizada pelo bombeamento de uma solução de hidróxido de sódio ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) em uma vazão de $0,83 \mu\text{L s}^{-1}$ por 15 minutos com o objetivo de produzir nos canais uma superfície terminada em OH, sendo todos esses parâmetros previamente estudados e otimizados. Realizando este procedimento, observou-se que a funcionalização garantiu cerca de seis análises sem que ocorresse perda na qualidade da separação dos analitos. Contudo, as etapas de limpeza e ativação devem ser repetidas para análises posteriores. A condição ideal de fluxo para medidas amperométricas foi obtida em uma mistura contendo padrão de AS e CAF ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cada um) na presença de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Tween 20, injetado no transportador composto por tampão B-R ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3,0). Soluções similares sem a adição de Tween 20 também foram preparadas de forma a obter-se dados comparativos. A exatidão foi o parâmetro crucial para estimar a confiabilidade do método proposto, uma vez que foi avaliada por experimentos de adição-recuperação realizados em amostras de água contaminadas com quantidades conhecidas de AS e CAF.

3.1.6 Estudos cromatográficos e testes de validação.

O estudo cromatográfico foi realizado utilizando o comprimento de onda de 275 nm, fase móvel de composição água/ metanol/ ácido acético (69/27/3%, v/v) e temperatura da coluna de 25 °C. A eluição foi realizada em modo isocrático em uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ por 20 minutos, e o volume injetado foi de $20 \mu\text{L}$. Antes da injeção, as amostras e padrões foram filtrados através de um disco de filtro de nylon de $0,25 \mu\text{m}$ (Millipore, São Paulo, Brasil).

As variáveis utilizadas como parâmetros de validação foram baseadas em (i) Linearidade baseando-se na curva de calibração analítica de padrão externo na faixa de concentração de



5,00 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (realizada em triplicadas para cada ponto); (ii) Limite de detecção (LOD); Limite de quantificação (LOQ); (iii) Precisão, expressa como desvio padrão relativo (RSD.), e avaliada usando a variabilidade dos valores medidos (obtidos por medidas replicadas nas mesmas condições). Cabe informar que todos os experimentos cromatográficos apresentados no presente trabalho foram realizados pelo professor Dr Daniel Araújo Gonçalves nas dependências da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).



3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Desempenho da plataforma baseada em PDMS em medidas amperométricas

Depois de construir a célula all-in-one, todo o processo de separação e detecção simultânea foi otimizado, avaliando de forma individual as seguintes variáveis: concentração do surfactante, ativação da parede interna do canal, vazão do transportador, potencial aplicado e volume de amostra injetada, cujos resultados obtidos serão apresentados e discutidos na sequência.

O desempenho da plataforma baseada em PDMS foi avaliado em condições em que o fluxo turbulento e/ou bolhas de ar estivessem presentes (Figura 3.3A). Os dados obtidos foram comparados com aqueles obtidos com uma célula de fluxo amperométrica comercial equipada com a configuração tradicional de três eletrodos (Figura 3.3B).

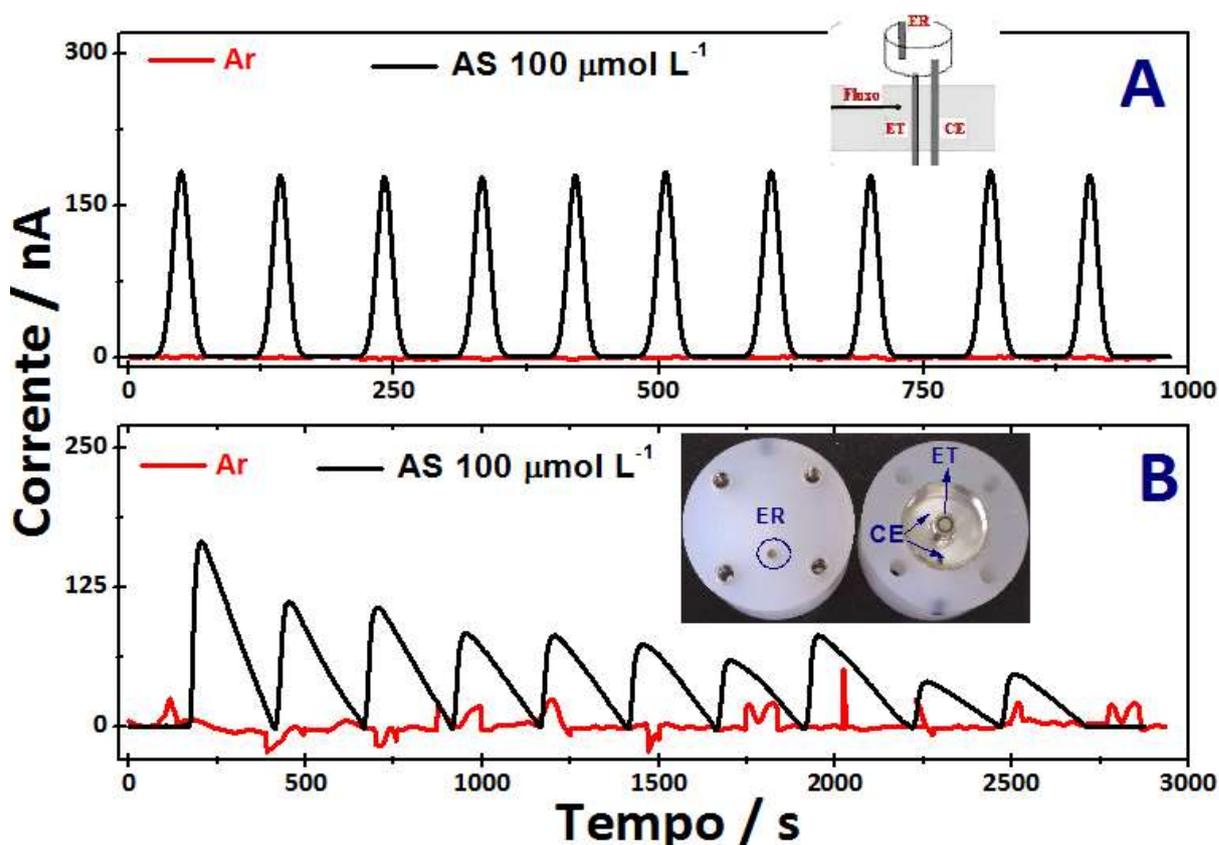


Figura 3.3 - Cronoamperogramas registrados para injeções discretas (60 μL) de AS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) na fase transportadora (linha preta). (A) plataforma baseada em PDMS equipada com o sistema eletroquímico de modo duplo e (B) a célula de fluxo comercial equipada com a configuração tradicional de três eletrodos. A linha vermelha é a injeção de ar no transportador. Fios de platina (420 μm) foram utilizados como ET, CE e PER. A solução transportadora foi o tampão B-R ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 3,0 com cloreto de potássio ($0,50 \text{ mol L}^{-1}$) para o ajuste de força iônica. Outros parâmetros: vazão de $17 \mu\text{L s}^{-1}$ para (A) e $22 \mu\text{L s}^{-1}$ para (B) e o potencial aplicado foi de $0,55 \text{ V vs. Pt}$.

O sistema eletroquímico proposto apresentou desempenho satisfatório na tentativa de



reduzir o ruído e a turbulência causados pela micropipeta ou o eventual problema causado pela ocorrência de bolhas de ar (Figura 3.3A). O amperograma obtido nesse caso apresentou considerável estabilidade em relação a corrente de pico ($I_p = 181 \pm 2,0$ nA, $n = 10$) após dez injeções de AS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), como mostrado na Figura 3.3A (linha preta). A injeção discreta de ar no sistema também não alterou a composição do transportador (Figura 3.3A, linha vermelha), o que garantiu a estabilidade do sistema mesmo com a injeção de ar.

Com o objetivo de comparar o desempenho da configuração de eletrodos (projetados em modo duplo), mudou-se o sistema de detecção na saída do fluxo com a célula amperométrica disponível comercialmente (Figura 3.3B). Conseqüentemente, com o uso do modo de injeção do analito (micropipeta) observou-se um aumento na turbulência do transportador e a detecção amperométrica — na qual os eletrodos foram montados em um arranjo convencional — falha. Isso ocorre devido o movimento do pistão da micropipeta que gera uma pressão suficiente para perturbar o equilíbrio entre o transportador e a fase discreta injetada, resultando em picos altamente ruidosos (Figura 3.3B). Essa turbulência pode criar uma falta de reprodutibilidade relacionada, pois bolhas de ar podem surgir e bloquear as superfícies dos ET e EPR. Quando isso ocorre, perde-se o contato elétrico entre os dois eletrodos, induzindo-se a uma queda de potencial inesperada. O ruído gerado perturba o sinal eletroquímico principal (Figura 3.3B, linha preta), produzindo sinais cujas medidas na intensidade não são reprodutíveis ($I_p = 86 \pm 36$ nA, $n = 10$). Os Cronoamperogramas obtidos para injeção de ar (Figura 3.3B, linha vermelha) confirmam que a configuração tradicional de três eletrodos pode detectar facilmente essa turbulência. Portanto, a nova configuração de sistema eletroquímico pode superar essas limitações (Figura 3.3A), garantindo um controle mais preciso do potencial aplicado no ET, o qual pode ser o mesmo em ambos os compartimentos.

