

Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Química

Marcos Rodrigues Facchini Cerqueira

Construção, caracterização e aplicação analítica de microdispositivos enzimáticos

Juiz de Fora

2016

Marcos Rodrigues Facchini Cerqueira

Construção, caracterização e aplicação analítica de microdispositivos enzimáticos

Tese apresentada ao departamento de Química da
Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos
requisitos necessários para a obtenção do título de
doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Renato Camargo Matos

Co-orientador: Lúcio Angnes

Juiz de Fora

2016

***“Scoppia Che La Vittoria è
Nostra.” (Autor não identificado)***

A toda minha família, presentes e ausentes, pelo apoio, carinho, compreensão e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Camargo Matos pela orientação na UFJF e pelos anos dedicados a minha formação profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Lúcio Angnes pela co-orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e, principalmente, pelos diversos “incentivos” que me fizeram crescer como homem e tornaram possível a conclusão de mais esta etapa da minha vida.

Aos amigos Alexandre (Peixe), Denis (Pimenta), Kelliton, Carlos, Wagner, Thiago, Fabiana (Fabs), Fernando (Ferds), Éric (Pop), Guilherme (Splinter), Mauro (Baiano), Luís, Suelly, Iranaldo (Ira), João, Pâmela, Paulo, Simone e Daniel, do Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica (LAIA/IQ-USP), por me acolherem e tornarem a estadia em São Paulo muito mais prazerosa.

Aos professores do Claudimir Lúcio do Lago, Ivano Gebhardt Rolf Gutz e Mauro Bertotti pela atenção, ensinamentos e pelo excelente convívio durante a estadia no IQ-USP.

Aos amigos do grupo Medquímica, em especial a Giselly e Ana Paula, por me dar a oportunidade de exercer meus conhecimentos.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa e Instrumentação Analítica (NUPIS), em especial a Fernanda, Gustavo, Mellina, Raiane e Roberto que fizeram do período na UFJF o mais divertido possível.

Aos demais alunos de pós graduação da UFJF e aos funcionários/professores do departamento de química da UFJF, pelo convívio ao longo dos anos.

Aos amigos “sem palavras” por me mostrar que as verdadeiras amizades sobrevivem até as maiores distâncias. E, em especial, ao Celso e a Tallita, por todas as experiências que vivemos juntos.

A todos os outros grandes amigos que estiveram presentes nas mais diversas ocasiões e me fizeram mais forte para encarar os obstáculos da vida.

Ao meu pai, João, a minha mãe, Benedita, e ao meu irmão, Gabriel, por todo o carinho, amor, preocupação e por tudo que já fizeram e ainda farão por mim.

À toda a minha família, pelo apoio, carinho, compreensão e amor

À Sociedade Esportiva Palmeiras pelas grandes emoções, boas ou ruins, ao longo de toda minha vida (“Explicar a emoção de ser palmeirense, a um palmeirense, é totalmente desnecessário. E a quem não é palmeirense... É simplesmente impossível!”)

À minha cara metade, Leticia, por toda complacência e amor nesses anos juntos. Sem você nada disso teria sido possível. Seu carinho e companheirismo me fizeram/farão superar todas as barreiras. O que eu sou hoje, é o reflexo do seu amor.

A FAPEMIG, FAPESP, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O foco deste trabalho foi o desenvolvimento e aplicação de microreatores enzimáticos, visando sua aplicação em sistemas de análise por injeção em fluxo. Em cima disso, dois substratos poliméricos foram utilizados para a avaliação de imobilização enzimática: um à base de poli (metil metacrilato) (PMMA) e outro em uma resina do éter diglicídico do bisfenol-A (BADGE). Uma impressora à laser de CO₂ foi utilizada para confeccionar os dispositivos nas dimensões desejadas. Para o sucesso da imobilização, os sistemas foram previamente tratados com polietilenoimina (PEI) visando a introdução de grupamentos funcionais reativos na superfície dos materiais de partida. Num primeiro estudo, baseado na modificação de PMMA, a ativação do material foi conseguida após tratamento dos microcanais com PEI em meio de dimetilsulfóxido (DMSO). Já no segundo caso o tratamento com PEI envolveu a simples mistura mecânica dos materiais, objetivando a cura da resina empregada. Após a ativação dos materiais com PEI, as enzimas foram imobilizadas após passagem de uma mistura de glutaraldeído (um agente espaçador) e as enzimas. Dentre as enzimas estudadas estão a *glicose oxidase* (GOx), a *ascorbato-oxidase* (AAO), a *catalase* (CAT), a *glutamato dehidrogenase* (GDH), além de um sistema híbrido baseado na imobilização simultânea das enzimas *glicose oxidase* (GOx) e *horseradish peroxidase* (HPR). A caracterização dos sistemas desenvolvidos foi feita primordialmente por meio da espectroscopia Raman. Além disso, a aplicação de alguns dos sistemas frente a amostras reais e o cálculo de parâmetros cinéticos e operacionais dos microreatores confeccionados foram realizados. Essas avaliações foram feitas baseadas em sistemas de detecção desenvolvidos no laboratório por técnicas eletroquímicas e por espectroscopia no visível. Como grande benefício dos sistemas desenvolvidos, podem ser destacados a velocidade e a simplicidade de implementação do processo de imobilização e operação.

Palavras-chave: Análise por injeção em fluxo. Imobilização enzimática. Microreator. Poli (metil metacrilato). Resina do éter diglicídico do bisfenol-A. Polietilenoimina.

ABSTRACT

The focus of this work is the development and application of enzymatic microreactors aiming their application through flow injection analysis systems. On top of that, two polymeric substrates were used for the evaluation of enzyme immobilization: one based on poly (methyl methacrylate) (PMMA) and another based on a bisphenol-A diglycidyl ether resin (BADGE). A CO₂ laser printer was used to fabricate the devices at the desired dimensions. For the success of the immobilization systems have been pretreated with polyethyleneimine (PEI) in order to introduce reactive functional groups on the surface of the starting materials. In a first study, based on PMMA modification, the activation of the material was achieved after treating microchannels with PEI in dimethylsulfoxide (DMSO). In the second case, treatment with PEI involved simply a mechanical mixture of the two materials, in order to cure the resin. After activation of materials with PEI, the enzymes were immobilized after passage of a mixture of glutaraldehyde (a spacer agent) and enzymes. Among the enzymes studied are *glucose oxidase* (GOx), *ascorbate oxidase* (AAO), *catalase* (CAT), *dehydrogenase glutamate* (GDH), and a hybrid system based on the simultaneous immobilization of the enzymes *glucose oxidase* (GOx) and *horseradish peroxidase* (HPR). The characterization of the developed systems was primarily done by Raman spectroscopy. Moreover, application of some of the proposed systems to real samples and calculation of kinetic and operational parameters are presented during the study. These evaluations were made with detection systems based on electrochemical and visible spectroscopy techniques, all developed at the laboratory. One great benefit of the developed systems, are the speed and simplicity of implementation the immobilization process and operation of the devices.

Keywords: Flow injection analysis. Enzymes immobilization. Microreactor. Poly(methyl methacrylate). Bisphenol-A diglycidyl ether resin. Polyethyleneimine.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ilustração do primeiro microssistema para cromatografia em fase gasosa fabricado em substrato de silício, com diâmetro de 5 cm, na Universidade de Stanford, no fim da década de 70.	25
Figura 2: Configuração de um sistema por injeção em fluxo em linha única: A – amostra, B – bobina de reação, C – carreador, D – detector, i – injetor e W – descarte.	27
Figura 3: Representação esquemática da tensão de cisalhamento	28
Figura 4: Pressão e tensão de cisalhamento em um fluido.	29
Figura 5: Perfil de velocidade desenvolvido durante o fluxo de fluido.....	31
Figura 6: Linhas de um fluxo laminar, transitório e turbulento	33
Figura 7: Representação esquemática da variação da densidade da partícula fluídica com relação a seu volume.....	35
Figura 8: Condição de não-escorregamento demonstrando a velocidade nula na parede do canal.	37
Figura 9: Fluxo unidirecional de um fluido entre duas placas paralelas. As placas são estacionárias e fluxo, estacionário e incompressível, é direcionado por um gradiente de pressão.....	38
Figura 10: Perfil de velocidade para o fluxo de um fluido entre duas placas paralelas. Camadas de fluxo paralelas possuem diferentes velocidades no percurso.	39
Figura 11: Fluxo em um cilindro e suas coordenadas.	40
Figura 12: Fluxo volumétrico em uma seção tubular.....	41
Figura 13: Etapas do processo de mistura de soluções. O processo de mistura homogeneiza os gradientes de concentração.....	42

Figura 14: Efeito da agitação sobre um corpo fluídico. O aumento das regiões com gradiente de concentração é nítido durante o processo.....	42
Figura 15: Exemplificação da dificuldade de mistura entre fluxos laminares em sistemas com baixo número de Reynolds e elevado número de Péclet (Kenis et al., 1999).....	44
Figura 16: Principais etapas empregadas na fotolitografia. a) substrato com camada metálica depositada; b) deposição do fotorresiste; c) foto-sensibilização do fotorresiste; d) revelação do fotorresiste; e) corrosão da camada metálica; f) corrosão da camada do sbstrato; g) remoção da camada metálica e h) fixação da cobertura.	48
Figura 17: Etapas envolvidas em processos de moldagem para polímeros a) rígidos e b) viscosos.	49
Figura 18: Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada enzimaticamente	52
Figura 19: Proposta de reação entre glutaraldeído (em sua forma mais comum em solução aquosa) e grupamentos amina das enzimas. Em (1) reação via base de Schiff e em (2) reação via adição de Michael.	61
Figura 20: Equipamento de gravação a laser de CO ₂ , modelo LS100 da Gravograph..	69
Figura 21: Representação dos modos de operação do sistema LS100. A representação do modo “raster” está ampliada para destacar a forma com que o mesmo é efetuado.....	70
Figura 22: Parâmetros ajustáveis no equipamento de ablação a laser. Em destaque estão os principais ajustes da ablação para cada uma das cores associadas	71
Figura 23: Efeito da potência do laser sobre o corte da superfície do canal. Potência do laser a) 10%, b) 20%, c) 30%, d)40%, e) 50%, f) 60%, g) 70%, h) 80%, i) 90% e j) 100%. Velocidade fixada em 10%.....	71
Figura 24: Efeito da velocidade de movimentação do eixo do laser sobre o corte da superfície do canal. Velocidade a) 10%, b) 20%, c) 30%, d)40%, e) 50%, f) 60%, g) 70%, h) 80%, i) 90% e j) 100%. Potência fixada em 10%.	72

Figura 25: Desenho de uma disposição de microcanais desenhadas no software Corel Draw.....	73
Figura 26: Esquema utilizado para a construção dos microcanais sob uma base de PMMA. A figura apresenta uma representação de a) uma placa de PMMA íntegra, b) da etapa de corte, c) os microcanais e sua cobertura, d) do processo de selagem e e) apresentação final do microdispositivo apresentando as dimensões obtidas. Para fins didáticos, as figuras estão representadas fora da escala real.	74
Figura 27: Configuração do sistema de fluxo aplicado em A): a) bomba de aquário; b) bomba peristáltica programável; c) microrreator; d) célula eletroquímica (d ₄ - elétrodo comercial duplo de platina, d ₂ – espaçador de polipropileno, d ₃ – bloco de PMMA contendo as conexões de entrada e saída de fluxo, além da conexão do eletrodo de referência e d ₁ - eletrodo miniaturizado de Ag/AgCl (sat KCl)). Em B) é apresentado um esquema ampliado da célula eletroquímica de detecção. Para fins didáticos, as figuras estão representadas fora da escala real.....	75
Figura 28: Estrutura dos polímeros empregados nesse estudo. A) PMMA (polimetilmetacrilato) e B) PEI (polietilenoimina).....	76
Figura 29: Imagens transversais (B e D) e seccionais (A e C) dos microcanais antes (A e B) e após (C e D) o tratamento com PEI 5% (m/m) em DMSO sob um regime de fluxo contínuo.....	78
Figura 30: Bandas características de um espectro Raman para os constituintes de diferentes etapas do processo de imobilização: A) PMMA puro; B) PEI pura; C-D) PMMA após tratamento com PEI em diferentes regiões do microrreator.	79
Figura 31: Espectros Raman para A) microcanais de PMMA e após o tratamento com PEI (5,0% m/m) em DMSO) e B) após a adição de glutaraldeído (1,0% v/v em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹).	81
Figura 32: Imagem de um teste colorimétrico realizado para confirmar a imobilização da GOx nos microcanais à base de PMMA. Foi utilizada a solução (A) descrita na seção 2.2. São observados microcanais com a enzima imobilizada (B) e sem a mesma imobilizada (C).	82

Figura 33: Imagens de seções transversais (em A) e B)) e seccionais (em C) e D)) de microreatores antes e após o tratamento enzimático, respectivamente. Em E) e F) são mostradas imagens ampliadas das seções seccionais mostradas em C) e D)..... 83

Figura 34: A) Efeito da vazão da bomba sobre o sinal analítico obtido para uma solução 0,100 mol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆] em KCl 0,100 mol L⁻¹ e B) influência da mesma sobre a dispersão no sistema. Célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em +400mV), eletrodo de referência (Ag/AgCl_(sat)) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão do fluxo carreador = 200 µL min⁻¹. Volume injetado = 10,0 µL. 86

Figura 35: Injeções consecutivas de uma solução 0,100 mol L⁻¹ de [Fe(CN)₆] em KCl 0,100 mol L⁻¹. Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em +400mV), eletrodo de referência (Ag/AgCl_(sat)) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão = 200 µL min⁻¹. Vazão da bomba de injeção = 1,90 mL min⁻¹. Comprimento do percurso analítico = 61,5 cm. 88

Figura 36: Influência da diluição no canal de injeção sobre a resposta analítica para uma solução 0,100 mol L⁻¹ de [Fe(CN)₆] em KCl 0,100 mol L⁻¹. Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em +400mV), eletrodo de referência (Ag/AgCl_(sat)) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão = 200 µL min⁻¹. Vazão da bomba de injeção = 1,90 mL min⁻¹. Comprimento do percurso analítico = 61,5 cm. 89

Figura 37: Efeito da vazão da bomba sobre a dispersão longitudinal do analito injetado. Vazões de A) 20,0µL min⁻¹ e B) 1,90 mL min⁻¹, respectivamente..... 90

Figura 38: Efeito do volume de amostra injetado sobre o sinal analítico detectado e a dispersão no sistema para uma solução 0,100 mol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆] em KCl 0,100 mol L⁻¹. Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em +400mV), eletrodo de referência (Ag/AgCl_(sat)) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão = 200 µL min⁻¹. Vazão da bomba de injeção = 1,90 mL min⁻¹. Comprimento do percurso analítico = 61,5 cm..... 91

Figura 39: A) Efeito do comprimento do percurso analítico sobre a resposta amperométrica e B) sobre a frequência analítica do sistema, para uma solução 0,100 mmol L⁻¹ de glicose em tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ (pH 7,00). Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em +600mV), eletrodo de

referência (Ag/AgCl_(sat)) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão = 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. Vazão da bomba de injeção = 1,90 mL min^{-1} . Volume injetado = 10,0 μL 93

Figura 40: Efeito da vazão do fluxo carreador sobre a resposta amperométrica para uma solução 0,100 mmol L^{-1} de glicose em tampão fosfato 0,100 mol L^{-1} (pH 7,00). Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em +600mV), eletrodo de referência (Ag/AgCl_(sat)) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão da bomba de injeção = 1,90 mL min^{-1} . Volume injetado = 10,0 μL . Comprimento do percurso analítico = 61,5 cm..... 95

Figura 41: (A) Perfil das curvas de Michaelis-Menten para diferentes unidades de GOx no microreator (imobilização feita em meio de glutaraldeído 1,0% (v/v)). (B) Influência da concentração de glutaraldeído na bioconversão enzimática (imobilização feita para 25,0 U de GOx). Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em +600mV), eletrodo de referência (Ag/AgCl_(sat)) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão do carreador (tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} , pH 7,0) = 150 $\mu\text{L min}^{-1}$. Vazão da bomba de injeção = 1,90 mL min^{-1} . Volume injetado = 10,0 μL . Comprimento do percurso analítico = 61,5 cm..... 98

Figura 42: A) Diagrama para a avaliação da linearidade do sistema desenvolvido para a GOx. A concentração de cada padrão se refere a; a: 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, b: 8,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, c: 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, d: 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e: 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, f: 80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, g: 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, h: 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, i: 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, j: 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$, k: 1,00 mmol L^{-1} , l: 2,00 mmol L^{-1} , m: 5,00 mmol L^{-1} , n: 8,00 mmol L^{-1} e o: 10,0 mmol L^{-1} de glicose, respectivamente. Em B) pode ser observada a faixa linear na faixa estudada em A). As medidas foram feitas seguindo as condições mostradas na Figura 41..... 101

Figura 43: Regressão de Michaelis-Menten para a taxa de conversão dos padrões de glicose analisados. 102

Figura 44: Análise de glicose em amostras de água de coco. Curva de calibração entre: (Sd₁) 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (Sd₂) 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (Sd₃) 40,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (Sd₄) 60,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (Sd₅) 80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. S₁ a S₅ e de S₁ⁿ a S₅ⁿ, se referem a passagem de amostras pelos reatores com e sem a enzima imobilizada, respectivamente. As condições de medidas são as mesmas das utilizadas na Figura 41..... 105

Figura 45: Adições de padrões de ácido ascórbico em dois diferentes microreatores:(a) com e (b) sem a AAO imobilizada. Os padrões se referem a concentrações de a ₁ -b ₁ : 0,008 mmol L ⁻¹ , a ₂ -b ₂ : 0,020 mmol L ⁻¹ , a ₃ -b ₃ : 0,040 mmol L ⁻¹ , a ₄ -b ₄ : 0,060 mmol L ⁻¹ , a ₅ -b ₅ : 0,080 mmol L ⁻¹ , a ₆ -b ₆ : 0,200 mmol L ⁻¹ , a ₇ -b ₇ : 0,400 mmol L ⁻¹ , a ₈ -b ₈ : 0,600 mmol L ⁻¹ , a ₉ -b ₉ : 1,20 mmol L ⁻¹ e a ₁₀ -b ₁₀ : 2,00 mmol L ⁻¹ , respectivamente. Outras condições analíticas semelhantes a da Figura 41.	108
Figura 46: Regressão de Michaelis-Menten para AAO imobilizada. Dados retirados da Figura 45.	109
Figura 47: (A) Adições de padrões de H ₂ O ₂ em dois microreatores diferentes: (a) sem e (b) com CAT imobilizada. Os padrões se referem a concentrações de a ₁ -b ₁ : 0,008 mmol L ⁻¹ , a ₂ -b ₂ : 0,020 mmol L ⁻¹ , a ₃ -b ₃ : 0,040 mmol L ⁻¹ , a ₄ -b ₄ : 0,060 mmol L ⁻¹ , a ₅ -b ₅ : 0,080 mmol L ⁻¹ , a ₆ -b ₆ : 0,200 mmol L ⁻¹ , a ₇ -b ₇ : 0,400 mmol L ⁻¹ , a ₈ -b ₈ : 0,600 mmol L ⁻¹ , a ₉ -b ₉ : 0,800 mmol L ⁻¹ e a ₁₀ -b ₁₀ : 2,00 mmol L ⁻¹ , respectivamente. (B) Curvas de calibração obtidas pelos dados da Figura 20-A. Outras condições analíticas são semelhantes a da Figura 41.	111
Figura 48: <i>Evolução de O₂ na superfície do microreator decorrente da ação da CAT.</i>	113
Figura 49: Microreatores modificados com GDH antes (A) e após (B) a reação com MTT. A coloração púrpura de produto confirma que a enzima foi imobilizada com sucesso.....	115
Figura 50: (A) Arranjo do sistema em fluxo aplicado: a – bomba de aquário; b – bomba peristáltica programável; c - micro-reator e d – célula espectrofotométrica em fluxo utilizada (lab-made) (d ₁ – núcleo da célula em PMMA, d ₂ – janelas de PMMA, d ₃ – caminho do fluxo em placas de PDMS e d ₄ – placas de PMMA contendo conectores para sistema de fibra ótica. (B) Representação ampliada da região d ₁ . O sentido do fluxo é demonstrado em (B). A aquisição do sinal foi feita utilizando um espectrofotômetro de fibra ótica miniaturizado.	119
Figura 51: Avaliação da transmitância da célula em fluxo desenvolvida no laboratório (lab-made).	120

Figura 52: Superfície de resposta obtida para descrever a influência da C_{HRP} e C_{GOx} no microdispositivo proposto. Condições de medida: vazão de $100,0 \mu\text{L min}^{-1}$ e volume de injeção de $20,0 \mu\text{L}$. Composição da solução injetada: $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose, $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de 4-aminoantipirina e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de fenol. A concentração de glutaraldeído durante a imobilização foi fixada em $0,05 \text{ v/v}$. Condições de medida: faixa entre 480 e 520 nm . A superfície de resposta foi construída com base na medida de 15 reatores diferentes. 124

Figura 53: Influência de A) volume de injeção e B) vazão na absorvância medida para um padrão de glicose $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os parâmetros de imobilização são os mesmos mostrados na Figura 51. A vazão e o volume de injeção foram de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ e $20,0 \mu\text{L}$, respectivamente. Comprimentos de onda de medida situavam na faixa de 480 e 520 nm . Na Figura 52-B são mostrados uma série de 3 injeções, em diferentes vazões, seguidas de injeções de solução branco (sem glicose). 127

Figura 54: Injeções consecutivas de padrões de glicose e sua correlação com a absorvância medida. $St_1 = 20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_2 = 50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_3 = 80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_4 = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_5 = 500 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_6 = 800 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_7 = 2,00 \text{ mmol L}^{-1}$, $St_8 = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$ e $St_9 = 8,00 \text{ mmol L}^{-1}$. A faixa linear obtida é destacada. Condições de medida: volume de injeção de $20,0 \mu\text{L}$ e vazão de $60,0 \mu\text{L min}^{-1}$ 130

Figura 55: Resposta espectrofotométrica para glicose após duas injeções de uma amostra de soro sanguíneo humano no sistema proposto. Condições de medida e de imobilização foram as mesmas previamente descritas. 131

Figura 56: Sinais obtidos em microreatores sem as enzimas imobilizadas (à esquerda) e com as enzimas imobilizadas (à direita). 132

Figura 57: Análises de glicose realizadas em amostras de soro sanguíneo humano em A) considerando e em B) não considerando o sinal interferente. Adições de padrões foram realizadas nos níveis de $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$. Condições de medida e de imobilização são as mesmas previamente descritas. 133

Figura 58: Estrutura química dos polímeros utilizados nesse estudo: A) BADGE e B) PEI. Em C) um mecanismo de cura de uma resina epóxico via substituição nucleofílica

de segunda ordem (SN2) é demonstrado (r.d.s.: etapa determinante de taxa, do inglês rate determining step) 137

Figura 59: A) Configuração do micro-reator: a₁) placa de PMMA usada como suporte para deposição da mistura BADGE/PEI, a₂) depressão retangular preenchida com a mistura polimérica, a₃) mistura BADGE/PEI gravada com os microcanais, a₄) placa de PDMS com 200 µm de espessura usada como espaçador para vedação do dispositivo, a₅) placa de PMMA com 3,0 mm de espessura utilizada como “tampa” do sistema (furos de 2,0 mm – para entrada do fluxo – e de 0,8 mm, com ângulo de 45°, foram gravados na entrada do sistema e estão destacados na figura), a₆) placa de PDMS com 200 µm de espessura para vedação da célula eletroquímica e a₇) célula eletroquímica (uma visão inferior da mesma é destacada). B) Configuração do sistema em fluxo aplicado: b₁) bomba de seringa de uma via, b₂) bomba peristáltica temporizada e b₃) micro reator. C) Imagem do microdispositivo. 139

Figura 60: Aspecto físico e microscopia das diferentes misturas poliméricas estudadas. Relação %m:m utilizada no processo: A) 9 BADGE: 1 PEI, B) 7:BADGE: 3 PEI, C) 5: BADGE: 5: PEI e D) 3 BADGE: 7 PEI. A proporção 1 BADGE: 9 PEI não é apresentada devido à cura incompleta do material polimérico..... 142

Figura 61: Espectros Raman obtidos para PEI pura, para a resina epóxico não curada e para diferentes razões m/m do polímero estudado. Uma banda de média intensidade entre 3160-3450 cm⁻¹ é destacada (referente ao estiramento vibracional de -NH₂ alifático).142

Figura 62: Superfícies de contorno dos espectros Raman obtidos para diferentes composições poliméricas..... 144

Figura 63: Espectros Raman de a) um polímero recém obtido na proporção 3:2 (m/m), b) após a passagem de 0,10% (v/v) de uma solução de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 mol l⁻¹ (pH 7,0) e c) após a passagem de uma solução de 25,0 U de GOx na composição b). Uma possível rota de reação para a imobilização da enzima na superfície polimérica é demonstrada..... 146

Figura 64: Imagens dos microcanais a) antes e b) após imobilização..... 146

Figura 65: Avaliação da faixa linear do microreator desenvolvido na faixa de St₁: 8,00 μmol L⁻¹, St₂: 20,0 μmol L⁻¹, St₃: 40,0 μmol L⁻¹, St₄: 60,0 μmol L⁻¹, St₅: 80,0 μmol L⁻¹, St₆: 200 μmol L⁻¹, St₇: 400 μmol L⁻¹, St₈: 600 μmol L⁻¹, St₉: 800 μmol L⁻¹, St₁₀: 2,00 mmol L⁻¹, St₁₁: 4,00 mmol L⁻¹, St₁₂: 6,00 mmol L⁻¹ e St₁₃: 8,00 mmol L⁻¹. Medidas foram realizadas aplicando um potencial de +0,60V vs. Ag/AgCl_(sat). Solução carreadora: tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH 7,0). Volume injetado: 10,0 μL. Vazão: 150 μL min⁻¹. 147

Figura 66: Análise de amostras de refrigerantes. Curva de calibração na faixa de St₁: 20,0 μmol L⁻¹, St₂: 40,0 μmol L⁻¹, St₃: 60,0 μmol L⁻¹, St₄: 80,0 μmol L⁻¹ e St₅: 100,0 μmol L⁻¹. Condições de medidas: as mesmas listadas na Figura 66. Sp: amostra após o tratamento com GOx. I: injeção direta da amostra em um reator não imobilizado (avaliação de interferentes). Diluição das amostras: Sp₁, Sp₃, Sp₄ e Sp₅ 1:800; Sp₂: 1:4000. A curva analítica obtida para a quantificação de glicose também é mostrada. 149

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação de enzimas e os tipos de reações catalisadas pelas mesmas....	51
Tabela 2: Métodos utilizados para imobilização de enzimas de forma não específica .	59
Tabela 3: Resultados obtidos para as análises de cinco diferentes amostras de água de coco, realizadas pelo método proposto e por espectrofotometria UV-Vis.....	106
Tabela 4: Matriz codificada para o planejamento factorial Box–Behnken 3 ³ e os valores obtidos em cada um desses níveis para um padrão de glicose 500 µmol L ⁻¹ *	122
Tabela 5: Valores para o modelo quadrático ajustado para um planejamento factorial Box–Behnken 3 ³ . Os coeficientes b ₁ , b ₂ e b ₃ são referentes as variáveis C _{glutaraldeído} , C _{GOx} e C _{HRP} , respectivamente.	123
Tabela 6: Valores obtidos para as amostras de refrigerante analisadas pelo método proposto e por análise fotométrica.....	150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ -TAS = micro total analysis system (micro sistema de análise total)

LOC = lab-on-a-chip (laboratório em um chip)

PDMS = polidimetilsiloxano

PMMA = poli (metil metacrilato)

UV = ultravioleta

FIA = flow injection analysis (análise por injeção em fluxo)

ρ = densidade ou massa específica

η = viscosidade dinâmica

τ_c = tensão de cisalhamento

Γ_c = taxa de cisalhamento

V_m = velocidade média

F = força

A = área

c = velocidade da luz

ν = viscosidade cinemática

EsNS = Equações de Navier-Stokes

F_n = força normal

F_t = força tangencial

Re = número de Stokes

Pe = número de Péclet

RNA = ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

FAD = dinucleótido de flavina e adenina

NAD = Dinucleótido de nicotinamida e adenina

ATP = Trifosfato de adenosina

LIGA = lithographie galvanic and abformung (litografia, galvanização e modelagem)

V_0 = velocidade inicial de uma reação enzimática

$V_{\text{máx}}$ = velocidade máxima de uma reação enzimática

K_m = constante de Michaelis Menten

GOx = *glucose oxidase*

AAO = *ascorbato oxidase*

CAT = *catalase*

GDH = *glutamato dehidrogenase*

HRP = *horseradish peroxidase*

PVDF = poli (fluoreto de polivinilideno)

PEI = polietilenoimina

DMSO = dimetilsulfóxido

D = coeficiente de dispersão

BADGE = éter diglicídico do bisfenol-A

d.p.r. = desvio padrão relativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
1.1	A evolução dos sistemas miniaturizados	24
1.2	Sistemas de análise por injeção em fluxo	26
1.2.1	Definição de fluido, tipos de fluxo e contextualização para sistemas microfluídicos.....	27
1.2.2	Condições para aplicação da EsNS	34
1.2.2.1	Hipótese de continuidade	35
1.2.2.2	Condição de não-escorregamento.....	36
1.2.3	Aplicações das equações de Navier-Stokes para sistemas em fluxo.....	37
1.2.3.1	Fluxo unidirecional entre duas placas infinitas	37
1.2.3.2	Lei de Hagen-Poiseuille para um fluxo estacionário em um duto cilíndrico	39
1.2.4	Definição de mistura, agitação e fluxo caótico	41
1.2.5	Mistura, agitação e difusão em fluidos com baixo numero de Reynolds	43
1.2.6	Miniaturização de sistemas por análise por injeção em fluxo	45
1.2.6.1	Parâmetros envolvidos na microfabricação	45
1.2.6.1.1	Substrato.....	46
1.2.6.1.2	Microcanalização	47
1.2.6.1.2.1	Fotolitografia	47
1.2.6.1.2.2	Moldagem.....	48
1.2.6.1.2.3	LIGA	49
1.2.6.1.2.4	Ablação a laser	49
1.3	Aplicação de enzimas em sistemas em fluxo	50
1.3.1	Enzimas.....	50
1.3.2	Equação de Michaelis e Menten.....	53
1.3.2.1	Significado de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m	54
1.3.3	Imobilização enzimática em microcanais	55
1.3.3.1	Imobilização com orientação aleatória	57
1.3.3.1.1	Ligação não covalente.....	57
1.3.3.1.2	Ligação covalente	58
1.3.3.2	Imobilização com orientação orientada	62
2	CONTEXTUALIZAÇÃO, OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	64
3	USO DE MICROREACTORES EM FLUXO À BASE DE POLI (METIL METACRILATO) E POLIETILENOIMINA PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	67
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS	68

3.1.1	Reagentes e soluções	68
3.1.2	Instrumentação e confecção dos microcanais	69
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	76
3.2.1	Modificação dos microcanais.....	76
3.2.2	Caracterização das superfícies funcionalizadas após imobilização	80
3.2.3	Avaliação do desempenho analítico dos microreatores construídos	83
3.2.3.1	Estudo de construção dos microcanais	83
3.2.4	Avaliação do desempenho dos microreator à base de PMMA	96
3.2.4.1	Glicose Oxidase (GOx).....	96
3.2.4.2	Ascorbato Oxidase (AAO).....	106
3.2.4.3	Catalase (CAT).....	110
3.2.4.4	Glutamato Dehidrogenase (GDH).....	114
3.3	CONCLUSÃO.....	115
4	IMOBILIZAÇÃO SIMULTÂNEA DE DUAS ENZIMAS EM MICROCANAIS À BASE DE POLI (METIL METACRILATO).....	117
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	118
4.1.1	Reagentes e soluções	118
4.1.2	Instrumentação	118
4.1.3	Metodologia analítica	120
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	121
4.3	CONCLUSÃO.....	134
5	DESENVOLVIMENTO DE UM MICROREATOR ENZIMÁTICO BASEADO NA POLIMERIZAÇÃO DE ÉTER DIGLICIDÍLICO DO BISFENOL-A E POLIETILENOAMINA.....	135
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	136
5.1.1	Reagentes e soluções	136
5.1.2	Instrumentação e construção dos microreatores.....	136
5.2	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	140
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	141
5.3.1	Caracterização do material.....	141
5.3.2	Estudo cinético	147
5.3.3	Desempenho do dispositivo frente à análise de glicose	148
5.3.3.1	Quantificação de glicose em amostras de refrigerantes.....	148
5.4	CONCLUSÃO.....	150

6	CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	151
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
	ANEXO I: PRODUÇÃO GERADA.....	165
	ANEXO II: PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSO.....	166

1 Introdução

1.1 A evolução dos sistemas miniaturizados

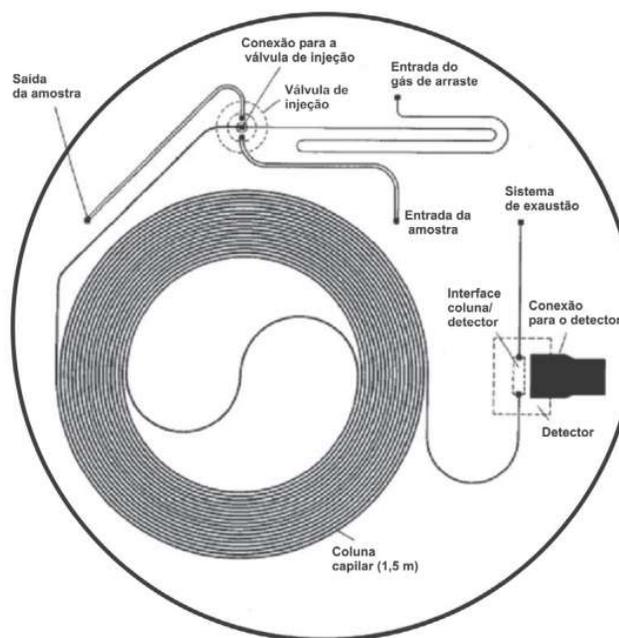
A partir da década de 60, diversas áreas científicas sofreram um grande e positivo impacto decorrente da revolução eletrônica. Tal processo encontrasse intimamente inserido no cotidiano pessoal e profissional, através dos telefones celulares, microcomputadores, maquinário industrial automatizado, equipamentos hospitalares, entre outros, todos decorrentes do advento de sistemas miniaturizados.(Coltro *et al.*, 2007) Tal evolução tecnológica impactou diretamente em áreas dependentes dos ramos da eletrônica e da informática. Obviamente, o ramo da química analítica sofreu impacto direto dessa evolução tecnológica que permitiu o desenvolvimento de sistemas de análise cada vez mais eficientes. Como alguns exemplos de benefícios associados à utilização desses dispositivos na química analítica, podemos citar a redução de equipamentos e componentes analíticos, como colunas capilares (em técnicas de eletroforese e cromatografia) e eletrodos (em técnicas eletroanalíticas) (Costa, 2009).

O primeiro dispositivo desenvolvido voltado diretamente para aplicações analíticas surgiu em 1979, com a construção e aplicação de um cromatógrafo a gás miniaturizado (Figura 1). Tal dispositivo foi elaborado utilizando uma tampa de vidro Pyrex, um disco de silício como substrato e fotolitografia e corrosão química como técnicas de canalização. O sistema possuía 5 cm de diâmetro, uma coluna de separação de 1,5 m x 200 μm x 30 μm (comprimento x largura x profundidade) e um detector de condutividade térmica, este construído em outro substrato e depois adicionado ao sistema anterior. Sua aplicação foi voltada à separação de misturas de hidrocarbonetos como: n-pentano, 3-metilpentano, n-hexano, 2,4-dimetil pentano, 1,1,1-tricloetano, ciclohexano e n-heptano (Terry *et al.*, 1979). Entretanto, apesar da comprovada eficiência do dispositivo, o mesmo não teve grande difusão na comunidade científica, ficando o desenvolvimento nesse campo restrito durante anos à fabricação de microbombas, microválvulas e miniaturização de detectores.

A pesquisa sobre tais dispositivos só se tornou mais efetiva na década de 1990, quando foi iniciada a disseminação dos conceitos de μ -TAS (Micro Total Analysis Systems)

e LOC (Lab-on-a-Chip), por parte de Manz *et al.* (Manz *et al.*, 1990) Tais pesquisadores desenvolveram um sistema de μ -HPLC, utilizando a técnica de fotolitografia em um substrato quadrado de silício de 5 mm de aresta e 0,4 mm de espessura, tampa de vidro pirex quadrada de 6 mm de aresta e 1 mm de espessura, uma coluna tubular aberta de 15 cm x 6,0 μ m x 2,0 μ m (comprimento x largura x profundidade), detector condutométrico e conexões para o acoplamento de bomba e válvulas externas de um cromatógrafo convencional (eficiências de 8000 e 25000 pratos teóricos foram obtidos com tempos de corrida de 1 e 5 minutos, respectivamente) (Manz *et al.*, 1990). O trabalho de Manz e colaboradores foi um marco cronológico na química analítica, levando a um intenso aumento no número de publicações à cerca do assunto. Não à toa, diversos periódicos indexados, especializados em microfabricação, estão disponíveis como: *Nano Letters*, *Lab-on-a-Chip*, *Small*, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, *Microchemical Journal*, *Microchimica Acta*, dentre outros.

Figura 1: Ilustração do primeiro microsistema para cromatografia em fase gasosa fabricado em substrato de silício, com diâmetro de 5 cm, na Universidade de Stanford, no fim da década de 70.



Fonte: COLTRO, W. K. T. et al. Microsistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. Química Nova, v. 30, p. 1986-2000, 2007. ISSN 0100-4042.

A grande vantagem associada a utilização dos dispositivos miniaturizados é a possibilidade de integração de várias etapas analíticas, dentre elas injeção, separação e detecção, em um único dispositivo, propiciando vantagens como o aumento da eficiência

analítica, redução do tempo de análise e consumo de reagentes, além da clara facilidade de operação e transporte do dispositivo devido a sua menor dimensão (Coltro *et al.*, 2007).

Materiais tais como vidro (Richter *et al.*, 2002), poliestireno (Drager *et al.*, 2007), polidimetilsiloxano (PDMS) (Thomsen *et al.*, 2007), e poli (metacrilato de metila) (PMMA) (Cerqueira Ferreira *et al.*, 2013) são cada vez mais explorados como possíveis materiais para suporte de sistemas miniaturizados, devido a algumas de suas características. De maneira geral, as grandes atratividades destes materiais se dão por meio de aspectos que englobam desde características mecânicas (*e.g.*: resistência e adequação ao processo de microfabricação), até aspectos elétricos (isolante), ópticos (transparência a radiação UV abaixo de 300 nm e ausência de fluorescência), térmicos (baixa condutividade térmica e possibilidade de selagem a baixas temperaturas) e químicos (inércia química perante os reagentes utilizados nos processos analíticos).

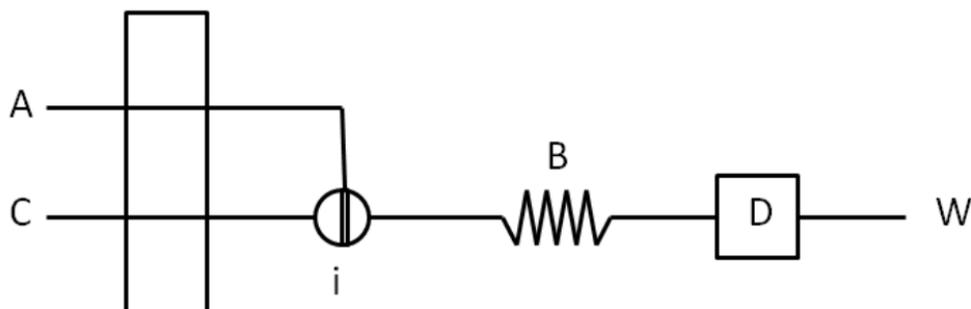
Os μ -TAS vêm sendo utilizados de forma ampla em diversos tipos de análises sejam elas de caráter ambiental (Chen *et al.*, 2006) ou clínico (Verpoorte, 2002). Dentre as diversas técnicas analíticas já desenvolvidas utilizando este tipo de dispositivo, destacam-se os sistemas em fluxo em geral (Miró e Hansen, 2007), a cromatografia em fase gasosa (Reidy *et al.*, 2006; Tzeng *et al.*, 2016), a cromatografia líquida (Steuer *et al.*, 2015) e a eletroforese capilar (Tanyanyiwa e Hauser, 2002; Benz *et al.*, 2015). Como forma de detecção, podem ser destacados os detectores óticos (Guo *et al.*, 2015; Prasertboonyai *et al.*, 2015), eletroquímicos (Dominguez *et al.*, 2015; Ravalli *et al.*, 2016), além de sistemas com detectores mais modernos como os que utilizam espectrômetros de massas (Foo *et al.*, 2015; Reichert *et al.*, 2015) e ressonância magnética nuclear (Olson *et al.*, 2004; Jansma *et al.*, 2005).

1.2 Sistemas de análise por injeção em fluxo

A análise de injeção em fluxo (FIA, do inglês, *Flow Injection Analysis*) é uma técnica de injeção de amostra sequenciada, utilizada para automatização de procedimentos analíticos. Tal técnica consiste na introdução da amostra em um fluido carreador, sendo a mesma transportada para um detector que continuamente registra mudanças na absorvância, potencial de eletrodo, ou outro parâmetro físico resultante da

passagem do material da amostra através da célula de fluxo. Um esquema simplificado de um sistema de análise de injeção em fluxo por linha única é mostrado na Figura 2. Durante o carregamento da amostra pelo sistema de injeção, esta pode sofrer reações químicas, receber reagentes ou passar por etapas de concentração e/ou separação (Santos e Masini, 2010).

Figura 2: Configuração de um sistema por injeção em fluxo em linha única: A – amostra, B – bobina de reação, C – carreador, D – detector, i – injetor e W – descarte.



Fonte: arquivo pessoal.

Os conceitos da análise por injeção em fluxo estão diretamente relacionados aos teoremas inerentes à mecânica dos fluidos. Esta, por sua vez estuda o movimento dos fluidos (líquidos ou gases) e as forças associadas a esse movimento. Para uma melhor compreensão dos sistemas de análise por injeção em fluxo, incluindo aqui os sistemas miniaturizados, é indispensável a apresentação dos conceitos fundamentais dessa vertente conceitual.