3.2.2 Desempenho da plataforma baseada em PDMS em testes de separação.

Embora a geometria do canal em forma de curva e a leve rugosidade na superfície (ver Figura 3.4) possam perturbar o fluxo laminar ⁷², neste caso pode-se usar essa característica como uma condição adequada para permitir a separação da mistura com dois analitos. A interação da parede do PDMS com a solução do transportador carregando os analitos de interesse também desempenha um papel importante na separação. O PDMS (por exemplo, Sylgard 184[®]) é composto de 70% do oligômero de dimetilsiloxano e outros aditivos (base A) e, além disso, entre 40 e 70% do agente de reticulação (base B) é composto de dimetil metil hidrogênio siloxano ⁷³. Assim, a estrutura química do PDMS caracteriza-o como sendo hidrofóbico ⁷⁴. Alguns desses aditivos usados para polimerização e cura podem ser quimicamente tratados para ter grupos funcionais ionizados. Por exemplo, o hidróxido de sódio é



reconhecidamente capaz de modificar a superfície do PDMS e formar grupos funcionalizados com características menos hidrofóbicas. Para superfícies de PDMS tratadas com hidróxido de sódio, ocorre um aumento do fluxo eletroosmótico, o que pode estar relacionado ao aumento dos grupos -OH⁷⁵.

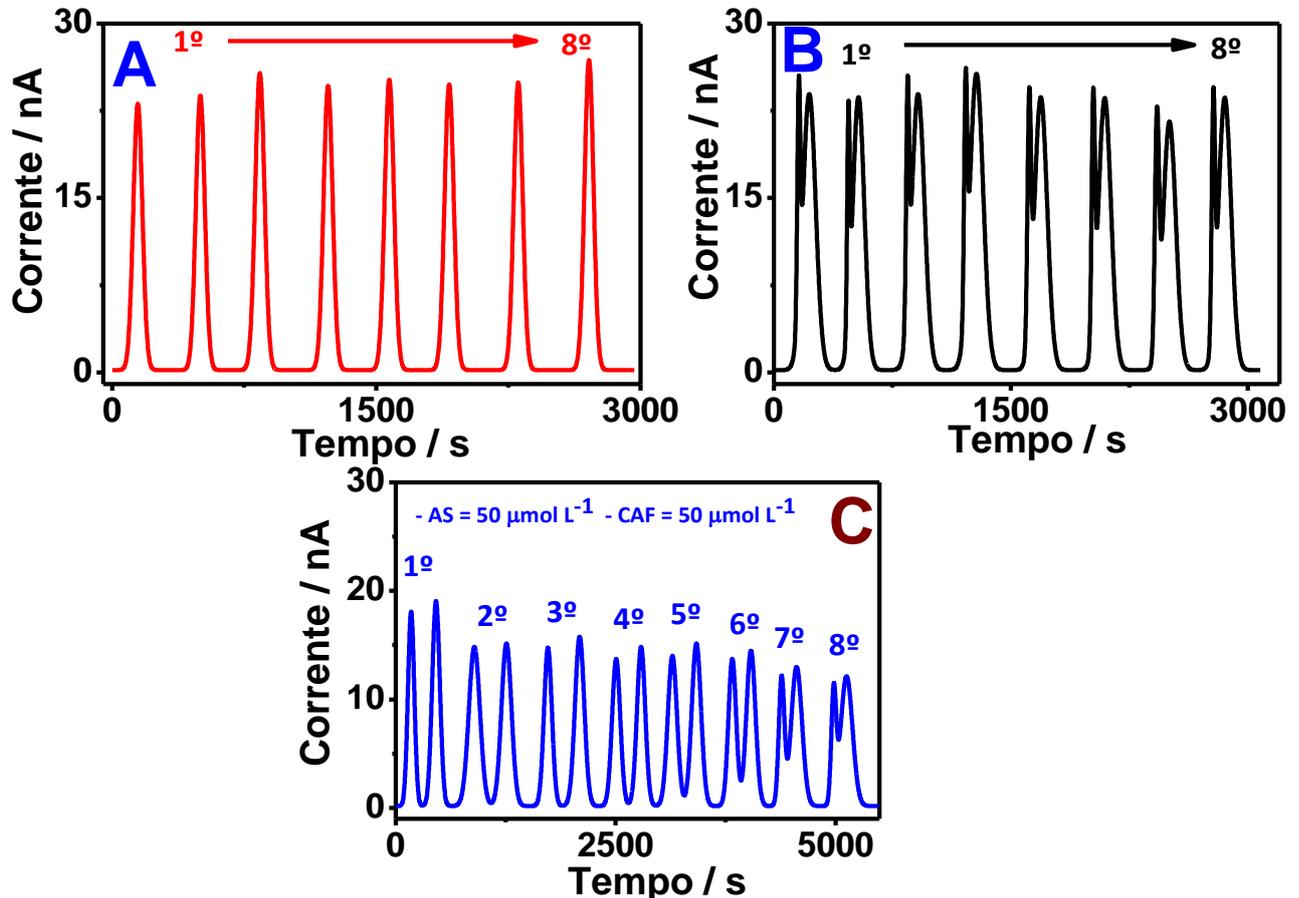


Figura 3.4 - Cronoamperogramas registrados para oito injeções (25 μL) de AS + CAF (50 μmol L⁻¹ para cada um) para comparar o desempenho do sistema proposto no teste de separação. (A) Ausência de surfactante e etapa de ativação, (B) apenas presença de Tween 20 a 50 μmol L⁻¹ na fase injetada; (C) presença de Tween 20 a 50 μmol L⁻¹ na fase injetada e após o método de ativação da parede interna do canal com NaOH (2,0 mol L⁻¹) por 15 minutos e bombeado a uma vazão de 0,83 μL s⁻¹. A solução transportadora foi o tampão B-R (0,04 mol L⁻¹) em pH 3,0, contendo cloreto de potássio (a 0,50 mol L⁻¹) para ajuste da força iônica, bombeado a 0,56 μL s⁻¹. Outro parâmetro: potencial aplicado foi de 0,55 V vs. Pt.

O perfil voltamétrico de AS e CAF tem um potencial de início (onset potential) similar durante a eletrooxidação, que se sobrepõe, exigindo métodos alternativos para identificação e detecção eletroanalítica simultânea. Este comportamento é ainda mais crítico para medidas amperométricas quando a injeção é realizada de forma direta no sistema sem uma etapa de separação anterior. Considerando-se esses fatos, primeiramente, foi injetada uma mistura de AS e CAF sem surfactante e sem nenhuma etapa de modificação da superfície do microcanal, em que apenas um pico pode ser identificado (Figura 3.4A). Em um segundo momento, foi injetada a mistura AS e CAF ao sistema na presença do surfactante Tween 20 (50 μmol L⁻¹), porém com a



superfície do PDMS não tratada. Pode-se observar que os picos tornaram-se ligeiramente distinguíveis (Figura 3.4B), no entanto, a sobreposição parcial ainda dificulta a quantificação. Por fim, os picos de oxidação de AS e CAF foram bem separados quando se utilizou o surfactante (na fase injetada) juntamente com a funcionalização do microcanal (Figura 3.4C). Esta resolução foi altamente satisfatória e permanece até a sexta injeção, a partir da qual os picos começam a se sobrepor (Figura 3.4C).

É importante mencionar que foram realizados inúmeros testes com diferentes surfactantes (Triton X-100, Triton X-114, SDS, Brij-35, CTAB, Tween 80 e Tween 20) visando a melhor separação dos picos referentes a AS e CAF. Por fim, o surfactante que apresentou melhor resposta para esse estudo foi o Tween 20. Essa resposta foi relacionada com sua molécula — de elevado tamanho — que proporciona a possibilidade de diferentes interações com os analitos/canais, sendo esse processo discutido posteriormente com mais detalhes.

Na Figura 3.5 pode-se observar como foi realizada a identificação dos picos de oxidação para cada analito ao variar sua concentração. Os picos obtidos foram simétricos e correspondem a AS e CAF, respectivamente, sugerindo que o CAF foi capaz de interagir mais fortemente com o microcanal funcionalizado do que o AS. Com isso sugere-se que o tempo de retenção tardio identificado para CAF pode ser uma consequência da interação dos grupos amina e amida (presentes no grupo imidazol) com Tween 20 (estrutura química na Figura 3.6). Os agregados micelares (CAF-Tween) de elevado tamanho movem-se mais lentamente através da parede do canal interno ativado por NaOH (geometria em formato de serpentina). Isso causa um maior tempo de retenção, pois o fluido contendo esses agregados interage com mais sucesso nas paredes do microcanal, resultando na separação seletiva de ambos analitos. Por sua vez, a solução contendo o surfactante também pode evitar que ocorra alguma competição entre o AS e o CAF ao interagir com a superfície tratada do PDMS, ocasionando uma diminuição no tempo de retenção do AS. Também foi possível associar a soma da área de pico individual (ou seja, AS + CAF, Figura 3.5 e Tabela 3.1) com os valores obtidos após a ativação e a presença do surfactante, comprovando que o único sinal observado anteriormente estava relacionado ao AS e CAF como esperado (Tabela 3.1). Uma vez que não houve diferença significativa entre os valores das áreas antes e depois do processo de ativação e da presença do surfactante, estes dados comprovam a separação de ambos os analitos e isso foi usado para fins analíticos quantitativos.

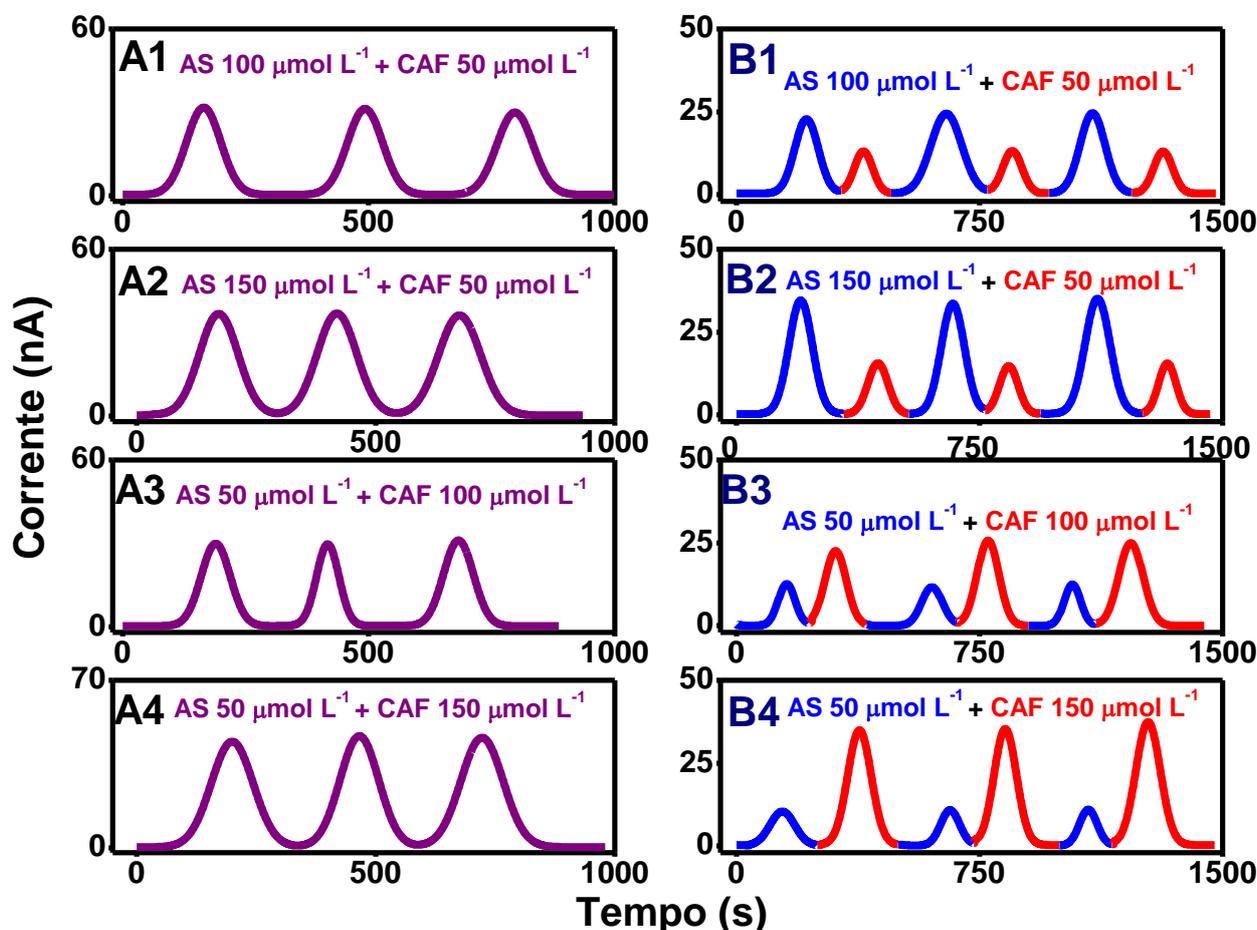


Figura 3.5 - Cronoamperogramas registrados para injeções em triplicata (25 μL) de AS + CAF após variar a concentração de 50 a 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para identificar os picos comparando sua área antes (**A1 e A4**) e após (**B1 e B4**) a etapa de ativação. Condições: o transportador foi o tampão B-R (0,04 mol L^{-1} a pH 3,0); o surfactante Tween 20 (a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e o processo de ativação (superfície interna do canal baseado em PDMS) foi realizado em solução de hidróxido de sódio (a 2,0 mol L^{-1}) bombeada na vazão de 0,83 $\mu\text{L s}^{-1}$ por 30 minutos. O transportador foi bombeado na taxa de fluxo de 0,56 $\mu\text{L s}^{-1}$ usando uma bomba de seringa, e o potencial aplicado foi de 0,55 V vs. Pt.

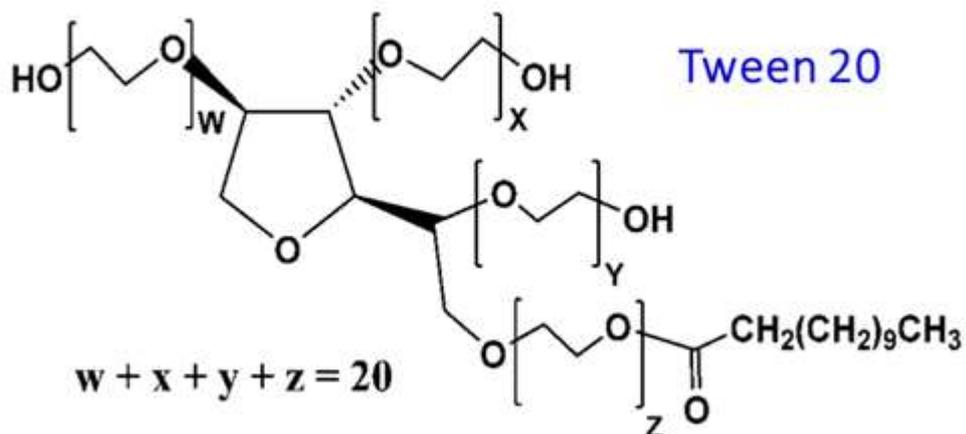


Figura 3.6 - Estrutura química do monolaurato de polioxietileno-20-sorbitano (Tween 20).

Tabela 3.1 - Soma e área dos picos individuais de AS e CAF calculadas antes e depois da etapa de ativação.

Área do pico antes da ativação	Área do pico depois da ativação		Área total após ativação
AS e CAF	AS	CAF	AS + CAF
2747	2040	904	2944
2774	2874	968	3842
2736	2365	932	3297
3711	3120	1185	4305
3803	3006	1055	4061
3978	3404	1032	4436
3619	654	2998	3652
3890	750	3174	3924
3740	631	3178	3809
4826	756	4165	4921
4703	764	4053	4817
5053	721	4525	5246



Quando analisa-se a influência da concentração de Tween 20 (variada em 5,00, 50,0 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, Figura 3.7) no desempenho da separação de AS e CAF, não se observa efeito significativo. Já a variação na vazão da solução transportadora tampão B-R (Figura 3.8) mostra que a resolução dos picos diminui em vazões altas, entretanto, não sendo o suficiente para influenciar na separação do pico (Figura 3.8 B1-5). Ademais, na Figura 3.8, fica comprovada que a oxidação de ambos os analitos não pode ser alcançada apenas usando a detecção amperométrica (Figura 3.8 A1-5), uma vez que será necessária uma etapa de separação desses picos na parede interna do canal.

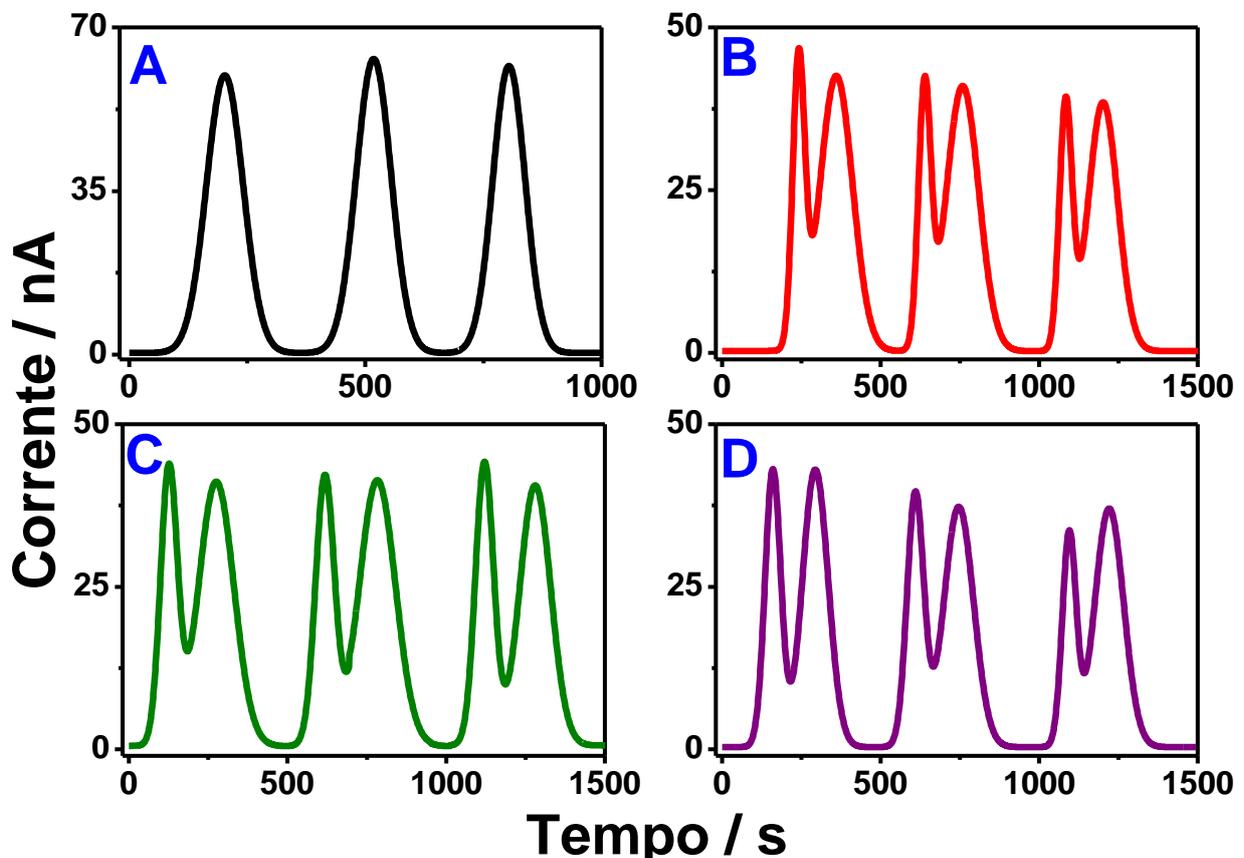


Figura 3.7 - Cronoamperogramas registrados para injeções discretas em triplicata (30 μL) de AS + CAF (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para cada um) para comparar o desempenho do sistema proposto sob diferentes concentrações de Tween 20 em relação à separação do analito durante a ativação das paredes internas do canal baseadas em PDMS por 30 minutos com NaOH (2,0 mol L^{-1}) a uma vazão de 0,83 $\mu\text{L s}^{-1}$. **A**) na ausência de surfactante; **B**) com Tween 20 a uma concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; **C**) com Tween 20 a uma concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; **D**) com Tween 20 a uma concentração de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Em todos os casos, a taxa de fluxo foi de 1,39 $\mu\text{L s}^{-1}$ e o potencial aplicado foi de 0,55 V vs. Pt.