1.2.1 Definição de fluido, tipos de fluxo e contextualização para sistemas microfluídicos

Um fluido é uma substância que possui volume definido sem que o mesmo ocorra em sua forma. Em outras palavras, um fluido é um material que não pode resistir a uma força, ou tensão de cisalhamento, sem se mover. Os dois parâmetros mais importantes que caracterizam um fluido são sua densidade e viscosidade. Densidade, ou massa específica, ρ , de um fluido é a massa por unidade de volume (em kg.m^{-3}) e a viscosidade

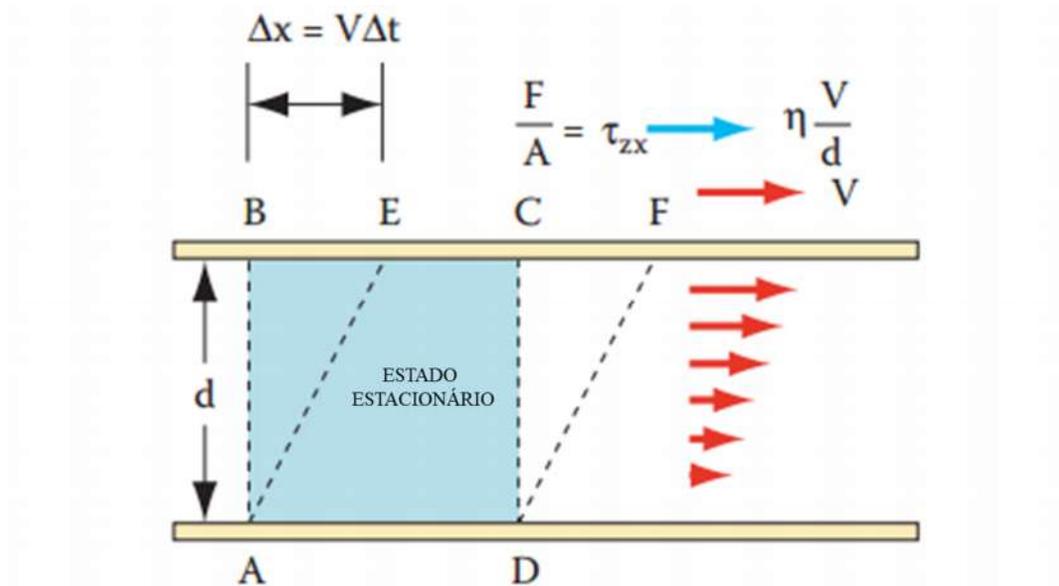
dinâmica, η , é a propriedade do fluido que causa a tensão de cisalhamento quando o fluido está movendo (sem a viscosidade não haveria resistência no movimento do fluido). A viscosidade dinâmica é medida em kg/ms, ou Pa.s ou Poiseuille (PI) e é dada pela razão da tensão de cisalhamento, τ_c , com a taxa de cisalhamento Γ_c :(Madou, 2012b)

$$\eta = \frac{\tau_c}{\Gamma_c} \quad (1)$$

A equação acima é mais facilmente compreendida através de uma avaliação da Figura 3, no qual é ilustrada duas grandes placas, de área A, separadas por uma camada de fluido com largura uniforme, d. Quando uma das duas placas se move linearmente em relação à outra, a uma velocidade média, V_m , a tensão de cisalhamento necessária para obter V_m é dada por, τ_{zx} ($F/A =$ força/área em $N.m^{-2}$, i.e., Pa).(Madou, 2012b)

$$\frac{F}{A} = \tau_{zx} = \eta \frac{V}{d} \quad (2)$$

Figura 3: Representação esquemática da tensão de cisalhamento



Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646

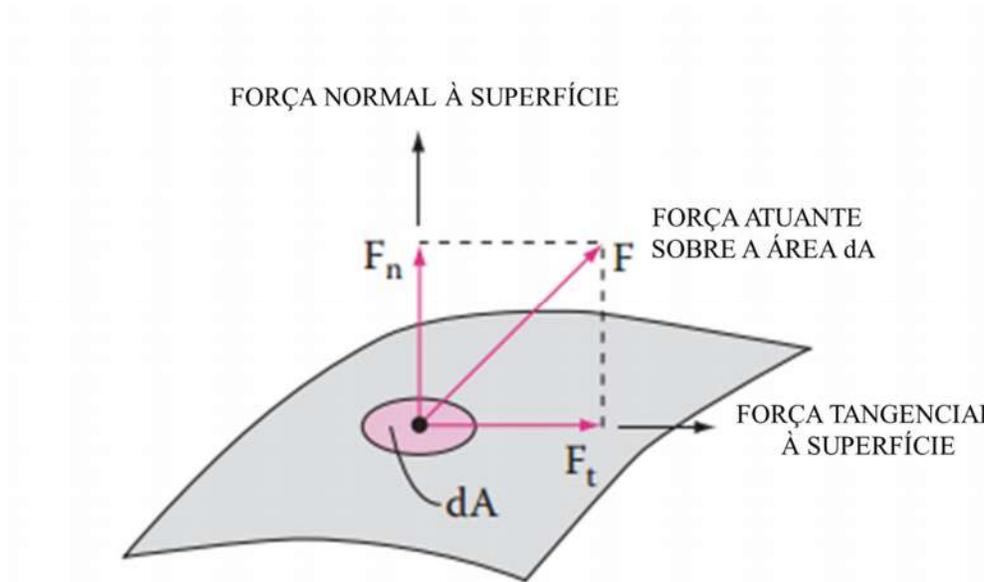
, onde $\frac{V}{d}$, corresponde à taxa de cisalhamento Γ_c (um gradiente de velocidade em s^{-1}). O primeiro termo de τ_{zx} se encontra na direção da força de cisalhamento (z), enquanto o segundo se encontra na direção da força aplicada (x). A equação 2, pode então ser generalizada como:(Madou, 2012b)

$$\tau_{zx} = \eta \frac{dV}{dz} \quad (3)$$

Essa relação é conhecida como Lei de Newton para viscosidade e está associada com a relação do gradiente de velocidade no fluido, com a tensão de cisalhamento. Dessa forma, a viscosidade se refere à fricção entre as camadas.

A componente normal (F_n) para um líquido em repouso é chamado de pressão, e o componente tangencial (F_t) é chamado de tensão de cisalhamento (Figura 4). Um sólido pode resistir a uma tensão aplicada se deformando, porém um fluido se deformará continuamente sobre uma tensão aplicada. (Madou, 2012b)

Figura 4: Pressão e tensão de cisalhamento em um fluido.



Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646.

A viscosidade cinemática, ν (m^2/s), é a razão da viscosidade absoluta e a densidade dado por: (Madou, 2012b)

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (4)$$

Para fluidos Newtonianos, como água e ar, a tensão de cisalhamento e a velocidade são linearmente relacionadas de forma que a viscosidade é uma simples função da natureza do fluido. Para fluidos não-Newtonianos, como leite e sangue, a

viscosidade é também uma função do gradiente de velocidade, tornando todas as definições da mecânica dos fluidos um tanto mais complexa.

As leis fundamentais que governam o movimento dos fluidos são as chamadas equações de Navier-Stokes (EsNS). As EsNS são equações vetoriais em três dimensões e representam a forma diferencial de três relações: 1) a conservação de massa, 2) a conservação do momento linear e, 3) a conservação da energia. As EsNS são aplicáveis para descrever o movimento de um volume de fluido em um espaço arbitrário, sob um sistema de fluxo em qualquer instante de tempo. (Madou, 2012b)

1) A equação para conservação de massa: a equação de continuidade na forma diferencial é dada por:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{V}) = 0 \quad (5)$$

A massa não pode ser criada ou destruída, ou seja, a taxa de acumulação deve ser igual a taxa de escoamento. Considerando uma única direção, por exemplo a direção x com um componente de velocidade, u , temos:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\partial (\rho u)}{\partial x} = 0 \quad (6)$$

Um fluxo é classificado como incompressível se sua densidade se mantiver constante durante todo o espaço percorrido. Para um fluido incompressível ($\rho = \text{constante}$ ou $\frac{\partial \rho}{\partial t} = 0$), resultando em:

$u = 0$ (para uma dimensão) e $\mathbf{V} = 0$ (para três dimensões)

Deve ser notado que a condição mostrada acima é verdadeira até para fluxos instáveis. Os fluxos em líquidos são tipicamente incompressíveis porém, os gases, ao contrário, são compressíveis, especialmente em altas velocidades. O número de Mach, $Ma = V/c$, é a razão da velocidade do fluxo com a velocidade da luz (c), podendo ser considerada como a razão das forças inerciais e elásticas. O número de Mach é um bom identificador de quando os efeitos de compressibilidade são importantes.

2) A conservação do momento: na notação vetorial, a conservação de momento é dada por:

$$\rho \frac{\partial V}{\partial t} + \rho(V \cdot \nabla)V = -\nabla p + \eta \nabla^2 V + \rho g \quad (7)$$

(a) (b) (c) (d) (e)

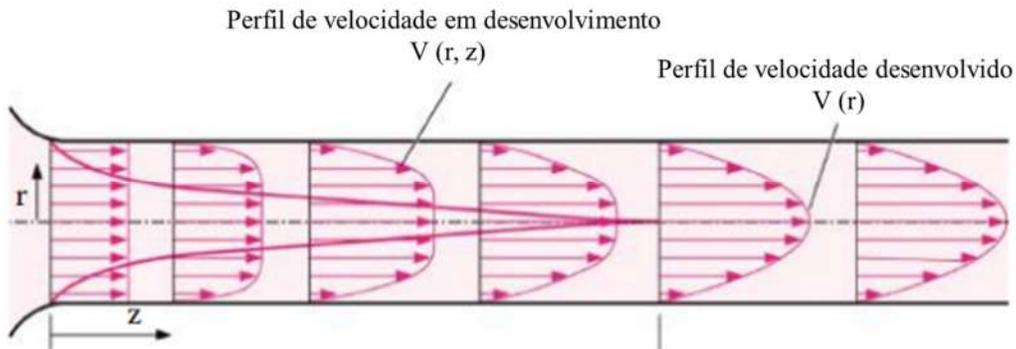
, onde g é a aceleração gravitacional, p é a pressão e t o tempo.

O termo (a) é a aceleração local do elemento fluídico. Para um fluxo estacionário esse termo é zero. Fluxos estacionários indicam que não há variação em nenhum ponto com o tempo e, assim, os termos transitórios na ENS são também zero:

$$\frac{\partial V}{\partial t} = \frac{\partial \rho}{\partial t} = 0 \quad (8)$$

Os termos transitórios descrevem um fluxo inicial, ou em desenvolvimento, conforme mostrado na Figura 5.

Figura 5: Perfil de velocidade desenvolvido durante o fluxo de fluido.



Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646

O termo (b) representa a aceleração convectiva da partícula fluídica e prediz como o fluxo se altera de um ponto ao outro, no mesmo instante de tempo. Fluxos uniformes não apresentam aceleração convectiva. O termo (c) é a aceleração por pressão, causada pela ação de bombeamento. O termo (d) é a desaceleração viscosa resultante da resistência de fricção do fluido. O termo (e) é a aceleração causada pela gravidade (peso). Regiões onde os efeitos de fricção são dominantes são chamados de regiões viscosas, sendo comuns próximas a regiões sólidas. Regiões onde as forças de fricção são pequenas,

se comparadas com as forças inerciais ou por pressão, são chamadas de regiões invíscidas. Tais fluidos são considerados como ideais e, nesse caso, o termo (d) da equação 7 pode ser desconsiderado:

$$\rho \frac{\partial V}{\partial t} + \rho(V \cdot \nabla)V = -\nabla p + \rho g \quad (8)$$

Essa equação é conhecida como a Equação de movimento de Euler. Apesar da relação de Euler ser mais simples que a relação de Navier-Stokes, a solução da mesma de forma geral não é possível devido ao fato de que a aceleração advectiva torna a equação não-linear.

Fluxos internos (e.g. dentro de um tubo), como ilustrado na Figura 5, são dominados pela influência da viscosidade através da região ocupada. No caso de movimentos fluídicos muito lentos, o termo relacionado à aceleração total (a + b) assim como a aceleração gravitacional (e) são zero. A equação 7 pode então ser reduzida para:

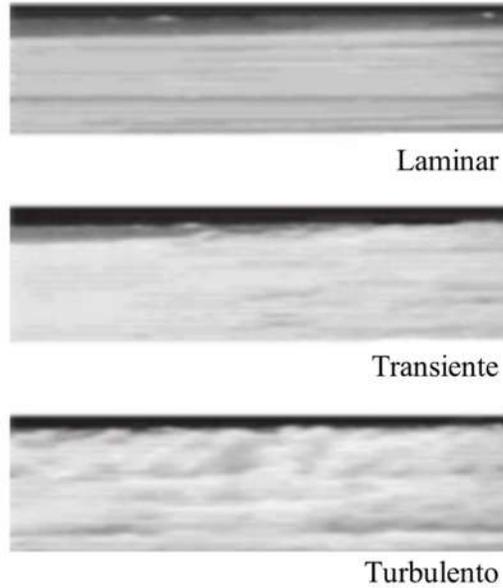
$$\nabla p = \eta \nabla^2 V \text{ (Equação para fluxo de Stokes)} \quad (9)$$

, essa equação é aplicável no caso de líquidos muito viscosos, fluxo capilar, e alguns metais derretidos.

Um outro conceito importante em mecânica de fluidos que deve ser levado em conta é o relacionado a linhas de corrente. Uma linha de corrente é o caminho traçado por uma partícula sem massa enquanto a mesma se move pelo fluxo. Cabe aqui ressaltar que a velocidade de uma partícula se movendo pelo fluxo é sempre tangencial às linhas de corrente em todos os pontos. (Madou, 2012b)

Em fluxos laminares, o movimento do fluido é altamente ordenado com linhas de corrente suaves. No caso de fluxos turbulentos, o movimento do fluido é altamente desordenado, caracterizado por flutuações de velocidade e turbilhões. Em algumas situações, um fluxo que contém regiões laminares e turbulentas pode ser formado. O número de Reynolds, $Re = \rho VL/\eta$, é o parâmetro utilizado para definir se um fluxo é laminar ou turbulento.

Figura 6: Linhas de um fluxo laminar, transitório e turbulento



Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646

Uma forma de reduzir o número de parâmetros das EsNS é transcrever a mesma para sua forma adimensional. Para isso, os seguintes parâmetros são assumidos:(Madou, 2012b)

- Velocidade adimensional: $v^* = V/V$;
- Comprimento adimensional: $x^* = x/L$;
- Gravidade adimensional: $g^* = g/g$;
- Tempo adimensional: $t^* = ft$ (onde f é definido como a frequência característica);
- Pressão adimensional: $p^* = p/p_0 - p_\infty$
- Operador del: $\nabla^* = L\nabla$

A substituição dos mesmos na ENS, resulta em:

$$\rho Vf \frac{\partial v^*}{\partial t^*} + \frac{\rho v^2}{L} (v^* \cdot \nabla^*) v^* = - \frac{p_0 - p_\infty}{L} \nabla^* p^* + \frac{\eta v}{L^2} \nabla^{*2} v^* + \rho g g^* \quad (22)$$

Para tornar a equação 22 adimensional, todos os termos da mesma devem ser multiplicados por $L/(\rho V^2)$, que possui dimensão ($m^{-1}L^2t^2$), cancelando todas as dimensões. Após rearranjo:

$$\left[\frac{fL}{v}\right] \frac{\partial v^*}{\partial t^*} + (v^* \cdot \nabla^*)v^* = -\left[\frac{p_0 - p_\infty}{\rho v^2}\right] \nabla^* p^* + \left[\frac{\eta}{\rho v L}\right] \nabla^{*2} v^* + \left[\frac{gL}{v^2}\right] g^* \quad (23)$$

Que pode ser reescrita como:

$$[St] \frac{\partial v^*}{\partial t^*} + (v^* \cdot \nabla^*)v^* = -[Eu] \nabla^* p^* + \left[\frac{1}{Re}\right] \nabla^{*2} v^* + \left[\frac{1}{Fr^2}\right] g^* \quad (24)$$

, onde St equivale ao termo de Strouhal, Eu ao termo de Euler, Re ao termo de Reynolds e Fr ao termo de Froude nas EsNS.

Com uma normalização adequada das EsNS, com todos os termos adimensionais tendendo à unidade e o número de Reynolds (Re) tendendo a zero (fluxo laminar), a equação de fluxo de Stokes é obtida (equação 8):

$$[Eu] \nabla^* p^* = \left[\frac{1}{Re}\right] \nabla^{*2} v^* \quad (25)$$

Pressão Viscosidade

, e como $p^* \sim 1$ e $\nabla^* \sim 1$:

$$[Eu] = \frac{p_0 - p_\infty}{\rho v^2} \sim \left[\frac{1}{Re}\right] = \frac{\eta}{\rho v L} \quad (26)$$

$$\Downarrow$$

$$p_0 - p_\infty \sim \frac{\eta v}{L}$$

1.2.2 Condições para aplicação da EsNS

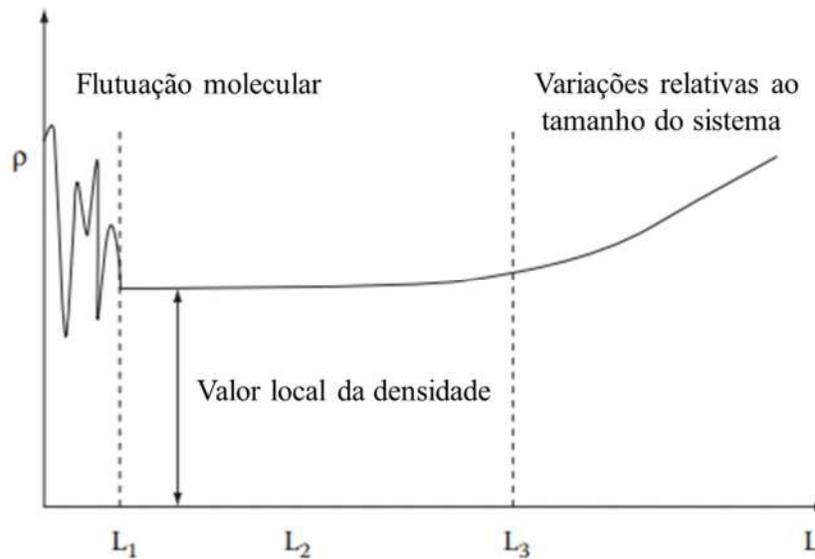
São apresentadas abaixo algumas condições essenciais para aplicação das EsNS. Cabe ressaltar que, caso seja do interesse do leitor, a derivatização completa das equações de Navier Stokes, incluindo todas as definições necessárias para sua compreensão, podem ser encontradas no livro texto “Fundamentals of microfabrication and nanotechnology:

Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology” (referência (Madou, 2012b)).

1.2.2.1 Hipótese de continuidade

Em uma condição contínua todas as medidas são definidas em todas as posições e variam continuamente de ponto a ponto. Para uma melhor compreensão, uma “densidade média” é considerada, ρ , tomada sobre uma “partícula fluidica média” com volume L_3 , como ilustrado na Figura 7.

Figura 7: Representação esquemática da variação da densidade da partícula fluidica com relação a seu volume.



Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646

A densidade média pode então ser definida por $\rho = N \cdot m / L_3$, onde N é o número de moléculas e m a massa de cada molécula. A hipótese de continuidade falha quando o volume de amostragem é muito pequeno. Adotando um tamanho pequeno para o sistema fluidico (L_1), a flutuação molecular pode causar variações na densidade. Ainda, para elementos com grande volume, próximos das dimensões do sistema (L_3), a densidade

pode variar por meio de flutuações espaciais causadas por alterações de pressão (e.g. colisão entre moléculas) ou temperatura. É apenas na região intermediária, na região chamada de mesoscópica (L_2), onde é possível estabelecer equações de fluxo, tomando como base um meio contínuo. A hipótese de continuidade assume então que no regime da região mesoscópica (com $L_1 \ll L_2 \ll L_3$), o fluido pode ser tratado como contínuo (i.e. não caracterizado por uma molécula única). Partículas líquidas nesse regime possuem tipicamente várias moléculas, até mesmo em volumes de amostragem pequenos. Dessa forma, partículas líquidas em um microcanal convencional (e.g. com mais de poucos micrometros de largura) ainda seguem as EsNS. Apenas quando se considera nano canais que tal condição deve ser reavaliada.

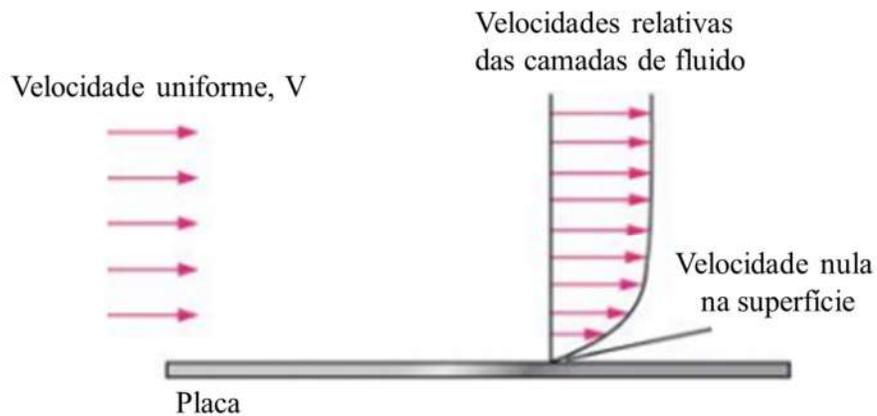
Em resumo, a teoria da continuidade é bem descrita enquanto as propriedades locais, como densidade e velocidade, podem ser definidas como uma média dos elementos, sendo esses grandes o suficiente se comparados com a estrutura microscópica do sistema, mas pequena o suficiente se comparado com os fenômenos macroscópicos.

1.2.2.2 Condição de não-escorregamento

Um fluido em contato direto com um sólido é “retido” em sua superfície como resultado dos efeitos da viscosidade, conforme ilustrado na Figura 8. Essa retenção é responsável pela geração de uma tensão de cisalhamento nas paredes do sólido, τ_w , um arraste superficial, $D = \int \tau_w dA$, e o desenvolvimento de camadas limites. A propriedade do fluido responsável pela condição de não-escorregamento é a viscosidade, η . Seguindo tal condição, para um fluido em contato com uma superfície sólida, a velocidade do mesmo deve ser igual a velocidade da superfície, como ilustrado na Figura 8.

A condição de não-escorregamento na interface fluido/sólido, supõem que a velocidade do fluido em relação ao sólido deve ser zero, e que a temperatura do fluido deve ser igual ao da superfície, necessitando então uma condição de equilíbrio termodinâmico entre sólido e fluido ²⁴.

Figura 8: Condição de não-escorregamento demonstrando a velocidade nula na parede do canal.



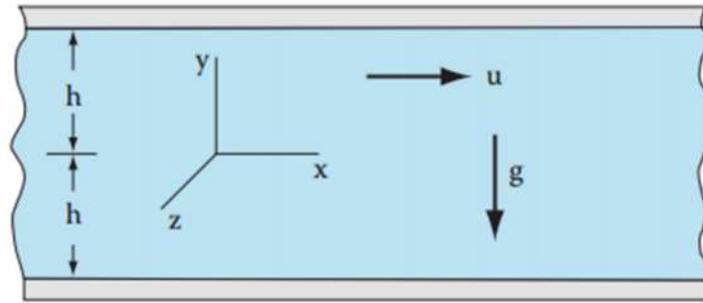
Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646

1.2.3 Aplicações das equações de Navier-Stokes para sistemas em fluxo

1.2.3.1 Fluxo unidirecional entre duas placas infinitas

Considerando um fluido, entre duas placas paralelas infinitas, como mostrado na Figura 9, e tomando as placas como estacionárias e um fluxo (também estacionário e incompressível) que é direcionado por um gradiente de pressão na direção x , o componente de velocidade do fluido será diferente de zero nessa situação em função do gradiente de pressão exercido sobre ele.

Figura 9: Fluxo unidirecional de um fluido entre duas placas paralelas. As placas são estacionárias e fluxo, estacionário e incompressível, é direcionado por um gradiente de pressão.



Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646

Na condição apresentada anteriormente, os componentes de velocidade na direção y e z, w e v, serão iguais a zero e u (componente de velocidade na direção x) será diferente de zero. Essa situação simplifica a equação de Navier Stokes, levando a: (Madou, 2012b)

$$0 = -\frac{\partial p}{\partial x} + \eta \frac{\partial^2 u}{\partial y^2}$$

$$0 = -\frac{\partial p}{\partial y} - \rho g \quad (33)$$

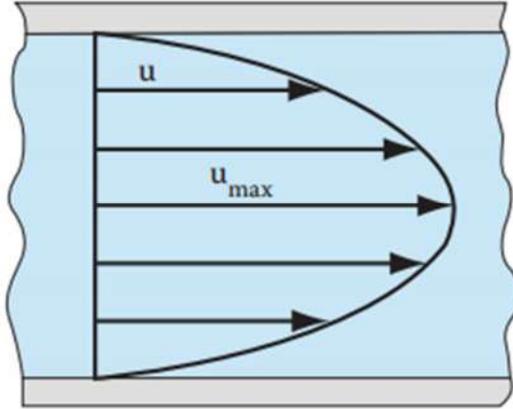
$$0 = -\frac{\partial p}{\partial z}$$

Após integração da primeira equação e aplicando uma condição de não-escorregamento nas placas (com $u = 0$ em $z = +h$ e em $-h$) obtém-se a relação abaixo:

$$u = \frac{1}{2\eta} \left(\frac{\partial p}{\partial x} \right) (y^2 - h^2) \quad (34)$$

Essa resolução proporciona uma resposta parabólica, como mostrado na Figura 10, expondo o formato de um fluxo laminar unidirecional exercido por uma diferença de pressão.

Figura 10: Perfil de velocidade para o fluxo de um fluido entre duas placas paralelas. Camadas de fluxo paralelas possuem diferentes velocidades no percurso.



Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646

Por fim, para a obtenção da taxa de fluxo volumétrico:(Madou, 2012b)

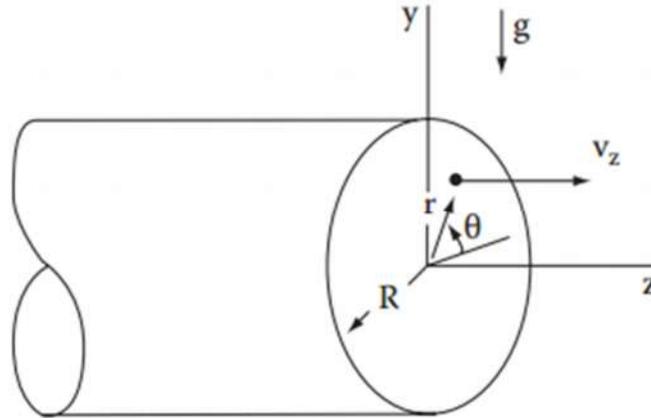
$$Q = \int_{-h}^{+h} u dy = \int_{-h}^{+h} \frac{1}{2\eta} \left(\frac{\partial p}{\partial x} \right) (y^2 - h^2) dy = -\frac{2h^3}{3\eta} \left(\frac{\partial p}{\partial x} \right) \quad (35)$$

1.2.3.2 Lei de Hagen-Poiseuille para um fluxo estacionário em um duto cilíndrico

Considerando agora um fluxo estacionário e laminar gerado por uma diferença de pressão na direção-z como mostrado na Figura 11, de forma que $V_z = f(r)$ e $v_r = v_\theta = 0$, e tomando como base coordenadas cilíndricas, tem-se que:(Madou, 2012b)

$$\begin{aligned} 0 &= -\rho g \sin\theta - \frac{\partial p}{\partial r} \\ 0 &= -\rho g \cos\theta - \frac{1}{r} \frac{\partial p}{\partial \theta} \\ 0 &= -\frac{\partial p}{\partial z} + \eta \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial v_z}{\partial r} \right) \right] \end{aligned} \quad (36)$$

Figura 11: Fluxo em um cilindro e suas coordenadas.



Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646

Resolvendo as equações 36 para uma condição de não-escorregamento, em $r = R$ (as paredes do duto), o perfil de velocidade parabólica é obtido e dado por:(Madou, 2012b)

$$v_z = \frac{1}{4\eta} \left(\frac{\partial p}{\partial z} \right) (r^2 - R^2) \quad (37)$$

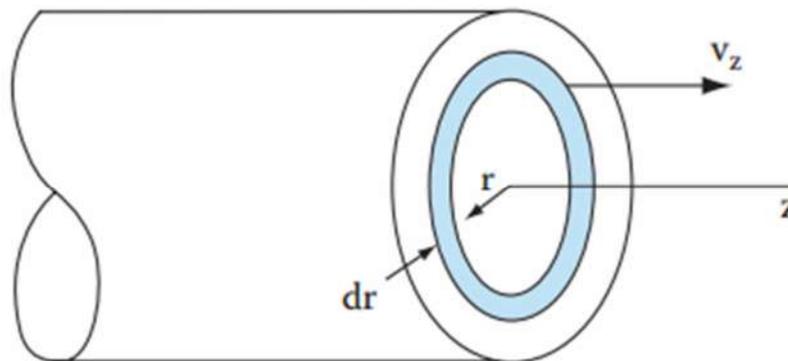
Tomando como base a Figura 12, o fluxo volumétrico é definido por:

$$Q = 2\pi \int_0^R v_z r dr = -\frac{\pi R^4}{8\eta} \left(\frac{\partial p}{\partial z} \right) \quad (38)$$

Adotando a velocidade média, V , ao invés da taxa de fluxo, Q , pela relação $V = Q/\pi R^2$ e assumindo o gradiente de pressão em um fluxo laminar como $\Delta p/l$, onde l é o comprimento do duto, obtemos a equação de Hagen-Poiseuille:(Madou, 2012b)

$$V = -\frac{R^2 \Delta p}{8\eta l} \quad (39)$$

Figura 12: Fluxo volumétrico em uma seção tubular.



Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646

A equação acima claramente demonstra que a queda de pressão em dutos mais finos é extremamente elevada. As equações 38 e 39 mostram que uma diminuição de 10 vezes no raio do duto, acarreta uma redução de 10^4 no fluxo volumétrico e um aumento de 10^2 na pressão. Consequentemente, bombas independentes, e capazes de exercer uma elevada pressão, são importantes em aplicações para sistemas microfluídicos. Outros fatores, como transferência de calor, fator de fricção, molhabilidade e tensão superficial devem ser considerados em aplicações de sistemas hidrodinâmicos em menor escala. Os últimos porém não serão abordados nesse texto, sendo recomendado a leitura de um livro texto “Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology” (Madou, 2012a), para uma melhor compreensão desses fatores.

1.2.4 Definição de mistura, agitação e fluxo caótico

Misturar uma solução significa homogeneizar a mesma por meio de convecção e difusão. Na mistura, os gradientes de concentração são suavizados até que os mesmos desapareçam, obtendo-se uma solução homogênea (Figura 13).

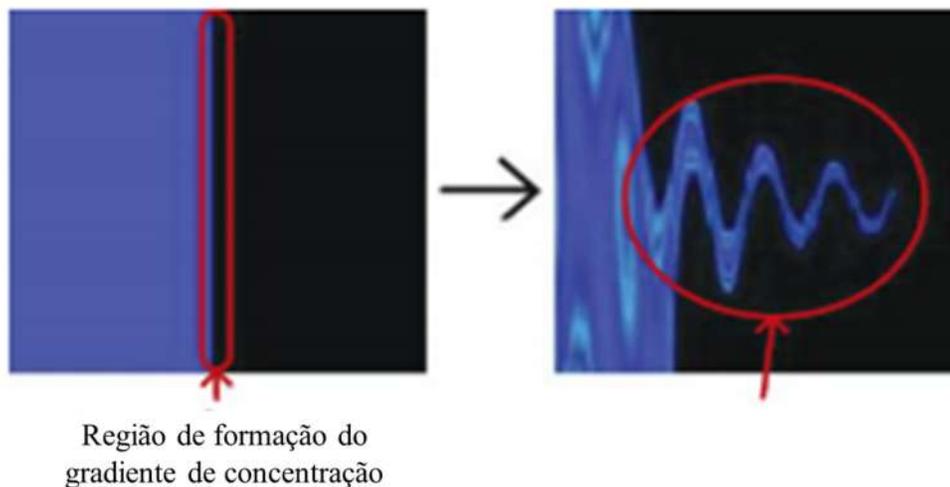
Figura 13: Etapas do processo de mistura de soluções. O processo de mistura homogeneiza os gradientes de concentração.



Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646

O processo de agitação ocorre via convecção forçada (mecânica) com o objetivo de diminuir o tempo de mistura. A agitação se desenvolve via alongamento e torção do elemento fluídico, aumentando as regiões com gradiente de concentração, conforme mostrado na Figura 14.

Figura 14: Efeito da agitação sobre um corpo fluídico. O aumento das regiões com gradiente de concentração é nítido durante o processo.



Fonte: MADOU, M. J. Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology. 3rd. 2012. 646

Em sistemas com baixo número de Reynolds, o processo de agitação se dá por alongamento do elemento fluídico, aumentando a interface difusional, e torção para diminuir a distância no qual as espécies tem para difundir. A inclusão de caminhos caóticos para dispersar o elemento fluídico, resulta em rápida torção e alongamento da interface líquido/líquido, aumentando a área interfacial onde ocorre a difusão e, por consequência, aumentando o processo de mistura. (Madou, 2012b) A implementação de “microagitadores passivos” pode ser obtida pela implementação de estruturas sinusoidais ou em “zig-zag” ao longo do percurso, além de bloqueadores de fluxo.

1.2.5 Mistura, agitação e difusão em fluídos com baixo numero de Reynolds

Fluxos com baixo número de Reynolds, ocorrem quando $Re \ll 1$, seja por conta de um valor reduzido de ρ , V ou L . Nessas condições, o processo de mistura de soluções é extremamente prejudicado. (Madou, 2012b) O primeiro fator que deve ser considerado como crítico para a mistura por convecção em microreatores, é a camada de líquido estacionário da parede do tudo. Nessa fronteira hidrodinâmica, a velocidade do fluxo, V , varia de zero na extremidade, na condição de não-escorregamento, até o valor máximo no centro do fluído, V_∞ . Um fluxo laminar ao redor de um objeto de comprimento L e fronteira δ é dado por:

$$\delta \sim \frac{L}{\sqrt{Re}} \quad (40)$$

Com uma diminuição do número de Reynolds, o valor da fronteira se torna maior. Dessa forma, a mistura em sistemas microfluídicos (< 1 mm) é dificultada por conta do fluxo ser predominantemente laminar e a mistura mecânica ser dificultada devido às dimensões do canal (**nota:** em fluxos caracterizados por baixos valores de Re , o transporte de massa inercial por convecção não é possível). (Kenis *et al.*, 1999) Dessa forma, a mistura de líquidos em sistemas microfluidicos só ocorre após vários centímetros devido ao transporte de massa por difusão, caso agentes que auxiliam o processo de mistura não sejam incorporados no sistema.

Figura 15: Exemplificação da dificuldade de mistura entre fluxos laminares em sistemas com baixo número de Reynolds e elevado número de Péclet (Kenis *et al.*, 1999).



Fonte: KENIS, P. J. A.; ISMAGILOV, R. F.; WHITESIDES, G. M. Microfabrication Inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning. *Science*, v. 285, n. 5424, p. 83-85, 1999-07-02 00:00:00 1999.

Para definir qual o tipo de transporte de massa é dominante, difusão ou convecção, o número de Péclet de ser avaliado. O número de Péclet representa a razão do transporte de massa por convecção e difusão:

$$Pe = \frac{VL}{D} \quad (41)$$

Quanto maior for o número de Péclet, maior a influência do transporte por difusão. Em líquidos, o coeficiente de difusão de moléculas pequenas é algo em torno de $10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$. Com velocidades de 1 mm/s, em canais de $100 \mu\text{m}$ de altura, o número de Péclet está na ordem de 100. Esse valor elevado sugere que as forças de difusão agem de forma lenta em relação aos transportes hidrodinâmicos. Para transporte por difusão o valor do número de Péclet deve ser menor que 1.

1.2.6 Miniaturização de sistemas por análise por injeção em fluxo

Os sistemas FIA podem, de uma maneira geral, ser facilmente miniaturizados passando a ser denominados de μ -FIA (do inglês, *micro-flow injection analysis*). Porém, para uma adequada operação do sistema, além dos parâmetros hidrodinâmicos apresentados anteriormente, parâmetros envolvidos na estruturação do sistema também devem ser considerados.

Através do processo de miniaturização algumas vantagens atreladas aos sistemas FIA são potencializadas tais como: a economia de reagentes, a redução de geração de resíduos, a minimização de contaminações, o aumento da frequência analítica e a possibilidade de tornar o sistema portátil. Porém, os sistemas μ -FIA apresentam também algumas desvantagens originadas do processo de miniaturização, sendo a principal delas o fácil entupimento das linhas de carreamento devido ao seu pequeno diâmetro (Coltro *et al.*, 2007).

1.2.6.1 Parâmetros envolvidos na microfabricação

Os processos envolvidos na confecção de microcanais podem ser definidos em três etapas distintas: uma primeira que seria a escolha de uma base, que confere sustentação mecânica ao dispositivo e onde são usinados os canais, uma segunda que trata da introdução dos componentes e conexões do sistema, e, por fim, a inserção de uma cobertura, geralmente composta do mesmo material que a base.

1.2.6.1.1 Substrato

A escolha adequada do substrato de trabalho constitui uma das etapas cruciais para a confecção dos microdispositivos. Esta escolha, porém, depende muito da função e/ou da necessidade analítica do dispositivo. De maneira geral, as principais propriedades procuradas em um substrato englobam os aspectos: mecânicos (resistência, adequação ao processo de microfabricação); elétricos (isolante elétrico); ópticos (transparência a radiação UV abaixo de 300 nm e ausência de fluorescência); térmicos (baixa condutividade térmica e possibilidade de selagem a baixas temperaturas) e químicos (inércia química perante os reagentes utilizados nos processo analíticos) (Coltro *et al.*, 2007).

Dentre os diversos substratos já citados, os poliméricos vêm ganhando bastante destaque na microfabricação, devido à enorme quantidade de materiais disponíveis no mercado, que apresentam ampla variedade de propriedades químicas, mecânicas, elétricas e ópticas, bem como a aplicação de diferentes métodos de microfabricação, além de seus baixos custos financeiros e sua fácil manipulação, se comparados a outros materiais como vidro e quartzo (Coltro *et al.*, 2007).

Dentre as grandes possibilidades para aplicações destes dispositivos na área de química, a analítica é a que vem tirando maior proveito de suas peculiaridades. Diversas técnicas analíticas já são descritas em termos miniaturizados, como a cromatografia em fase gasosa (Reidy *et al.*, 2006), cromatografia líquida de alta eficiência (Manz *et al.*, 1990) e a eletroforese capilar (Tanyanyiwa e Hauser, 2002), sendo utilizados, em geral, sistemas de detecção ópticos (Greenway *et al.*, 1999) ou eletroquímicos (Wang, 2002; Vandaveer *et al.*, 2004). Para tal, as características físico-químicas do substrato devem ser levadas em consideração.

1.2.6.1.2 Microcanalização

Hoje em dia, diversas tecnologias já foram desenvolvidas visando a fabricação de microdispositivos na superfície de substratos diversos. Algumas delas serão tratadas aqui porém, para um melhor compreensão do assunto o leitor poderá consultar o livro texto “Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Manufacturing Techniques for Microfabrication and Nanotechnology” (referencia (Madou, 2012a)).

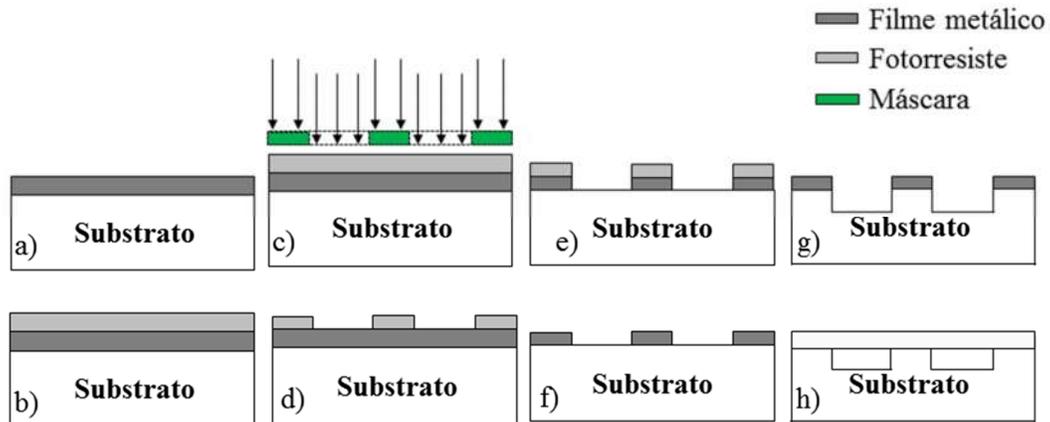
1.2.6.1.2.1 Fotolitografia

A fotolitografia foi a primeira técnica utilizada na confecção de microdispositivos fluídicos, vindo de uma adaptação de processos já bastante utilizados na fabricação de componentes eletrônicos. O método de confecção fotolitográfico consiste em remover seletivamente regiões pré-determinadas do substrato. Após esse processo, a base utilizada apresentará sulcos que definem as dimensões dos canais do sistema(Vladisavljević *et al.*, 2008).

A Figura 16 ilustra as etapas envolvidas em um procedimento de fotolitografia. Em uma primeira etapa, o substrato deve ser limpo com água, detergente, solventes orgânicos (isopropanol ou acetona) e com uma solução altamente oxidante como $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$ ou $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$. Esses tratamentos tem a finalidade de remover qualquer resquício de impureza, orgânica e inorgânica, que possa estar aderida na superfície do material. Em seguida, uma fina camada de metal é depositada sobre a superfície do substrato por evaporação térmica (Figura 16-a). Sobre essa, uma camada de fotorresiste é depositada pela técnica de *spin-coating* (processo utilizado para deposição de finas camadas uniformes de substrato, por força da ação de pseudo-foça centrífuga) (Figura 16-b). Uma máscara (de fotolito, ou Cr/Au), contendo o desenho da estrutura que se deseja obter, é posicionada entre o fotorresiste e um gerador de ondas magnéticas (laser ou luz UV) (Figura 16-c). O polímero depois de exposto é então revelado (Figura 16-d), sendo a camada exposta do metal corroída quimicamente (KI/I_2 , ou HCl/HNO_3 , entre outros)

(Figura 16-e). Após a corrosão do substrato por via úmida ou seca (Figura 16-f), segue-se a remoção da camada metálica (Figura 16-g) e, por fim, a fixação da cobertura (Figura 16-h).