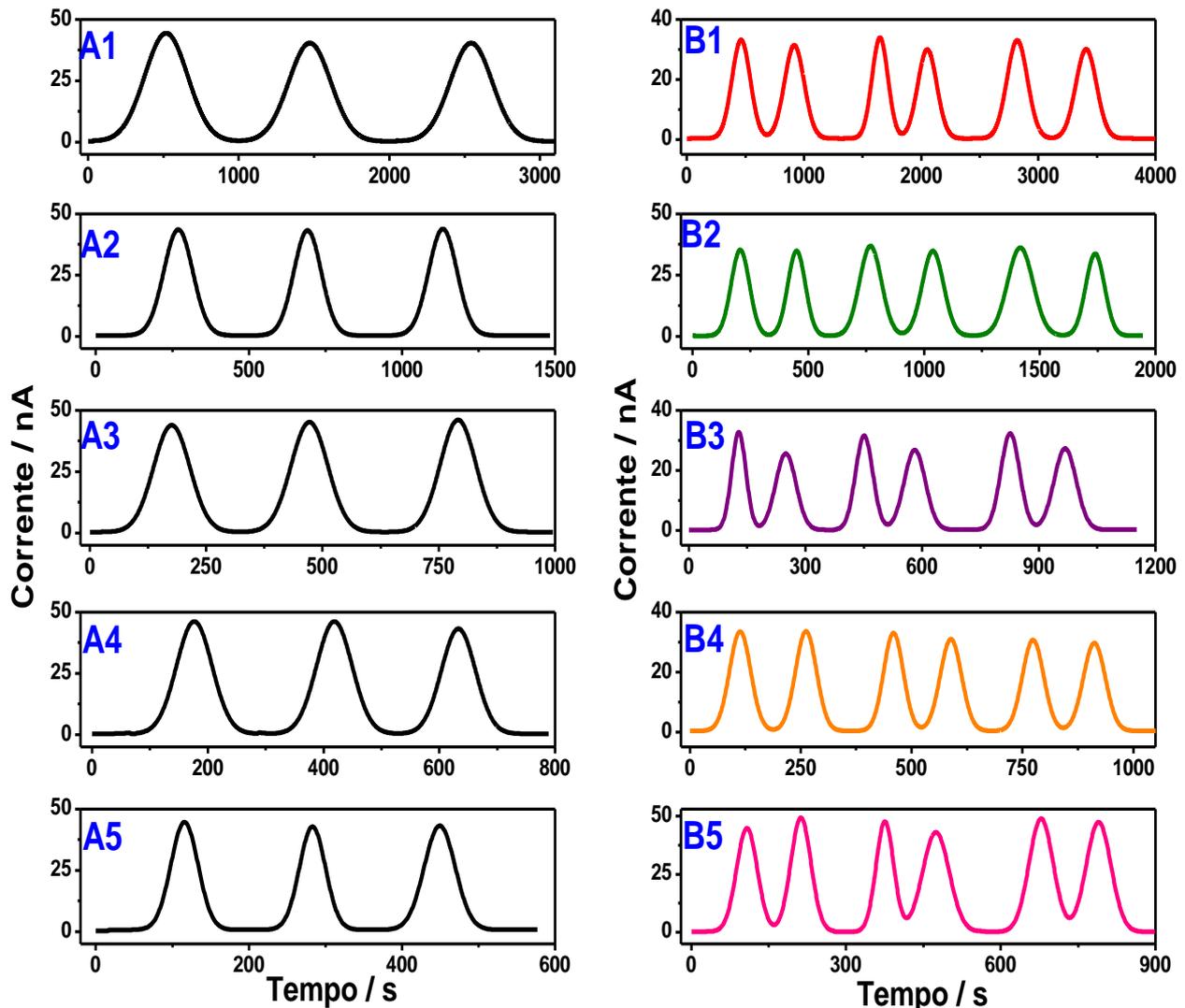


Figura 3.8 - Cronoamperogramas registrados para injeções discretas em triplicata (30 μL) de AS + CAF (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para cada um) durante a ativação das paredes internas do canal baseado em PDMS por 15 minutos com NaOH (2,0 mol L^{-1}) a uma vazão de 0,83 $\mu\text{L s}^{-1}$. **A1**) na ausência de ativação com vazão de 0,28 $\mu\text{L s}^{-1}$; **B1**) após ativação e com vazão de 0,28 $\mu\text{L s}^{-1}$; **A2**) na ausência de ativação com vazão de 0,56 $\mu\text{L s}^{-1}$; **B2**) após ativação e com vazão de 0,56 $\mu\text{L s}^{-1}$; **A3**) na ausência de ativação com vazão de 0,83 $\mu\text{L s}^{-1}$; **B3**) após ativação e com vazão de 0,83 $\mu\text{L s}^{-1}$; **A4**) na ausência de ativação com vazão de 1,11 $\mu\text{L s}^{-1}$; **B4**) após ativação e com vazão de 1,11 $\mu\text{L s}^{-1}$; **A5**) na ausência de ativação com vazão de 1,39 $\mu\text{L s}^{-1}$; **B5**) após ativação e com vazão de 1,39 $\mu\text{L s}^{-1}$. Em todos os casos, o potencial aplicado foi de 0,55 V vs. Pt. A concentração de Tween 20 foi de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O tempo e a vazão no processo de funcionalização também são fatores de fundamental importância na separação. O tempo em que a parede do canal interno foi ativada com NaOH (vazão de 0,83 $\mu\text{L s}^{-1}$) influenciou significativamente tanto na resolução quanto na separação propriamente dita, sendo os melhores tempos de ativação entre 15 e 30 minutos (Figura 3.9). Já na Figura 3.10, verifica-se que a vazão da solução de NaOH no processo de funcionalização pode alterar a separação dos analitos. Nesse caso, os menores valores (de 0,28 a 1,11 $\mu\text{L s}^{-1}$)



são os mais adequados para produzir uma separação satisfatória, levando a picos amperométricos bem resolvidos e simétricos com resolução confiável.

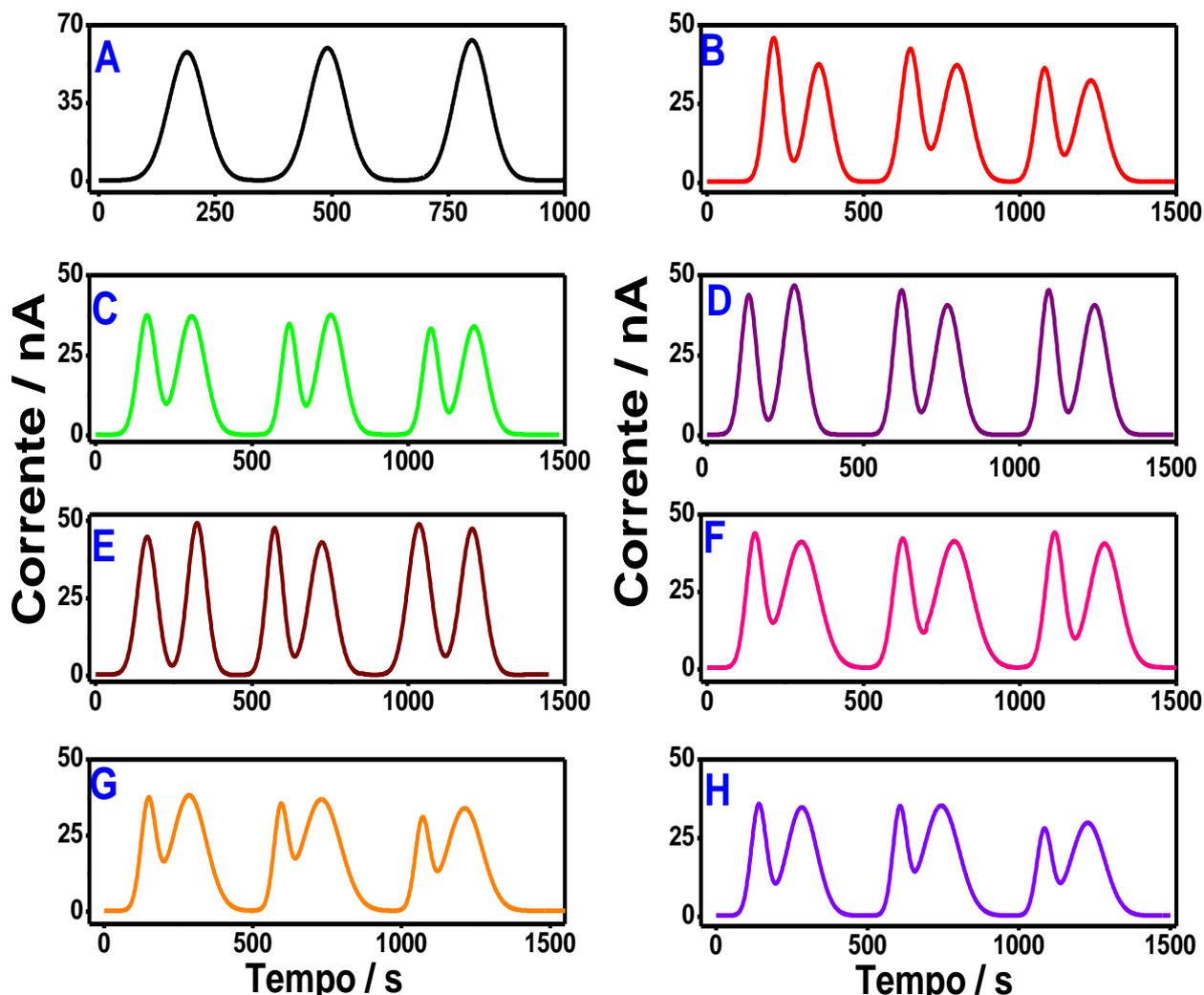


Figura 3.9 - Cronoamperogramas registrados para injeções discretas em triplicata (30 μL) de AS + CAF ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cada um) para comparar o desempenho do sistema proposto em diferentes tempos de ativação durante a ativação das paredes internas do canal baseado em PDMS com NaOH ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) a uma vazão de $0,83 \mu\text{L s}^{-1}$. **A**) na ausência de ativação com vazão de $0,28 \mu\text{L s}^{-1}$; **B**) ativação por 5,0 minutos; **C**) ativação por 7,5 minutos; **D**) ativação por 10 minutos; **E**) ativação por 15 minutos; **F**) ativação por 30 minutos; **G**) ativação por 45 minutos; **H**) ativação por 60 minutos. Em todos os casos, a vazão para o transportador (tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 3,0) foi $0,56 \mu\text{L s}^{-1}$, o potencial aplicado foi de $0,55 \text{ V vs. Pt}$ e a concentração de Tween 20 foi de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

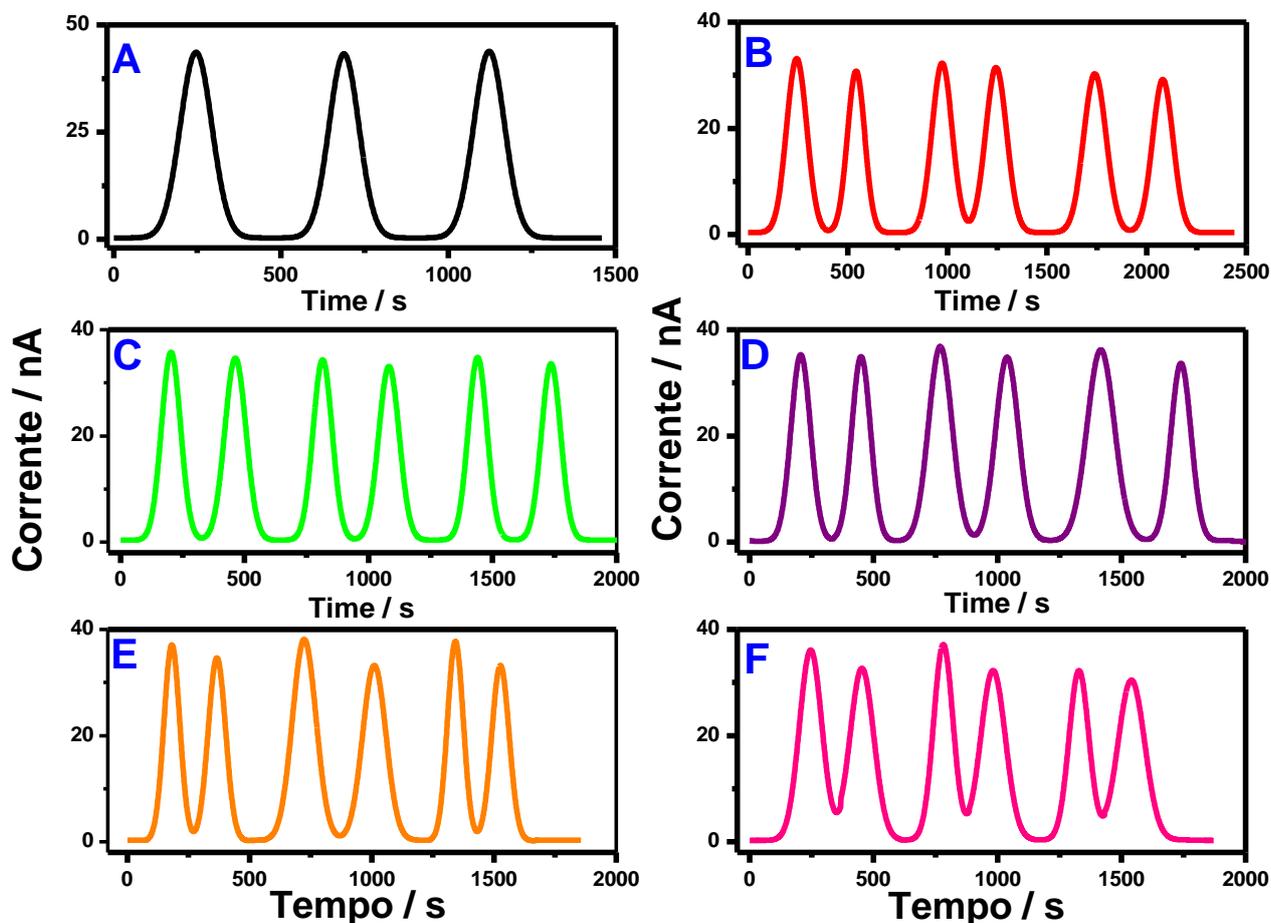


Figura 3.10 - Cronoamperogramas para injeções discretas em triplicata (30 μL) de AS + CAF (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para cada um) para comparar o desempenho do sistema proposto em diferentes vazões de NaOH (2,0 mol L^{-1}) durante a ativação do canal do PDMS por 15 minutos. **A**) na ausência de ativação; **B**) com NaOH em uma vazão de 0,14 $\mu\text{L s}^{-1}$; **C**) com NaOH em uma vazão de 0,28 $\mu\text{L s}^{-1}$; **D**) com NaOH em uma vazão de 0,56 $\mu\text{L s}^{-1}$; **E**) com NaOH em uma vazão de 0,83 $\mu\text{L s}^{-1}$; **F**) com NaOH em uma vazão de 1,11 $\mu\text{L s}^{-1}$. Em todos os casos, a vazão para o transportador (tampão Britton-Robinson 0,04 mol L^{-1} a pH 3,0) foi 0,56 $\mu\text{L s}^{-1}$, o potencial aplicado foi de 0,55 V vs. Pt e a concentração de Tween 20 foi de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Após a otimização do volume de injeção discreta (Figura 3.11 e Tabela 3.2) e a obtenção do voltamograma hidrodinâmico para avaliar o melhor potencial a ser aplicado na detecção amperométrica (Figura 3.12 e Tabela 3.2), foi possível dar continuidade nos estudos de separação de AS + CAF com as avaliações dos parâmetros de confiabilidade analítica.