Figura 16: Principais etapas empregadas na fotolitografia. a) substrato com camada metálica depositada; b) deposição do fotorresiste; c) foto-sensibilização do fotorresiste; d) revelação do fotorresiste; e) corrosão da camada metálica; f) corrosão da camada do substrato; g) remoção da camada metálica e h) fixação da cobertura.

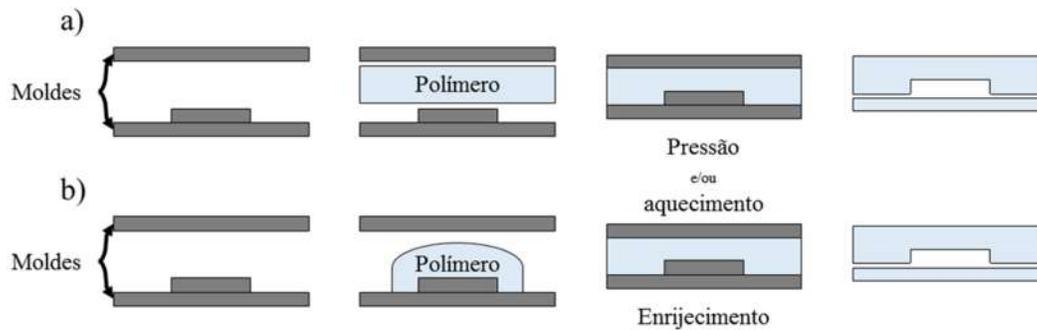


Fonte: arquivo pessoal.

1.2.6.1.2.2 Moldagem

Os processos que envolvem microfabricação por moldagem são exclusivos para aplicações em bases poliméricas. Para tal, essa técnica se faz valer das propriedades elastoméricas, características de alguns tipos de materiais. Os polímeros, no estado sólido (Figura 17-a) ou líquido viscoso (Figura 17-b), são prensados contra moldes contendo um relevo dos desenhos da estrutura desejada. Para tal, os moldes devem ser previamente confeccionados por outra técnica de microfabricação. Os moldes podem ser definidos como a imagem negativa da estrutura desejada. Após pressão, os polímeros adquirem a contra-forma da matriz (Kameoka *et al.*, 2001).

Figura 17: Etapas envolvidas em processos de moldagem para polímeros a) rígidos e b) viscosos.



Fonte: arquivo pessoal

1.2.6.1.2.3 LIGA

O nome LIGA vem do alemão, *Lithographie, Galvanic and Abformung* (Litografia, Galvanização e Modelagem) e, como o próprio nome já sugere, é realizado em três etapas, envolvendo processos de litografia, galvanoplastia e moldagem. Dessa forma, pode-se dizer que os princípios dessa técnica são semelhantes ao da fotolitografia. De fato, a grande diferença é, que ao contrário do que ocorre no processo fotolitográfico, com remoção de uma camada metálica, na LIGA ocorre a eletrodeposição de uma camada metálica na parte do fotorresiste revelado. Dessa forma, após a remoção da camada de fotorresiste, é obtida uma matriz para moldagem.

1.2.6.1.2.4 Ablação a laser

Na ablação por radiação a laser, pequenos pulsos de radiação são direcionados à superfície do substrato. As fontes de radiação empregada possuem energia suficiente para quebrar as ligações químicas em uma área focal extremamente pequena. Essa quebra de ligação acarreta em um abrupto aumento de pressão localizada, induzindo um aumento da energia local, que acaba por vaporizar o material do substrato (Cheng *et al.*, 2004).

Neste contexto, a utilização da ablação por laser de dióxido de carbono vem sendo bastante difundida. O laser de CO₂ emite radiação eletromagnética com comprimento de onda na região do infravermelho, entre 9,4 e 10,6 μm, região onde ocorrem os estiramentos C-C, C-O e C-N o que o torna apropriado para praticamente todo tipo de material de natureza orgânica. A energia transferida pelo laser aquece localmente o substrato, provocando sua fusão, ebulição e vaporização. A desvantagem dos métodos de microfabricação baseado em laser é que a radiação do laser provoca alterações físicas e/ou químicas nas vizinhanças das ablações, podendo dificultar a selagem ou até mesmo inviabilizar o mesmo (Chen *et al.*, 2008).

1.3 Aplicação de enzimas em sistemas em fluxo

A imobilização de enzimas consiste em uma poderosa ferramenta para melhorar o desempenho de sistemas analíticos dependentes de propriedades enzimáticas. No que se diz imobilização, entende-se por sistemas que empregam biomoléculas retidas em um reator ou sistema analítico.

1.3.1 Enzimas

Com exceção para um pequeno grupo de moléculas de RNA, todas as enzimas são proteínas. A sua atividade catalítica depende da integridade de sua conformação prostética nativa. Dessa forma, se uma enzima é desnaturada ou dissociada em suas subunidades, sua atividade catalítica é, em geral, perdida.

Algumas enzimas apresentam atividade apenas através de seus resíduos de aminoácidos (centros prostéticos), enquanto outras necessitam de componentes químicos adicionais chamados de co-fatores (como Fe²⁺, Mg²⁺ e Zn²⁺), ou co-enzimas (como

dinucleótido de flavina e adenina – FAD – e Dinucleótido de nicotinamida e adenina – NAD) para tal. As enzimas são classificadas de acordo com as reações que catalisam, conforme mostrado na Tabela 1(Lehninger *et al.*, 2008).

Tabela 1: Classificação de enzimas e os tipos de reações catalisadas pelas mesmas

Classe	Tipo de reação catalisada
Oxirredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de H)
Transferases	Transferência de grupamentos
Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para água)
Liases	Adição de grupos para olefinas, ou formação de duplas ligações via remoção de grupos funcionais
Isomerases	Transferência de grupos entre moléculas para formação de formas isoméricas
Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N, por reações de condensação acopladas a quebra de ATP

Uma reação enzimática simplificada pode ser escrita como:



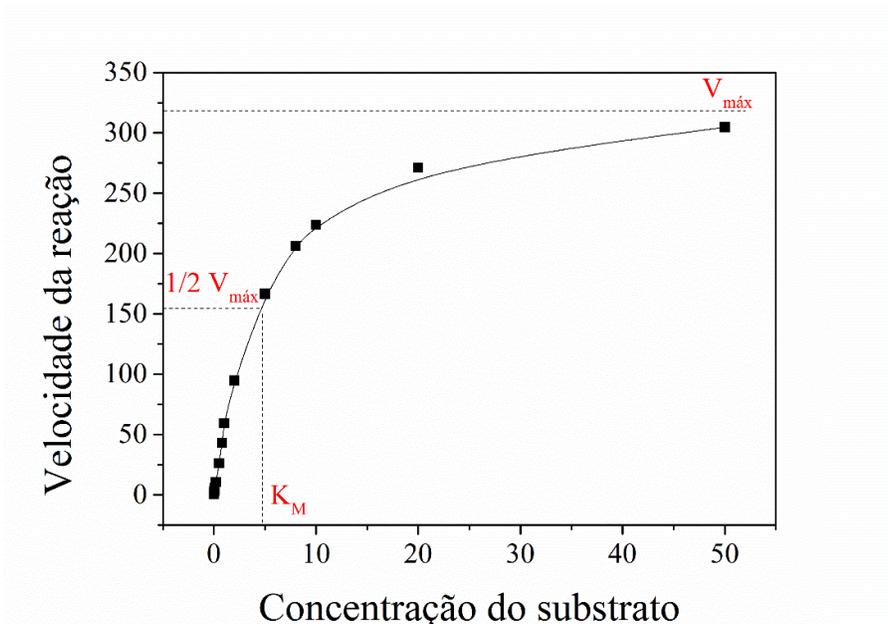
, onde E, S e P representam a enzima, o substrato e o produto, respectivamente, e ES é o complexo transiente da enzima com substrato.

Um dos fatores que afetam a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima é a concentração do substrato [S]. A avaliação do efeito da concentração do substrato no entanto é complicada, pelo fato da mesma variar durante o curso da reação à medida que o substrato é convertido em produto. Dessa forma, os parâmetros cinéticos são geralmente avaliados pela velocidade inicial da reação (V_0). Como em um experimento a [S] é sempre muito maior que a concentração da enzima [E], e se o tempo de reação é suficiente pequeno, as mudanças da [S] são negligenciáveis, podendo ser consideradas como um constante(Lehninger *et al.*, 2008).

O efeito provocado em V_0 pela variação da [S], quando a concentração da enzima é mantida constante, é mostrado na Figura 18. Em concentração pequenas de substrato,

V_0 aumenta por incrementos menores em resposta ao aumento da $[S]$. Finalmente, um estado estacionário é alcançado ($V_{m\acute{a}x}$), sem aumentos significativos em V_0 , mesmo diante de aumentos em $[S]$.

Figura 18: Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada enzimaticamente



Fonte: arquivo pessoal

O perfil cinético apresentado para as reações enzimáticas pode ser compreendido em duas etapas:

- a) Inicialmente a enzima combina-se reversivelmente com o substrato, para formar o complexo enzima-substrato, em um passo reversível relativamente rápido:



- b) A seguir, em uma etapa lenta, o complexo ES se rompe com formação da enzima livre e do produto da reação P:



Como a reação de quebra do complexo transiente é mais lenta, é ela quem limita a velocidade da transformação global do reagente em produto. Em qualquer etapa da reação, a enzima pode ser encontrada sobre a forma livre, E, ou complexada, ES. Em concentrações pequenas de substrato, a grande maioria da enzima estará na forma livre, sendo a velocidade de reação proporcional a [S], uma vez que o equilíbrio estará deslocado para formação de ES. A velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) será atingida quando praticamente todas as moléculas da enzima estiverem na forma do complexo ES, sendo a concentração da enzima livre desprezível. Nesse ponto, a enzima se encontra saturada com o substrato e a velocidade da reação não aumenta com o aumento de [S](Lehninger *et al.*, 2008).

1.3.2 Equação de Michaelis e Menten

A Figura 18 mostra a relação entre [S] e V_0 para uma reação enzimática. A curva que expressa tal relação possui a mesma forma para a grande maioria das enzimas, sendo expressa pela equação de Michaelis-Menten. Tal relação parte da hipótese que, nas reações enzimáticas, o passo limitante da velocidade é a quebra do complexo ES.

A equação de Michaelis-Menten (Equação 45) descreve a velocidade para uma reação enzimática, com um único substrato. Tal expressão demonstra a relação quantitativa entre a velocidade inicial, V_0 , a velocidade máxima, $V_{m\acute{a}x}$, e a concentração inicial de substrato, [S]. Todas essas variáveis são relacionadas através da constante de Michaelis-Menten, K_m . Essa constante é dita dinâmica, expressando a relação entre as concentrações reais no estado estacionário ao invés da concentração no equilíbrio(Lehninger *et al.*, 2008):

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad (45)$$

Uma relação numérica importante emerge da equação de Michaelis-Menten quando o valor de V_0 é exatamente metade de $V_{m\acute{a}x}$ (Figura 18), ou seja:

$$K_m = [S] \rightarrow V_0 = \frac{1}{2} V_{m\acute{a}x} \quad (46)$$

K_m é equivalente à concentração de substrato na qual V_0 é igual à metade de $V_{m\acute{a}x}$ e indica a afinidade da enzima pelo substrato. Quanto menor for o valor de K_m maior será a afinidade da enzima pelo substrato. **Obs:** $V_{m\acute{a}x}$ depende do k_2 , a constante da etapa lenta da reação, e da concentração da enzima.

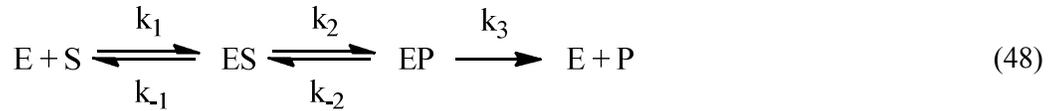
1.3.2.1 Significado de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m

Toda enzima que apresenta uma dependência hiperbólica entre V_0 e $[S]$ segue a teoria cinética de Michaelis-Menten. No entanto, tal relação não é descrita apenas pelo equilíbrio químico demonstrado anteriormente (dependente de k_1 e k_2). Muitas enzimas possuem mecanismos de ação completamente diferentes entre si, mas exibem o mesmo comportamento cinético no estado estacionário. Dessa forma, o significado real de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m podem variar de uma enzima para outra. O significado real de K_m depende de aspectos específicos do mecanismo de reação, como o número e velocidade das etapas envolvidas no seu mecanismo. Considerando uma reação em dois passos (Lehninger *et al.*, 2008):

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (47)$$

Como k_2 é a etapa limitante da reação, quando $k_2 \ll k_{-1}$, K_m se reduz ao valor k_{-1}/k_1 , e tal condição vai definir a afinidade da enzima pelo substrato no complexo ES. Muitas vezes, $k_2 \gg k_{-1}$, e logo $K_m = k_2/k_1$, ou até $k_2 \sim k_{-1}$ e K_m se torna uma função mais complexa envolvendo todas as três constantes de velocidade.

O valor de $V_{m\acute{a}x}$ também varia consideravelmente entre diferentes enzimas. Se uma enzima reage por um mecanismo de duas etapas de Michaelis-Menten, $V_{m\acute{a}x}$ é equivalente a $k_2[E]$, onde k_2 é a constante da etapa limitante da reação. Entretanto, o número de etapa de uma reação e as energias envolvidas na etapa limitante da reação podem variar de enzima para enzima, conforme exemplificado abaixo (Lehninger *et al.*, 2008):



Na saturação, grande parte da enzima no meio reacional se encontra na forma de EP e $V_{m\acute{a}x} = k_3[E]$. Portanto pode-se definir a constante k_{cat} para descrever a velocidade limitante de qualquer reação catalisada por uma enzima nas condições de saturação.

É importante ressaltar que cada enzima tem valores ótimos de k_{cat} e K_m que refletem o ambiente químico, a concentração do substrato e a química da reação que está sendo catalisada. Como o ambiente químico impacta diretamente nas constantes catalíticas de uma enzima, é de se esperar também que uma enzima apresente valores diferentes de k_{cat} e K_m em diferentes meios.

1.3.3 Imobilização enzimática em microcanais

Uma das aplicações que vem ganhando grande atenção da comunidade científica envolve o uso de microdispositivos como biodispositivos e, nesse ramo insere-se o processo de imobilização de enzimas. A imobilização de enzimas fornece uma gama de vantagens se comparada à utilização das mesmas em processos de batelada tais como, a reutilização do sistema enzimático, um menor consumo de reagentes, menor custo, além de um aumento da vida útil e estabilidade da enzima(Asanomi *et al.*, 2011).

Além das vantagens associadas à imobilização em si, o uso de biodispositivos associados a sistemas em fluxo, chamados de biorreatores, conferem ao sistema outras vantagens se comparadas a biodispositivos de monitoramento, os biosensores. Algumas vantagens que podem ser associadas a esses sistemas são a grande razão entre a superfície imobilizada e o volume de solução no sistema, tempos de reação bem definidos e reprodutíveis, além da necessidade de reduzida quantidade de volume de amostra (Bulmus *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 2000; Soper *et al.*, 2002). Um grande número de diferentes aplicações que envolvam a utilização de enzimas imobilizadas em microcanais já foi apresentada (Drager *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Vladisavljević *et al.*, 2008; Delattre

e Vijayalakshmi, 2009). A performance final de um microreator (biorreator em escala micrométrica) depende diretamente de parâmetros relacionados ao processo de imobilização, incluindo:

a) propriedade físico/químicas da superfície, já que essas influenciam as ligações específicas e não-específicas da enzima alvo;

b) a distância entre a enzima imobilizada e a superfície do dispositivo;

c) a orientação da enzima imobilizada, que pode impossibilitar sua imobilização, especialmente no caso de moléculas com grande volume;

d) a densidade de enzimas na superfície do dispositivo, que determina a sensibilidade e o limite de detecção do dispositivo.

Estas abordagens são geralmente alcançadas por: a) o aprisionamento de partículas: tais como a utilização de um agente de ligação cruzada, também comumente chamados de *crosslinker*; b) a modificação da superfície do substrato visando a imobilização química, c) mediante a aplicação de membranas para imobilização física e d) à partir de adsorção física via interações hidrofóbicas, de Van der Waals ou eletrostáticas.

Quando se trata da utilização de biorreatores, a utilização de ligações cruzadas associada à modificação da superfície do substrato é geralmente desejada, visto que a energia de ligação presente nesses sistemas é consideravelmente elevada (na ordem de 3,2 a $14,1 \times 10^{-19}$ J) o que propicia uma maior rigidez mecânica do sistema, diminuindo os processos de lixiviação. Porém, para o sucesso da implementação desse tipo de imobilização, faz-se necessária a presença de grupos funcionais reativos na estrutura do substrato para que esses possam interagir diretamente com a enzima ou com um agente de ligação cruzada (*crosslinker*, que atua como uma molécula espaçadora) (Fixe *et al.*, 2004). Os *crosslinkers* são responsáveis pela realização da ligação entre o composto bioativo, no caso a enzima, e o substrato. Estes podem também melhorar a bioatividade, reduzindo os efeitos estéricos e protegendo o composto da desnaturação induzida, provocada por interações diretas com a superfície na qual ele é imobilizado.

Em geral, as enzimas oferecem vários grupos funcionais para imobilização, principalmente em suas cadeias laterais de aminoácidos, que são adequadas para fins de imobilização. Esses grupos funcionais podem ser utilizados para, como já dito anteriormente, covalentemente ligar a superfícies dos polímeros à enzima por uma variedade de diferentes reações (Jonkheijm *et al.*, 2008).

As estratégias químicas escolhidas para ligar as enzimas à superfície do material do substrato podem determinar grande parte das propriedades do microreator. Por exemplo, um processo de imobilização com ordenação da enzima de forma aleatória pode diminuir, ou até mesmo reprimir, a atividade enzimática. No entanto, os sistemas com ordenação aleatória são extremamente difundidos devido a sua tendência de imobilização de uma maior quantidade de enzimas. Para assegurar a acessibilidade ao centro ativo da enzima e, dessa forma, possibilitar um estudo mais dinâmico em cima de sua atividade catalítica, uma orientação homogênea das mesmas, sem afetar sua conformação, deve ser objetivada. Tal fato é geralmente alcançado via aplicação de estratégias de imobilização seletivas. Serão descritas adiante algumas possibilidades de obtenção dos diferentes sistemas (Jonkheijm *et al.*, 2008).

1.3.3.1 Imobilização com orientação aleatória

1.3.3.1.1 Ligação não covalente

As proteínas, de uma forma geral, podem adsorver em superfícies por ligações iônicas e interações hidrofóbicas e polares, sendo que a força dominante será dependente tanto da enzima empregada, como também do substrato utilizado. A imobilização física em superfícies de poliestireno hidrofóbico é, de longe, o método mais comum para imobilização enzimática.

A imobilização enzimática seguindo esses critérios pode também ser alcançada via interações eletrostáticas. Superfícies que são modificadas para conter amins

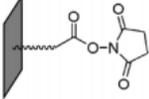
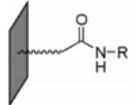
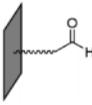
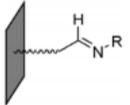
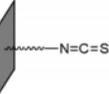
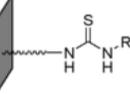
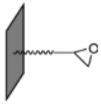
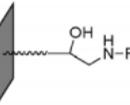
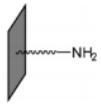
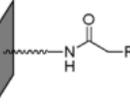
carregadas positivamente, ou grupos carboxílicos negativamente carregados, são os mais adequados para esse propósito. A superfície enzimática resultante é comumente orientada de forma heterogênea, já que cada molécula pode formar diversas interações, em diversas orientações, minimizando a repulsão por parte da superfície e também por parte das enzimas previamente imobilizadas.

1.3.3.1.2 Ligação covalente

De longe, a grande maioria dos processos envolvendo imobilização via ligação covalente utilizam os grupamentos das cadeias laterais de amino-ácidos presente nas enzimas (Jonkheijm *et al.*, 2008). Tais grupamentos podem ser usados desde que grupos específicos estejam presentes na superfície do substrato, ou via adição de “*cross-linkers*” apropriados.

Os “crosslinkers” são responsáveis pela realização da ligação entre o composto bioativo, no caso a enzima, e o substrato. Estes podem também melhorar a bioatividade, reduzindo os efeitos estéricos e protegendo o composto da desnaturação induzida, provocada por interações diretas com a superfície na qual ele é imobilizado. A Tabela X mostra alguns exemplos típicos de grupos presentes nos substratos e/ou “*cross-linkers*”, compatíveis com o processo de imobilização.

Tabela 2: Métodos utilizados para imobilização de enzimas de forma não específica

Grupamento funcional do substrato	Grupamento funcional da enzima	Produto formado
Éster NHS (Jiang <i>et al.</i> , 2004; Yam <i>et al.</i> , 2006)	 H_2NR	Amida 
Aldeído (D'souza e Godbole, 2002; Tomizaki <i>et al.</i> , 2005; Rozkiewicz <i>et al.</i> , 2006)	 H_2NR	Imina 
Isotiocianato (Groll <i>et al.</i> , 2004)	 H_2NR	Tiuréia 
Epóxido (Guisan <i>et al.</i> , 2001; Mateo <i>et al.</i> , 2003; Mateo <i>et al.</i> , 2007)	 H_2NR	Aminoálcool 
Amina (Slocik <i>et al.</i> , 2006)	 HO(O)CCH_2 R	Amida 

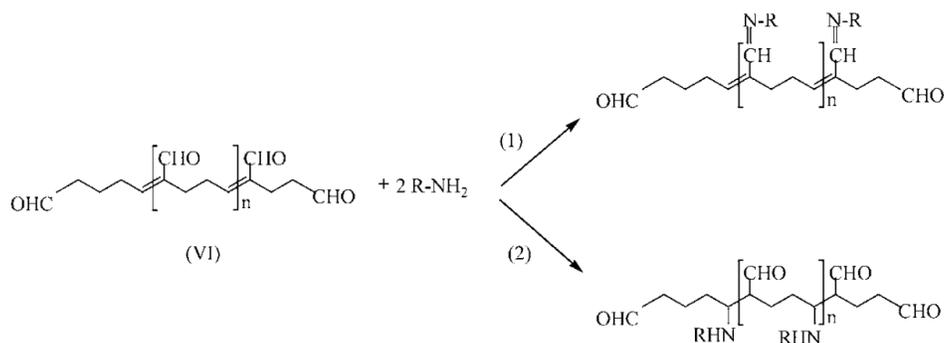
Um dos “*cross-linkers*” mais utilizados para a realização de imobilizações covalentes é o glutaraldeído. O glutaraldeído é conhecido pela sua alta reatividade com proteínas em pH neutro, sendo tal reatividade atribuída a presença de diversos resíduos reativos na estrutura proteica e das diferentes formas do glutaraldeído em solução (ao menos 11 diferentes), levando a vários possíveis mecanismos de reação (Migneault *et al.*, 2004). Em geral, a imobilização enzimática envolvendo a aplicação de glutaraldeído se dá de forma não-ordenada, uma vez que este reagente não é seletivo com relação aos resíduos laterais presentes nas estruturas enzimáticas. Tal característica, usualmente em

pH próximo da neutralidade, é baseada na presença dos diversos resíduos reativos das proteínas e nas diversas formas moleculares em que o glutaraldeído se encontra em solução aquosa (Migneault *et al.*, 2004).

Dentre os aminoácido reativos podem ser destacados a lisina, a tirosina, o triptofano, a fenilalamina, a histidina, a cisteína, a prolina, a serina, a glicina, a glicilglicina e a arginina, particularmente via cadeias laterais de proteínas contendo amina, carboxila, tiol, fenol e imidazol (Jonkheijm *et al.*, 2008).

De longe, o método mais comum para imobilização covalente de enzimas em substratos é usando o grupamento amina da cadeia lateral de lisina. Infelizmente, a grande abundância desses grupos (maior que 10%) pode ocasionar problemas de aumento de heterogeneidade e de flexibilidade conformacional restrita, devido a imobilizações em vários pontos de uma única enzima. No entanto, como os resíduos de lisina estão comumente situados na periferia da estrutura proteica (em contato com o solvente), tais processos não influenciam na atividade catalítica das enzimas, desde que os mesmos sejam realizados em nível moderado. Devido as propriedades químicas dos grupamentos envolvidos nesse processo de imobilização, a eficiência da imobilização depende diretamente de diversos fatores, como pH, concentração, força iônica e tempo de reação. O glutaraldeído reage reversivelmente com grupamentos amina em uma larga faixa de pH ($\geq 3,0$), com exceção à faixa entre 7,0 e 9,0, onde o processo se torna pouco reversível (Okuda *et al.*, 1991). O processo de reação no entanto ainda não é bem descrito na literatura, onde reside a dúvida se o processo ocorre via formação de bases de Schiff ou adição de Michael (Migneault *et al.*, 2004) (Figura 19). Cabe ressaltar que essas propostas de mecanismo são as mais difundidas na literatura, porém uma vasta gama de outras possíveis rotas de imobilização encontra-se reportadas, baseadas nas diferentes apresentações do glutaraldeído em solução aquosa.

Figura 19: Proposta de reação entre glutaraldeído (em sua forma mais comum em solução aquosa) e grupamentos amina das enzimas. Em (1) reação via base de Schiff e em (2) reação via adição de Michael.



Fonte: MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, v. 37, n. 5, p. 790-+, Nov 2004. ISSN 0736-6205.

A imobilização via grupamentos carboxílicos podem vir a ser uma alternativa para os processos baseados em reações com aminas, já que os ácido aspártico e glutâmico usualmente constituem o maior fração das enzimas. Dessa forma, ao invés de adsorver as enzimas via interações não-covalentes em superfícies “aminadas”, métodos de imobilização suave podem ser usados para obter uma imobilização covalente usando 1,1-carbonildiimidazol (CDI) para ativar os grupamentos carboxílicos das enzimas (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1993). Essa estratégia tem a desvantagem de poder induzir uma rápida ligação cruzada entre as enzimas, e não com a superfície do material.

Nesse contexto incluísse ainda o uso de superfícies fotoativas que permitiu a utilização de dispositivos enzimáticos envolvendo a imobilização direta no suporte sólido. Apesar da imobilização fotoquímica estar sujeita a algumas limitações, como condições reacionais que possivelmente degradam e/ou desnaturam as enzimas, elas possuem duas importantes vantagens sobre outras técnicas que é proporcionar rápido acesso aos microreatores, visto que não necessitam de modificações químicas trabalhosas nos reagentes, e permitir um controle mais preciso da forma em que a enzima é imobilizada. Grande parte das reações fotoquímicas podem ser realizadas sobre condições brandas, independente do pH e da temperatura, e são iniciadas por radiações com $\lambda \approx 350$ nm, em qual a grande maioria das biomoléculas são transparentes. Após a ativação, os reagentes passam por transformações químicas distintas que, em seguida, levam a formação de ligações covalentes entre os intermediários foto-gerados e as enzimas. Dessa

forma, ocorre uma reação cruzada entre o substrato, o reagente foto-ativado e a enzima (Fleming, 1995).

1.3.3.2 Imobilização com orientação orientada

O distanciamento do sítio de interesse de uma enzima imobilizada, por meio de sua orientação espacial, em geral, facilita o processo de interação com o analito. Para tal, estratégias adaptadas de métodos já bem desenvolvidos que utilizam reagentes de captura ou de fusão de sistemas proteicos, que foram originalmente desenvolvidas para a purificação de proteínas por cromatografia, vem sendo adaptadas para imobilizar enzimas de forma orientada sobre a superfície do substrato. A vantagem sobre os sistemas que envolvem adsorção física, ou imobilização covalente, se dá na especificidade e na orientação do sistema enzima-analito. Além disso, a facilidade de reversibilidade do sistema imobilizado pode ser um outro atrativo sob o ponto de vista econômico (Jonkheijm *et al.*, 2008).

Uma estratégia adaptada da cromatografia por afinidade é a ligação específica de biotina às proteínas específicas avinidina e estreptavidina (SAv). SAv possui quatro sub-unidades idênticas, no qual cada uma se liga a uma molécula de biotina. Devido a elevada afinidade entre SAv e a biotina ($K = 10^{13} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$), a formação do complexo é considerada quase irreversível (Green, 1975), em uma escala similar à de uma ligação covalente. A ligação SAv – biotina é rápida e não é afetada por fatores como pH, temperatura, solventes orgânicos, ou outros agentes de desnaturação. Em geral, tais sistemas são fabricados por camadas de biotina/SAv/biotina, ao invés da imobilização direta de SAv, uma vez que proporcionam um melhor grau de organização (Lin *et al.*, 2010).

Uma outra forma para obtenção da imobilização ordenada se dá tomando como base agentes naturais de captura de algumas enzimas (*e.g.* anticorpos) e as ligações proteínas-anticorpos. Baseado nisso, microssistemas já foram desenvolvidos incluindo arranjos de anticorpos mono- ou poli- clonados, fragmentos de anticorpos ou ligantes polipeptídicos sintéticos (Borrebaeck, 2000; Lueking *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2008). No

entanto, como os anticorpos são, em geral, glicosilados e possuem uma grande área superficial para interação, apresentam uma grande probabilidade de reações cruzadas. Essa falta de especificidade pode gerar um grande número de falsos positivo ou negativo. No entanto, enquanto os sistemas convencionais apresentam orientação randômica, a ligação via superfícies imunoreceptoras, se bem arquitetadas, pode gerar sistemas altamente orientados (Jonkheijm *et al.*, 2008).

Além das formas de imobilização já descritas, uma outra alternativa se dá via imobilização química por meio das cadeias laterais de aminoácidos. Em geral, tal alternativa propicia a imobilização randômica por conta de ser realizada por resíduos que se apresentam por mais de uma vez nas periferias das enzimas. Dessa forma, a imobilização pode ocorrer simultaneamente por meio de vários resíduos, potencializando a heterogeneidade da população de enzimas imobilizadas (Borrebaeck, 2000). Grande parte dos métodos utilizados para a imobilização quimo-seletiva de enzimas são baseadas em métodos de ligação originalmente descritas para síntese e derivatização seletiva das mesmas (Muir, 2003; Camarero, 2006). Todas essas metodologias envolvem derivatização da enzima utilizando com um único reagente química e em uma posição definida para que a mesma possa posteriormente reagir seletivamente com um grupamento complementar no suporte sólido.

Em alguns casos, a imobilização orientada da enzima pode ocorrer no caso em que esta possui um único aminoácido acessível e reativo. A cisteína (Cis) é o único aminoácido natural que possui um grupamento tiol em sua estrutura e sua abundância relativa em proteínas é, em geral, pequena (menos que 1%). Os tióis possuem pK_a em torno de 8,5 e em pH 7,0 são suficientemente nucleofílicos para reagir seletivamente com superfícies químicas devidamente modificadas, formando, por exemplo, ligações de estáveis de tioéter (Gauvreau *et al.*, 2004; Wacker *et al.*, 2004; Blank *et al.*, 2006; Ichihara *et al.*, 2006). Nesses casos, o resíduo reativo de Cis não pode estar envolvido em nenhum elemento estrutural da enzima devendo ainda estar em uma posição exposta a solventes para possibilitar o processo de imobilização. Caso a Cis não esteja nativa na estrutura da enzima em questão, a mesma pode muitas vezes ser incluída em sua estrutura via mutações específicas nos resíduos de serina e alanina, preferencialmente em uma posição acessível a solventes.

2 Contextualização, objetivos e justificativas

A necessidade constante da comunidade atual em desenvolver sistemas cada vez mais eficientes se depara diretamente com os avanços nos processos de microfabricação. No que tange a química analítica, fatores como a diminuição do consumo de amostra, maior frequência analítica, maior sensibilidade e a portabilidade são fatores cada vez mais desejados para a obtenção de dispositivos analíticos mais robustos e de fácil operação. Com isso os processos de microfabricação vem ganhando cada vez mais espaço e tendem a substituir os sistemas macroscópicos amplamente difundidos nos dias atuais.

Aliado a isso o desenvolvimento de técnicas de imobilização se torna importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos, aumentar a estabilidade enzimática e propiciar sistemas mais seletivos. Além disso, a diminuição de alterações estruturais, especialmente em seu sítio ativo, representa uma condição ímpar ao sistema com a manutenção dos parâmetros enzimáticos por períodos longos de tempo e análise, o que torna os microdispositivos enzimáticos um potencial expoente na área de análise química, independente da área de aplicação.

Substratos poliméricos tais como vidro (Richter *et al.*, 2002), poliestireno (Drager *et al.*, 2007), polidimetilsiloxano (PDMS) (Ekstrom *et al.*, 2000; Thomsen *et al.*, 2007) e poli (metilmetacrilato) (PMMA) (Cerdeira Ferreira *et al.*, 2013), são cada vez mais explorados para a imobilização devido a vantagens tais como a reutilização do sistema enzimático, o menor consumo de reagente, um tempo de vida prolongado da enzima e sua maior estabilidade.

As possibilidades de desenvolver dispositivos microfluídicos feitos de polímeros os torna extremamente atraentes para aplicações analíticas. Esses sistemas apresentam algumas vantagens em comparação com a utilização direta de biossensores, tais como a sua grande relação de área/volume, maiores tempos de reação e a necessidade de pequenas quantidades de amostra (Figeys e Pinto, 2000; Gao *et al.*, 2001; Szekely e Guttman, 2005), como já citado anteriormente.

O PMMA mostra algumas vantagens se comparado a outros polímeros sintéticos tais como o seu baixo preço, biocompatibilidade, excelente transparência óptica e

propriedades mecânicas e químicas atraentes (Bulmus *et al.*, 1997). No entanto, a imobilização direta de enzimas em sua estrutura se torna prejudicada em virtude de sua composição química. Nesses casos, para que a imobilização de enzimas seja possível, a adição de grupos funcionais reativos, que podem interagir diretamente com a enzima ou com auxílio de um *crosslinker* (atuando como uma molécula espaçadora) faz-se necessário (Fixe *et al.*, 2004). Diferentes metodologias para a funcionalização de PMMA, tais como a adição direta de grupos funcionais durante a polimerização, como um monômero de acroleína (Li *et al.*, 2004), já foram relatadas. Outra abordagem envolve a ligação de grupamentos ativos diretamente na superfície do PMMA, que pode ser conseguida por: utilização do reagente N-litiodiaminoetano; por incubação com soluções de aminas em meio alcalino (tais como tampão de borato pH 11,5, ou solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹) (Bai *et al.*, 2006); ou por outras metodologias ainda mais laboriosas (Bulmus *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 2000; Soper *et al.*, 2002).

Nos últimos anos a pesquisa para diferentes estratégias visando a fabricação e aplicação de sistemas de biocatálise em fluxo, através de reatores enzimáticos, vem apresentando numerosos esforços da comunidade científica. A busca por suportes insolúveis e que apresentem condições para imobilização são uma preocupação constante nos dias de hoje e muitas publicações diferentes podem ser encontradas dentro deste campo (Schoenherr *et al.*, 2007; Temporini *et al.*, 2007; Nicoli *et al.*, 2008; Sinitsyna *et al.*, 2008; Bibi *et al.*, 2011; Ozoner *et al.*, 2011; Urban *et al.*, 2012).

Além da presença de grupos funcionais ativos no suporte para imobilização, outras propriedades como a afinidade à água, a porosidade e a estrutura química da superfície podem afetar dramaticamente as características da enzima imobilizada^{84, 85}. Assim a fabricação de microreatores em fluxo baseiam-se na seleção apropriada da matriz e das condições de imobilização⁸⁴.

Nesse contexto, suportes à base de epóxi estão ganhando popularidade para imobilização devido a sua estabilidade em soluções neutras, resistência mecânica em meio aquoso e sua reatividade com vários grupos nucleófilos para formação de fortes ligações⁸⁵. No entanto, reações covalentes diretas entre as proteínas e o suporte epóxi são extremamente lentas, tornando o uso de suportes multifuncionais (no aspecto químico) necessários. Substratos à base de grupos epóxi-amino são capazes de imobilizações mais rápidas e também podem aumentar o tempo de vida da enzima imobilizada⁸⁵.

Frente aos comentários apresentados aqui, o principal objetivo deste estudo é desenvolver microreatores poliméricos visando sua aplicação em sistemas μ -FIA, tendo em vista a imobilização de enzimas oxirredutases e sua possível aplicação para a quantificação de analitos de relevância analítica em amostras reais.

Como objetivos secundários, podem ser destacados destacar:

- Fabricar e avaliar as condições empregadas na construção de microcanais em diferentes bases poliméricas (PMMA e sistemas baseados em suportes epóxi);
- Desenvolver e avaliar condições para imobilização enzimática não específica nas bases poliméricas citadas acima;
- Estudar a modificação dos microcanais com diferentes tipos de enzimas oxirredutases;
- Implementar sistemas de análise por injeção de fluxo para avaliar os microreatores desenvolvidos;
- Aplicar os sistemas confeccionados para a quantificação de diferentes analitos utilizando os sistemas enzimáticos confeccionados.

3 Uso de microreatores em fluxo à base de poli (metil metacrilato) e polietilenoimina para imobilização enzimática

RESUMO

Neste trabalho, uma nova metodologia foi desenvolvida para imobilizar diferentes enzimas, entre elas *glicose oxidase* (GOx), *ascorbato oxidase* (AAO), *catalase* (CAT) e *glutamato dehidrogenase* (GDH), em microcanais de poli(metilmacrilato) (PMMA). Como benefícios da metodologia proposta, podem ser destacados a velocidade e a simplicidade de operação do processo. O processo de imobilização envolve apenas duas etapas, onde na primeira uma reação entre 5,0% (% m/m) de polietilenoimina (PEI), em DMSO, e PMMA é realizada, seguida da imobilização das enzimas com uma solução 100 U ml⁻¹ das mesmas e 0,1% (% v/v) de glutaraldeído, atuando no sistema como *crosslinker*. Parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (V_{max} e K_m), quando possível, foram calculados para as enzimas imobilizadas com base em respostas amperométricas obtidas. Tais medidas foram realizadas de forma direta para GOx e indireta para AAO e CAT, aplicando-se um potencial de +0,60V em uma célula eletroquímica constituída de um eletrodo duplo de platina (eletrodo de trabalho e auxiliar) e um eletrodo de referência de Ag/AgCl_(sat) confeccionado no próprio laboratório. Estudos baseados na enzima GDH não foram realizados devido a problemas de adequação analítica do sistema proposto, porém sua imobilização foi comprovada com sucesso.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho apresentavam grau analítico. Placas de poli(metil metacrilato) (PMMA) foram adquiridas da PlastiTécnica (São Paulo, Brasil). Di-hidrogeno fosfato de sódio, hidrogeno fosfato de sódio, peróxido de hidrogênio e álcool isopropílico foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil). Glutaraldeído 25% (V/V), D-(+)-glicose, cloreto de potássio e ferrocianeto de potássio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Polietilenoimina (PEI) (PM médio = $750000 \text{ g mol}^{-1}$, 50% (m/v) em água), dimetil sulfóxido (DMSO), 4-aminoantipirina, (*L*)-*glutamate dehydrogenase* de fígado bovino ($14,7 \text{ U mg}^{-1}$), *diaforese* de *clostridium kluveri* ($4,5 \text{ U mg}^{-1}$), *ascorbate oxidase* de *cucurbit asp* (162 U mg^{-1}), *catalase* de fígado bovino (2860 U mg^{-1}), sal de monohidrato de (L)-ácido glutâmico monossódico $\geq 98\%$, brometo de tiazolil azul de tetrazolio e hidrato de β -Nicotinamida adenina dinucleotídio foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). *Glicose oxidase* de *Aspergillus niger* (124 U mg^{-1}) foi adquirida da Toyobo (Osaka, Japão). Amostras de água de coco foram adquiridas em um mercado local sendo quatro amostras industriais e uma extraída direto da fruta.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Dubuque, USA), com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$. Todos os padrões e soluções enzimáticas foram preparadas em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,00).

3.1.2 Instrumentação e confecção dos microcanais

A confecção dos microcanais sobre as superfícies poliméricas foram feitas utilizando uma impressora a laser de CO₂ L-Solution 100 da Gravograph (La Chapelle-St Luc, França), semelhante ao equipamento mostrada na Figura 20. O aparelho em questão apresenta potência de até 30 W. O funcionamento da impressora a laser de CO₂ se faz emitindo radiação eletromagnética em um comprimento de onda de 10,6 μm e possui uma área utilizável de 460 x 305 mm.

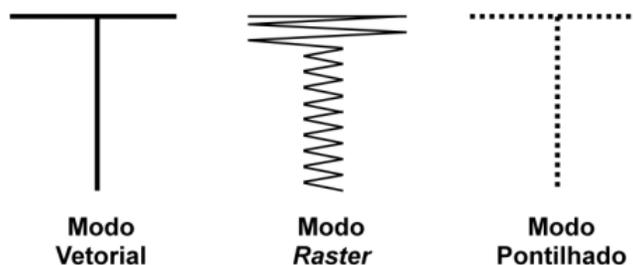
Figura 20: Equipamento de gravação a laser de CO₂, modelo LS100 da Gravograph.



Fonte: Disponível em: <http://www.gravograph.com.br/laser-gravacao/ls100.php>. Acesso em: 16 out 2016

Um tubo de plasma acoplado a um gerador de radiofrequência, montados sobre um eixo deslizante na posição xy, é quem define a área do laser. O equipamento possui três modos de operação, que impactam diretamente na forma de ablação sobre o substrato, são elas: modo vetorial, modo *raster* e modo pontilhado. A Figura 21 mostra a operação de cada um desses modos. No modo vetorial, o feixe de laser realiza movimento apenas em um único sentido vetorial. No modo *raster*, o laser hachura a área do desenho fazendo movimentos de *vai-e-vem*, similar a uma impressora matricial. Já o modo pontilhado opera de forma semelhante ao vetorial, porém o feixe do laser não é contínuo, e sim pulsado.

Figura 21: Representação dos modos de operação do sistema LS100. A representação do modo “raster” está ampliada para destacar a forma com que o mesmo é efetuado.