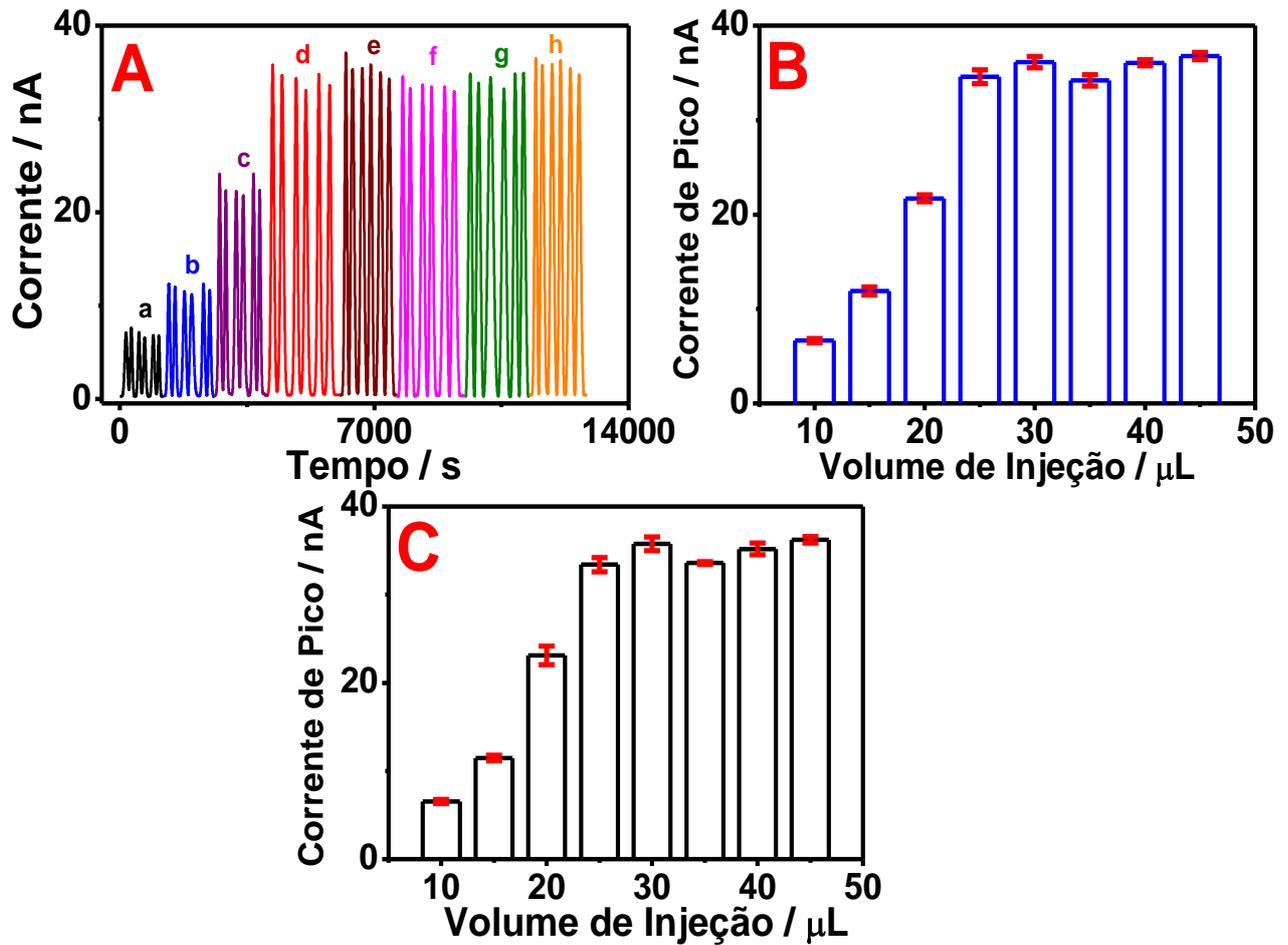


Figura 3.11 - A) Cronoamperogramas e gráficos de corrente *versus* volume de injeção discreta (μL) obtidos para injeções em triplicata ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cada um) de AS (B) e CAF (C) para comparar o desempenho do sistema proposto em diferentes volumes de injeções discretas. Os dados foram registrados após a ativação das paredes internas do canal por 15 minutos com NaOH ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) em uma vazão de $0,83 \mu\text{L s}^{-1}$ e concentração de Tween 20 a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Volumes de injeção: (a) 10; (b) 15; (c) 20; (d) 25; (e) 30; (f) 35; (g) 40 e (h) 45 μL . Em todos os casos, o potencial aplicado foi de 0,55 V vs. Pt.

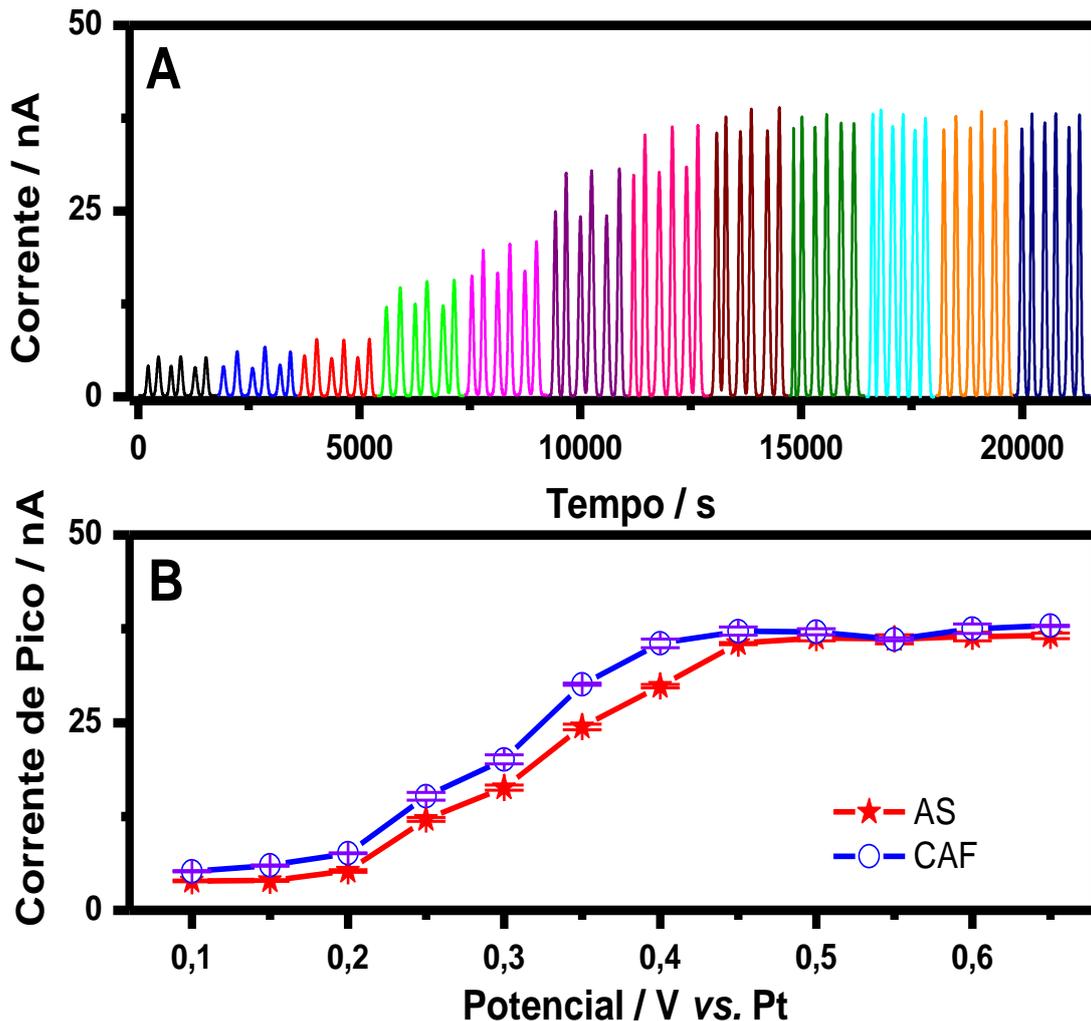


Figura 3.12 - A) Cronoamperogramas e **B)** Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para injeções discretas (30 μL) em triplicata de AS e CAF (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para cada um) comparando o desempenho do sistema proposto em diferentes potenciais aplicados (0,10 a 0,65 V). A ativação das paredes internas do canal com NaOH (2,0 mol L^{-1}) por 15 minutos em uma vazão de 0,83 $\mu\text{L s}^{-1}$. A concentração de Tween 20 foi de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 3.2 - Resumo dos parâmetros avaliados e otimizados para o estudo da separação de diferentes analitos usando o dispositivo microfluídico.

Parâmetro	Estudado	Otimizado
Concentração de Tween 20 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5-100	50
Tempo de ativação dos canais (minutos)	5-60	15
Vazão para ativação dos canais com NaOH ($\mu\text{L s}^{-1}$)	0,14-1,11	0,83
Vazão da solução transportadora ($\mu\text{L s}^{-1}$)	0,28-1,39	0,56
Potencial Aplicado (V)	0,10-0,65	0,55
Volume de Injeção do analito e amostra (μL^{-1})	10-50	30



3.2.2 Parâmetros de confiabilidade analítica e desempenho do dispositivo na análise em fluxo

A linearidade e a sensibilidade obtidas para comparar injeções discretas em triplicata tanto para a eletroanálise simultânea de ambos os analitos (Figura 3.13, A e A1) quanto à detecção individual de SA (Figura 3.13, B e B1) e CAF (Figura 3.13, C e C1), permitiram a detecção seletiva de ambos os analitos nas condições relatadas. A sensibilidade não foi significativamente afetada, sugerindo que a plataforma eletroanalítica proposta baseada em PDMS atende ao requisito para a aplicação analítica em um sistema eletroquímico em fluxo miniaturizado.