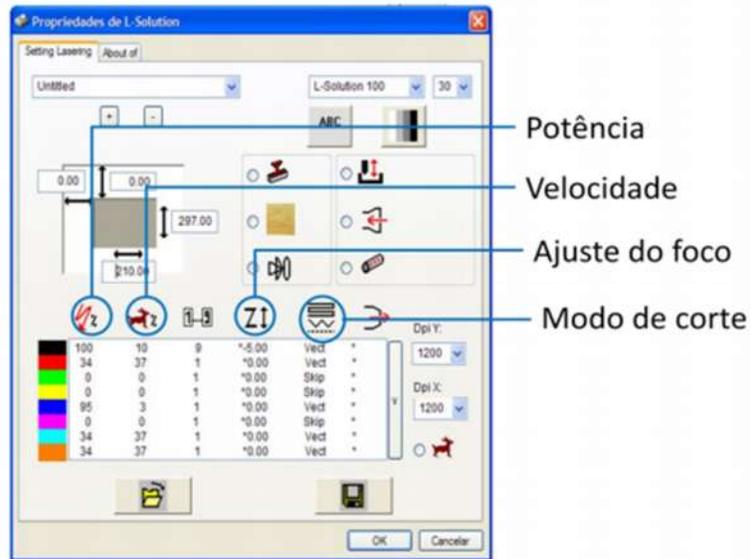


Fonte: arquivo pessoal

Os dispositivos confeccionados sobre a base de PMMA foram realizados utilizando o modo *raster*, para delineamento das bases dos microcanais, e o modo vetorial para corte lateral das peças e inclusão do canal de injeção. Uma das vantagens de se utilizar o modo *raster* para formação dos microcanais é que, além de facilitar o controle das dimensões dos mesmos, aumenta a rugosidade do sistema que, por sua vez, favorece os futuros processos de imobilização enzimática e de bioconversão.

A Figura 22 mostra a janela de controle do equipamento LS100, que permite o controle de alguns parâmetros ajustáveis do mesmo. O aparelho é capaz de distinguir oito tipos de cores em uma representação gráfica. Isso significa que, para cada uma das oito cores, é possível ajustar parâmetros operacionais diferentes como potência do corte, velocidade da base do laser, distância focal e modo de ablação.

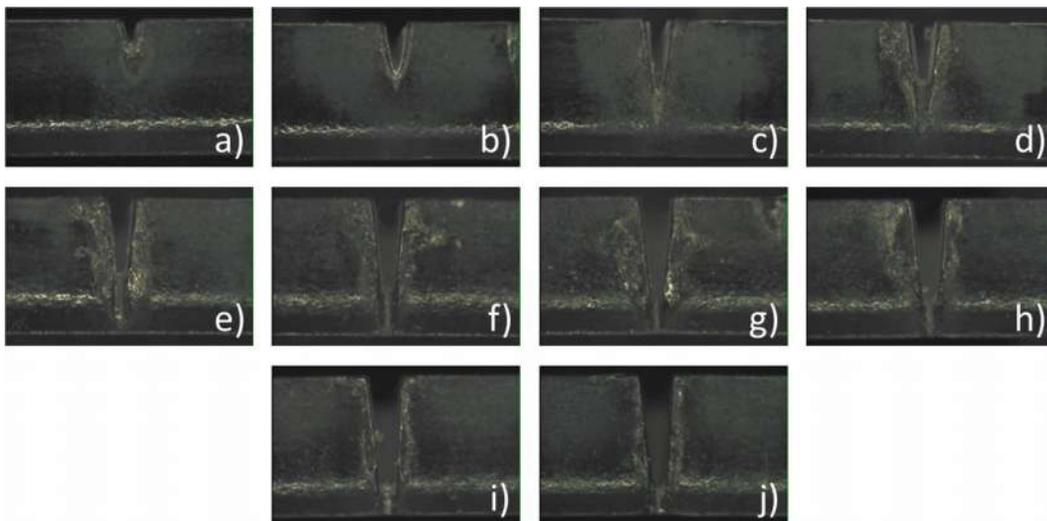
Figura 22: Parâmetros ajustáveis no equipamento de ablação a laser. Em destaque estão os principais ajustes da ablação para cada uma das cores associadas



Fonte: arquivo pessoal

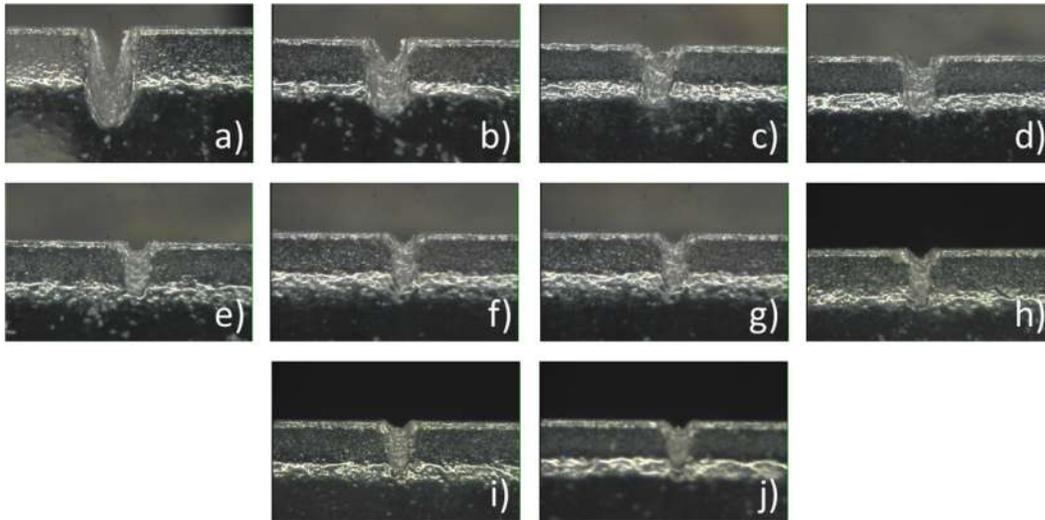
O efeito da variação da velocidade e da intensidade do feixe de laser empregado são mostrados nas Figuras 23 e 24. Tais parâmetros são os mais importantes na microfabricação por ablação a laser visto que, em geral, a distância focal ao substrato é mantida constante durante o processo.

Figura 23: Efeito da potência do laser sobre o corte da superfície do canal. Potência do laser a) 10%, b) 20%, c) 30%, d) 40%, e) 50%, f) 60%, g) 70%, h) 80%, i) 90% e j) 100%. Velocidade fixada em 10%.



Fonte: arquivo pessoal

Figura 24: Efeito da velocidade de movimentação do eixo do laser sobre o corte da superfície do canal. Velocidade a) 10%, b) 20%, c) 30%, d)40%, e) 50%, f) 60%, g) 70%, h) 80%, i) 90% e j) 100%. Potência fixada em 10%.

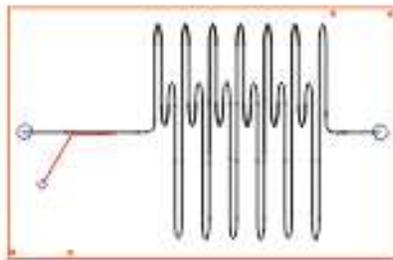


Fonte: arquivo pessoal

Pelos detalhes mostrados nas figuras acima, fica claro que a variação das condições apresentadas vão afetar diretamente as dimensões (profundidade e largura) do microcanal. Dessa forma diferentes combinações foram empregadas para diferentes finalidades. Nos microdispositivos desenvolvidos nesse estudo, foram utilizadas composições de velocidade:potência de 10%:10% para a obtenção do microcanal de injeção (operando no modo vetorial), 10%:30% para obtenção dos microcanais (operando no modo *raster*) e 10%:100% para realização de cortes na placa (orifícios para conexão de tubulações e delimitação da área física do dispositivo).

O design dos microcanais foi realizado no software Corel Draw 12 (Corel Corporation-versão 12.0.0.458-2003). A utilização desse software é favorável, uma vez que permite idealizar ablações com resolução de 0,01mm, além de ser compatível com as definições da impressora LS100. Um esboço do microcanal desenhado no software em questão está disposto na Figura 25.

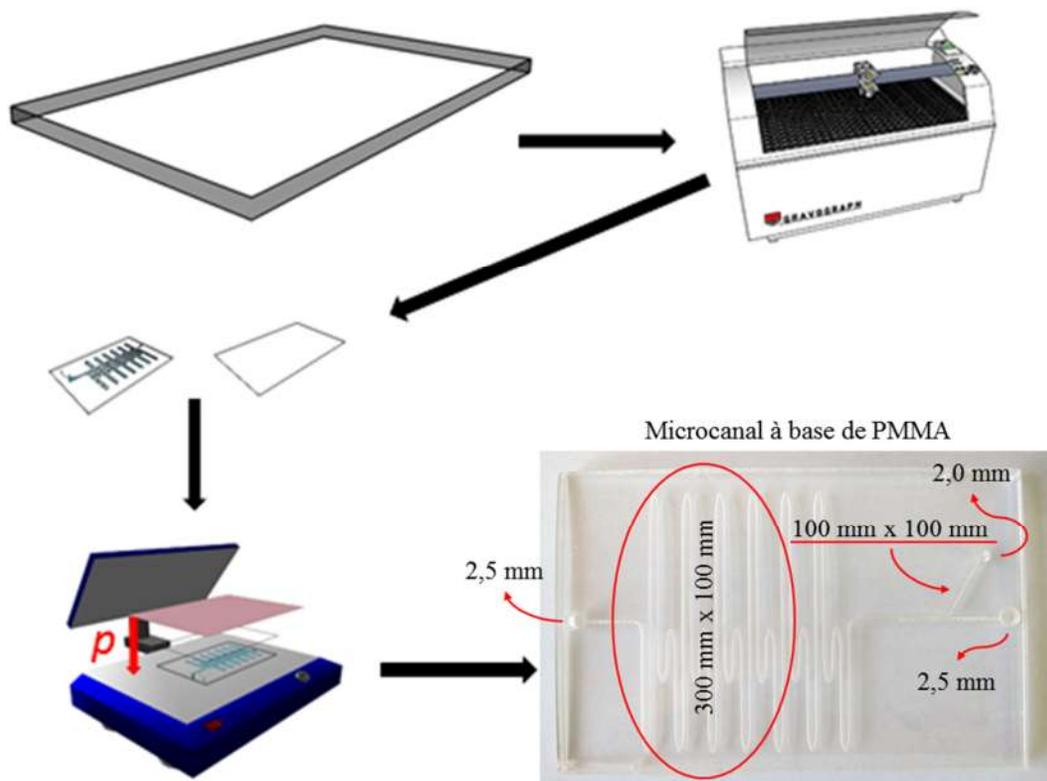
Figura 25: Desenho de uma disposição de microcanais desenhadas no software Corel Draw.



Fonte: arquivo pessoal

Os microcanais principais foram construídos com dimensões fixas de 300 μm de largura e 100 μm de profundidade. Estudos para avaliação do efeito do comprimento na resposta analítica foram realizados e serão discutidos adiante. Os microcanais foram confeccionados em placas de material polimérico com dimensões de 8,5 cm x 5,5 cm x 2,0 mm. A alça de injeção para adaptar o reator em um sistema em fluxo foi feita através de uma confluência do canal principal com um outro canal tangencial, com dimensões de 10,0 μm de largura e 20,0 μm de profundidade. Tal configuração foi tomada de forma a tentar aumentar a resistência nesse ponto do sistema e diminuir a possibilidade de uma queda abrupta na taxa de vazão na célula de detecção. Após a impressão dos microcanais, a placa de PMMA era cortada para obtenção das conexões de tubulações externas e do “chip” propriamente dito. Em seguida, o mesmo era lavado com água deionizada, seca sob um fluxo de ar e, em seguida, selada termicamente sob uma outra placa de PMMA de igual dimensão. O processo de selagem foi feito usando uma prensa térmica Ferragini modelo HT3020 (São Paulo, Brasil) operada a 110 ° C sob 590 kPa durante 30 minutos. Uma placa de silicone foi colocada entre a chapa em aquecimento e a placa de PMMA para evitar a condução direta de calor entre as mesmas. Uma imagem do microcanal em PMMA, após a selagem contendo as dimensões envolvidas nos microdispositivos confeccionados, além de uma esquematização da construção do mesmo, é mostrada na Figura 26.

Figura 26: Esquema utilizado para a construção dos microcanais sob uma base de PMMA. A figura apresenta uma representação de a) uma placa de PMMA íntegra, b) da etapa de corte, c) os microcanais e sua cobertura, d) do processo de selagem e e) apresentação final do microdispositivo apresentando as dimensões obtidas. Para fins didáticos, as figuras estão representadas fora da escala real.

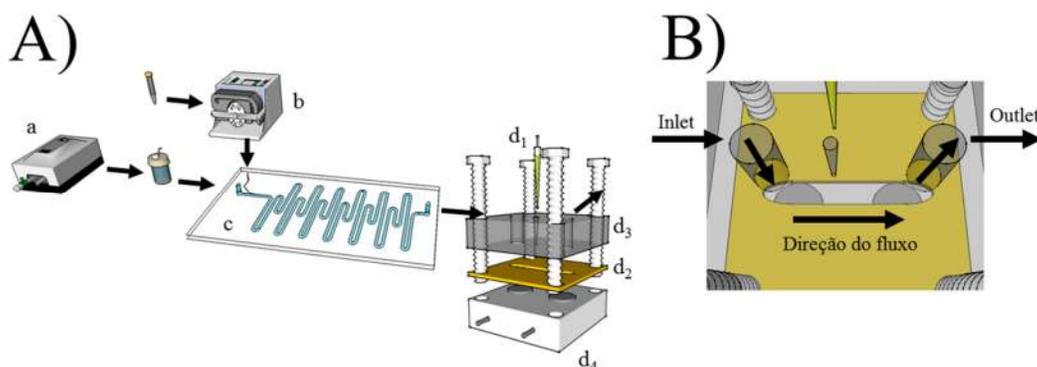


Fonte: arquivo pessoal

Ao longo deste estudo um sistema em fluxo empregando detecção amperométrica foi utilizado. Os principais constituintes aplicados para estas medições estão apresentados na Figura 27. De forma geral, o sistema em fluxo era constituído por dois sistemas de propulsão distintos: uma bomba de aquário (a) foi utilizada para propulsar pneumáticamente o eletrólito suporte, e uma bomba peristáltica programável Reglo MS digital (Ismatec, Suíça) (b) foi utilizada para introduzir volumes reprodutíveis de amostra no microcanal. Essa bomba peristáltica trabalha através da injeção de um volume definido em função da vazão da mesma. As injeções de amostras pela bomba peristáltica foram feitas utilizando tubos Tygon® com 0,3 mm de diâmetro interno. Um regulador de pressão, situado entre o reservatório de eletrólito e a bomba pneumática, permitia o controle da taxa de fluxo dos microcanais até o detector. As medições eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato μ -Autolab Tipo III (EcoChemie, Holanda) com um sistema de três elétrodos (d), funcionando no modo cronoamperométrico. Um eletrodo comercial duplo de platina (d_4) e um eletrodo miniaturizado de Ag/AgCl (sat KCl)

(confeccionado a partir de uma microponteira) (d_1) foram empregados como eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência, respectivamente. As medições amperométricas foram realizadas aplicando um potencial de +0,60 V vs. Ag/AgCl (sat KCl). Uma fina folha de polipropileno (200 μm de espessura - d_2) foi utilizada como espaçador para delimitar a área da célula eletroquímica. A vedação da célula foi realizada por meio de uma tampa de PMMA (d_3), a qual foi fixada por meio de quatro parafusos, cada um em uma extremidade da estrutura. Além disso, três buracos foram perfurados nessa tampa superior, onde dois deles foram usados como entrada e saída da solução de fluxo, e o terceiro furo, feito exatamente em frente do eletrodo de trabalho, serviu como base para o eletrodo de referência.

Figura 27: Configuração do sistema de fluxo aplicado em A): a) bomba de aquário; b) bomba peristáltica programável; c) microrreator; d) célula eletroquímica (d_4 - elétrodo comercial duplo de platina, d_2 - espaçador de polipropileno, d_3 - bloco de PMMA contendo as conexões de entrada e saída de fluxo, além da conexão do eletrodo de referência e d_1 - eletrodo miniaturizado de Ag/AgCl (sat KCl)). Em B) é apresentado um esquema ampliado da célula eletroquímica de detecção. Para fins didáticos, as figuras estão representadas fora da escala real.

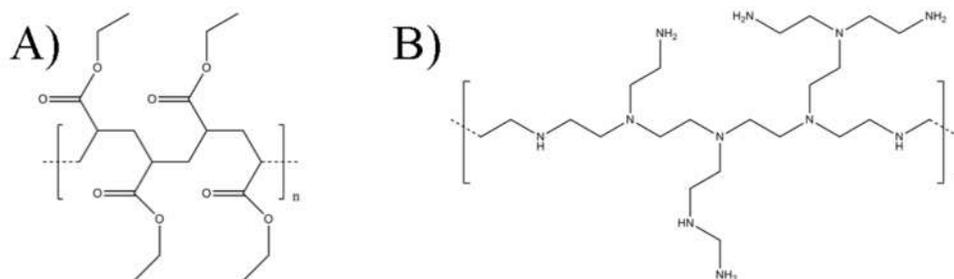


Fonte: arquivo pessoal

Os dados eletroquímicos foram adquiridos por meio do software GPES (EcoChemie, Holanda), sendo os mesmos posteriormente tratados com o software Origin 9.0.0 (OriginLab Corporation, EUA).

Nesse trabalho dois materiais poliméricos foram utilizados como base para o desenvolvimento dos microcanais sendo eles o PMMA e PEI. As estruturas poliméricas desses polímeros são apresentadas na Figura 28.

Figura 28: Estrutura dos polímeros empregados nesse estudo. A) PMMA (polimetilmetacrilato) e B) PEI (polietilenoimina).



Fonte: arquivo pessoal

A fim de caracterizar e validar algumas das metodologias propostas alguns equipamentos adicionais foram empregados. Um microscópio Modelo GP-KR222 (Panasonic, Japão) foi usado para fazer imagens das superfícies de microcanais, tal como para verificar o sucesso dos processos de imobilização. Adicionalmente, um espectrofotômetro 600 Plus (Femto, Brasil) utilizando uma célula de quartzo com um 1,00 cm de caminho óptico foi empregado para a realização de medidas espectrofométricas, a fim de validar algumas das metodologias propostas.

As superfícies funcionalizadas foram caracterizadas por medições com espectroscopia Raman, realizadas com microscópio confocal modelo Alpha 300R (WITEc, Alemanha) equipados com lasers de Ar, Nd:YAG e He-Ne. Os espectros foram adquiridos com o laser operando com excitação a 1024 nm visando um menor efeito de fluorescência.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.2.1 Modificação dos microcanais

Antes de realizar a imobilização enzimática, foi necessário realizar a funcionalização da base de PMMA, de forma a se obter grupamentos funcionais ativos. É importante ressaltar que todas as reações envolvendo imobilização enzimática foram

realizadas após o processo de selagem, sob condições de fluxo. Este procedimento é vantajoso, uma vez que evita a desnaturação enzimática durante o processo de selagem a quente e, adicionalmente, contribui para tornar o processo mais dinâmico.

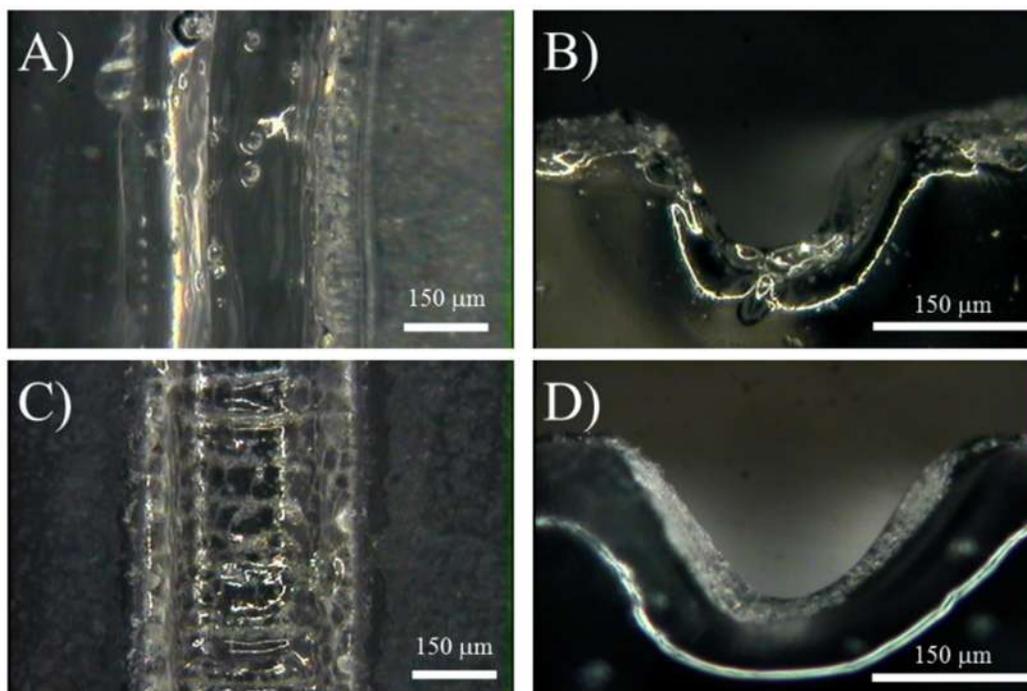
A modificação para os microcanais à base de PMMA foi feita através de um procedimento à base de PEI em meio de DMSO. A escolha por DMSO foi feita devido ao seu caráter aprótico, o que poderia favorecer reações do tipo SN_2 entre a base de PMMA e a PEI, já que é um conhecido catalisador para esse tipo de reação. Tal favorecimento com relação à incorporação de aminas à estrutura do PMMA já foi estudada por Brown *et al.* (Brown *et al.*, 2006). Além disso, outros estudos envolvendo a reação entre ésteres (grupo funcional presente no PMMA) e aminas primárias e secundárias (grupos funcionais presente na PEI), já foram extensamente estudados (Suh *et al.*, 1986; Talvik *et al.*, 1999; Um *et al.*, 2002; Ilieva *et al.*, 2003).

Para realizar a modificação dos microcanais, estes foram inicialmente limpos com isopropanol durante 5 minutos, a fim de remover quaisquer impurezas que poderiam estar aderidas à superfície do canal. Uma solução de PEI 5,0% (m/m) em DMSO foi utilizada para a modificação dos microcanais. Essa concentração de PEI foi adotada já que um excesso de grupos $-NH_2$ em relação à grupos $-COOCH_3$ (ao menos em uma estequiometria 2:1), são necessárias para o processamento da reação (Ilieva *et al.*, 2003). Soluções com concentrações superiores a essa foram evitadas devido à saturação da mesma. Essa solução foi inserida no microreator a um fluxo de $15 \mu L \text{ min}^{-1}$ por 20 min.

Na sequência, o microcanal foi seco, e o excesso de PEI removido sob um fluxo de N_2 . A próxima etapa do tratamento foi feita visando tanto a limpeza dos microcanais quanto a estabilização da PEI modificada na superfície do mesmo (Boeris *et al.*, 2011). Para tal, uma solução de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) foi passada pelo canal por 5 min (sob uma vazão de $150 \mu L \text{ min}^{-1}$).

A Figura 29 mostra as imagens transversais e seccionais de um microcanal antes e após os tratamentos descrito, via fluxo, a fim de evidenciar o efeito sob a superfície do PMMA.

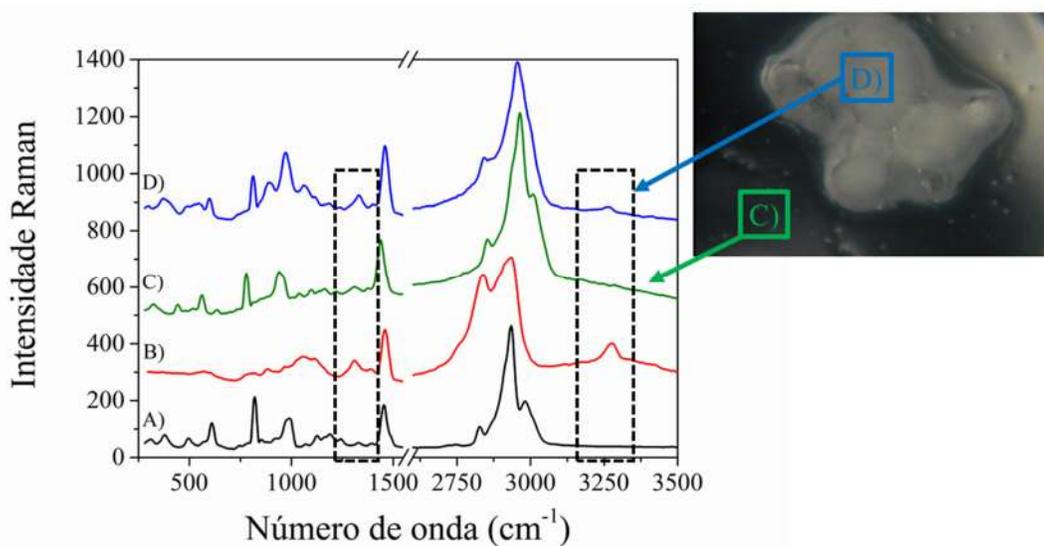
Figura 29: Imagens transversais (B e D) e seccionais (A e C) dos microcanais antes (A e B) e após (C e D) o tratamento com PEI 5% (m/m) em DMSO sob um regime de fluxo contínuo.



Fonte: arquivo pessoal

Como pode ser observado na Figura 29 é nítida a alteração estrutural na superfície do microcanal. Porém, não é possível afirmar apenas em função dessa imagem a incorporação dos sítios $-NH_2$ provenientes da PEI da estrutura polimérica de PMMA. Em cima disso, estudos baseados na espectroscopia Raman foram realizados a fim de provar a incorporação dos grupamentos $-NH_2$. Porém, em uma avaliação inicial não foi possível realizar uma distinção entre os espectros obtidos nas duas etapas do tratamento. Apesar de ser evidente a formação de uma camada de material na superfície do material polimérico, Figura 29-D, não é claro que tal camada seja totalmente proveniente da deposição da PEI. Com base nessa dificuldade inicial, uma avaliação por mapeamento via espectroscopia Raman foi realizada para evidenciar a real modificação estrutural da superfície polimérica com PEI. Espectros de diferentes regiões de uma superfície do canal são mostrados na Figura 30.

Figura 30: Bandas características de um espectro Raman para os constituintes de diferentes etapas do processo de imobilização: A) PMMA puro; B) PEI pura; C-D) PMMA após tratamento com PEI em diferentes regiões do microreator.



Fonte: arquivo pessoal

Na Figura 30-A são observadas bandas típicas de um espectro obtido para uma amostra de PMMA (Matsushita *et al.*, 2000). A modificação da superfície do PMMA com PEI, através do tratamento com DMSO, pode ser confirmada por comparação com o espectro obtido para uma amostra de PEI pura e as bandas associadas aos grupamentos NH_2 presentes na mesma (Figura 30-B). Com relação a essa, uma banda referente a uma deformação vibracional de $-\text{CH}_2$ provenientes de grupos $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ pode ser observada na faixa de $1470\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$ além de um estiramento vibracional de $-\text{NH}_2$ alifático na região de $3450\text{-}3160\text{ cm}^{-1}$, sendo ambas observadas no espectro obtido após a modificação (Figura 30-D). Uma outra característica que merece destaque é o alargamento do sinal observado na região de $\sim 3100\text{ cm}^{-1}$, provavelmente devido à sobreposição das bandas características de PMMA e PEI.

A dificuldade de detecção de sinais característicos de PEI, levando à necessidade de utilização de análises por espectroscopia Raman por varredura, pode ser explicado pela pequena porção de PEI imobilizada no microcanal, levando a geração de bandas características de baixa intensidade, e em apenas alguns pontos espaçados do microcanal, impossibilitando a associação de outras possíveis bandas.

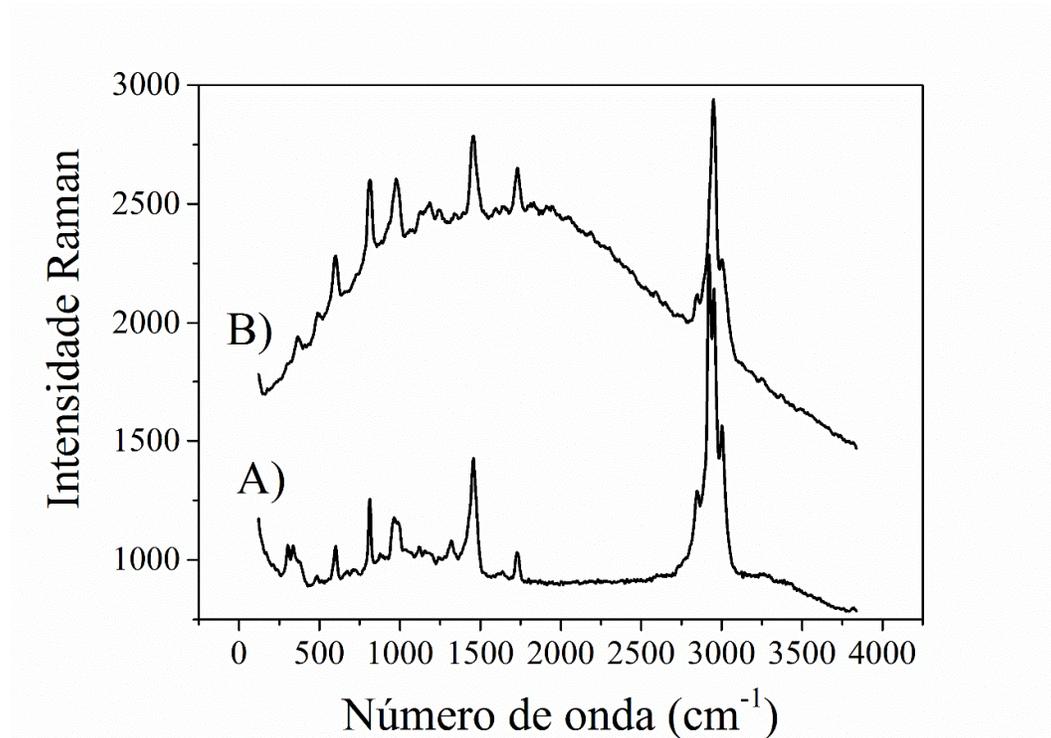
3.2.2 Caracterização das superfícies funcionalizadas após imobilização

Após os tratamentos apresentados nas seções anteriores, todos os reatores foram submetidos ao mesmo processo de imobilização enzimática. Uma mistura recém preparada de enzima e glutaraldeído, em solução tampão fosfato, era introduzida nos microcanais. Por fim, os microcanais foram novamente lavados com solução tampão fosfato (5 min) e secos com N₂.

Uma vez comprovada a funcionalização dos microreatores à base de PMMA com a PEI, estudos visando avaliar a eficácia da imobilização enzimática foram realizados. Para tal, a enzima glicose oxidase foi tomada como teste, já que ela é conhecida uma enzima estável, de bom poder catalítico, além de propiciar testes que facilitariam comprovar sua imobilização.

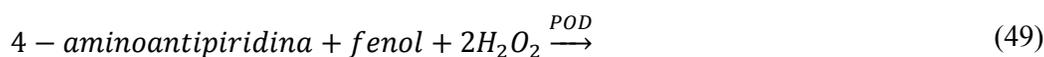
Na Figura 31 são demonstrados espectros Raman para caracterizar o processo de imobilização. Pode ser observado na Figura 31-A as bandas típicas do espectro obtido para uma amostra de PMMA após a modificação com PEI. Após a adição de glutaraldeído, o grande número de ligações $-C=N-$, associada às propriedades reticulares do mesmo (podendo aumentar o efeito dispersivo da radiação), acarretaram em um intenso sinal de fluorescência após a excitação Raman (Figura 31-B). Medidas após a imobilização de GOx acarretaram apenas em um acréscimo na intensidade do sinal de fluorescência observado anteriormente (dados não demonstrados). Esse acréscimo pode ser associado ao grupo cromóforo flavina, pertencente a estrutura do dinucleótido flavina e adenina (FAD), que é responsável pela atividade redox da GOx (Cerqueira Ferreira *et al.*, 2013), ou também pelo incremento das ligações $-C=N-$ (decorrente da reação entre um grupo $-NH_2$ da enzima e um aldeído terminal do glutaraldeído).

Figura 31: Espectros Raman para A) microcanais de PMMA e após o tratamento com PEI (5,0% m/m) em DMSO) e B) após a adição de glutaraldeído (1,0% v/v em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹).



Fonte: arquivo pessoal

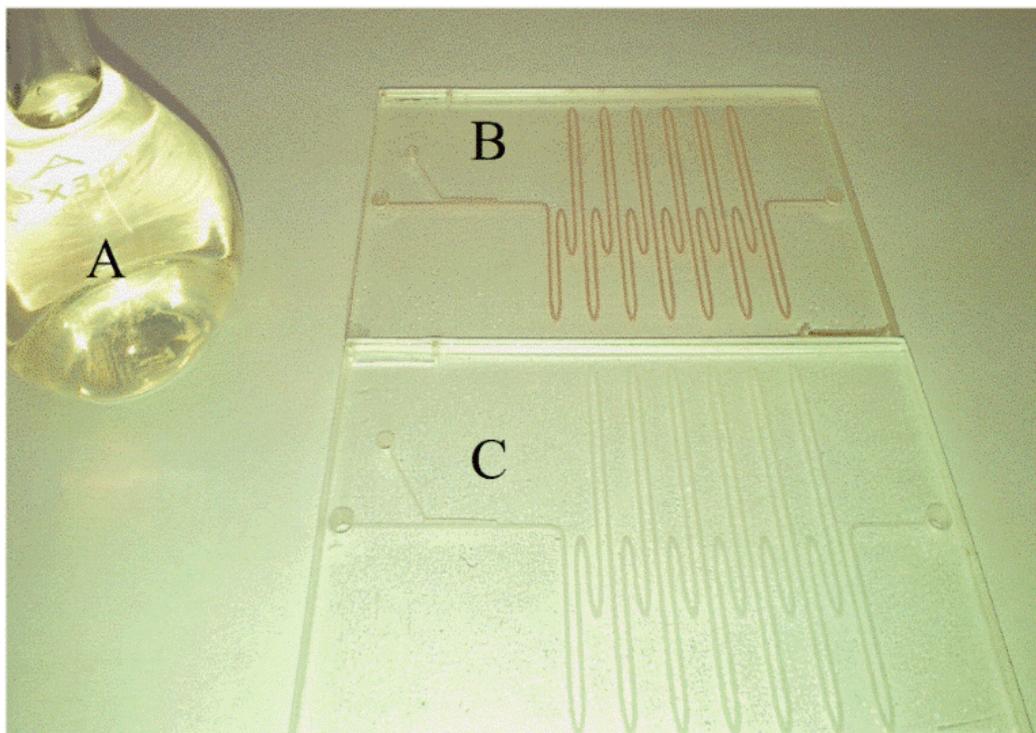
Visando confirmar o processo de imobilização da GOx, um teste colorimétrico baseado na reação de Trinder (Equação 49 (Barham e Trinder, 1972)) foi realizado em um reator após a imobilização com GOx e em outro reator, sob o mesmo processo de imobilização, porém sem GOx imobilizada. A composição da solução utilizada para esse teste foi: 5,0 mmol L⁻¹ fenol; 0,50 mmol L⁻¹ 4-aminoantipirina, 20 U mL⁻¹ de peroxidase e 0,10 mmol L⁻¹ de glicose, em meio de tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹, pH 7,0.



A Figura 32 mostra a diferença de coloração da solução descrita acima (Figura 32-A) da coloração formada no reator contendo GOx (Figura 32-B) após a injeção da

mesma. No reator sem a presença da enzima, após uma hora, nenhuma alteração de cor foi observada (Figura 32-C).

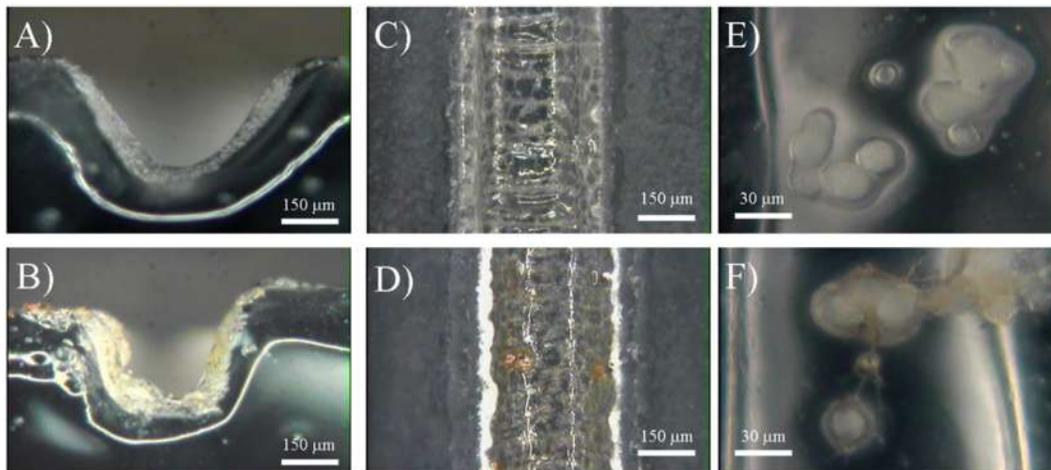
Figura 32: Imagem de um teste colorimétrico realizado para confirmar a imobilização da GOx nos microcanais à base de PMMA. Foi utilizada a solução (A) descrita na seção 2.2. São observados microcanais com a enzima imobilizada (B) e sem a mesma imobilizada (C).



Fonte: arquivo pessoal

Além da caracterização por espectroscopia Raman e do teste colorimétrico, ambos realizados para confirmar a presença da enzima imobilizada nos microcanais, imagens dos mesmos (transversais e seccionais) foram tomadas de forma a demonstrar a estrutura interna dos microcanais antes e após o processo de imobilização (Figura 33). É possível observar nessas imagens a aglutinação de material na superfície do canal, provavelmente decorrente da rápida reação entre a superfície funcionalizada com PEI e o glutaraldeído.

Figura 33: Imagens de seções transversais (em A) e B)) e seccionais (em C) e D)) de microreatores antes e após o tratamento enzimático, respectivamente. Em E) e F) são mostradas imagens ampliadas das seções seccionais mostradas em C) e D).



Fonte: arquivo pessoal

3.2.3 Avaliação do desempenho analítico dos microreatores construídos

Uma vez comprovada a capacidade dos microreatores confeccionados para imobilização da enzima GOx, o desempenho analítico dos mesmos, visando sua aplicação como microreatores, foi avaliado. Parâmetros como comprimento do percurso analítico, volume injetado, vazão, estabilidade do reator, além de parâmetros associados ao desempenho analítico (limites de detecção e quantificação e repetibilidade), assim como características cinéticas das enzimas imobilizadas (K_m e V_{max}), foram avaliados. Para tal, a enzima GOx foi utilizada como parâmetro para otimização das condições de estudo.

3.2.3.1 Estudo de construção dos microcanais

O desempenho de um sistema em fluxo convencional está diretamente atribuído às características adotadas no seu processo de construção, já que são essas que vão afetar a intensidade de dispersão da amostra no sistema. A dispersão por sua vez, está

diretamente associada a parâmetros importantes como: sensibilidade, cinética química, mistura, dentre outras.

O coeficiente de dispersão (D) está associado à diluição inerente ao volume injetado no fluxo carreador e é definido por:

$$D = C_0/C_i = I_0/I_i \quad (50)$$

, onde D é o coeficiente de dispersão, C_0 é a concentração em volume infinito, C_i é a concentração após diluição no fluxo carreador e I_0 e I_i são os sinais associados a cada uma dessas concentrações.

Segundo Poppe (Poppe, 1980), o alargamento médio de sinais em sistemas FIA, e logo sua dispersão no fluxo carreador, pode ser calculada pela soma das variâncias das contribuições individuais da injeção, transporte e detecção:

$$\delta_{Total}^2 = \delta_{injeção}^2 + \delta_{transporte}^2 + \delta_{detecção}^2 \quad (51)$$

Podendo ainda ser expressa em função das características inerentes do sistema em fluxo empregado, ficando:

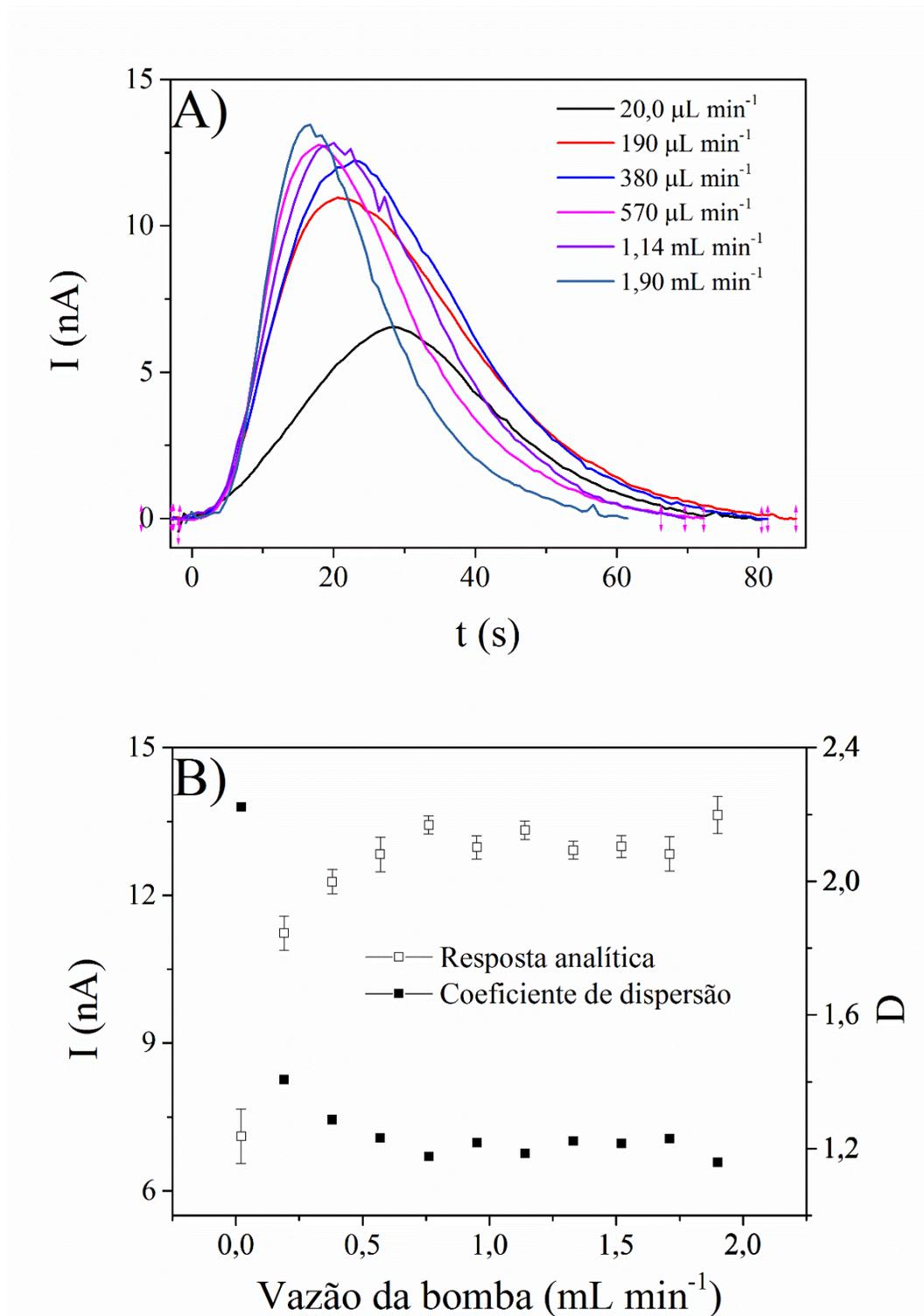
$$\delta_{Total}^2 = k_1 S_V + k_2 L + k_3 V_{célula} \quad (52)$$

, onde S_V é o volume de amostra injetado, L é o comprimento do percurso analítico e V_{cell} o volume da célula de detecção

Dessa forma pode ser percebido claramente a influência que cada um desses parâmetros terá sobre o sinal analítico obtido. Nesse estudo, apenas as condições associadas à injeção e transporte foram estudadas, visto que a mesma célula analítica foi utilizada para os estudos, variando apenas conforme a técnica de detecção utilizada. Um outro ponto importante de se destacar é que, como no presente estudo o processo de transporte está diretamente relacionado às reações enzimáticas estudadas, esse foi avaliado apenas para microreatores após o processo de imobilização, tomando sempre a GOx como enzima padrão.

Pela Equação 51 pode ser observado que a injeção está diretamente relacionada ao alargamento do sinal analítico detectado. Como já citado anteriormente, nesse estudo uma bomba peristáltica temporizada foi utilizada para as injeções. Tal bomba permite a injeção de volumes definidos em função da vazão empregada na mesma, sendo que maiores tempos de injeção serão necessários para menores vazões. Sendo assim, além do volume de amostra injetado (Equação 52), o efeito da vazão da bomba peristáltica também terá uma influência direta no processo de dispersão do analito injetado. Um estudo mostrando o efeito desse parâmetro sobre a resposta analítica de uma solução padrão $0,100 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (em $\text{KCl } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$) foi realizado, em um microcanal não imobilizado, e é apresentado na Figura 34.

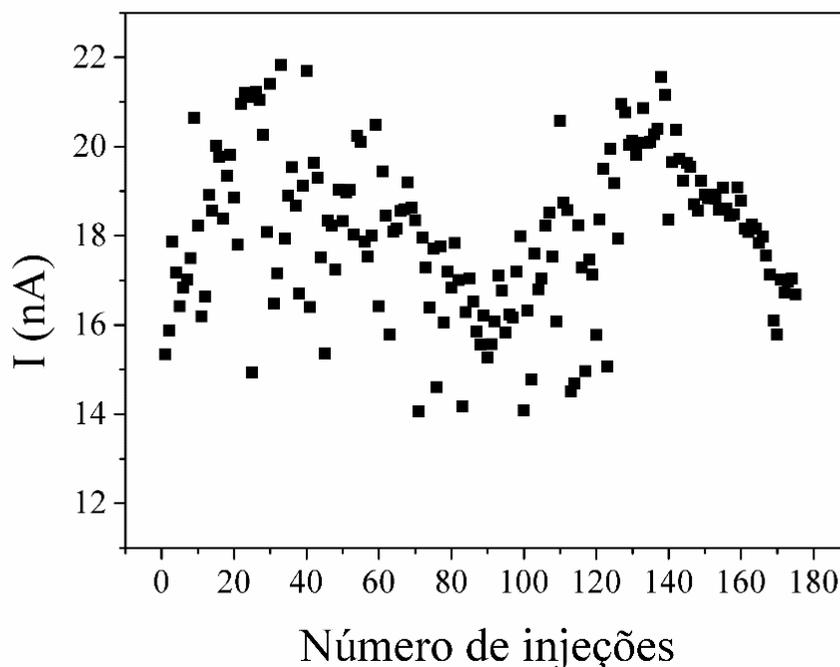
Figura 34: A) Efeito da vazão da bomba sobre o sinal analítico obtido para uma solução $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $\text{KCl } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$ e B) influência da mesma sobre a dispersão no sistema. Célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em $+400\text{mV}$), eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão do fluxo carreador = $200 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$. Volume injetado = $10,0 \text{ } \mu\text{L}$.



Fonte: arquivo pessoal

Como pode ser observado na Figura 34, o efeito da rotação da bomba afeta diretamente o processo de dispersão da amostra, sendo que menores vazões acarretaram em uma maior dispersão (até $\sim 600 \mu\text{L min}^{-1}$). Para vazões maiores é possível observar que os valores de dispersão se encontram dentro de um valor médio, apesar da aparente variância. Tal variância pode ser explicado pela forma de operação das bombas peristálticas. A mesma se baseia na alternância de compressões e relaxamentos do tubo de injeção, puxando o conteúdo para fora do mesmo. Um rolo giratório passa pelo tubo, comprimindo-o totalmente e gerando uma vedação entre o lado de sucção e o lado de descarga da bomba. Na restituição do tubo, forma-se um vácuo forte, que puxa o produto para a bomba e elimina o restante em direção ao microcanal. A variação da posição do rolo giratório durante o processo de injeção pode explicar a variância associada ao processo de injeção. Tal fato pode ser mais claramente observado na Figura 35. Nela diversas injeções sequenciais de uma solução padrão $0,100 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (em $\text{KCl } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$) foram realizadas. Aqui, a variância do método de injeção pode ser mais claramente observada, com valores de desvio padrão relativo de aproximadamente 18,0%. No entanto, deve ser destacado que para a operação do sistema desenvolvido, era necessária a total eliminação da solução presente no tubo de injeção, com consequente preenchimento com a próxima solução. Tal operação torna a posição do rolo giratório aleatória em relação ao tubo de injeção, minimizando a influência desse tipo de erro sistemático.

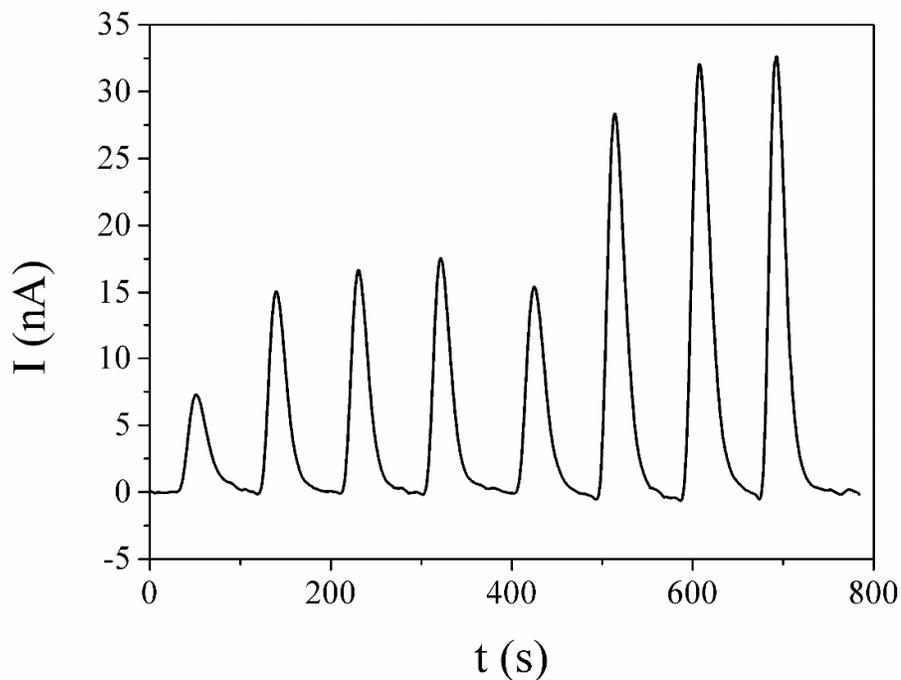
Figura 35: Injeções consecutivas de uma solução $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $\text{KCl } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$. Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em $+400\text{mV}$), eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão = $200 \mu\text{L min}^{-1}$. Vazão da bomba de injeção = $1,90 \text{ mL min}^{-1}$. Comprimento do percurso analítico = $61,5 \text{ cm}$.



Fonte: arquivo pessoal

Como forma de esclarecimento, é importante destacar que no sistema em estudo a injeção da amostra é feita sem interrupção do fluxo carreador, em um canal tangencial ao mesmo, sobre um volume pré-definido, diferenciando então dos sistemas em fluxo convencionais. Tal adequação acaba gerando um efeito adverso durante o processo de injeção, visto que a primeira injeção é realizada contendo uma porção do analito e do eletrólito carreador que preenche o canal de injeção durante a troca de soluções. Por conta disso, uma redução no sinal da primeira injeção realizada é observada visto que, como já citado anteriormente, uma remoção completa da solução do tubo de injeção é necessária para um conseguinte preenchimento com a nova solução. Esse aspecto é demonstrado na Figura 36. Cabe aqui ressaltar que, apenas para exposição dos dados, os primeiros sinais obtidos foram removidos em todos os diagramas desse estudo.

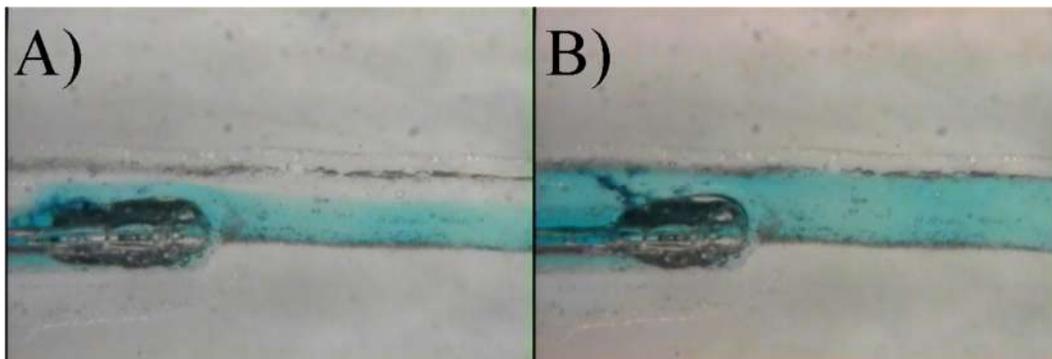
Figura 36: Influência da diluição no canal de injeção sobre a resposta analítica para uma solução $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $\text{KCl } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$. Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em $+400\text{mV}$), eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão = $200 \mu\text{L min}^{-1}$. Vazão da bomba de injeção = $1,90 \text{ mL min}^{-1}$. Comprimento do percurso analítico = $61,5 \text{ cm}$.



Fonte: arquivo pessoal

A relação entre a vazão da bomba, e logo o tempo de injeção, e a dispersão do analito no sistema já era esperada de ser observada. Essa variação na dispersão está associada ao processo de dispersão longitudinal do analito injetado, sendo que em menores vazões esse processo é mais pronunciado do que para vazões maiores, onde tornasse desprezível. Para uma melhor visualização desse fenômeno, imagens de uma solução $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de azul de metileno sob vazões de $20 \mu\text{L min}^{-1}$ e $1,90 \text{ mL min}^{-1}$ foram realizadas (Figura 37).

Figura 37: Efeito da vazão da bomba sobre a dispersão longitudinal do analito injetado. Vazões de A) $20,0\mu\text{L min}^{-1}$ e B) $1,90\text{ mL min}^{-1}$, respectivamente.

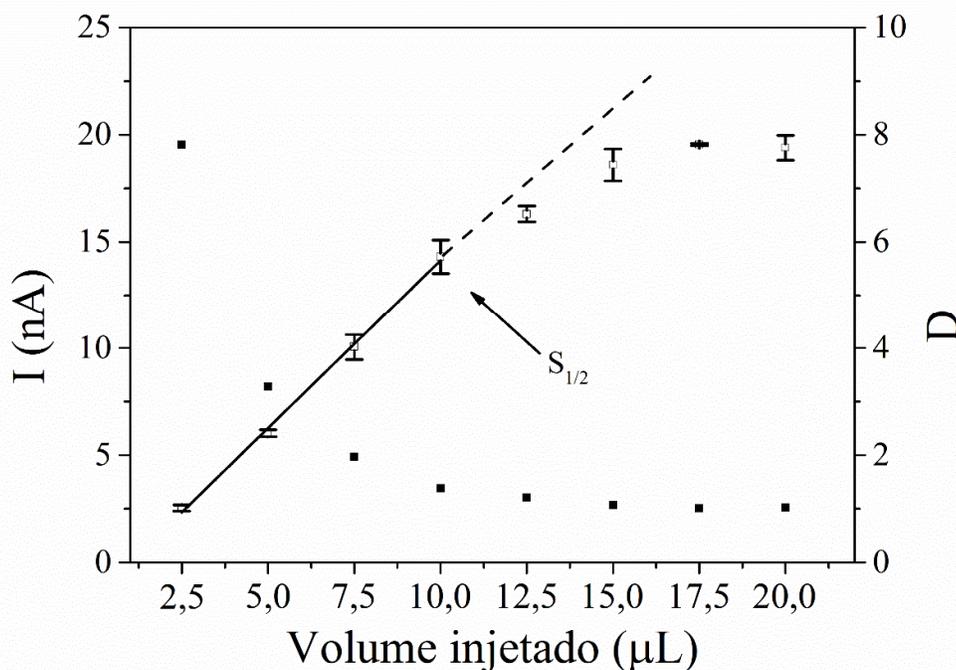


Fonte: arquivo pessoal

Como pode ser observado, para baixas vazões o analito é injetado progressivamente no microcanal, enquanto que para vazões mais elevadas o mesmo é injetado integralmente, imediatamente após a injeção, tornando a dispersão longitudinal desprezível. Visto isso e, como forma de evitar possíveis interferências da dispersão longitudinal no estudo de volume de injeção, a máxima vazão da bomba ($\sim 1,90\text{ mL min}^{-1}$) foi adotada para todos os seguintes estudos.

Visto o efeito gerado pela vazão da bomba sobre a injeção da amostra, um estudo de diferentes volumes injetados foi feito visando a obtenção de uma menor dispersão nos microreatores. Na Figura 38 são mostrados os sinais provenientes da injeção de diferentes volumes de uma solução $0,100\text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $0,100\text{ mol L}^{-1}$ de KCl , além da relação destes com o coeficiente de dispersão (D).

Figura 38: Efeito do volume de amostra injetado sobre o sinal analítico detectado e a dispersão no sistema para uma solução $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $\text{KCl } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$. Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em $+400\text{mV}$), eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão = $200 \mu\text{L min}^{-1}$. Vazão da bomba de injeção = $1,90 \text{ mL min}^{-1}$. Comprimento do percurso analítico = $61,5 \text{ cm}$.

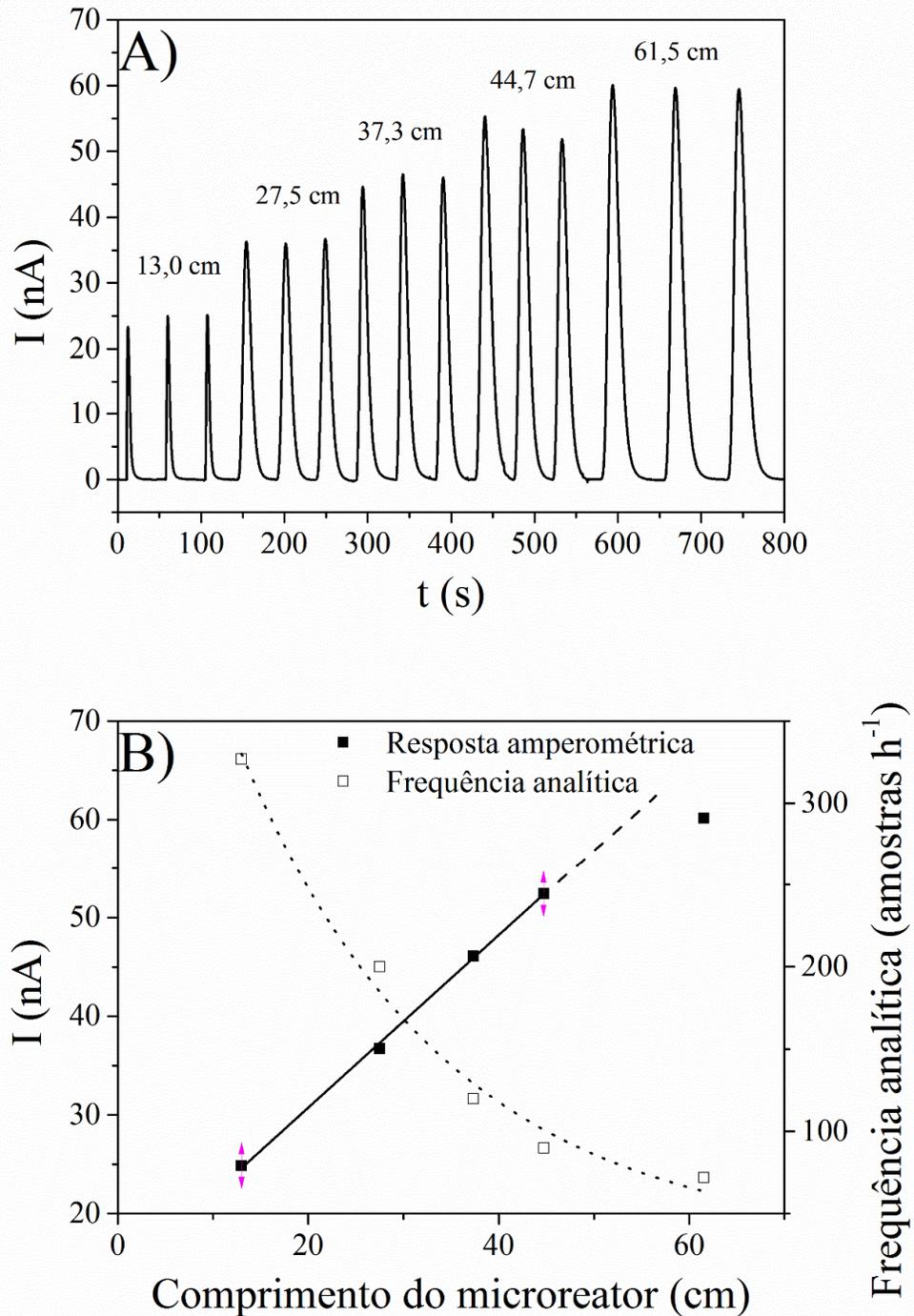


Fonte: arquivo pessoal

Como visto na Equação 50 o coeficiente de dispersão pode ser determinado pela razão dos sinais analíticos à volume infinito e após a dispersão no fluxo carreador. A determinação da concentração em volume infinito é feita através do completo preenchimento do percurso analítico com solução do analito, garantindo que nenhuma diluição ocorra por parte do fluxo carreador e, logo, gerando uma situação de estado estacionário no detector. Dessa forma, os valores de dispersão provenientes de cada volume injetado foram calculados. Observa-se pelo gráfico que o valor de $S_{1/2}$ (definido como o volume de amostra necessário para a obtenção de um sinal à metade da condição de estado estacionário, $D = 2$) foi obtido para um valor próximo de $10,0 \mu\text{L}$ ($D = 1,94$), sendo que o incremento do volume injetado acarreta em um desvio da linearidade (Guebeli *et al.*, 1991). Tal valor de volume de injeção ($10,0 \mu\text{L}$) foi tomado para todos os consequentes estudos. Dessa forma, todas as concentrações injetadas visando a construção de curvas analíticas tiveram seus valores corrigidos por um fator de diluição de 1,94.

Com relação à dimensão dos microcanais utilizados, apenas o comprimento do percurso analítico foi avaliado nesse estudo. Dessa forma, para todos os testes realizados, microreatores de 100 μm de profundidade e 300 μm de largura foram utilizados. Uma vez que o comprimento do percurso analítico terá efeito tanto no processo de dispersão (Equação 52), quanto na eficiência da conversão enzimática (já que mais enzima acarretará em mais produto detectável), esse estudo foi realizado usando microreatores já imobilizados com a enzima GOx. Canais com diâmetros menores que os citados foram evitados devido a constantes problemas com entupimento dos mesmos após o processo de imobilização enzimática. Na Figura 39-A é apresentado o perfil dos sinais analíticos em função do comprimento do percurso analítico, obtidos para um padrão de glicose 0,100 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,100 mol L^{-1} (pH 7,00), enquanto que na Figura 39-B é mostrada uma relação entre a resposta analítica obtida e a frequência analítica do sistema.

Figura 39: A) Efeito do comprimento do percurso analítico sobre a resposta amperométrica e B) sobre a frequência analítica do sistema, para uma solução $0,100 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose em tampão fosfato $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,00). Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em $+600\text{mV}$), eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão = $200 \mu\text{L min}^{-1}$. Vazão da bomba de injeção = $1,90 \text{ mL min}^{-1}$. Volume injetado = $10,0 \mu\text{L}$.



Fonte: arquivo pessoal

De acordo com a figura acima, pode ser verificado um crescimento linear do sinal analítico entre os comprimentos de 13 a 44,7 cm, sendo que após esse ponto um desvio da linearidade é observado. Para sistemas FIA convencionais, onde não ocorre interação direta entre a composição do canal analítico e o volume de amostra, é esperado que um aumento do percurso analítico acarrete em uma diminuição do sinal, além de um alargamento do mesmo, devido à maior dispersão do volume de amostra no fluxo carreador. No caso em questão, o crescimento do sinal analítico se dá devido ao maior número de sítios de enzima imobilizadas no canal, gerando um maior número de produto detectável. Porém, o aumento do efeito dispersivo sobre o volume de amostra injetado também deve ser levado em consideração. Possivelmente, é justamente esse fato que contribui para o desvio da linearidade observado para reatores com 61,5 cm de comprimento, onde começa a ser observada uma competição entre a dispersão da amostra e o maior número de produto detectável formado.

Associada à dispersão, a frequência analítica também se torna um parâmetro analítico bem interessante de ser analisado. Por definição, a frequência analítica pode ser definida pela equação:

$$f = 3600 / t_{limpeza} \quad (53)$$

, onde f é a frequência analítica e $t_{limpeza}$ é o tempo necessário para que o sinal gerado decresça a 95% de seu valor máximo.

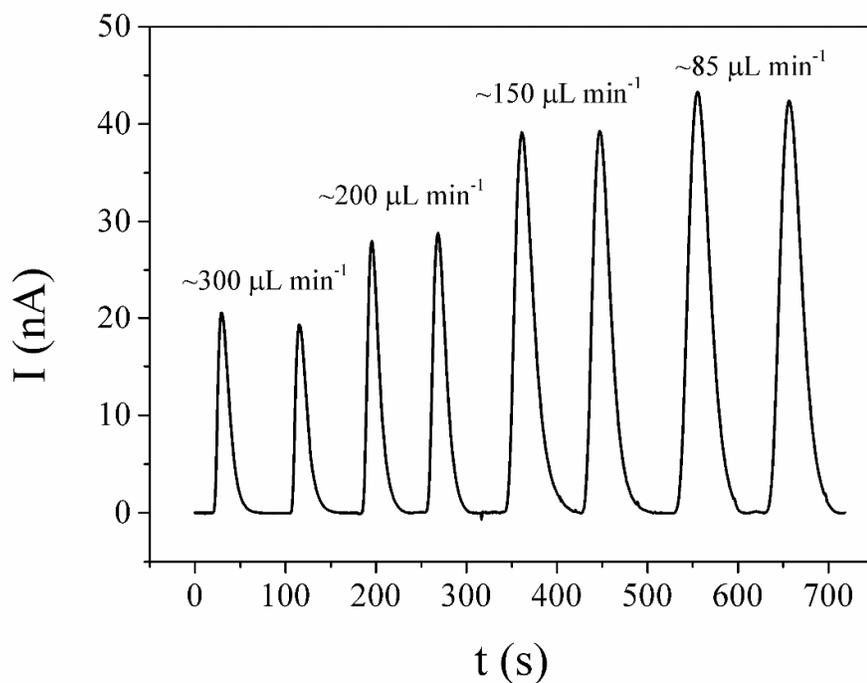
Segundo a Figura 39-B, pode ser observado um decréscimo na frequência analítica com o aumento do percurso analítico, fator esse diretamente associado ao incremento do processo dispersivo no sistema.

Mesmo mostrando evidências de apresentar um significativo incremento no processo dispersivo (ocasionando uma diminuição na frequência analítica), o comprimento de 61,5 cm ($V_{interno} \sim 25\mu\text{L}$) foi adotado como base para a confecção dos conseguintes microreatores almejando sempre uma maior sensibilidade dos dispositivos confeccionados.

Outro fator importante que pode acarretar diretamente em alteração no sinal analítico é a vazão do fluxo carreador. Em sistemas de fluxo convencionais (sem reações

envolvidas) a taxa de vazão do fluxo carreador afeta infimamente o valor do sinal analítico detectado, influenciando apenas a frequência analítica do sistema. Porém, quando se trata de sistemas que envolvem reações com velocidades cinéticas de média a lenta, tal fator se torna crucial para um bom desempenho do processo em estudo. Dessa forma, espera-se que uma diminuição da taxa de fluxo, acarrete em uma maior geração de produto por meio da reação enzimática e, por consequência, um aumento do sinal analítico. O efeito desse parâmetro sobre a resposta analítica é mostrado na Figura 40. Cabe aqui enfatizar que a resposta analítica mostrada na Figura 40 é proveniente de um microcanal já modificado com *glicose oxidase*.

Figura 40: Efeito da vazão do fluxo carreador sobre a resposta amperométrica para uma solução 0,100 mmol L⁻¹ de glicose em tampão fosfato 0,100 mol L⁻¹ (pH 7,00). Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em +600mV), eletrodo de referência (Ag/AgCl_(sat)) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão da bomba de injeção = 1,90 mL min⁻¹. Volume injetado = 10,0 µL. Comprimento do percurso analítico = 61,5 cm.



Fonte: arquivo pessoal

Como pode ser observado, o decréscimo da taxa de fluxo afeta diretamente a cinética enzimática, acarretando em um aumento do sinal analítico. Porém, da mesma forma, tal decréscimo influencia também a frequência analítica, visto o maior tempo de residência da amostra. Dessa forma, a fim de contemplar tanto uma maior sensibilidade,

como uma maior frequência analítica, vazões em torno de $150 \mu\text{L min}^{-1}$ foram tomadas como base para os estudos.

3.2.4 Avaliação do desempenho dos microreator à base de PMMA

Para os microcanais com base em PMMA, além de um estudo detalhado de imobilização da enzima GOx, foram ainda imobilizadas com sucesso as enzimas AAO, CAT e GDH.

3.2.4.1 *Glicose Oxidase (GOx)*

Uma vez determinadas as condições conformacionais e operacionais do microreator à base de GOx, estudos visando sua possível aplicação para sistemas analíticos foram realizados. Dessa forma, os parâmetros envolvidos na imobilização, nas propriedades cinéticas da enzima imobilizada e em seus consequentes parâmetros analíticos, provenientes da eficiência catalítica da mesma, foram estudados.

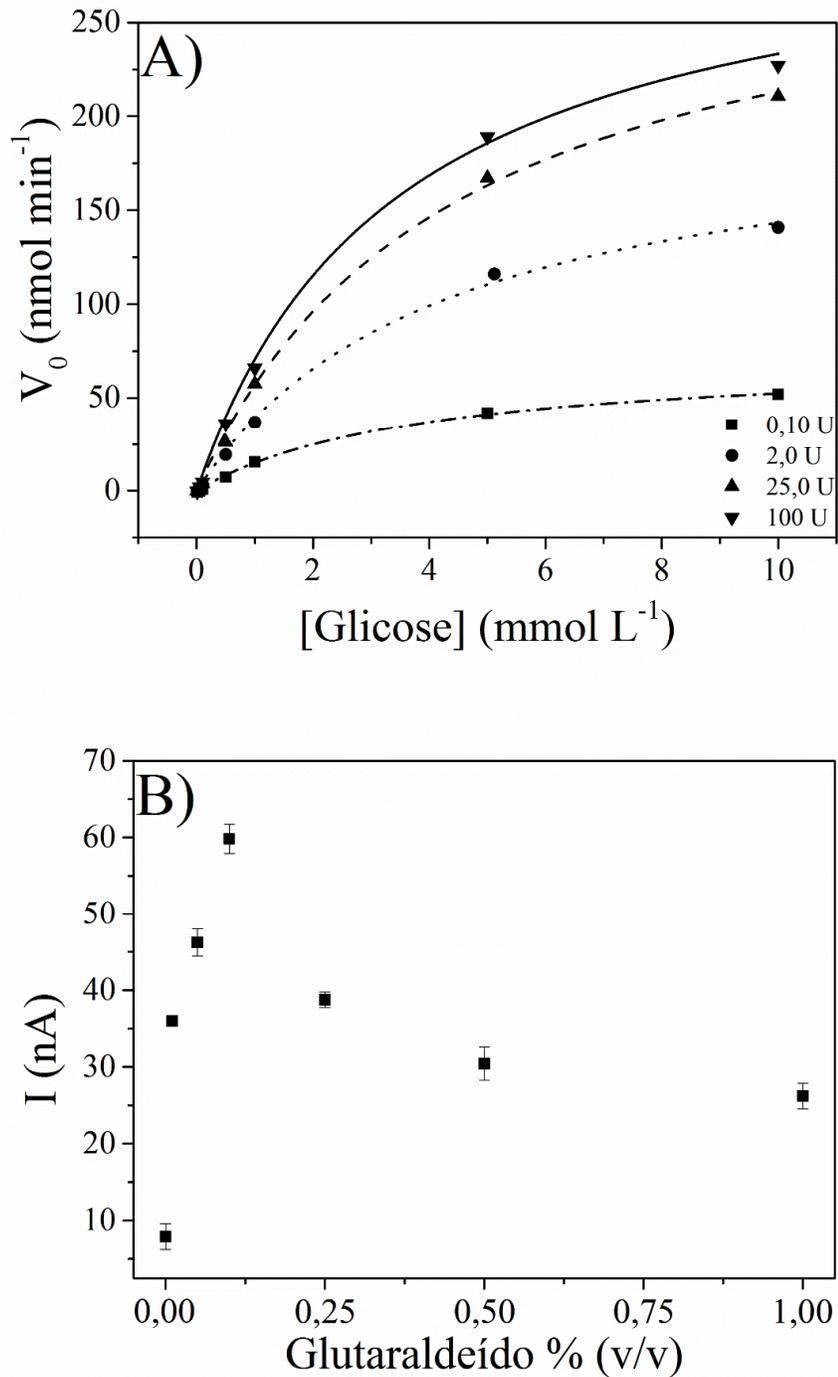
Os primeiros estudos realizados visando a avaliar a potencialidade da enzima imobilizada para aplicações analíticas foram as condições envolvidas na imobilização da mesma, ou seja, a concentração de enzima e glutaraldeído utilizados. Segundo Migneault (Migneault *et al.*, 2004) esses parâmetros são importantes pois são eles que irão regular a quantidade de derivados da enzima insolúveis em água, formados via ligação cruzada na superfície de PMMA-PEI, favorecendo a ligação intermolecular ao invés da intramolecular. Esses estudos foram realizados baseados na detecção amperométrica do H_2O_2 formado pela enzima imobilizada.

Para estabelecer a quantidade ótima de unidades de enzima, experimentos em uma faixa entre 0,10 U e 100 U de GOx (em 5 mL) foram realizados, sendo a concentração de glutaraldeído fixada em 1,0 % (v/v). A Figura 41-A mostra o comportamento de

diferentes microreatores frente a diferentes quantidades de GOx. As velocidades máximas de reação (definida mais a frente como V_{\max}) calculadas para cada microreator foram de 313,6, 305,9, 203,9 e 72,2 nmol min^{-1} para 100 U, 25,0 U, 2,00 U e 0,10 U, respectivamente. O pequeno incremento observado para os reatores de 25,0 U para os de 100 U podem ser atribuídos à saturação dos sítios de imobilização na superfície do microreator, podendo também indicar um decréscimo das ligações intermoleculares à uma dada concentração de glutaraldeído. Dessa forma, soluções de 25,0 U de enzima foram adotadas para os demais estudos.

Como dito anteriormente, o efeito da concentração de glutaraldeído também foi avaliado. Uma faixa entre 0,01% (v/v) a 5,0% (v/v) foi avaliada, sempre na presença de GOx (25 U em 5 mL). Foi observado que a resposta analítica aumentou de 0,01% (v/v) a 0,10% (v/v) de glutaraldeído, e decresceu para valores maiores (Figura 41-B). Esse comportamento já foi descrito anteriormente por Chui e Wan (Chui e Wan), onde tal decréscimo foi atribuído ao fato de que um excesso de agentes de ligação cruzada na superfície da enzima podem resultar em uma distorção na sua estrutura (i.e., a conformação do sítio ativo). Com essa distorção, o acesso e acomodação do substrato pode se tornar mais difícil, suprimindo a atividade catalítica (Migneault *et al.*). Para valores de concentração mais elevados (>2,0% v/v) os microreatores entupiram, tornando impossível qualquer avaliação dos mesmos.

Figura 41: (A) Perfil das curvas de Michaelis-Menten para diferentes unidades de GOx no microreator (imobilização feita em meio de glutaraldeído 1,0% (v/v)). (B) Influência da concentração de glutaraldeído na bioconversão enzimática (imobilização feita para 25,0 U de GOx). Composição da célula eletroquímica: eletrodo de trabalho (Pt com potencial em +600mV), eletrodo de referência (Ag/AgCl_(sat)) e eletrodo auxiliar (Pt). Vazão do carreador (tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹, pH 7,0) = 150 μL min⁻¹. Vazão da bomba de injeção = 1,90 mL min⁻¹. Volume injetado = 10,0 μL. Comprimento do percurso analítico = 61,5 cm.



A eficiência catalítica de um substrato (S) e um co-substrato (O_2), por meio de uma enzima da classe oxidase (E) contendo FAD como grupo prostético, para produzir um produto (P) pode ser descrita segundo as reações abaixo (O'Neill *et al.*):



A velocidade de reação geral (V) desses sistemas seguem a relação de Michaelis-Menten e pode ser descrita por (O'Neill *et al.*):

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + K_M(S)/[S] + K_M(O_2)/O_2} \quad (56)$$

, onde V_{\max} é a velocidade de reação máxima do sistema e K_M é definido como a concentração de substrato que fornece um valor de V igual a metade de V_{\max} . Esses valores são conhecidos como os parâmetros de Michaelis-Menten e são uma boa forma de determinar a eficiência de conversão enzimática.

No entanto, se o co-substrato (no caso em questão O_2) estiver em concentração elevada, e constante, em relação ao substrato a equação 8 pode ser escrita como (O'Neill *et al.*):

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + K_M(S)/[S]} \quad (57)$$

A equação 57 descreve a taxa de formação do produto decorrente de uma reação enzimática que obedece os pressupostos descritos acima. No caso do sistema em estudo, à medida que soluções contendo glicose são injetadas no microreator, porções relativas de H_2O_2 são produzidas. Tal formação pode ser então utilizada para prever os parâmetros de Michaelis-Menten associados ao sistema.

A corrente medida no sensor após cada injeção de glicose é diretamente proporcional à concentração de H_2O_2 gerada e segue a equação abaixo:

$$I = k[H_2O_2]_{\text{gerado}} \quad (58)$$

No entanto, quando se trata de sistemas em fluxo, os parâmetros cinéticos do microreator dependem diretamente da vazão do carreador aplicada (afeta diretamente o tempo de reação do substrato com a enzima) já que essa é em geral muito superior ao coeficiente de dispersão do analito em solução. Dessa forma, a velocidade de reação do sistema pode ser descrita por (Laurell *et al.*):

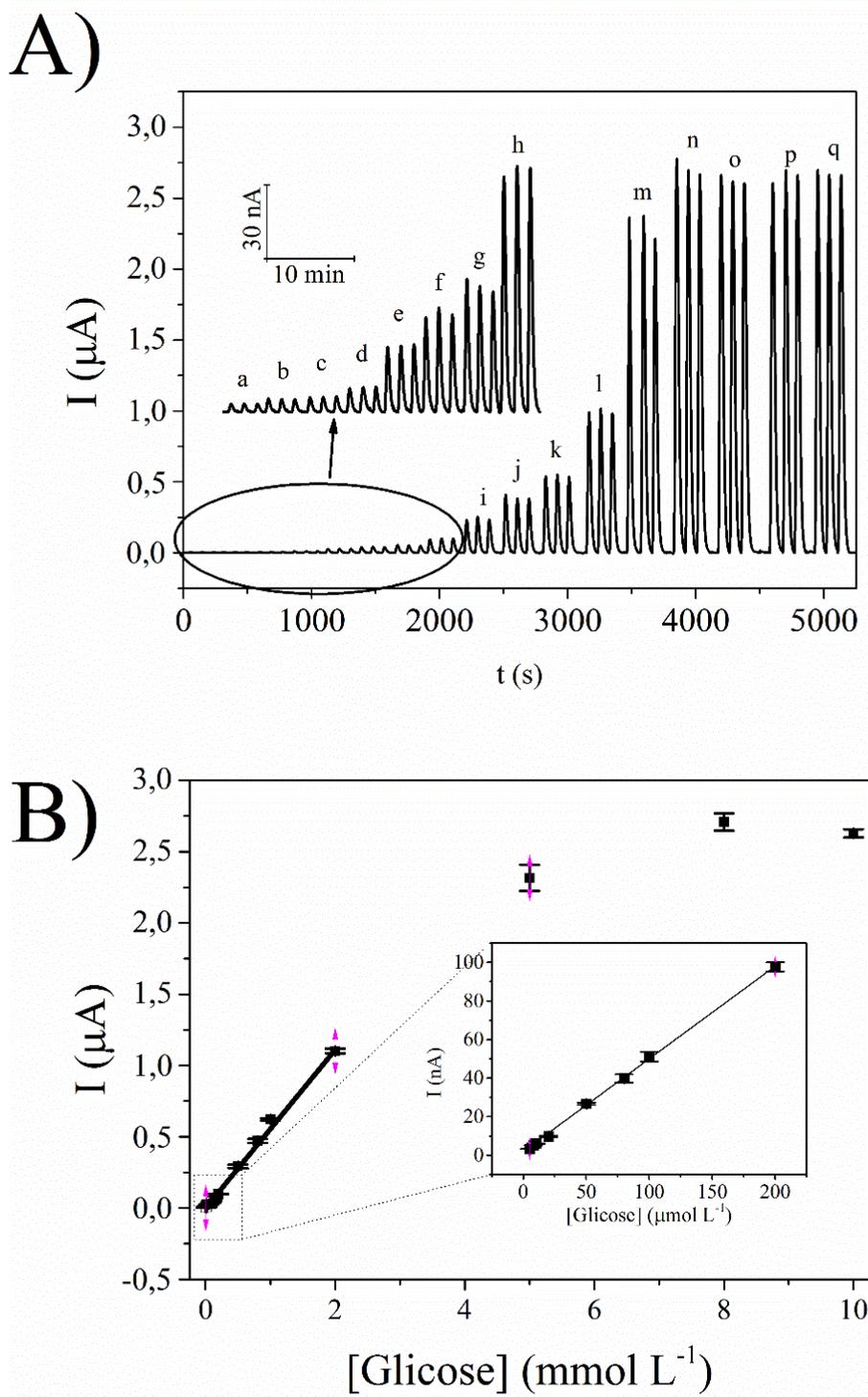
$$V = [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{gerado}} \phi \quad (59)$$

, onde ϕ é a vazão do carreador. Assim, quando as condições de operação são modificadas, seja pela alteração da proporção dos reagentes ou pela alteração da vazão do carreador, a taxa de conversão do reator é alterada (Lasch e Koelsch).

Como a quantidade de H_2O_2 produzida é desconhecida e o termo “k” da Equação 58 é de difícil estimar, uma curva de calibração para o mesmo foi construída com o intuito de quantificar sua produção e, dessa forma estimar os parâmetros cinéticos do microreator à base de GOx. Uma faixa entre $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi utilizada obtendo a seguinte equação de reta: $I (\mu\text{A}) = 0,083(\pm 0,002) + 1,370(\pm 0,031) [\text{H}_2\text{O}_2] (\text{mmol L}^{-1})$, $R^2: 0,995$.

Assim como para o H_2O_2 uma curva de calibração para glicose foi construída de forma a determinar os parâmetros cinéticos e a faixa linear de resposta do microreator desenvolvido. Uma faixa de concentração entre $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi estudada (Figura 42-A). Os sinais obtidos mostraram uma relação linear entre $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$ ($I (\mu\text{A}) = 0,006(\pm 0,003) + 0,502(\pm 0,007) [\text{Glicose}] (\text{mmol L}^{-1})$, $R^2: 0,999$) como é mostrado na Figura 42-B).

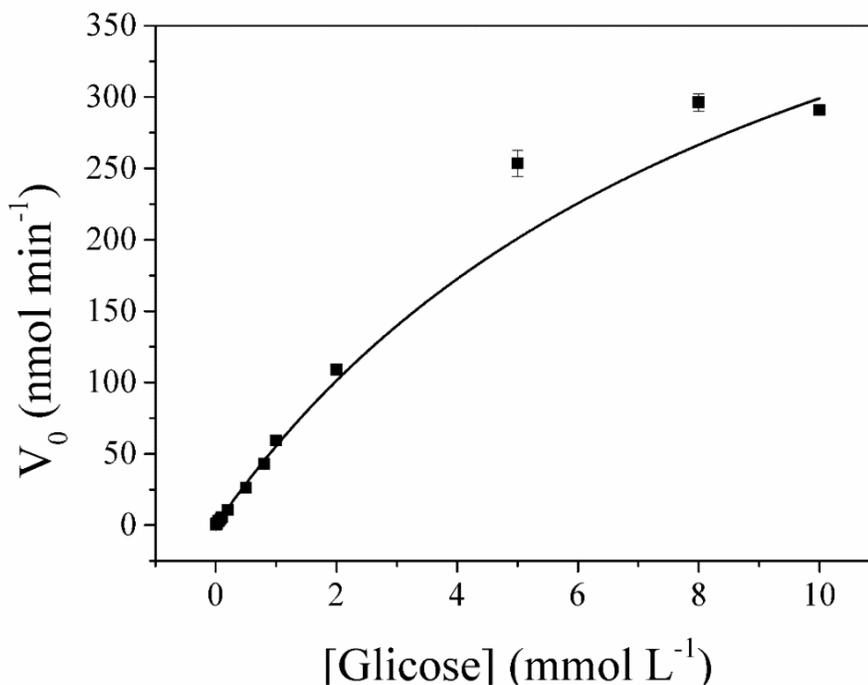
Figura 42: A) Diagrama para a avaliação da linearidade do sistema desenvolvido para a GOx. A concentração de cada padrão se refere a; a: $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$, b: $8,00 \mu\text{mol L}^{-1}$, c: $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, d: $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, e: $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, f: $80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, g: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, h: $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, i: $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, j: $800 \mu\text{mol L}^{-1}$, k: $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$, l: $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$, m: $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$, n: $8,00 \text{ mmol L}^{-1}$ e o: $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose, respectivamente. Em B) pode ser observada a faixa linear na faixa estudada em A). As medidas foram feitas seguindo as condições mostradas na Figura 41.