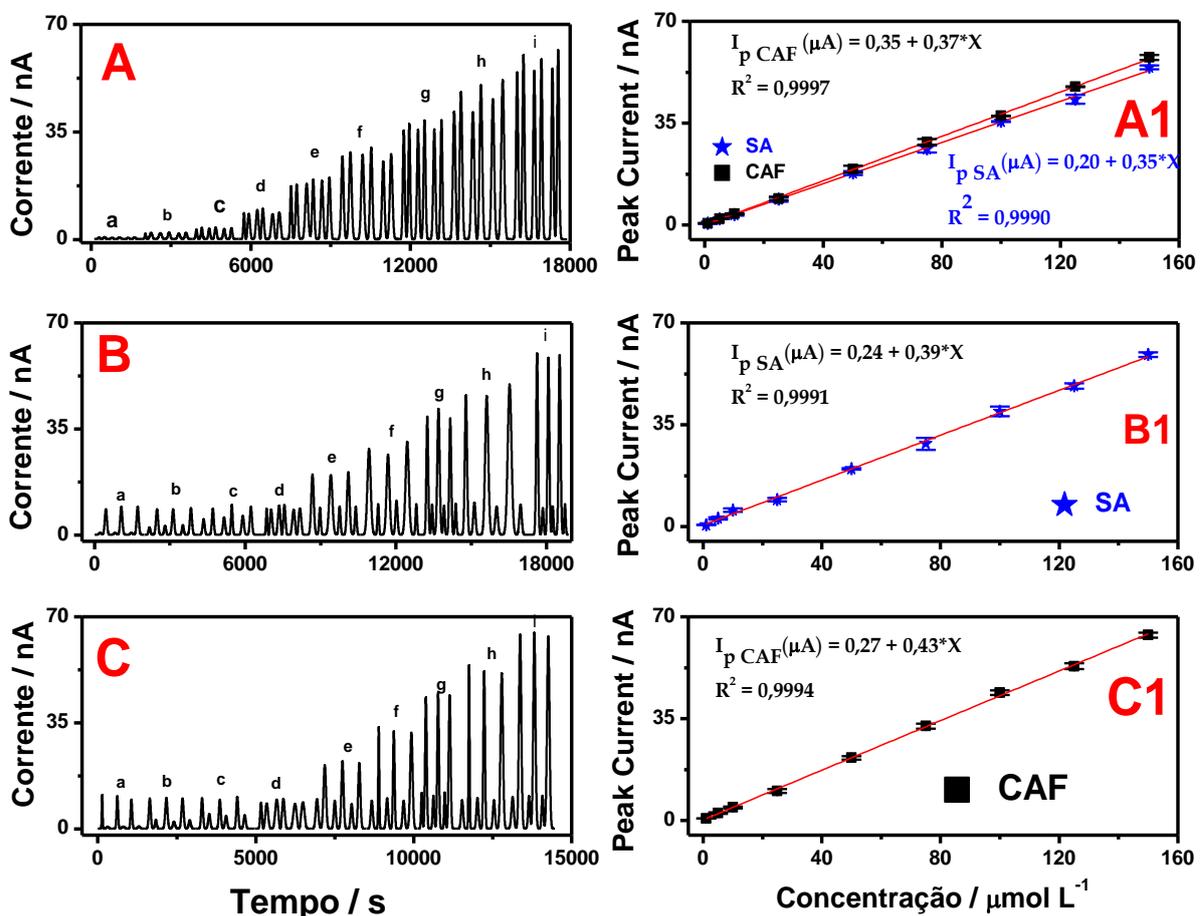


Figura 3.13 - (A) Cronoamperogramas e (A1) Curvas de calibração para injeções em triplicata (30 μL) de SA e CAF, ambos na faixa de concentração de 1,00 a 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Cronoamperogramas e (B1) Curvas de calibração para injeções em triplicata (30 μL) de SA na faixa de concentração de 1,00 a 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e fixando em 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF. (C) Cronoamperogramas e (C1) Curvas de calibração para injeções em triplicata (30 μL) de CAF na faixa de concentração de 1,00 a 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e fixando em 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS. Potencial aplicado: 0,55 V. Outras condições como na Tabela 3.2.



Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados de acordo com o proposto por Ruggieri et al.⁷¹. Neste caso, o $LOD = (3 \times S)/\sqrt{n}$ e $LOQ = (10 \times S)/\sqrt{n}$, em que S é o desvio padrão de dez repetições das amostras contaminadas em três níveis (baixo, médio e alto) e n é o número de repetições. O LOD para AS e CAF foi de 0,20 e 0,18 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e o LOQ foi de 0,70 e 0,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Esse resultado garante a obtenção de dados robustos, mesmo em baixas concentrações.

HPLC-DAD é sem dúvida uma das técnicas mais robustas para a separação e quantificação de compostos orgânicos. Usando os parâmetros otimizados (Tabela 3.2), comparou-se a precisão do sistema microfluídico com aqueles obtidos por HPLC-DAD (Tabela 3.3) mediante testes de adição e recuperação dos analitos. O desempenho em termos de precisão (variabilidade medida via desvio padrão) e exatidão (medida via recuperação) do dispositivo proposto foi comparável ao HPLC-DAD, com recuperações variando entre 98 e 106% (AS) e entre 97 e 101% (CAF) para todas as amostras de água analisadas. Ambas as técnicas geraram resultados de recuperação próximos ao esperado, no entanto, estes diferem apenas em termos de desvio padrão relativo (RSD). A plataforma baseada em PDMS mostra desempenho superior, com RSD entre 0,80-4,20% e 0,30-1,90% para AS e CAF, respectivamente. Enquanto isso, o HPLC-DAD forneceu valores maiores de RSD%: 6,20-9,00% (AS) e 6,60-9,60% (CAF), respectivamente. Portanto, a concordância entre o valor real dos analitos nas amostras contaminadas e o valor estimado obtidos por ensaios de recuperação na matriz mostra que o sistema proposto pode ser uma alternativa para análises de amostras e determinação simultânea desses analitos. Essa hipótese é reforçada quando se compara estes resultados com aqueles obtidos pelo método HPLC-DAD usado como referência.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DOUTORADO EM QUÍMICA EM ASSOCIAÇÃO

Tabela 3.3 - Porcentagens de recuperação (%) para determinação simultânea de AS e CAF em amostras de água contaminadas, comparando o desempenho do dispositivo baseado em PDMS e HPLC-DAD.

Ácido Salicílico					
Amostra	Solução Preparada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Dispositivo proposto		HPLC-DAD	
		Encontrada \pm SD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperada (%)	Encontrada \pm SD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperada (%)
Água de Lago	7,50	7,93 \pm 0,04	106	6,92 \pm 0,01	92
	60,0	59,9 \pm 0,05	100	63,2 \pm 0,02	105
	110	107 \pm 0,02	98	112 \pm 0,02	101
Água Subterrânea	7,50	7,71 \pm 0,02	103	6,82 \pm 0,01	91
	60,0	60,7 \pm 0,06	101	65,2 \pm 0,08	109
	110	108 \pm 0,05	99	114 \pm 0,08	103
Água de Torneira	7,50	7,48 \pm 0,03	99	7,07 \pm 0,01	94
	60,0	59,5 \pm 0,02	99	64,0 \pm 0,08	107
	110	108 \pm 0,01	98	113 \pm 0,07	102

Cafeína					
Amostra	Solução Preparada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Dispositivo baseado em PDMS		HPLC-DAD	
		Encontrada \pm SD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperada (%)	Encontrada \pm SD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperada (%)
Água de Lago	7,50	7,30 \pm 0,02	97	6,94 \pm 0,01	93
	60,0	58,6 \pm 0,03	98	63,5 \pm 0,02	106
	110	107 \pm 0,01	98	113 \pm 0,02	102
Água Subterrânea	7,50	7,58 \pm 0,04	101	6,75 \pm 0,10	90
	60,0	58,5 \pm 0,05	97	65,3 \pm 0,03	109
	110	109 \pm 0,03	100	114 \pm 0,06	103
Água de Torneira	7,50	7,45 \pm 0,01	99	7,07 \pm 0,01	94
	60,0	60,6 \pm 0,02	101	64,5 \pm 0,03	107
	110	110 \pm 0,04	100	114 \pm 0,05	103



3.3 CONCLUSÃO

Neste capítulo foi apresentado um método simples de aplicação do sistema microfluídico integrado a um detector eletroquímico de modo duplo, no qual todos os componentes foram construídos diretamente em uma única plataforma baseada em PDMS. A configuração do sistema eletroquímico, que pode ser utilizado tanto em modo estacionário quanto em fluxo melhorou significativamente a detecção amperométrica. Isso possibilitou resolver uma das limitações que geralmente ocorrem em dispositivos operando em modo hidrodinâmicos, os quais funcionam em configuração de três eletrodos com os arranjos convencionais. Foi possível demonstrar como o canal da plataforma PDMS pode ser utilizado na separação de dois analitos, realizando apenas uma etapa de ativação (com NaOH) das paredes internas. Dessa forma, pode-se concluir que esse sistema microfluídico apresenta potencial para aplicação em cromatografia, uma vez que não necessita de membranas e não requer uma fase estacionária específica para empacotar o canal, o que evita contaminação, reduz custos e agiliza as análises. Por fim, o desempenho da plataforma baseada em PDMS foi comparável ao encontrado por medidas de HPLC-DAD para aplicações simples na qual a separação e determinação simultânea de AS e CAF é realizada em amostras aquosas.



4. REFERÊNCIAS

- (1) MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, n. 1–6, p. 244–248, 1990.
- (2) HUNG, L.-H.; WANG, H.-L.; YANG, R.-J. A portable sample concentrator on paper-based microfluidic devices. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 20, n. 5, 2016.
- (3) LEMAN, M. et al. Droplet-based microfluidics at the femtolitre scale. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 3, p. 753–765, 2015.
- (4) MEREDITH, N. A. et al. Paper-based analytical devices for environmental analysis. **The Analyst**, v. 141, n. 6, p. 1874–1887, 2016.
- (5) RACKUS, D. G.; SHAMSI, M. H.; WHEELER, A. R. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 15, p. 5320–5340, 2015.
- (6) WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–373, 2006.
- (7) MARY, P.; STUDER, V.; TABELING, P. Microfluidic Droplet-Based Liquid–Liquid Extraction. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 8, p. 2680–2687, 2008.
- (8) NGE, P. N.; ROGERS, C. I.; WOOLLEY, A. T. Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2550–2583, 2013.
- (9) FARRÉ, M.; BARCELÓ, D.; BARCELÓ, D. Analysis of emerging contaminants in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 240–253, 2013.
- (10) KANTIANI, L. et al. Emerging food contaminants: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 6, p. 2413–2427, 2010.
- (11) SHANG, L.; CHENG, Y.; ZHAO, Y. Emerging Droplet Microfluidics. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7964–8040, 2017.
- (12) SAMIE, M.; SALARI, A.; SHAFII, M. B. Breakup of microdroplets in asymmetric T junctions. **Physical Review E**, v. 87, n. 5, p. 053003, 2013.
- (13) LE, H. P. Progress and Trends in Ink-jet Printing Technology. **Journal of Imaging Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 49–62, 1998.
- (14) REYES, D. R. et al. Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2623–2636, 2002.
- (15) RÍOS, Á.; ZOUGAGH, M.; AVILA, M. Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 740, p. 1–11, 2012.
- (16) HAEBERLE, S.; ZENGERLE, R. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 9, p. 1094, 2007.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DOUTORADO EM QUÍMICA EM ASSOCIAÇÃO