Fonte: arquivo pessoal

A partir dos valores obtidos para a produção de H_2O_2 (por meio das curvas de calibração para H_2O_2 e glicose) foi possível definir a velocidade de reação, em cada concentração de glicose, em função da vazão do carreador ($150 \mu\text{L min}^{-1}$). Já que valores superiores a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ levaram a valores de corrente constantes (Figuras 43) esses não foram levados em consideração para a avaliação dos parâmetros cinéticos. Prováveis associações que podem ser levadas para o não incremento do sinal analítico para concentração elevadas são a saturação dos sítios enzimáticos no microreator, a competição entre glicose e H_2O_2 pelos sítios eletroativos do eletrodo (já que os padrões de glicose estão altamente concentrados), ou até devido à elevação da viscosidade da solução diminuindo o progresso difusional do analito até o eletrodo. A Figura 43 apresenta a correlação entre as concentrações de glicose e a velocidade de reação para o sistema em estudo.

Figura 43: Regressão de Michaelis-Menten para a taxa de conversão dos padrões de glicose analisados.



Fonte: arquivo pessoal

Os valores de V_{max} e K_M foram calculados utilizando uma regressão quadrática não-linear para se adequar diretamente aos dados experimentais obtidos, com valores iguais a $449 \pm 48 \text{ nmol min}^{-1}$ para V_{max} e $7,79 \pm 0,98 \text{ mmol}$ para K_M . Este valor de K_M está de acordo com o valor obtido para a imobilização aleatória de GOX em PEI (Zhang

et al.), o que mostra a boa estabilidade do microreator desenvolvido, já que baixos valores de K_m mostram que a enzima pode alcançar sua máxima eficiência catalítica para baixas concentrações de substrato. Os microreatores desenvolvidos com GOX mostraram um decréscimo de sinal em torno de 50,0% após duas semanas de uso (~1000 injeções). Durante esse período, o microreator foi utilizado, limpo com solução de tampão fosfato, secos com N_2 e guardados em um refrigerador a 4°C

A atividade da enzima imobilizada frente a glicose foi também avaliada como função da sua eficiência. O'Neill et al. propuseram uma forma de normalizar a resposta de biosensores à base de GOx com relação à sua sensibilidade frente a H_2O_2 , por meio dos coeficientes angulares para as respostas obtidas frente à soluções de H_2O_2 e à produção de H_2O_2 por parte do biosensor. (2008). Os coeficientes angulares de ambas as curvas de calibrações foram utilizados para o cálculo da eficiência de bioconversão do microreator, seguindo a Equação 59:

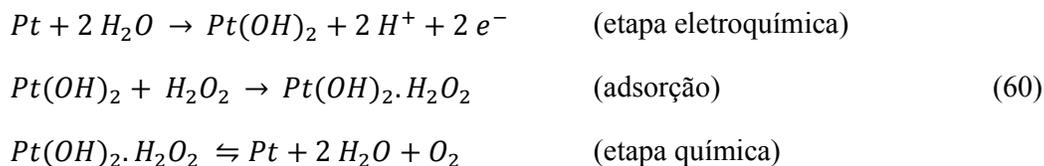
$$E (\%) = C. A. (S) * 100 / C. A. (H_2O_2) \quad (59)$$

Um valor de 36,6% foi encontrado para as condições adotadas nesse estudo. É importante ressaltar que, se caso maiores valores de bioconversão sejam necessários, uma simples diminuição da vazão do carreador pode ser implementada para se adequar à necessidade do operador.

O desvio padrão (d.p.) do padrão de menor concentração detectável ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi utilizado para a determinação dos limites de detecção (3,3 vezes o d.p.) e quantificação (10 vezes o d.p.) do método, com valores obtidos de $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,66 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Para avaliar a repetitividade do método, 105 injeções de um padrão de glicose ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) foram realizadas. Um valor médio de corrente de 40,1 nA e desvio padrão relativo de 3,81%, foi obtido para essa série de medidas. Uma frequência analítica de 60 amostras por hora foi obtida.

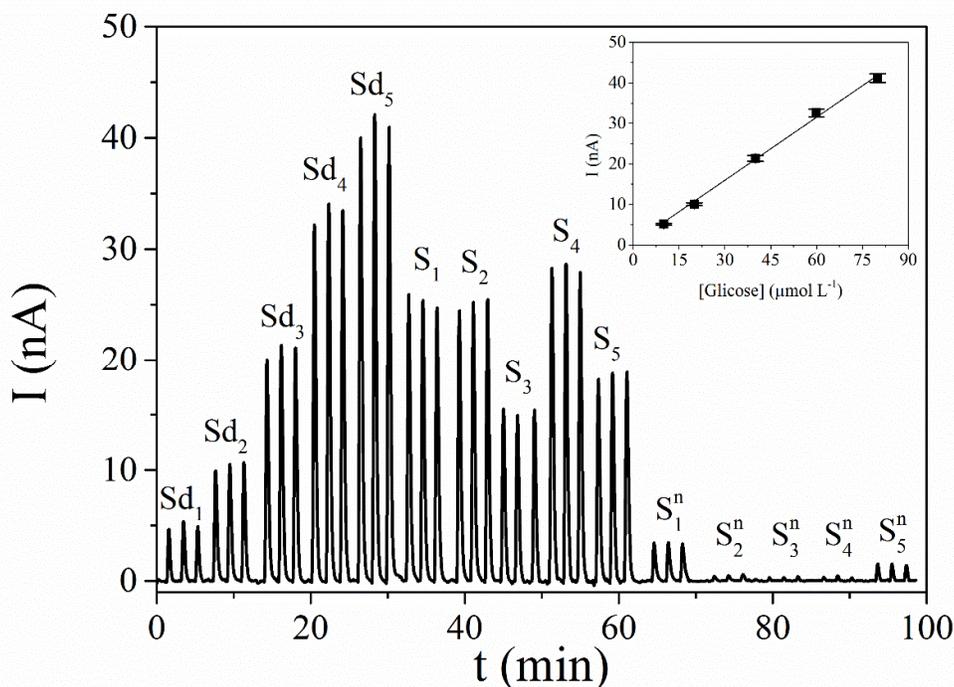
Para aplicações analíticas envolvendo amostras reais, um grande problema para o uso da detecção amperométrica utilizada nesse estudo é o alto potencial empregado para a oxidação catalítica de H_2O_2 em eletrodos de platina (Equação 60):



Nesses potenciais, espécies comumente encontradas em amostras reais, como ácido ascórbico, vão também ser oxidadas (Harper e Anderson, 2010). Para prevenir esses interferentes, modificações no eletrodo de trabalho vem sendo adotadas visando a diminuição do potencial de oxidação do H_2O_2 , como através da imobilização de ciprofloxacina na superfície de um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono (Sornambikai e Kumar, 2014) ou eletrodos à base de grafeno e nanopartículas de óxido de cobalto (Karuppiyah *et al.*, 2014). Uma outra abordagem possível, e que não necessita de nenhum tratamento do eletrodo de trabalho, é via a injeção da amostra em dois microreatores distintos, um contendo e outro sem a enzima imobilizada de forma a realizar uma medida diferencial do sinal da amostra (Cerqueira *et al.*, 2014).

A abordagem diferencial foi então adotada para a determinação de glicose em amostras de água de coco, sendo essas analisadas sem nenhum pré-tratamento. As amostras foram diluídas em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e injetadas nos microreatores. A Figura 44 mostra o sinal de corrente proveniente da curva de calibração (de $10,0$ a $80,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, $I \text{ (nA)} = -0,15 (\pm 0,04) + 0,53 (\pm 0,012) [\text{Glicose}] \text{ (}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)}$, $R^2: 0,995$) obtida para a análise de glicose, assim como os sinais provenientes da amostra após a passagem por microreator com, e sem, GOx imobilizada. O último grupo de medidas é extremamente importante visto que são eles quem vão definir o sinal dos interferentes. Esses valores de corrente foram então subtraídos dos obtidos para o microreator contendo GOx para a determinação de glicose em amostras reais.

Figura 44: Análise de glicose em amostras de água de coco. Curva de calibração entre: (Sd₁) 10,0 μmol L⁻¹; (Sd₂) 20,0 μmol L⁻¹; (Sd₃) 40,0 μmol L⁻¹; (Sd₄) 60,0 μmol L⁻¹e (Sd₅) 80,0 μmol L⁻¹, respectivamente. S₁ a S₅ e de S₁ⁿ a S₅ⁿ, se referem a passagem de amostras pelos reatores com e sem a enzima imobilizada, respectivamente. As condições de medidas são as mesmas das utilizadas na Figura 41



Fonte: arquivo pessoal

Como mostrado na Figura 44, a curva de calibração foi satisfatória para a determinação de glicose para as amostras analisadas. A Tabela 3 mostra as diferentes concentrações de glicose obtidas para cada amostra e seus valores de d.p.r. (desvio padrão relativo), obtidos via análise por amperometria e espectrofotometria no UV-Vis, pelo método de Trinder ($\lambda = 505 \text{ nm}$) (Barham e Trinder, 1972). De forma a comparar os dois métodos de análise empregados um teste t pareado foi aplicado e nenhuma evidência de diferença sistemática foi observada ($t_{\text{calculado}, 0,05; 4} = 1,35 < t_{\text{tabelado}, 0,05; 4} = 2,78$).

Tabela 3: Resultados obtidos para as análises de cinco diferentes amostras de água de coco, realizadas pelo método proposto e por espectrofotometria UV-Vis.

Amostras	Amperometria		Espectrofotometria (UV-Vis)	
	[Glicose] (mmol L ⁻¹)	d.p.r. (%)	[Glicose] (mmol L ⁻¹)	d.p.r. (%)
S ₁ (natural)	4,28	2,28	5,13	2,74
S ₂	96,08	2,41	93,77	1,75
S ₃	28,79	1,99	31,29	3,92
S ₄	109,43	1,35	124,68	0,38
S ₅	33,12	2,38	34,66	0,54

Com relação a concentração de glicose nas amostras, é interessante observar que a razão entre amostras industriais e natural variou entre diferentes marcas, alcançando valores quase que 25 maiores para algumas amostras industriais. Já é conhecido que a quantidade de glicose em água de coco varia com seu tempo de maturação, mas também essa pode ser adicionada como uma forma de acrescentar sabor nos processos industriais (Oliveira *et al.*; Jackson *et al.*). Dessa maneira, a metodologia proposta pode ser utilizada como uma forma rápida de investigação de adulteração desse tipo de amostra.

Parâmetros envolvendo a quantidade de enzima e a concentração de glutaraldeído utilizados no processo de imobilização foram definidos para a enzima GOx (25,0 U de enzima em 0,10% (v/v) de glutaraldeído). Cabe ressaltar que os conseguintes estudos, envolvendo diferentes enzimas, as mesmas condições de imobilização foram empregadas, mesmo sabendo que essas não serão necessariamente as melhores condições para todas elas. No entanto, a otimização das condições para cada enzima seria extremamente trabalhosa (um estudo semelhante ao mostrado na Figura 41 requereria, ao menos, 19 microreatores) e não representa o objetivo principal desse estudo.

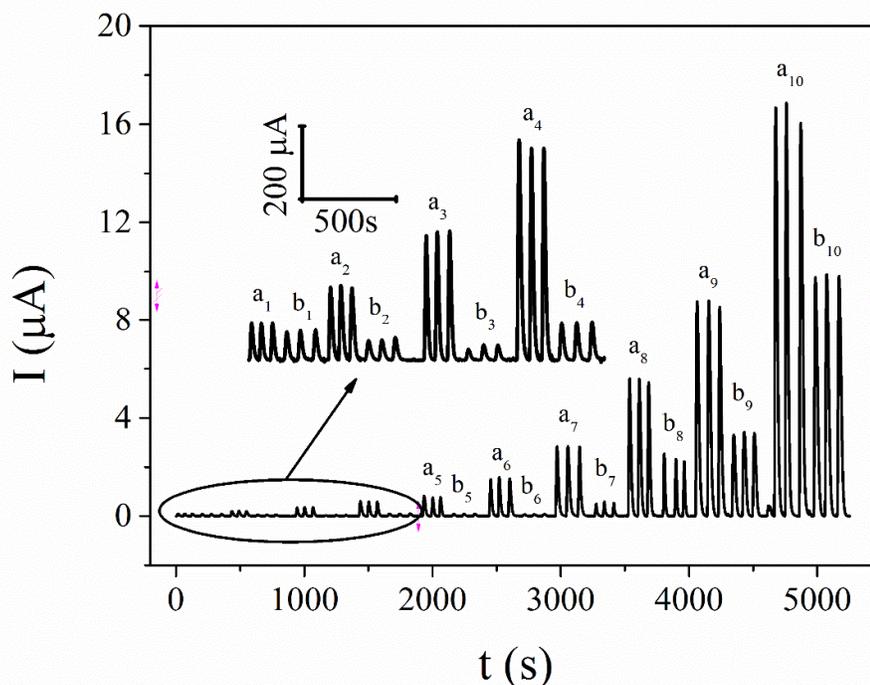
3.2.4.2 *Ascorbato Oxidase (AAO)*

AAO tem sido amplamente utilizada para aplicações analíticas, já que essa enzima é um catalisador muito eficiente para a oxidação do L-ascorbato (AH) para dehidroascorbato (DHA) (Barbehenn *et al.*). Nesse estudo, todos os experimentos foram

realizados sobre um eletrodo de platina (o mesmo utilizado para os estudos de GOx) e foi observado que para as condições aplicadas (iguais as aplicadas para GOx) a biotransformação de L-ascorbato por meio da enzima imobilizada não foi completa. Para avaliar a atividade da enzima no microreator, medidas diferenciais para concentrações crescentes de ácido ascórbico numa faixa entre 0,008 mmol L⁻¹ e 2,00 mmol L⁻¹, foram realizadas.

As medidas diferenciais foram realizadas injetando os padrões em microreatores sem (Figura 45-A) e com (Figura 45-B) a enzima imobilizada. Sobre as condições implementadas o sinal analítico para o ácido ascórbico nunca foi completamente suprimido, mas a eficiência de bioconversão claramente aumentou com a concentração do analito até um máximo de 95% para concentrações de 0,200 mmol L⁻¹. Para maiores concentrações a eficiência decresce rapidamente (e.g., 40% para 2,00 mmol L⁻¹) possivelmente devido à insuficiência de O₂ disponível e/ou saturação dos sítios catalíticos das enzimas imobilizadas.

Figura 45: Adições de padrões de ácido ascórbico em dois diferentes microreatores:(a) com e (b) sem a AAO imobilizada. Os padrões se referem a concentrações de a_1 - b_1 : $0,008 \text{ mmol L}^{-1}$, a_2 - b_2 : $0,020 \text{ mmol L}^{-1}$, a_3 - b_3 : $0,040 \text{ mmol L}^{-1}$, a_4 - b_4 : $0,060 \text{ mmol L}^{-1}$, a_5 - b_5 : $0,080 \text{ mmol L}^{-1}$, a_6 - b_6 : $0,200 \text{ mmol L}^{-1}$, a_7 - b_7 : $0,400 \text{ mmol L}^{-1}$, a_8 - b_8 : $0,600 \text{ mmol L}^{-1}$, a_9 - b_9 : $1,20 \text{ mmol L}^{-1}$ e a_{10} - b_{10} : $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente. Outras condições analíticas semelhantes a da Figura 41.



Fonte: arquivo pessoal

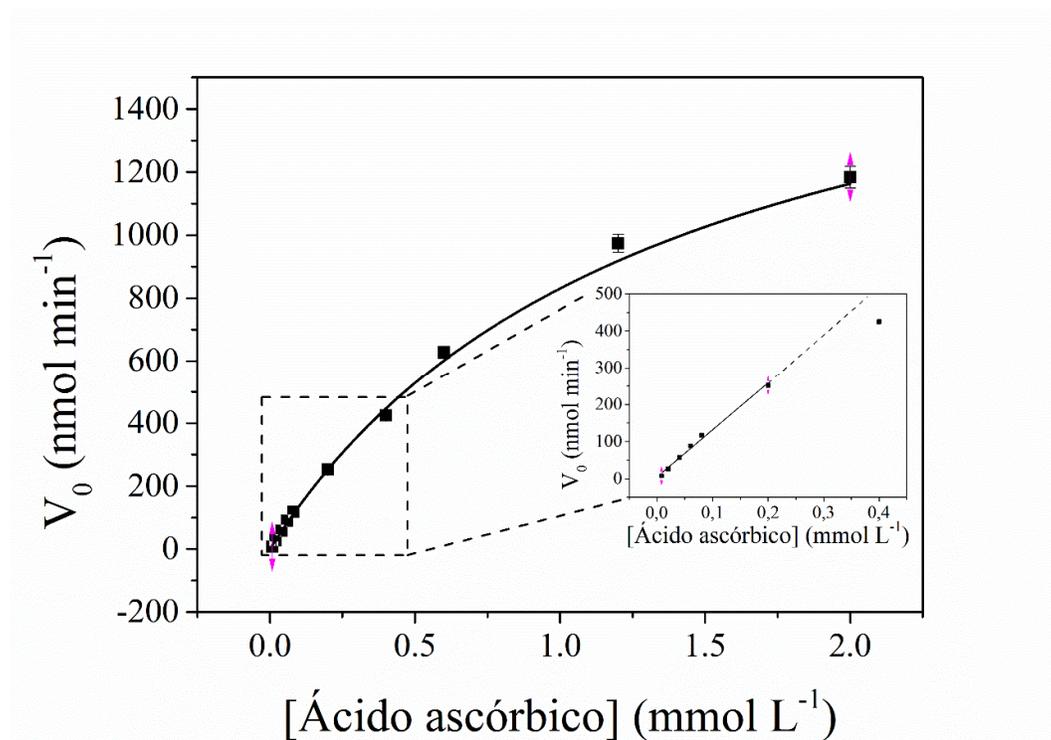
A medida diferencial para os dois reatores dá informação sobre a performance do microreator enzimático e, na faixa de concentração onde a oxidação do ácido ascórbico é eficiente, ele pode permitir a correção dos sinais amperométricos originários de espécies interferentes em amostras reais.

A Figura 46 mostra a curva de Michaelis-Menten obtida baseada na medida diferencial dos microreatores (dados retirados da Figura 46). Um valor de $1915 \text{ nmol min}^{-1}$ e $1,30 \text{ mmol}$ foram obtidos respectivamente para V_{max} e K_M , sob uma vazão de carreador de $150 \mu\text{L min}^{-1}$. Esse valor de K_M é quase 7 vezes maior do que o reportado na literatura para AAO imobilizada ($0,20 \text{ mmol}$) (Chauhan *et al.*, 2010). No entanto é importante destacar que esse valor foi calculado baseado em uma condição específica de vazão e imobilização.

Uma faixa linear de bioconversão foi obtida para esse sistema entre $0,008 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,200 \text{ mmol L}^{-1}$ ($\Delta I (\mu\text{A}) = 0,082 (\pm 0,027) + 9,01 (\pm 0,29) [\text{ácido ascórbico}]$)

(mmol L^{-1}), $R^2 = 0,997$). A atividade de AAO imobilizada decresceu em 29% do seu valor original, para uma solução $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico, após 2 semanas de uso intenso (~ 1000 injeções). As condições de armazenamento seguiram as descritas no item 3.2.4.

Figura 46: Regressão de Michaelis-Menten para AAO imobilizada. Dados retirados da Figura 45.



Fonte: arquivo pessoal

Como discutido anteriormente, o tempo de residência do ácido ascórbico dentro do microreator afeta diretamente a extensão da bioconversão enzimática. Esse tempo de residência pode ser controlado por alterações na taxa de vazão do carreador que passa pelo microcanal modificado (Cerqueira *et al.*). Por exemplo, uma redução na vazão de $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ a $0,05 \text{ mL min}^{-1}$, para injeções de soluções de ácido ascórbico $0,400 \text{ mol L}^{-1}$, aumentaram a bioconversão em 42,6%. Esse procedimento pode ser utilizado para oxidar o restante de ácido ascórbico residual, apesar de diminuir a frequência analítica. Outra possibilidade seria aumentar a extensão do microreator, levando a um aumento do tempo de residência.

Para aplicações analíticas reais, o uso de medidas diferenciais deve ser adotado com cautela, já que duas curvas de calibração devem ser adotadas (para reatores com e

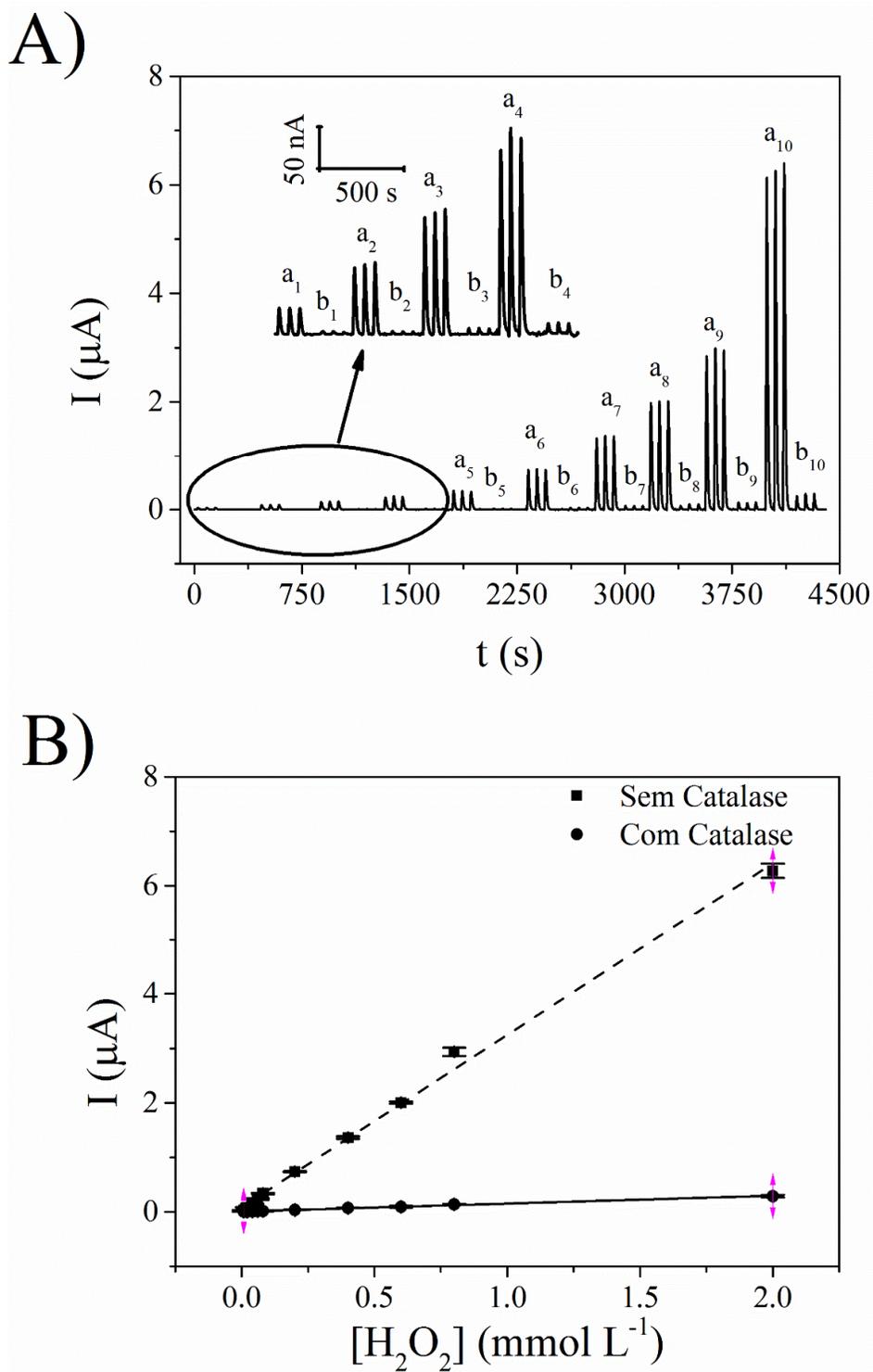
sem AAO imobilizada) de forma a determinar a eficiência de bioconversão do microreator. Outra possibilidade seria a aplicação direta do microreator fazendo a medida da corrente de redução do oxigênio consumido durante a reação enzimática. Para tal, sondas de detecção de oxigênio dissolvido (e.g., tipo Clark) (Akyilmaz e Dinckaya, 1999) ou eletrodos modificados (Wang *et al.*, 2008) poderiam ser utilizados. Outro ponto que deve ser mencionado é a possibilidade de utilização dos microreatores à base de AAO para a eliminação de ácido ascórbico em alguns testes bioquímicos (Martinello e Da Silva, 2006; Martinello e Luiz Da Silva, 2006). No entanto, nesse caso em particular, a concentração do mesmo na amostra real deve ser antes estimada, para que a concentração residual não sobreponha o limite da metodologia analítica.

3.2.4.3 *Catalase (CAT)*

CAT é uma enzima que catalisa a desproporção de H_2O_2 para O_2 e água (Felhofer *et al.*, 2010). Por essa razão, as propriedades catalíticas da CAT tem sido amplamente utilizadas para facilitar a detecção amperométrica de H_2O_2 (Di *et al.*), assim como substratos “não-nativos” como o ácido 3-cloroperoxibenzoico (Horozova *et al.*) e etanol (Akyilmaz e Dinckaya).

Assim como AAO, a atividade de CAT nesse trabalho foi estudada através de medidas diferenciais de um microreator com e outro sem a enzima imobilizada. A Figura 47-A mostra a resposta amperométrica para concentrações de H_2O_2 em um faixa de 0,008 mmol L^{-1} a 2,00 mmol L^{-1} , após passarem por microreatores sem (Fig 47-A,a) e com (Figura 47-A,b) CAT imobilizada.

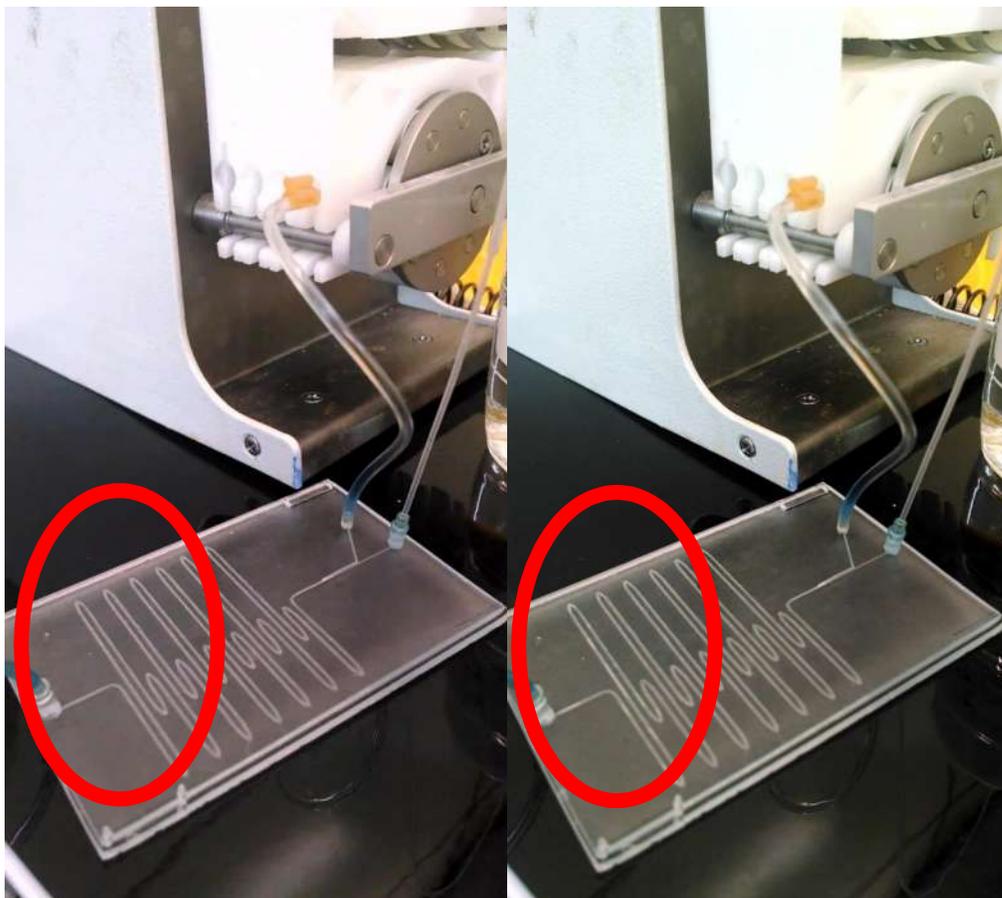
Figura 47: (A) Adições de padrões de H_2O_2 em dois microreatores diferentes: (a) sem e (b) com CAT imobilizada. Os padrões se referem a concentrações de a_1 - b_1 : $0,008 \text{ mmol L}^{-1}$, a_2 - b_2 : $0,020 \text{ mmol L}^{-1}$, a_3 - b_3 : $0,040 \text{ mmol L}^{-1}$, a_4 - b_4 : $0,060 \text{ mmol L}^{-1}$, a_5 - b_5 : $0,080 \text{ mmol L}^{-1}$, a_6 - b_6 : $0,200 \text{ mmol L}^{-1}$, a_7 - b_7 : $0,400 \text{ mmol L}^{-1}$, a_8 - b_8 : $0,600 \text{ mmol L}^{-1}$, a_9 - b_9 : $0,800 \text{ mmol L}^{-1}$ and a_{10} - b_{10} : $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente. (B) Curvas de calibração obtidas pelos dados da Figura 20-A. Outras condições analíticas são semelhantes a da Figura 41.



Fonte: arquivo pessoal

Como mostrado na Figura 47-A, a intensa atividade da CAT frente a H_2O_2 proporciona bioconversões de até 95%, para concentrações tão elevadas quanto $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$. A Figura 47-B apresenta as curvas de calibração obtidas para crescentes concentrações de H_2O_2 em ambos reatores. A regressão linear dos dados registrados foi $I (\mu\text{A}) = 0,084 (\pm 0,051) + 3,165 (\pm 0,071) [\text{H}_2\text{O}_2] (\text{mmol L}^{-1})$, $R^2 = 0,998$ para o microreator sem CAT imobilizada, e de $I (\mu\text{A}) = 0,007 (\pm 0,003) + 0,145 (\pm 0,004) [\text{H}_2\text{O}_2] (\text{mmol L}^{-1})$, $R^2 = 0,997$ para o microreator contendo CAT. Essa grande diferença entre as sensibilidades observadas nos dois sistemas evidenciam a incrível atividade da CAT frente à H_2O_2 . Essa grande bioconversão já era esperada, uma vez que a CAT tem um dos maiores valores de *turnover* (quantas vezes a enzima completa o ciclo da reação em um segundo) da natureza (Brigelius-Flohé e Kipp). Concentrações mais elevadas de H_2O_2 ($> 2,00 \text{ mmol L}^{-1}$) levaram a distúrbios na detecção eletroquímica devido à grande taxa de emersão de O_2 do microreator (Figura 48), o que tornou o estimo dos parâmetros de Michaelis-Mentel inviáveis.

Figura 48: Evolução de O_2 na superfície do microreator decorrente da ação da CAT.



Fonte: arquivo pessoal

Apesar da dificuldade encontrada para medidas de concentrações elevadas de H_2O_2 , estas são incomuns em amostras reais, o que ainda não impediria uma simples diluição da mesma, tornando o método proposto eficaz para uma quantificação diferencial de H_2O_2 ou, se desejado, por uma medida direta do O_2 gerado. Assim como para a AAO, outra aplicação interessante desse microreator seria para a eliminação da interferência do H_2O_2 em amostras reais, como para a demanda química de oxigênio (Lee *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Os microreatores mantiveram sua atividade inicial após intenso uso (~1000 injeções) para uma solução de H_2O_2 0,100 mmol L^{-1} . As condições de armazenamento seguiram as descritas no item 3.2.4.

A influência da taxa de vazão do carreador frente a bioconversão de H_2O_2 , nos microreatores contendo CAT também foi avaliada. Como esperado, uma tendência de aumento da eficiência enzimática com a redução da vazão, e.g. diminuindo a mesma de

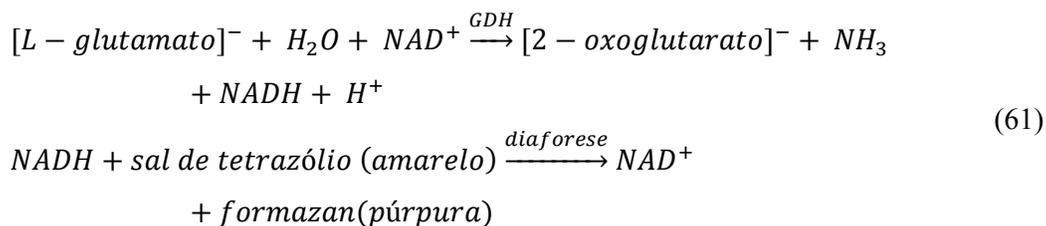
0,150 mL min⁻¹ a 0,100 mL min⁻¹, a desproporção catalítica de uma solução de H₂O₂ 0,200 mmol L⁻¹ aumentou de 87% para 100%.

3.2.4.4 Glutamato Dehidrogenase (GDH)

GDH é uma enzima que catalisa a deaminação oxidativa do L-glutamato em presença de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺), para 2-oxoglutarato, amônia e a forma reduzida da dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) (Stillman *et al.*).

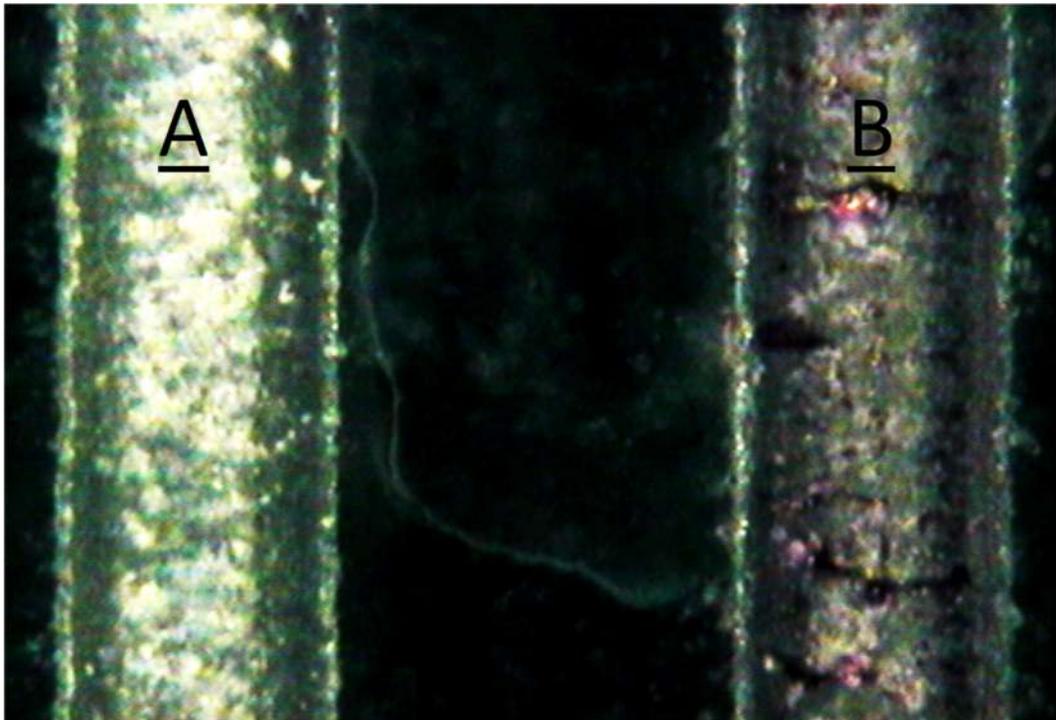
A determinação da atividade da GDH geralmente é feita pelo monitoramento do NADH gerado, que pode ser realizado por métodos eletroquímicos (Fujishima *et al.*; Raj e Ohsaka; Zhang *et al.*) ou espectrofotométricos (Rover *et al.*). Infelizmente, tanto os detectores amperométricos quanto espectrofotométricos usados nesse trabalho não foram capazes de quantificar o NADH, já que esse adsorve intensamente em eletrodos de platina (Jaegfeldt) e um intenso efeito Schlieren, associado ao L-glutamato e ao NAD⁺, impossibilitou a medida espectrofotométrica. Nem mesmo o monitoramento de múltiplos comprimentos de onda, visando evitar a interferência do efeito Schlieren, foi suficiente já que uma pronunciada flutuação na linha base foi observada próximo ao comprimento de onda de absorção do NADH ($\lambda = 340$ nm). Alterações nos eletrodos de trabalho, ou mesmo no sistema espectrofotométrico, não foram adotadas para evitar esse problema já que não era o foco desse estudo.

Para comprovar a imobilização da GDH, uma reação bem conhecida envolvendo a redução do sal de metiltetrazólio (MTT) pelo NADH (formado pela redução de NAD⁺ em meio de glutamato e GDH) e diaforese, que leva à formação de uma tintura de formazan roxa (Berridge *et al.*), foi explorada (Equação 61).



A Figura 49 mostra um microreator modificado com GDH, antes (Figura 49-A) e após (Figura 49-B) as reações descritas acima. Uma exaustiva limpeza do microreator com tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) foi feita antes de processar a reação com o objetivo de remover qualquer resquício de enzima livre no mesmo. A coloração roxa desenvolvida na superfície do microreator comprova a imobilização da GDH. No entanto, essa reação não pôde ser utilizada para possíveis detecções espectrofotométricas do NADH, já que o produto formado é insolúvel em meio aquoso.

Figura 49: Microreatores modificados com GDH antes (A) e após (B) a reação com MTT. A coloração púrpura de produto confirma que a enzima foi imobilizada com sucesso.



Fonte: arquivo pessoal

3.3 CONCLUSÃO

Foi possível através dos resultados mostrados nesse trabalho mostrar o sucesso da imobilização de diferentes enzimas [glicose oxidase (GOx), ascorbato oxidase (AAO), catalase (CAT), e glutamato dehidrogenase (GDH)] em microcanais confeccionados sobre bases de poli(metil metacrilato). Um simplificado processo de imobilização baseado na

funcionalização com polietilenoimina (PEI) foi empregado, mostrando a grande versatilidade da metodologia.

Condições de construção e aplicação dos microcanais foram estudadas a fim de se extrair a melhor performance do sistema. Além disso, efeitos da imobilização enzimática sobre a resposta analítica foram avaliados em função da enzima GOx. Um volume de 5 mL de uma solução tampão, contendo 25 U de enzima e 0,10%(v/v) de glutaraldeído foram utilizadas para todas as imobilizações enzimáticas.

Sistemas analíticos baseados em detecções eletroquímicas foram desenvolvidos e aplicados com sucesso para a caracterização de parâmetros cinéticos dos microreatores. A estabilidade das enzimas foram avaliadas, sendo que as mesmas mostraram valores de constante K_M muito próximos dos descritos na literatura para sistemas semelhantes.

Os resultados mostrados aqui revelam o potencial do sistema enzimático à base de PMMA-PEI para o desenvolvimento de sensores microanalíticos e até como futura base para sistema “lab-on-a-chip”.

4 Imobilização simultânea de duas enzimas em microcanais à base de poli (metil metacrilato)

RESUMO

A imobilização simultânea de duas enzimas distintas no interior de microcanais de poli(metil metacrilato) (PMMA) ainda não está retratado na literatura, e portanto foi investigada neste trabalho. Um método simples e rápido, semelhante ao descrito no Capítulo 3, envolvendo apenas dois passos para a imobilização de ambas enzimas, em menos de uma hora, foi realizado. As enzimas *glicose oxidase* (GOx) e *peroxidase* (HRP) foram escolhidas como modelo para avaliação deste estudo. A imobilização resultante foi avaliada por espectrofotometria em fluxo, com base na clássica reação de Trinder. Para determinar a melhor condição de imobilização, um estudo multivariado foi realizado utilizando um planejamento fatorial Box-Behnken 3^3 , com condições ótimas definidas com concentrações de GOx e HRP de 100 U mL^{-1} e concentração de glutaraldeído de $0,05\%$ (% v/v). Os estudos de otimização estabeleceram que o volume de injeção e a taxa de fluxo ótimos foram de $25,0 \mu\text{L}$ e $60,0 \mu\text{L min}^{-1}$, respectivamente, para as dimensões do microreator utilizado. Respostas lineares na faixa de $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose foram obtidas usando as condições otimizadas. Os limites de detecção e de quantificação foram avaliados em $0,27 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,88 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A estabilidade de um microreator assim preparado diminuiu lentamente com a sua utilização (63,8% após duas semanas de uso intenso, ~1000 injeções). Uma amostra de soro sanguíneo humano foi analisada pelo método proposto e os resultados comparados com uma análise espectrofotométrica clássica.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho apresentavam grau analítico. Placas de poli(metil metacrilato) (PMMA) foram adquiridas da PlastiTécnica (São Paulo, Brasil). Di-hidrogeno fosfato de sódio, hidrogeno fosfato de sódio e álcool isopropílico foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil). Glutaraldeído 25% (V/V) e D-(+)-glicose foi adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Polietilenoimina (PEI) (PM médio = $750000 \text{ g mol}^{-1}$, 50% (m/v) em água), dimetil sulfóxido (DMSO) e 4-aminoantipirina foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Uma amostra de soro humano (de macho com sangue tipo AB coagulado), utilizada para realização de glicose em amostras reais, também foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). *Glicose oxidase* de *Aspergillus niger* (124 U mg^{-1}) foi adquirida da Toyobo (Osaka, Japão) e *horseradish peroxidase* (115 U mg^{-1}) foi adquirida da Seppim (Puteaux, França).

Todas as soluções foram preparadas com água dialisada e deionizada obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Dubuque, USA), com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$. Todos os padrões e soluções enzimáticas foram preparadas em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,00).

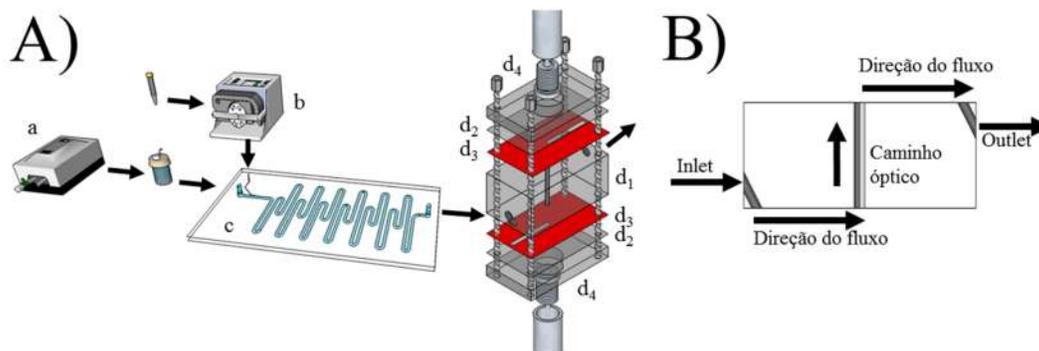
4.1.2 Instrumentação

A composição do sistema em fluxo utilizado e dos microcanais utilizados nesse estudo foram as mesmas descritas no item 3.1.2 (Capítulo 3), exceto pelo método de detecção que, ao invés da utilização de um sistema com base amperométrica, o vigente estudo se baseia em detecções fotométricas. As medidas por espectrometria no UV-Vis foram feitas usando um espectrômetro miniaturizado com fibra óptica UB-4000 (Ocean Optics, EUA) com um detector TCD1304AP de arranjo CCD linear com 3648 elementos

(Toshiba, Japão). As medições foram feitas usando um sistema conforme descrito na Figura 50.

Uma célula espectrofotométrica em Z confeccionada no próprio laboratório (Figura 50-B) foi utilizada nas detecções. Uma placa de PMMA (d_1) com dimensões de 50 mm x 30 mm x 10 mm foi utilizada como "núcleo" da célula. Três orifícios de 0,8 milímetros de diâmetro foram perfurados a esta placa, a fim de se fazer a entrada e saída de fluxo, além do caminho óptico (1 cm) da célula. Duas camadas de silicone de 100 μ m de espessura (d_3), cada uma delas contendo um corte de 200 μ m de largura (um na parte inferior e outro na parte superior do núcleo da célula) foram utilizadas para delimitar o percurso do fluxo carreador. Além disso, duas camadas de PMMA de 1,0 mm de espessura cada (d_2) foram usadas como "janelas" para evitar o contato direto das soluções com as fibras ópticas. Finalmente, outras duas camadas PMMA (espessura de 3 mm) (d_4), cada uma com um conector fixado no centro, foram usadas como suporte para as fibras ópticas.

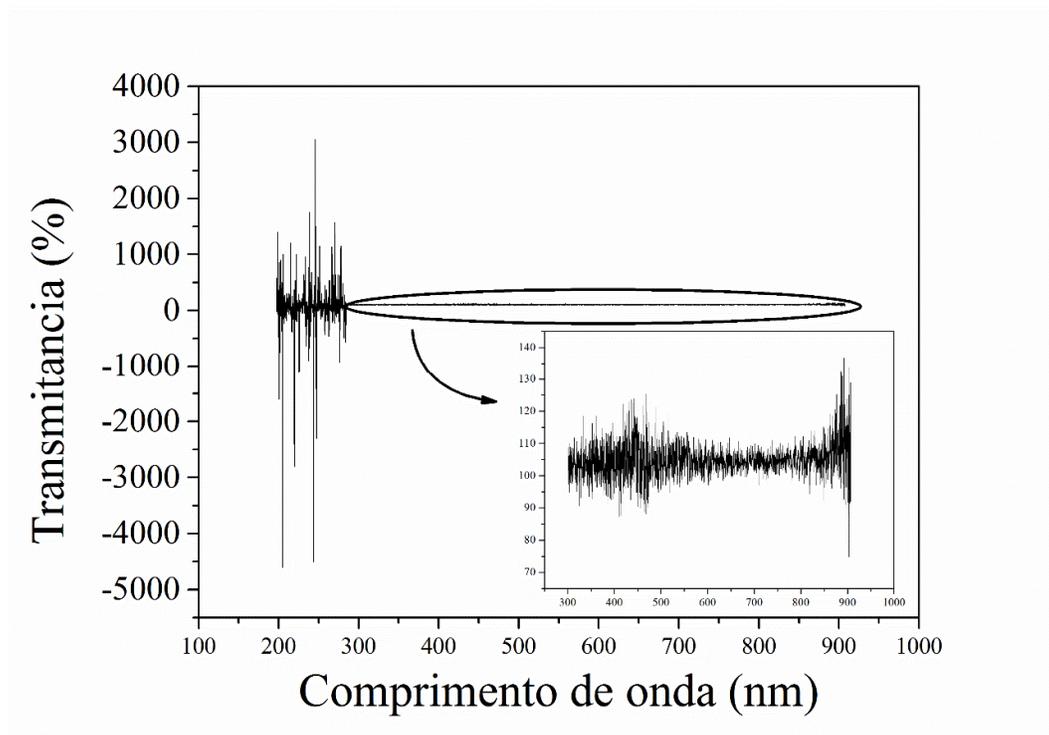
Figura 50: (A) Arranjo do sistema em fluxo aplicado: a – bomba de aquário; b – bomba peristáltica programável; c - micro-reator e d – célula espectrofotométrica em fluxo utilizada (lab-made) (d_1 – núcleo da célula em PMMA, d_2 – janelas de PMMA, d_3 – caminho do fluxo em placas de PDMS e d_4 – placas de PMMA contendo conectores para sistema de fibra óptica. (B) Representação ampliada da região d_1 . O sentido do fluxo é demonstrado em (B). A aquisição do sinal foi feita utilizando um espectrofotômetro de fibra óptica miniaturizado.



Fonte: arquivo pessoal

Uma avaliação da transmitância relativa às janelas de PMMA foi feita visando avaliar a interferência que a mesma teria sobre o sinal fotométrico medido. A Figura 51, mostra que a mesma demonstraria interferência apenas em medidas realizadas em comprimentos de onda inferiores a 300 nm.

Figura 51: Avaliação da transmitância da célula em fluxo desenvolvida no laboratório (lab-made).



Fonte: arquivo pessoal

Os dados espectrométricos foram adquiridos por meio do software SpectraSuite (Ocean Optics, EUA), sendo os mesmos posteriormente tratados com o software Origin 9.0.0 (OriginLab Corporation, EUA).

4.1.3 Metodologia analítica

A experiência adquirida nos estudos anteriores foi utilizada novamente nesta etapa do trabalho. O processo de imobilização foi realizado sob condições de fluxo e todo o processo foi reduzido para apenas dois passos. Uma mistura, com volume final de 5 mL, das duas enzimas e glutaraldeído, em solução tampão de fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) foi utilizada para modificação. A quantidade de enzimas, assim como a concentração de glutaraldeído foram otimizados através de um projeto de planejamento Box-Behnken ³³.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar da metodologia utilizada para imobilização das duas enzimas ser a mesma descrita anteriormente, como o desenvolvimento de um sistema híbrido é inovador, e cria possíveis novas dificuldades à cerca do processo de imobilização, uma otimização desse processo baseado em um planejamento fatorial Box-Behnken 3^3 , com triplicata no ponto central, foi desenvolvido.

Tal planejamento pode ser entendido como um planejamento fatorial fracionário especial contendo três níveis e k fatores ($3k$, onde $k \geq 3$), que permite uma estimativa eficiente dos coeficientes de primeira e de segunda ordem do modelo matemático. Estes modelos são mais eficientes e econômicos do que os seus modelos correspondentes, principalmente devido ao maior número de variáveis, requerendo um número de experimentos de $N = 2k(k - 1) + pc$ (em que pc é o número de pontos centrais, que são utilizados para o cálculo do erro experimental). Assim, todos os níveis fatoriais são ajustados apenas em três níveis (-1, 0, +1), com intervalos igualmente espaçados entre eles (Ferreira *et al.*, 2007). As variáveis escolhidas para este procedimento foram concentração de glutaraldeído ($C_{\text{glutaraldeído}}$, % v/v), quantidade de GOx (C_{GOx} , U mL⁻¹) e HRP (C_{HRP} , U mL⁻¹).

A Tabela 4 mostra a matriz codificada do planejamento fatorial Box-Behnken 3^3 , mostrando os níveis, fatores e a resposta (absorbância média) obtida para um padrão de glicose de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os elevados valores de absorbância aqui demonstrados são oriundos do fato que as medidas analíticas foram realizadas em uma faixa de comprimento de onda de 480 a 520 nm, e não em um comprimento de onda unitário como se é usualmente aplicado em métodos com detecção espectrofotométrica.

Tabela 4: Matriz codificada para o planejamento factorial Box–Behnken 3^3 e os valores obtidos em cada um desses níveis para um padrão de glicose $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ *

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	Absorbância (u.a.)
1	-1	-1	0	1,885
2	+1	-1	0	1,348
3	-1	+1	0	1,226
4	+1	+1	0	0,966
5	-1	0	-1	0,540
6	+1	0	-1	0,410
7	-1	0	+1	2,619
8	+1	0	+1	1,957
9	0	-1	-1	0,783
10	0	+1	-1	2,207
11	0	-1	+1	0,504
12	0	+1	+1	3,553
13	0	0	0	1,459
14	0	0	0	1,115
15	0	0	0	1,341

X₁: C_{glutaraldeído} (% v/v): (-1): 0,05; (0): 0,275; (+1): 0,50

X₂: C_{GOx} (U mL⁻¹): (-1): 10,0; (0): 55,0; (+1) 100

X₃: C_{HRP} (U mL⁻¹): (-1): 10,0; (0): 55,0; (+1): 100

*Condições da medida: fluxo $0,100 \text{ mL min}^{-1}$ (solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,00), percurso analítico (61,5 cm), volume de injeção de $20,0 \mu\text{L}$ e comprimento de onda de medida entre 480-520 nm.

Utilizando um modelo quadrático ajustado (Equação 62), uma análise de regressão com superfície de resposta, utilizando unidades codificadas, foi realizado para cada fator de resposta.

$$\hat{y} = \widehat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^k \widehat{\beta}_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + r_i \quad i < j \quad (62)$$

A Tabela 5 mostra os valores calculados para os coeficientes e os estimadores p-valor (p-valor é a probabilidade da hipótese nula). Usando um nível de significância de 5%, um fator é considerado como efetivo na resposta se os coeficientes diferirem significativamente de zero e o valor de p-valor <0,05. Assim, uma avaliação dos coeficientes foi feita para cada parâmetro e suas interações. Os estimadores p-valor calculados indicam que a única variável estudada significativa foi C_{HRP}, assim como sua interação com C_{GOx} (p <0,05). Além disso, os modelos ajustados foram avaliados (ANOVA) e os resultados obtidos indicaram que nenhuma evidência de falta de ajuste foi observada no intervalo de confiança de 95% (p-valor = 0,167).

Tabela 5: Valores para o modelo quadrático ajustado para um planejamento fatorial Box–Behnken 3³. Os coeficientes b₁, b₂ e b₃ são referentes as variáveis C_{glutaraldeído}, C_{GOx} e C_{HRP}, respectivamente.

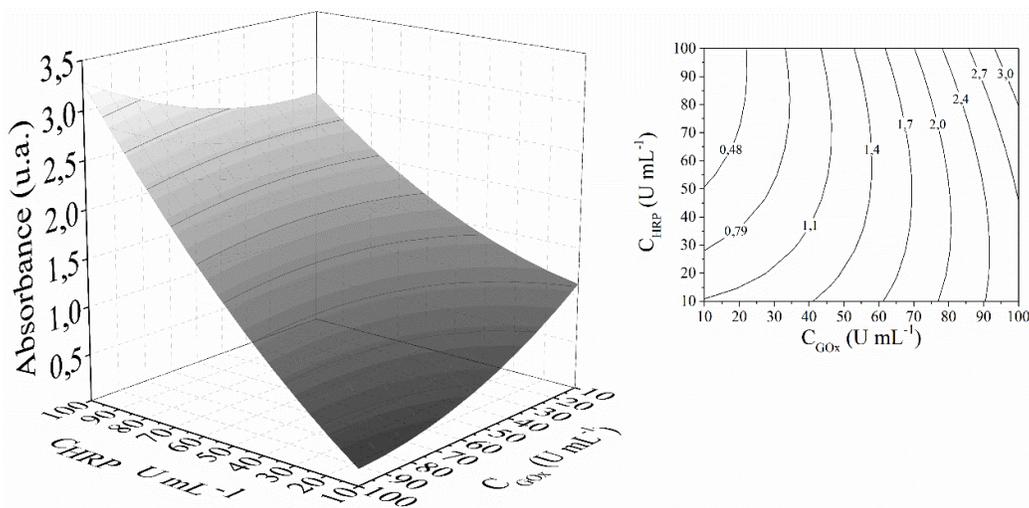
Coefficiente	Coefficiente da regressão	Desvio padrão	t calculado	p valor
Média	1,305	0,101	12,93	0,006
b ₁	-0,198	0,062	3,214	0,085
b ₂	0,003	0,062	0,053	0,962
b ₃	1,012	0,062	16,38	0,004
b ₁₂	0,069	0,087	0,792	0,511
b ₁₃	-0,133	0,087	1,522	0,267
b ₂₃	0,406	0,087	4,648	0,043
b ₁₁	-0,165	0,091	1,808	0,212
b ₂₂	0,216	0,091	2,372	0,141
b ₃₃	0,241	0,091	2,649	0,117

Com base nos fatores que afetam a reação de Trinder, já eram esperados que esses dois parâmetros fossem significativos na absorbância medida, uma vez que GOx e HRP agem em conjunto para produzir o composto cromóforo detectável. No entanto, uma vez que a HRP é quem influencia diretamente a oxidação do reagente aceitador de oxigênio,

ela parece ser mais importante no sistema do que GOx. Surpreendentemente, a concentração de glutaraldeído não mostrou qualquer influência significativa no sinal analítico, já que mais enzimas imobilizadas seriam esperadas para concentrações mais elevadas. Além disso, a contribuição negativa obtida em b1 mostra que uma concentração mais elevada de glutaraldeído, de algum modo, inibe a atividade das duas enzimas. Este comportamento já havia sido observado no estudo anteriormente descrito envolvendo apenas a imobilização de GOx.

Como C_{HRP} e C_{GOx} (associado com C_{HRP}) são as variáveis predominantes, a superfície de resposta calculada (Figura 52) refere-se à influência de ambas as enzimas na absorbância medida. Neste caso, $C_{glutaraldeído}$ foi fixada no seu nível mais baixo (0,05 % v/v), a fim de se atingir uma melhor sensibilidade e para minimizar o consumo desse reagente no processo de imobilização.

Figura 52: Superfície de resposta obtida para descrever a influência da C_{HRP} e C_{GOx} no microdispositivo proposto. Condições de medida: vazão de $100,0 \mu\text{L min}^{-1}$ e volume de injeção de $20,0 \mu\text{L}$. Composição da solução injetada: $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose, $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de 4-aminoantipirina e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de fenol. A concentração de glutaraldeído durante a imobilização foi fixada em 0,05 v/v. Condições de medida: faixa entre 480 e 520 nm. A superfície de resposta foi construída com base na medida de 15 reatores diferentes.



Fonte: arquivo pessoal

A Figura 52 ilustra a influência das duas enzimas no sistema. Esta representação gráfica correlaciona o sinal (absorbância) produzido em cada composição (teor de HRP e GOx entre 10 e 100 U mL⁻¹ na solução de imobilização). Essa figura foi alcançada utilizando os resultados obtidos para 15 microcanais preparados distintamente. Como mencionado anteriormente, o aumento de C_{HRP} levou a um sinal de absorbância maior uma

vez que esta enzima é aquela que regula a reação colorimétrica. Da mesma forma, a contribuição de C_{GOx} foi significativa, uma vez que é crucial para gerar o H_2O_2 reativo.

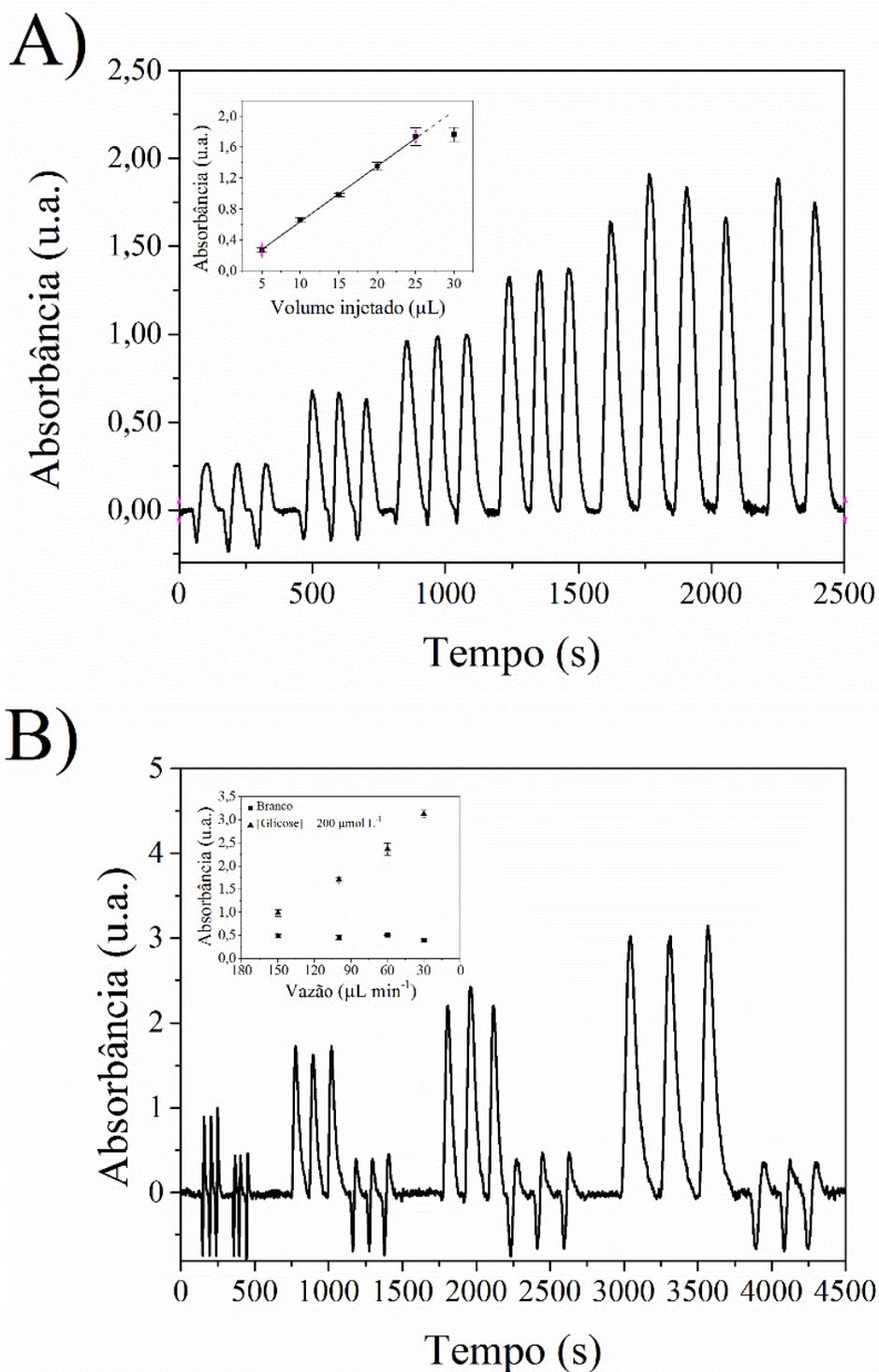
A análise da Figura 53 mostra aspectos interessantes: por exemplo, observando o sinal produzido quando C_{HRP} foi fixada em $10,0 \text{ U mL}^{-1}$, o sinal aumentou exponencialmente quando C_{GOx} diminuiu (a absorbância aumentou de 0,17 a 1,1 u.a.). Este resultado, à primeira vista parece contraditório, mas é necessário ter em mente que cada ponto dessa superfície refere-se à quantidade de enzimas presente nas soluções utilizadas para a preparação dos microreactores. Como a imobilização de ambas as enzimas é um processo competitivo, para uma C_{HRP} fixa e com C_{GOx} diminuindo, a quantidade de HRP imobilizados nas paredes do microcanal aumenta. Olhando para o ponto que representa uma concentração de HRP de $100,0 \text{ U mL}^{-1}$ e de GOx de $10,0 \text{ U mL}^{-1}$, o sinal gerado é mais intenso (absorbância cresceu para 2,6 u.a.). A razão para este comportamento não é óbvia, uma vez que os aspectos como as afinidades de ligação de ambas as enzimas nas paredes do microcanal, assim como suas características cinéticas "condicionais", nessas condições são desconhecidos. Outro aspecto mostrado na Figura 53 é que maiores quantidades de ambas as enzimas melhora a resposta analítica, visto que enquanto concentrações de $10,0 \text{ U mL}^{-1}$ de ambas as enzimas gerou uma absorbância de $\sim 1,1$ u.a., concentrações de $100,0 \text{ U mL}^{-1}$ de ambas as enzimas gerou um aumento da absorbância, 3,29 u.a.). Estes resultados revelam uma melhoria notável na eficácia da biotransformação de glicose com a variação das condições de imobilização.

Devido ao aumento do consumo de enzima, e porque um sinal significativo foi obtido mesmo para concentrações relativamente baixas de glicose, concentrações maiores de enzimas não foram avaliadas. Desta forma, as condições de imobilização utilizadas nos experimentos seguintes foram: $C_{\text{glutaraldeído}}$ de 0,05 (% v/v), C_{GOx} de 100 U mL^{-1} e C_{HRP} de 100 U mL^{-1} .

Uma vez estabelecidas as melhores condições de imobilização, os parâmetros envolvidos no desempenho do microreactor para a conversão da glicose foram avaliados. O grau de bioconversão desenvolvido por cada microreactor é afetado diretamente por uma série de parâmetros. Como exemplo, podem ser destacados o contato da amostra com as enzimas imobilizadas na parede do microreactor e o tempo de permanência da amostra no interior do canal. Assim, a turbulência causada por irregularidades nas paredes do canal (já que os microcanais foram criados usando o modo *raster*) e as variações na taxa de fluxo

irão afetar diretamente a bioconversão. Portanto, é de se esperar que os dois parâmetros que vão aumentar a resposta analítica são a taxa de fluxo aplicada e o volume injetado, uma vez que são capazes de modificar de forma significativa a taxa de bioconversão. A Figura 53 mostra a influência de ambos os parâmetros na metodologia proposta.

Figura 53: Influência de A) volume de injeção e B) vazão na absorbância medida para um padrão de glicose $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os parâmetros de imobilização são os mesmos mostrados na Figura 51. A vazão e o volume de injeção foram de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ e $20,0 \mu\text{L}$, respectivamente. Comprimentos de onda de medida situavam na faixa de 480 e 520 nm. Na Figura 52-B são mostrados uma série de 3 injeções, em diferentes vazões, seguidas de injeções de solução branco (sem glicose).



Com base nos resultados descritos acima, é bastante claro que tanto a taxa de fluxo quanto o volume injetado desempenham um papel importante neste sistema. O aumento do volume injetado proporciona mais reagentes ao sistema, o que leva a um sinal mais acentuado. Para um mesmo volume injetado, tempos de residência mais longos favorecem o aumento das taxas de bioconversão.

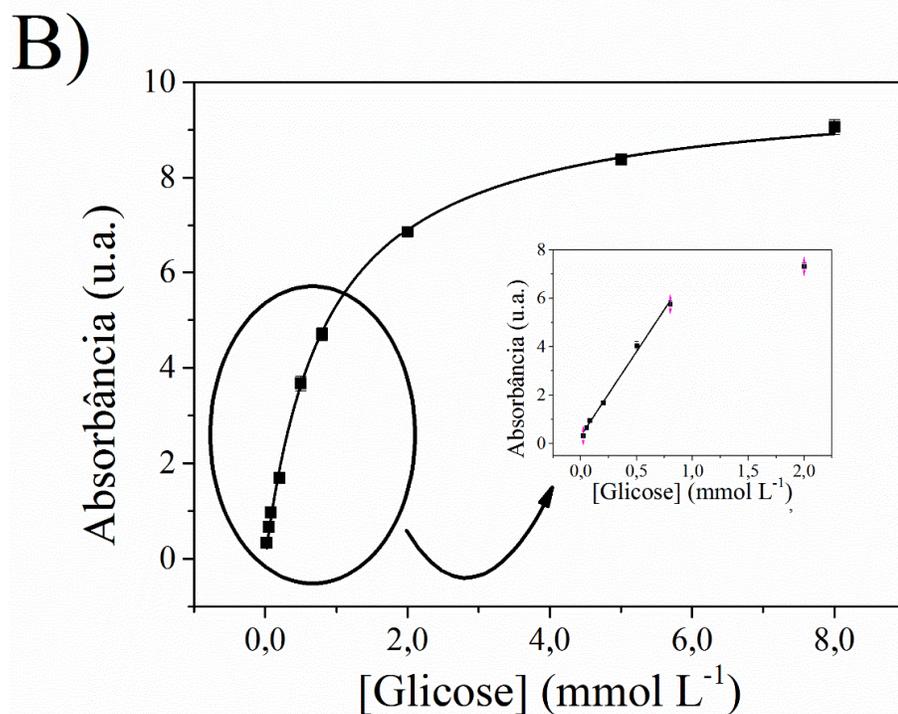
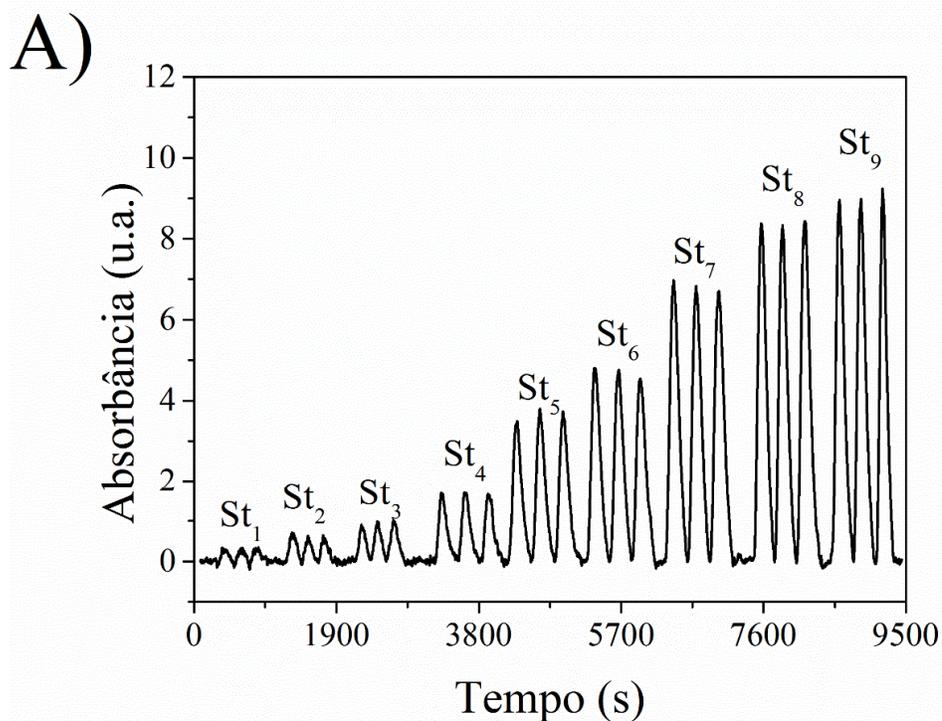
O estudo envolvendo a variação do volume injetado (Figura 53-A) mostra que o sinal de absorvância aumenta linearmente até 25,0 μL , atingindo um estado estacionário quando maiores volumes são injetados. Nesta condição (25,0 μL), o volume injetado é suficiente para ocupar todo o microreactor, uma vez que o volume interno do microcanal corresponde $\sim 21 \mu\text{L}$. Sob esta condição, os efeitos de dispersão desaparecem e o sinal obtido alcança o estado estacionário. Estas experiências foram realizadas a uma taxa de fluxo constante de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$.

No estudo envolvendo variação das taxas de fluxo (Figura 53-B), foi observado um sinal negativo inesperado para taxas de fluxo elevadas. Este sinal (negativo) desapareceu para valores menores. Quando elevadas taxas de fluxo são aplicadas, a bioconversão é menor, a quantidade de reagentes restantes é elevada e a formação da espécie colorimétrica é pequena, razão para o aparecimento do pico negativo, provavelmente resultante do efeito Schlieren. Para verificar esta hipótese, uma série de injeções de soluções contendo os reagentes (5,00 mmol L^{-1} de fenol e 0,50 mmol L^{-1} de 4-aminoantipirina em solução tampão fosfato 0,10 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,0$), sem qualquer adição de glicose, foram feitas em todas as taxas de fluxo. A diferença de composição da solução carreadora e a solução injetada provoca esta perturbação, uma vez que nenhum composto cromóforo está presente. Por outro lado, quando 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose são injetados, este comportamento é observado somente a velocidades de fluxo elevadas, devido à baixa taxa de formação de produto detectável (a solução injetada é muito semelhante ao branco). Diminuindo a taxa de fluxo, a formação do composto cromóforo irá aumentar, resultando na supressão quase total do efeito Schlieren. Para os seguintes experimentos, uma condição intermediária, injetando volumes de 20,0 μL e uma taxa de fluxo de 60,0 $\mu\text{L min}^{-1}$, foram adotadas. Nesta condição, uma frequência analítica de 35 amostras h^{-1} pode ser conseguida.

A Figura 54 mostra a relação entre a concentração de glicose e a absorvância medida. Um aumento linear de 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 800,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pode ser observado (Abs

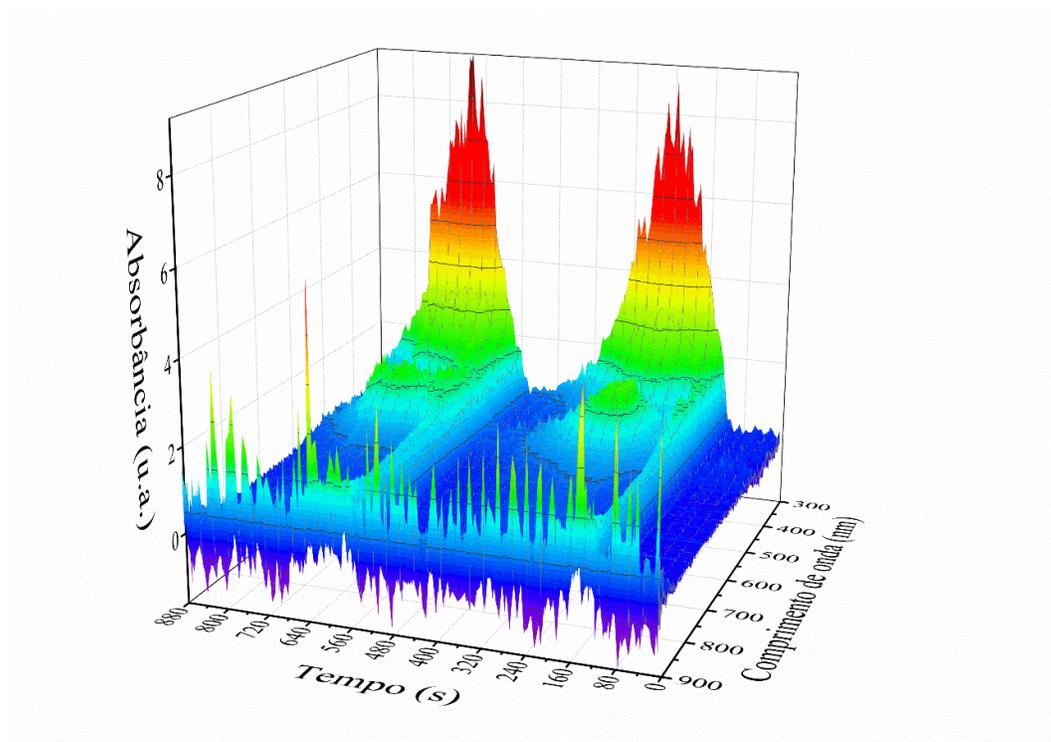
(u.a.) = $0,330 (\pm 0,089) + 6,961 (\pm 0,226)$ [Glicose] ($\mu\text{mol L}^{-1}$). Os limites de detecção e quantificação calculados foram de $0,27 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,88 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. As concentrações mais elevadas de glicose mostraram um desvio linear na resposta analítica, provavelmente devido à saturação dos centros ativos das enzimas imobilizadas. O perfil obtido para concentrações de glicose é muito semelhante ao observado para curvas de Michaelis-Menten. Porém, os valores de K_m e V_{\max} para esse sistema não possuem expressividade visto que ambas as enzimas agem conjuntamente na resposta analítica. A atividade de um microreator assim preparado diminuiu para 36,2% da sua atividade inicial após uma série de 1000 injeções. As condições de armazenamento seguiram as descritas no item 3.2.4. do Capítulo 3 Esta redução da atividade pode ser a soma de diferentes fatores, entre elas a inativação e a remoção das enzimas por lixiviação das paredes do reator. No entanto, para novas aplicações esta variação pode ser corrigida por novas calibrações após os intervalos de medição.

Figura 54: Injeções consecutivas de padrões de glicose e sua correlação com a absorbância medida. $St_1 = 20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_2 = 50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_3 = 80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_4 = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_5 = 500 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_6 = 800 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_7 = 2,00 \text{ mmol L}^{-1}$, $St_8 = 5,00 \text{ mmol L}^{-1}$ e $St_9 = 8,00 \text{ mmol L}^{-1}$. A faixa linear obtida é destacada. Condições de medida: volume de injeção de $20,0 \mu\text{L}$ e vazão de $60,0 \mu\text{L min}^{-1}$.



Depois de estabelecer as melhores condições para a imobilização das enzimas e os melhores parâmetros operacionais, foi realizada a análise de glicose em soro sanguíneo humano para demonstrar a versatilidade do método descrito. Para este ensaio, uma amostra de soro sanguíneo humano masculino coagulado (tipo AB) foi utilizada. A Figura 55 mostra o sinal espectrofotométrico obtido em diferentes comprimentos de onda, após a passagem da amostra através do microreactor modificado. Esta figura ilustra duas injeções sucessivas, sob baixa taxa de fluxo, para melhor visualização do processo.

Figura 55: Resposta espectrofotométrica para glicose após duas injeções de uma amostra de soro sanguíneo humano no sistema proposto. Condições de medida e de imobilização foram as mesmas previamente descritas.

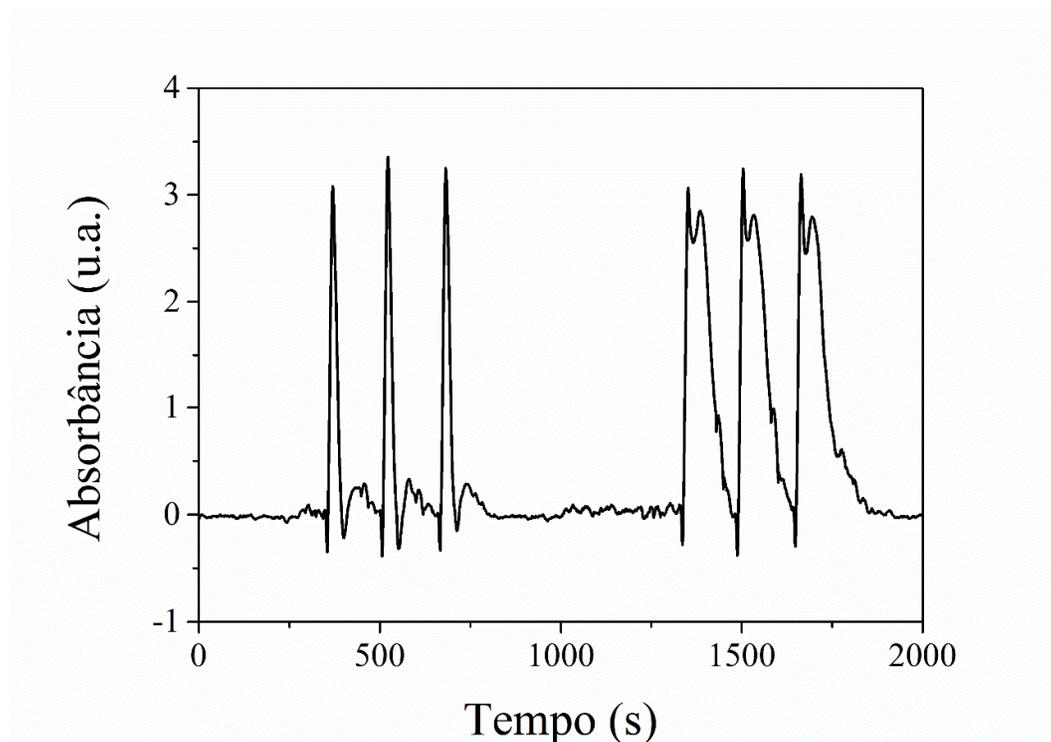


Fonte: arquivo pessoal

A injeção de amostra de soro humano resultou num comportamento curioso no sistema, representado na Figura 55. Quando o “plug” de amostra atingiu a célula de detecção, um intenso desvio da linha base ($\sim 2,0$ u.a.) apareceu. Rapidamente, a absorvância medida diminuiu para próximo da linha de base e o sinal relacionado ao grupo cromóforo começou a aumentar. O sinal obtido quando a solução atinge a região de medição pode corresponder a um forte efeito Schlieren. Em poucos segundos, a parte da solução contendo o grupo cromóforo ocupa o volume da célula e, em seguida, os

espectros da reação principal são registrados no intervalo de 480-520 nm. Quando o tampão passa no reator, o sinal decai novamente à linha de base. Tal fato pode ser claramente observado na Figura 56, onde é mostrada a injeção de uma amostra de soro sanguíneo em um microreator sem ser modificado e em outro microreator contendo as enzimas.

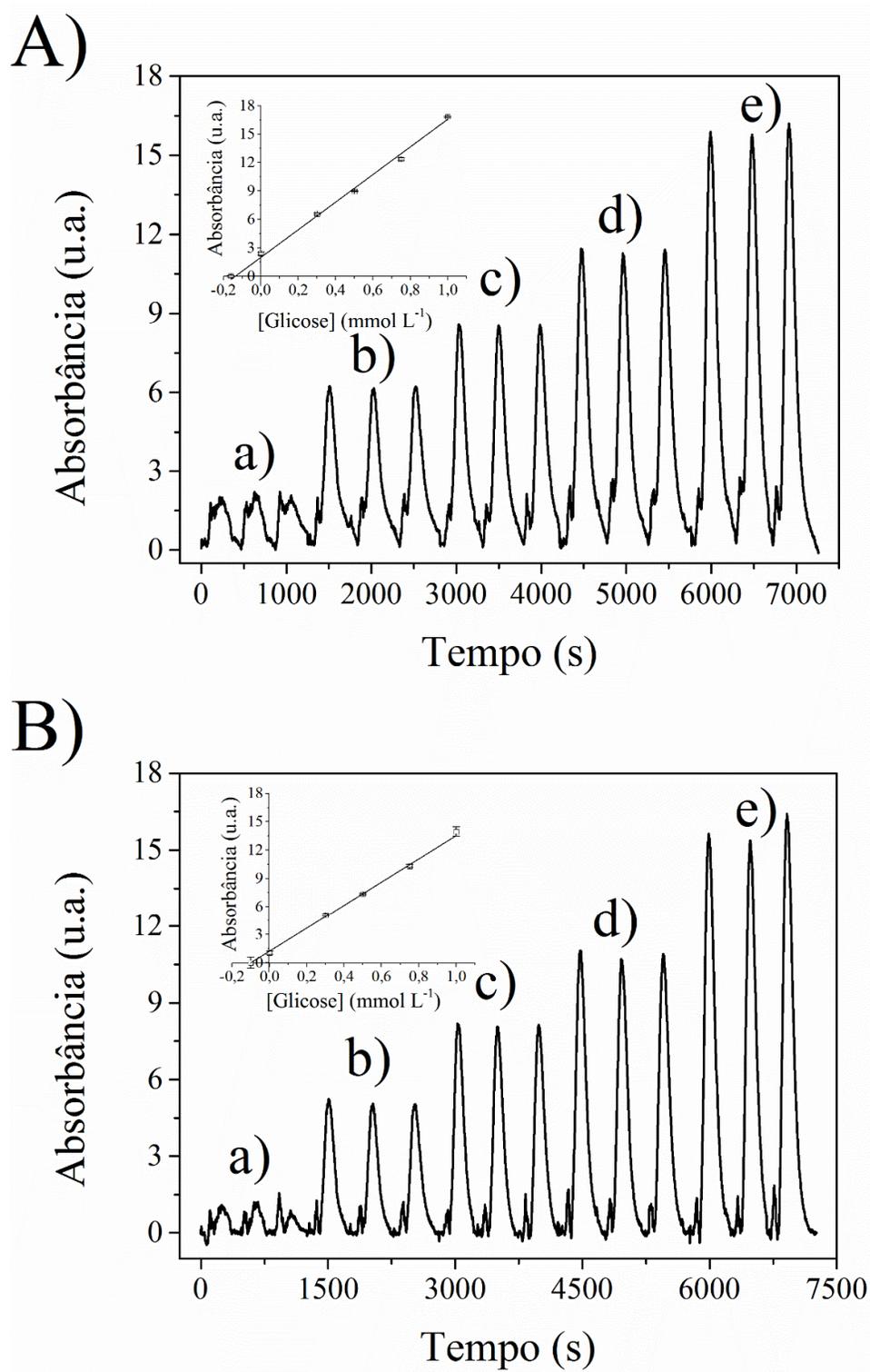
Figura 56: Sinais obtidos em microreatores sem as enzimas imobilizadas (à esquerda) e com as enzimas imobilizadas (à direita).