-
- (17) TOBISZEWSKI, M. Metrics for green analytical chemistry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 15, p. 2993–2999, 2016.
- (18) PRAKASH, S.; PINTI, M.; BHUSHAN, B. Theory, fabrication and applications of microfluidic and nanofluidic biosensors. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 370, n. 1967, p. 2269–2303, 2012.
- (19) RIVET, C. et al. Microfluidics for medical diagnostics and biosensors. **Chemical Engineering Science**, v. 66, n. 7, p. 1490–1507, 2011.
- (20) DATTA-CHAUDHURI, T.; ABSHIRE, P.; SMELA, E. Packaging commercial CMOS chips for lab on a chip integration. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 10, p. 1753, 2014.
- (21) CHOW, A. W. Lab-on-chip: Opportunities for chemical engineering. **AIChE Journal**, v. 48, n. 8, p. 1590–1595, 2002. .
- (22) FU, Y. Q. et al. Advances in piezoelectric thin films for acoustic biosensors, acoustofluidics and lab-on-chip applications. **Progress in Materials Science**, v. 89, p. 31–91, 2017.
- (23) TEMIZ, Y. et al. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? **Microelectronic Engineering**, v. 132, p. 156–175, 2015.
- (24) YAZDI, A. A. et al. 3D printing: an emerging tool for novel microfluidics and lab-on-a-chip applications. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 20, n. 3, 2016.
- (25) ERICKSON, D.; LI, D. Integrated microfluidic devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 507, n. 1, p. 11–26, 2004.
- (26) HU, J. et al. Portable microfluidic and smartphone-based devices for monitoring of cardiovascular diseases at the point of care. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 3, p. 305–320, 2016.
- (27) ALLEN, P. B.; CHIU, D. T. Calcium-Assisted Glass-to-Glass Bonding for Fabrication of Glass Microfluidic Devices. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 18, p. 7153–7157, 2008.
- (28) HARRISON, D. J. et al. Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 895–897, 1993.
- (29) UNGER, M. A. Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 113–116, 2000.
- (30) WU, J.; GU, M. Microfluidic sensing: state of the art fabrication and detection techniques. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 8, p. 080901, 2011.
- (31) GOTTSCHLICH, N. et al. Two-Dimensional Electrochromatography/Capillary Electrophoresis on a Microchip. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 11, p. 2669–2674, 2001.
- (32) LEE, H. et al. Chip–NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells. **Nature Medicine**, v. 14, n. 8, p. 869–874, 2008.
- (33) MUKHOPADHYAY, R. When PDMS isn't the best. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 9, p. 3248–3253, 2007.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DOUTORADO EM QUÍMICA EM ASSOCIAÇÃO

- (34) MAPPES, T.; ACHENBACH, S.; MOHR, J. X-ray lithography for devices with high aspect ratio polymer submicron structures. **Microelectronic Engineering**, v. 84, n. 5–8, p. 1235–1239, 2007.
- (35) KEE, J. S. et al. Monolithic integration of poly(dimethylsiloxane) waveguides and microfluidics for on-chip absorbance measurements. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 134, n. 2, p. 532–538, 2008.
- (36) LOPERA ARISTIZÁBAL, S. **Desenvolvimento de sistemas Lab-on-a-Chip para análises em biofísica celular**. Doutorado em Microeletrônica—São Paulo: Universidade de São Paulo, 2012.
- (37) ROMAN, G. T. et al. Sol–Gel Modified Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Devices with High Electroosmotic Mobilities and Hydrophilic Channel Wall Characteristics. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 1414–1422, 2005.
- (38) HWANG, Y.; PAYDAR, O. H.; CANDLER, R. N. 3D printed molds for non-planar PDMS microfluidic channels. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 226, p. 137–142, 2015.
- (39) LIGA, A.; MORTON, J. A. S.; KERSAUDY-KERHOAS, M. Safe and cost-effective rapid-prototyping of multilayer PMMA microfluidic devices. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 20, n. 12, 2016.
- (40) SAGGIOMO, V.; VELDERS, A. H. Simple 3D Printed Scaffold-Removal Method for the Fabrication of Intricate Microfluidic Devices. **Advanced Science**, v. 2, n. 9, p. 1500125, 2015.
- (41) SOCHOL, R. D. et al. 3D printed microfluidics and microelectronics. **Microelectronic Engineering**, v. 189, p. 52–68, 2018.
- (42) WIETSMA, J. J. et al. Lab-on-a-Chip: Frontier Science in the Classroom. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 267–275, 2018.
- (43) COLTRO, W. K. T. et al. Microssistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1986–2000, 2007.
- (44) ERKAL, J. L. et al. 3D printed microfluidic devices with integrated versatile and reusable electrodes. **Lab Chip**, v. 14, n. 12, p. 2023–2032, 2014.
- (45) AMBROSI, A.; PUMERA, M. 3D-printing technologies for electrochemical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 10, p. 2740–2755, 2016.
- (46) GORLA, F. A. et al. Electrochemical study for the simultaneous determination of phenolic compounds and emerging pollutant using an electroanalytical sensing system based on carbon nanotubes/surfactant and multivariate approach in the optimization. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 65–75, 2016.
- (47) HWANG, Y.; CANDLER, R. N. Non-planar PDMS microfluidic channels and actuators: a review. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 23, p. 3948–3959, 2017.
- (48) MOHAMMED, M. I.; HASWELL, S.; GIBSON, I. Lab-on-a-chip or Chip-in-a-lab: Challenges of Commercialization Lost in Translation. **Procedia Technology**, v. 20, p. 54–59, 2015.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DOUTORADO EM QUÍMICA EM ASSOCIAÇÃO

-
- (49) TRINDADE, M. A. G. et al. New Electrochemical Flow-Cell Configuration Integrated into a Three-Dimensional Microfluidic Platform: Improving Analytical Application in the Presence of Air Bubbles. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 18, p. 10917–10926, 2018.
- (50) SARKAR, S.; LAI, S.; LEMAY, S. Unconventional Electrochemistry in Micro-/Nanofluidic Systems. **Micromachines**, v. 7, n. 5, p. 81, 3 maio 2016.
- (51) PUMERA, M.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing VII. Microfluidic chip platforms. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 219–235, 2006.
- (52) NOYHOUSER, T. et al. The Best of Both Worlds: Combining Ultramicroelectrode and Flow Cell Technologies. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 165, n. 2, p. H10–H15, 2018.
- (53) KUDR, J. et al. Microfluidic electrochemical devices for pollution analysis—A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 246, p. 578–590, 2017.
- (54) SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, 2014.
- (55) GEISSEN, V. et al. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57–65, 2015.
- (56) MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, 2017.
- (57) NOGUERA-OVIEDO, K.; AGA, D. S. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 316, p. 242–251, 2016.
- (58) RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 546–582, 2016.
- (59) FAIRBAIRN, D. J. et al. Sources and transport of contaminants of emerging concern: A two-year study of occurrence and spatiotemporal variation in a mixed land use watershed. **Science of The Total Environment**, v. 551–552, p. 605–613, 2016.
- (60) DAUGHTON, C. G. Pharmaceuticals in the Environment. In: **Comprehensive Analytical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 62p. 37–69.
- (61) QUADRA, G. R. et al. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1200–1218, 2017.
- (62) WHO. **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 5 ago. 2020.
- (63) LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 473–474, p. 619–641, 2014.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DOUTORADO EM QUÍMICA EM ASSOCIAÇÃO

-
- (64) KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1–2, p. 132–145, 2007.
- (65) KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3498–3518, 2008.
- (66) MASTROIANNI, N. et al. Illicit and abused drugs in sewage sludge: Method optimization and occurrence. **Journal of Chromatography A**, v. 1322, p. 29–37, 2013.
- (67) US-EPA. **SPECIAL REPORT ON ENVIRONMENTAL ENDOCRINE DISRUPTION: AN EFFECTS ASSESSMENT AND ANALYSIS**. Disponível em: <http://www.acpo.org.br/biblioteca/03_interferentes_hormonais/epa.pdf>. Acesso em: 5 ago. 2020.
- (68) ADAMIAK, W.; KAŁUŻA, D.; JÖNSSON-NIEDZIOLKA, M. Compatibility of organic solvents for electrochemical measurements in PDMS-based microfluidic devices. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 20, n. 9, 2016.
- (69) LEE, J. N.; PARK, C.; WHITESIDES, G. M. Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 23, p. 6544–6554, 2003.
- (70) WALSH, E. J. et al. Microfluidics with fluid walls. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.
- (71) RUGGIERI, F.; ALIMONTI, A.; BOCCA, B. Full validation and accreditation of a method to support human biomonitoring studies for trace and ultra-trace elements. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 471–485, 2016.
- (72) SHARP, K. V. et al. Liquid flows in microchannels. **MEMS: Introduction and Fundamentals**, p. 10-1-10–46, 2005.
- (73) WOLF, M. P.; SALIEB-BEUGELAAR, G. B.; HUNZIKER, P. PDMS with designer functionalities—Properties, modifications strategies, and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 83, p. 97–134, 2018.
- (74) SEETHAPATHY, S.; GÓRECKI, T. Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 48–62, 2012.
- (75) HOEK, I.; THO, F.; ARNOLD, W. M. Sodium hydroxide treatment of PDMS based microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 17, p. 2283, 2010.