Fonte: arquivo pessoal

As análises da amostra de soro sintético foram feitas com soluções preparadas diariamente. A Figura 57 mostra os sinais obtidos para duas curvas analíticas por adição de padrão, uma considerando o sinal de interferência citado anteriormente ($Abs(u.a.) = 2,011 (\pm 0,281) + 0,014 (\pm 4,025e-4) [Glicose] (\mu mol L^{-1})$), a Figura 57-A) e outra após tratamento gráfico para ajuste da linha de base ($Abs(u.a.) = 1,239 (\pm 0,166) + 0,012 (\pm 3,399e-4) [Glicose] (\mu mol L^{-1})$), Figura 57-B). Ao comparar os interceptos de ambas as curvas de adição de padrão (2,011 e 1,239), fica claro que a interferência do sinal inicial resultaria em uma medição errônea. No entanto, é possível ver que as sensibilidades obtidas são semelhantes para ambas as curvas (0,014 e 0,012), indicando que a matriz da amostra não provocam qualquer interferência na resposta da glicose.

Figura 57: Análises de glicose realizadas em amostras de soro sanguíneo humano em A) considerando e em B) não considerando o sinal interferente. Adições de padrões foram realizadas nos níveis de $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$. Condições de medida e de imobilização são as mesmas previamente descritas.



Fonte: arquivo pessoal

A fim de avaliar a interferência da matriz da amostra, uma análise fotométrica convencional foi feita para determinar a quantidade real de glicose na amostra de soro humano e, com isso, avaliar a viabilidade das curvas analíticas obtidas anteriormente. A avaliação por espectroscopia no visível com o uso de cubetas é comumente utilizada em laboratórios clínicos e também é baseada na reação do Trinder. Nesta análise, a concentração de glicose determinada foi de $6,057 (\pm 0,309)$ mmol L⁻¹ (valor de referência de 2,775 a 9,990), enquanto que as obtidas pelo método de adição de padrão ignorando o sinal inicial foi de $5,482 (\pm 0,513)$ e o considerando o sinal inicial foi de $8,788 (\pm 0,254)$. Uma avaliação t-student foi feito para a comparação dos resultados obtidos. Os t-valores obtidos, com $\alpha = 0,05$, foram de 10,91 (considerando-se o sinal de inicial) e 1,382 (desconsiderando o sinal de inicial). Este resultado mostra o efeito crítico que o sinal de interferência tem sobre o sistema de fluxo proposto e que uma simples correção de linha de base pode ser usado para a determinação de glicose ($t_{\text{calculado}} = 1,382 < t_{\text{tabelado}} = 2,776$).

4.3 CONCLUSÃO

A reação de Trinder para a determinação de glicose em biofluidos já é bem conhecida e é comumente empregada em laboratórios de análises clínicas por meio de medidas espectrofotométricas em cubetas convencionais. Dessa forma, o microreator à base de GOx-HPR mostra algumas grandes vantagens como seu baixo custo, o baixo volume de amostra necessária e, mesmo com o observado decréscimo do sinal após algum uso, a possibilidade de reutilização (requerendo apenas uma nova calibração periodicamente) resultando em um menor consumo enzimático.

5 Desenvolvimento de um microreator enzimático baseado na polimerização de éter diglicídico do bisfenol-A e polietilenoamina

Resumo

Um novo reator enzimático de rápida fabricação, baixo custo e com elevada eficiência foi desenvolvido neste trabalho. À base de seu desenvolvimento foi a utilização de polietilenoimina (PEI) como agente de cura de uma resina epoxi éter diglicídico do bisfenol-A (BADGE), a fim de introduzir um grande número de grupos $-NH_2$ reativos no substrato. Uma mistura de proporção 3:2 PEI:BADGE (m:m) se mostrou a mais adequada para a cura tendo em vista o número de sítios de imobilização e a resistência do material utilizado para a microfabricação. Medidas eletroquímicas feitas por um sistema de três eletrodos (eletrodos de trabalho e auxiliar de platina e eletrodo de referência de $Ag/AgCl_{(sat)}$), adaptados diretamente ao sistema em fluxo, mostrou que os valores de K_m determinados para a enzima *glucose oxidase* (GOx) ($3,86 \pm 0,51$ mmol) foi duas vezes inferior aos valores publicados na literatura para GOx imobilizada em substratos derivados de PEI. O sistema empregando a detecção amperométrica mostrou uma resposta linear entre $8,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $8,00$ mmol L^{-1} de glicose, com valores de limite de detecção e quantificação de $1,94 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5,89 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Uma diminuição na resposta analítica do sistema em cerca de 41% após uma semana de uso intenso foi observada. Mesmo assim, a atividade remanescente foi suficiente para quantificações de aproximadamente $0,10$ mmol L^{-1} de glicose requisitando apenas uma nova calibragem do sistema antes da sua utilização. O sistema desenvolvido foi utilizado para quantificação de glicose em amostras de refrigerantes.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho apresentavam grau analítico. Di-hidrogeno fosfato de sódio e hidrogeno fosfato de sódio foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil). Glutaraldeído 25% (V/V), D-(+)-glicose foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Polietilenoimina (PEI) (PM médio = 750000 g mol⁻¹, 50% (m/v) em água) e 4-aminoantipirina foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). *Glicose oxidase* de *Aspergillus niger* (124 U mg⁻¹) foi adquirida da Toyobo (Osaka, Japão) e horseradish peroxidase (PER) (115 U mg⁻¹) da Seppim (Puteaux, France). Uma resina de éter diglicídico do bisfenol-A (BADGE) (Araldite Hobby®) foi adquirida da Brascola (Joinville, Brazil).

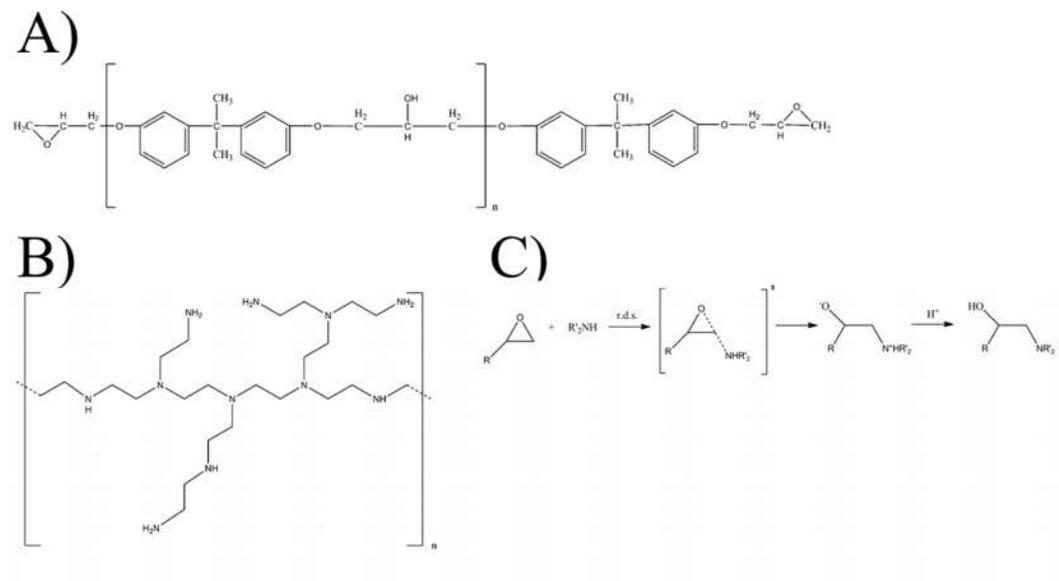
Todas as soluções foram preparadas com água dialisada e deionizada obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Dubuque, USA), com resistividade de 18,2 MΩ·cm. Todos os padrões e soluções enzimáticas foram preparadas em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH 7,00). Amostras de refrigerante, usados para avaliação do sistema contra amostras reais, foram adquiridas em um comércio local.

5.1.2 Instrumentação e construção dos microreatores

Os compostos à base de amina estão entre os agentes de cura mais utilizados para epóxi, visto que aminas primárias e secundárias são altamente reativas com epóxi. O processo de cura foi realizado pela mistura manual de diferentes razões de peso de PEI e BADGE (1:9, 3:7, 5:5, 7:3 e 9:1). Devido à fragilidade física inicial da mistura obtida, um suporte retangular de PMMA (75 mm x 20 mm x 5,0 mm), contendo uma depressão de menor dimensão (65 mm x 10 mm x 2,0 mm), foi utilizado para depositar o polímero não curado. Todos os cortes envolvidos foram feitos com uma impressora a laser de CO₂

(La Chapelle-St Luc, France). A estrutura química dos polímeros utilizados (Figura 58-A,B) e uma rota de reação já aceita pela comunidade científica para a cura de polímeros de base epóxi com aminas, seguindo um mecanismo SN_2 (Figura 58-C), são mostrados na Figura 58 (Ehlers *et al.*, 2007).

Figura 58: Estrutura química dos polímeros utilizados nesse estudo: A) BADGE e B) PEI. Em C) um mecanismo de cura de uma resina epóxido via substituição nucleofílica de segunda ordem (SN_2) é demonstrado (r.d.s.: etapa determinante de taxa, do inglês *rate determining step*)



Fonte: arquivo pessoal

Na estrutura de PMMA descrita acima, oito orifícios de 5,0 mm, para inclusão de parafusos, foram perfurados a fim de selar o dispositivo. Após a deposição, o sistema foi aquecido a 80 °C a fim de acelerar o processo de cura do polímero formado⁸⁵. Após resfriamento, a superfície obtida foi polida com uma lixa (com granulometria de 2000) até se atingir o nível da estrutura de PMMA. Um material elastomérico (uma fina folha de 200 µm de PDMS) foi usado como espaçador para o processo de vedação por pressão. Uma cobertura de PMMA, com 3,0 mm de espessura, e oito parafusos foram utilizados para selar o dispositivo. Além disso, dois orifícios de 2,0 mm de diâmetro e um terceiro furo com 0,8 mm (a 45° da entrada de fluxo) foram furados na tampa de PMMA. Os dois primeiros foram utilizados para entrada e saída do eletrólito suporte, enquanto o último foi utilizado para injeção da amostra. Uma representação do dispositivo, com todos os seus componentes, está descrita na Figura 59-A.

Os desenhos dos canais foram feitos no software Corel Draw 12 (Corel Corporation versão 12.0.0.458-2003). Microcanais com 60,0 mm x 300 μm x 100 μm foram criados na superfície do polímero por meio de ablação com laser de CO_2 , sendo as configurações do laser utilizada as mesmas apresentadas no Capítulo 3. Os resíduos de material condensado foram removidos manualmente a partir do interior do microcanal com uma agulha, seguido por sopro de ar pressurizado. Antes de prosseguir para a imobilização de enzimas, a estrutura interior dos microcanais foi copiosamente limpa com solução tampão de fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7,00).

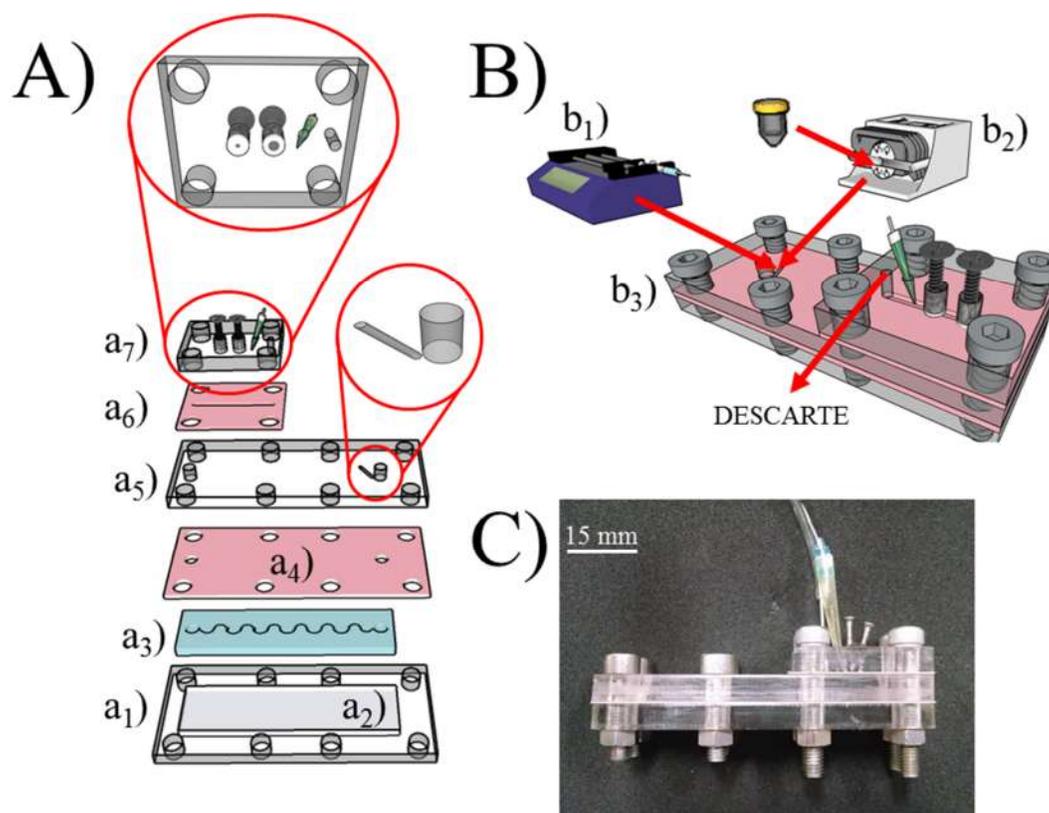
As superfícies dos polímeros foram caracterizadas por espectroscopia Raman, realizada com um microscópio modelo WITec confocal Raman Alpha 300R equipado com lasers Ar, Nd: YAG e He-Ne. Os espectros foram adquiridos com o laser operando a 532 nm.

Os principais componentes utilizados nas medições são apresentados na Figura 59-B. O sistema de fluxo foi composto de dois sistemas de propulsão distintos: uma bomba de seringa (b1) (Cole Parmer GV-74905-08) para impelir o eletrólito suporte e uma bomba peristáltica programável (b2) (Reglo MS digital, Ismatec) para introduzir alíquotas reprodutíveis de amostra no microdispositivo (b3). Um tubo de Tygon[®] com 0,3 mm de diâmetro interno foi utilizada para injeção de amostra no sistema.

As medições eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato μ -Autolab tipo III (EcoChemie, Holanda), com um sistema de três eletrodos operando no modo cronoamperométrico. Uma célula eletroquímica (a7) foi feita de forma a adaptar-se diretamente na saída do dispositivo. Para isto, uma placa de PMMA (30,0 mm x 20,0 mm x 5,00 mm) foi utilizada como base para a célula eletroquímica. Quatro furos com 5,0 mm foram perfurados a fim de ajustar os parafusos de vedação. Uma fina placa de PDMS (com 200 μm de espessura) foi utilizada como espaçador e para limitar as bordas da célula eletroquímica. Além disso, quatro furos de 1,00 mm foram perfurados na placa de PMMA, onde um deles foi utilizado para entrada do fluxo carreador, enquanto os outros três para encaixar o sistema de três eletrodos. Duas peças de platina foram usados como eletrodo de trabalho (200 μm de diâmetro) e contra eletrodo (800 μm de diâmetro), com parafusos de aço inox usados para contato.

Com o objetivo de garantir um contato elétrico adequado, os dois orifícios contendo as peças de platina foram cuidadosamente preenchidos com pó de grafite em óleo mineral. Estes dois eletrodos foram fixados na extremidade inferior da placa de PMMA com uma fina camada de Araldite. Após a secagem, esta camada foi polida até que as superfícies eletrodos fossem expostas. Finalmente, um eletrodo de referência de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ ⁸⁵ foi usado para compor a célula eletroquímica. Uma imagem do dispositivo é mostrada na Figura 59-C.

Figura 59: A) Configuração do micro-reator: a₁) placa de PMMA usada como suporte para deposição da mistura BADGE/PEI, a₂) depressão retangular preenchida com a mistura polimérica, a₃) mistura BADGE/PEI gravada com os microcanais, a₄) placa de PDMS com 200 μm de espessura usada como espaçador para vedação do dispositivo, a₅) placa de PMMA com 3,0 mm de espessura utilizada como “tampa” do sistema (furos de 2,0 mm – para entrada do fluxo – e de 0,8 mm, com ângulo de 45°, foram gravados na entrada do sistema e estão destacados na figura), a₆) placa de PDMS com 200 μm de espessura para vedação da célula eletroquímica e a₇) célula eletroquímica (uma visão inferior da mesma é destacada). B) Configuração do sistema em fluxo aplicado: b₁) bomba de seringa temporizada e b₂) bomba peristáltica temporizada e b₃) micro reator. C) Imagem do microdispositivo.



Fonte: arquivo pessoal

A avaliação da exatidão do método proposto para determinação de glicose em amostras de bebidas foi realizada através de uma comparação estatística com uma metodologia espectrofotométrica (reação de Trinder⁸⁵). Uma mistura de 5,0 mmol L⁻¹ de

fenol, 0,50 mmol L⁻¹ de 4-aminoantipirina, 15,0 U mL⁻¹ de GOx e 20,0 U mL⁻¹ de HPR, tudo em uma solução 0,10 mol L⁻¹ de tampão de fosfato (pH 7,0) foi usada para a detecção de glicose por fotometria. As medições foram feitas usando uma célula de quartzo com um percurso óptico de 1,00 cm usando um espectrofotômetro 600 Plus (Femto, Brasil), operando a 500 nm.

5.2 METODOLOGIA ANALÍTICA

A modificação dos microcanais para a imobilização da GOx foi feita nas mesmas condições de unidades de enzima, tempo de reação e concentração de reagentes do trabalho descrito no item 3.2.1 (Capítulo 3). O intuito de não avaliar as condições de imobilização foi para se ter um ponto de comparação de dois diferentes microreatores, sob as mesmas condições de imobilização. Assim, diferentes resultados podem ser atribuídos diretamente à eficiência da superfície do polímero com relação a imobilização das enzimas.

Uma vez que os grupos epóxi são pouco reativos para a imobilização direta da proteína ⁸⁶ uma solução contendo 0,10% (v/v) de glutaraldeído (um agente de reticulação utilizado para grupos NH₂) e 25,0 U de GOx foi utilizado para realizar a imobilização da enzima.

Todos os passos foram feitos com um canal fechado e sem a célula eletroquímica. Neste caso, e de modo a impelir as soluções através do dispositivo, foi utilizada uma cobertura de PMMA com as mesmas dimensões das usadas para o suporte de polímero.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Caracterização do material

Como descrito anteriormente, massas diferentes de razões de BADGE e PEI foram estudados. Duas características principais, a estrutura química e rigidez física, foram avaliadas a fim de escolher a melhor composição. Como a imobilização ocorre mais rapidamente e são mais estáveis em grupos epóxi-amino, se comparado a imobilização direta através de grupos epóxi, o objetivo foi a obtenção de uma mistura que abrangesse ambos os grupamentos funcionais ⁸⁵.

A Figura 60 mostra as imagens macroscópicas e microscópicas de uma pequena porção de cada proporção testada (9:1, 3:7, 5:5 e 7:3 - BADGE (mg):PEI (mg)). A proporção 1:9 (BADGE:PEI) não foi apresentada visto que a mesma não apresentou rigidez física necessária para construção de microcanais. Uma avaliação macroscópica da proporção 9:1 (BADGE:PEI) permite constatar que a mesma não pode ser utilizada devido ao aspecto quebradiço obtido para a mistura, provavelmente devido a cura incompleta do material. A proporção 3:7 (BADGE: PEI) também não pode ser empregada uma vez que a mesma apresentou grande fragilidade mecânica, muito devido à grande quantidade de PEI que torna o polímero formado extremamente higroscópico, levando o mesmo à fragilidade física observada. Já as proporções 7:3 e 5:5 (BADGE:PEI) apresentaram boa rigidez mecânica e ainda, o aspecto rugoso demonstrado nas imagens microscópicas, tornam essas misturas vantajosas para o processo biocatalítico, visto que um maior contato entre solução e substrato é esperado.

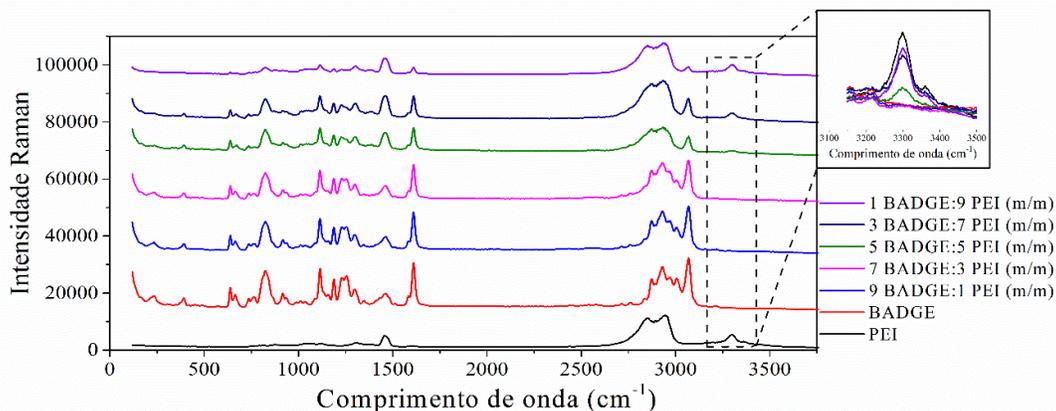
Figura 60: Aspecto físico e microscopia das diferentes misturas poliméricas estudadas. Relação %m:m utilizada no processo: A) 9 BADGE: 1 PEI, B) 7:BADGE: 3 PEI, C) 5: BADGE: 5: PEI e D) 3 BADGE: 7 PEI. A proporção 1 BADGE: 9 PEI não é apresentada devido à cura incompleta do material polimérico.



Fonte: arquivo pessoal

A Figura 61 mostra os espectros Raman obtidos para todas as proporções avaliadas de BADGE:PEI, além dos obtidos para os polímeros *in natura*.

Figura 61: Espectros Raman obtidos para PEI pura, para a resina epóxico não curada e para diferentes razões m/m do polímero estudado. Uma banda de média intensidade entre 3160-3450 cm^{-1} é destacada (referente ao estiramento vibracional de $-\text{NH}_2$ alifático).



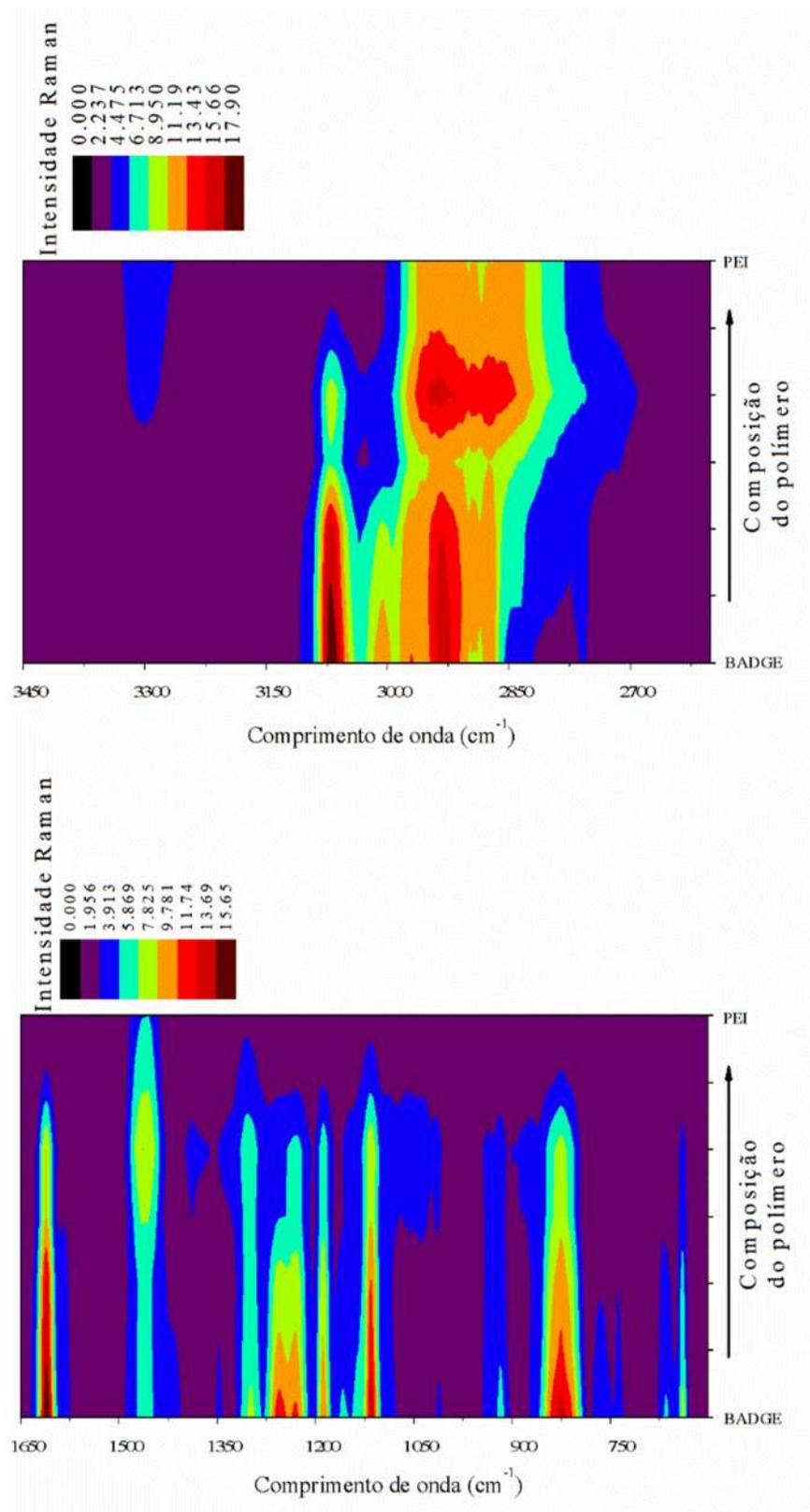
Fonte: arquivo pessoal

Analisando as bandas características para cada polímero, algumas delas podem ser associadas aos mesmos e assim determinar a melhor proporção de mistura. Para PEI, bandas de média intensidade entre 3450-3160 cm^{-1} (estiramento de $-\text{NH}_2$ alifático) e

1470-1430 cm^{-1} (vibração e deformação de $-\text{CH}_2$ de $-\text{CH}_2\text{NH}_2$), podem ser associadas. Para a resina epóxi, bandas intensas relacionadas a epóxidos monosubstituídos foram encontradas na faixa de 3075-2970 (estiramento simétrico e assimétrico de CH), 1445-1375 (deformação e vibração de -CH), 1265-1245 (estiramento do anel epóxido) e 965-810 (vibração e deformação simétrica e assimétrica do anel).

A polimerização é esperada de ocorrer através de ataque nucleofílico do átomo de nitrogênio ao átomo de carbono do anel epóxido, seguido pela transferência de um átomo de hidrogênio da amina para o oxigênio do anel epóxido, com a formação de uma hidroxila (Figure 58-C) (Ehlers *et al.*, 2007). Dessa maneira, foram investigadas várias misturas de BADGE e PEI, em proporções variáveis de 10%, visando avaliar a polimerização através dos grupos reativos. Superfícies de contorno dos espectros Raman obtidos para os polímeros obtidos mostraram incremento em bandas que podem ser associados a formação de álcoois secundários. Bandas de intensidade média a alta, características de álcoois secundários na faixa de 1150-1075 (estiramento C-O, que geralmente se mostra na forma de multipletos devido a acoplamentos) e 900-800 (estiramento $-\text{CCO}$) foram observados (Figura 62). Outras bandas características em 1440-1260 (deformações fora do plano de O-H e bandas vibracionais de álcoois secundários) e 1430-1370 (deformação de O-H no plano e vibrações de $-\text{OH}$ acopladas com oscilações CH), também puderam ser observadas.

Figura 62: Superfícies de contorno dos espectros Raman obtidos para diferentes composições poliméricas.

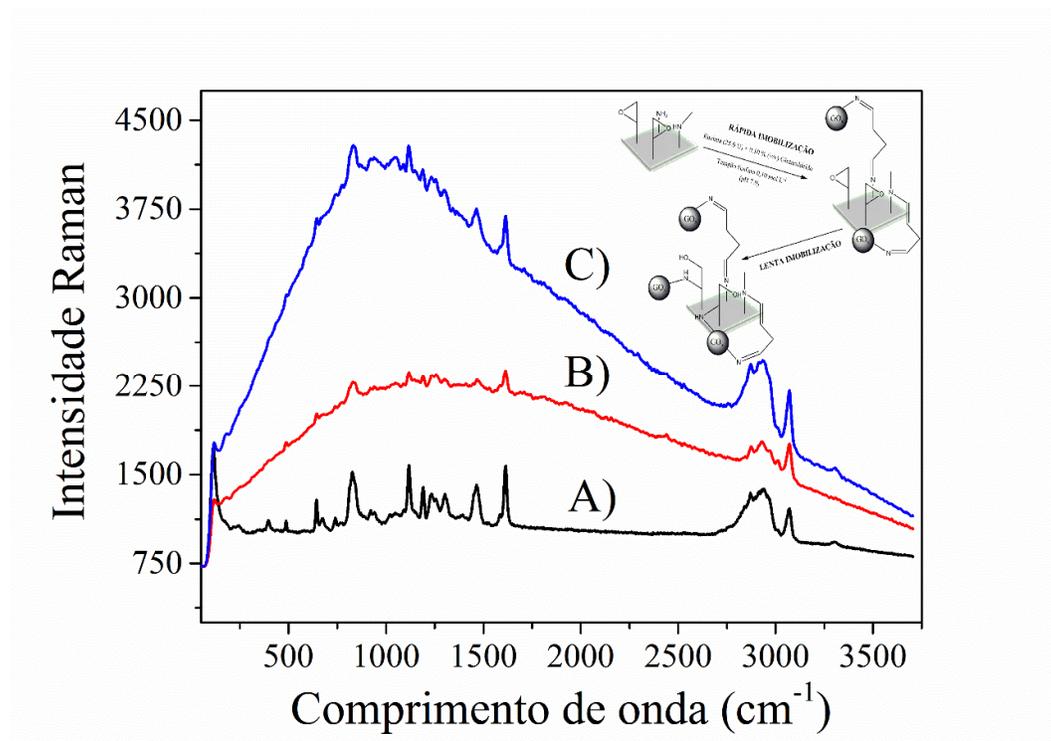


Fonte: arquivo pessoal

Como a imobilização via ligação cruzada é esperada por ocorrer via os grupamentos $-NH_2$, apenas as misturas com proporção de PEI, iguais ou superiores a 50% (m/m), foram avaliadas visto que nenhuma banda relacionada a tais grupamentos foram avaliadas para menores razões desse polímero (Figura 61). No entanto, o aumento do conteúdo de PEI na mistura aumentou a fragilidade física do polímero obtido (Figura 60), provavelmente devido à saturação dos grupos epóxi e ao excesso de PEI na mistura, um polímero altamente hidrofílico. Nesse contexto, uma proporção final de 60% PEI e 40% BADGE foi utilizada para o processo de cura do polímero.

A imobilização de GOx foi realizada após a microcanalização do polímero, como descrito no item 5.1.2 desse capítulo. Para confirmar a imobilização da enzima, medidas por espectroscopia Raman foram realizadas após cada uma das etapas de imobilização. Conforme mostrado na Figura 63, um incremento no sinal de fluorescência é observado após a passagem de glutaraldeído e enzima, devido ao grande número de duplas ligações formadas após a reação de adição nucleofílica entre as aminas primárias (iminas) e secundárias (enaminas) com os grupamentos formil do glutaraldeído. Além disso, o grupo prostético altamente fluorescente da GOx, o dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD), contribuiu claramente com o sinal obtido (Figura 63-C) (Cerqueira Ferreira *et al.*, 2013).

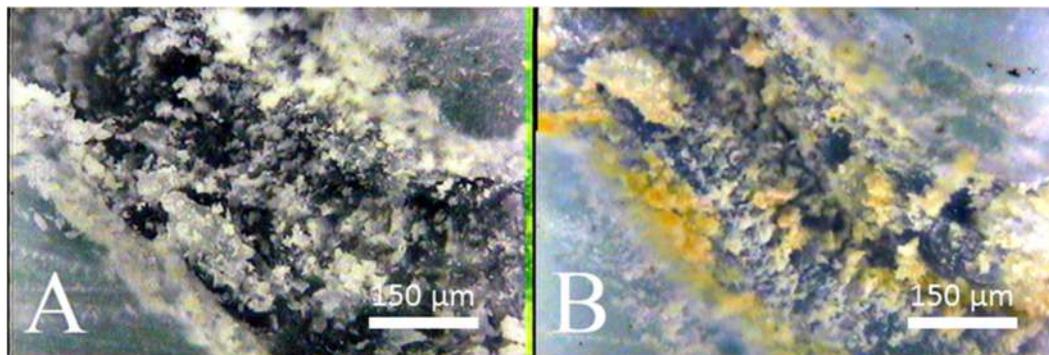
Figura 63: Espectros Raman de a) um polímero recém obtido na proporção 3:2 (m/m), b) após a passagem de 0,10% (v/v) de uma solução de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 mol l⁻¹ (pH 7,0) e c) após a passagem de uma solução de 25,0 U de GOx na composição b). Uma possível rota de reação para a imobilização da enzima na superfície polimérica é demonstrada.



Fonte: arquivo pessoal

Imagens microscópicas de microcanais obtidos antes e após o processo de imobilização são mostrados na Figura 64. Os pontos amarelos observados na estrutura do material mostram os prováveis pontos onde a reação com o glutaraldeído ocorrem.

Figura 64: Imagens dos microcanais a) antes e b) após imobilização.

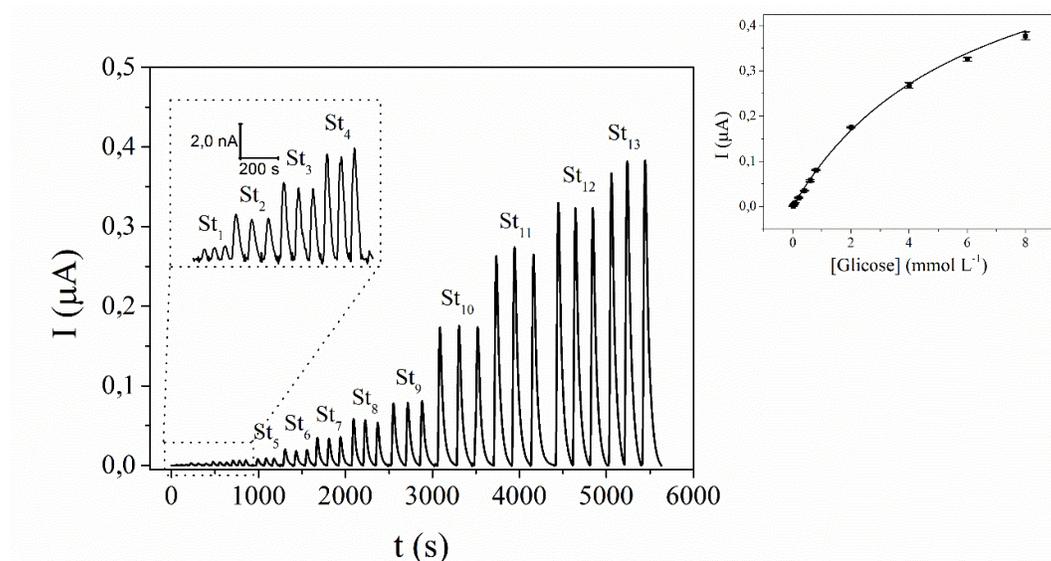


Fonte: arquivo pessoal

5.3.2 Estudo cinético

Tomando como base uma proporção de formação de polímero 6:4 (%m/m), estudos cinéticos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a eficiência do dispositivo. Com o objetivo de determinar os parâmetros cinéticos e a faixa de resposta linear do sistema, medidas eletroquímicas relativas ao peróxido de hidrogênio gerado foram conduzidas em uma faixa de concentração de glicose de $8,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $8,00 \text{mmol L}^{-1}$ (Figura 65). Uma relação linear foi observada entre $8,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,00 \text{mmol L}^{-1}$ ($I (\mu\text{A}) = 0,002(\pm 0,001) + 0,088(\pm 0,001) [\text{Glicose}] (\text{mmol L}^{-1})$, $R^2: 0,996$). As respostas obtidas para a mesma faixa, com respostas diretas para H_2O_2 , levaram a uma relação linear com equação $I (\mu\text{A}) = 0,010(\pm 0,002) + 0,238(\pm 0,011) [\text{H}_2\text{O}_2] (\text{mmol L}^{-1})$, $R^2: 0,999$.

Figura 65: Avaliação da faixa linear do microreator desenvolvido na faixa de $\text{St}_1: 8,00 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{St}_2: 20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{St}_3: 40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{St}_4: 60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{St}_5: 80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{St}_6: 200 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{St}_7: 400 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{St}_8: 600 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{St}_9: 800 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{St}_{10}: 2,00 \text{mmol L}^{-1}$, $\text{St}_{11}: 4,00 \text{mmol L}^{-1}$, $\text{St}_{12}: 6,00 \text{mmol L}^{-1}$ e $\text{St}_{13}: 8,00 \text{mmol L}^{-1}$. Medidas foram realizadas aplicando um potencial de $+0,60\text{V}$ vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$. Solução carreadora: tampão fosfato $0,10 \text{mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Volume injetado: $10,0 \mu\text{L}$. Vazão: $150 \mu\text{L min}^{-1}$.



Fonte: arquivo pessoal

Valores de V_{max} e K_{M} foram calculados como descritos na seção 2.4.1 (Capítulo 3), sendo obtidos valores de $75,9 \pm 6,8 \text{nmol min}^{-1}$ (V_{max}) e $3,86 \pm 0,51 \text{mmol}$ (K_{M}) para o sistema. Se comparado aos obtidos para o estudo anterior, onde a GOx foi imobilizada em um microreator de PMMA:PEI, o valor de K_{m} obtido foi duas vezes menor. Esse valor mostra a boa estabilidade da enzima imobilizada no dispositivo, já que menores valores

de K_M mostram que a enzima atinge sua máxima atividade catalítica em pequenas concentrações de substrato. No entanto, o valor de V_{max} obtido nesse estudo foi seis vezes menor do que o descrito no item 3.2.4.1 (Capítulo 3), indicando uma clara redução na quantidade de enzima imobilizada, provavelmente devido ao menor comprimento do percurso analítico. A superfície ativa mostrou uma taxa de bioconversão de glicose de 6,92%.

5.3.3 Desempenho do dispositivo frente à análise de glicose

O desvio padrão (d.p.) da menor concentração de glicose detectável ($5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi utilizado para determinar os limites de detecção (3,3 vezes o d.p.) e quantificação (10 vezes o d.p.) do método, com valores definidos de $1,94 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5,89 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

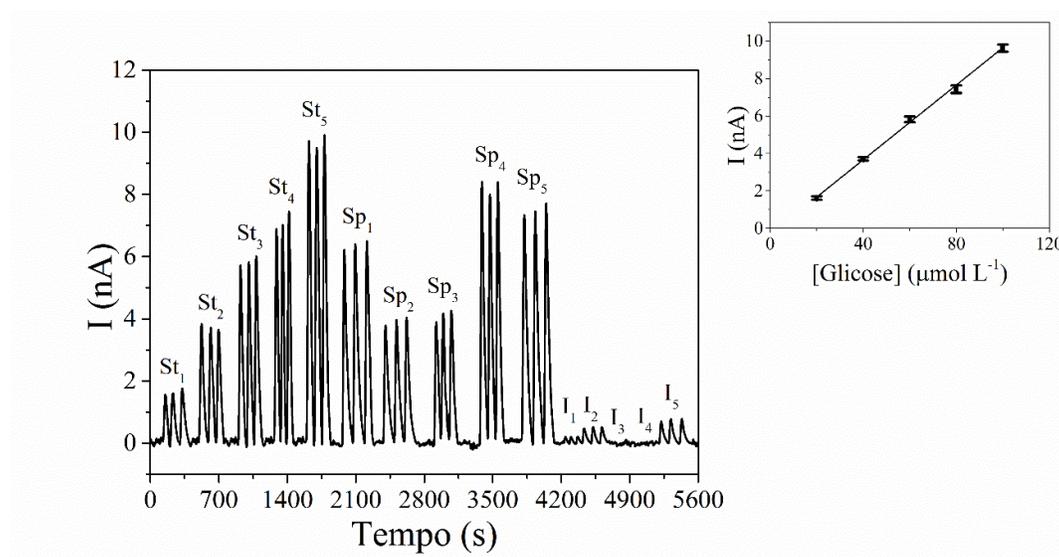
Para avaliar a repetibilidade do método proposto, 100 injeções de glicose ($80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram realizadas, obtendo um valor de corrente médio de $7,19 \text{ nA}$, com desvio padrão relativo (d.p.r.) de 8,16%. A rugosidade do material obtido não demonstrou influência significativa sobre a repetibilidade do método. A frequência analítica obtida foi de 58 amostras por hora (com uma taxa de fluxo de $150 \mu\text{L min}^{-1}$). Para avaliar a estabilidade do sistema, 1000 injeções de glicose ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) foram realizadas com um único reator, por um período de 1 semana, mostrando um decréscimo no sinal obtido de 41%. As condições de armazenamento seguiram as descritas no item 3.2.4.

5.3.3.1 *Quantificação de glicose em amostras de refrigerantes*

Amostras de refrigerantes foram analisadas após desgaseificação em banho ultrassônico. Diferentes taxas de diluições – Sp_1 , Sp_3 , Sp_4 e Sp_5 1:800 (v/v), e Sp_2 : 1:4000(v/v) – foram adotadas de acordo com o sinal de glicose obtido nas amostras. As amostras foram diluídas diretamente em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e injetadas

no microdispositivo. A Figura 66 mostra as respostas de corrente obtidas para padrões de glicose entre $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $I \text{ (nA)} = -0,32 (\pm 0,11) + 0,09 (\pm 0,02) [\text{Glicose}] \text{ (}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)}$, $R^2: 0,998$), para microreatores –com e –sem GOx imobilizada. O último grupo de medidas foi realizado com o objetivo de avaliar a presença de espécies interferentes no sistema. Como pode ser observado, mesmo após elevada diluição, sinais de interferentes ainda foram detectados, sendo os mesmos subtraídos dos valores totais obtidos para suas respectivas amostras.

Figura 66: Análise de amostras de refrigerantes. Curva de calibração na faixa de $St_1: 20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_2: 40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_3: 60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $St_4: 80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $St_5: 100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições de medidas: as mesmas listadas na Figura 66. Sp: amostra após o tratamento com GOx. I: injeção direta da amostra em um reator não imobilizado (avaliação de interferentes). Diluição das amostras: Sp_1, Sp_3, Sp_4 e Sp_5 1:800; Sp_2 1:4000. A curva analítica obtida para a quantificação de glicose também é mostrada.



Fonte: arquivo pessoal

Como pode ser observado na Figura 66, a curva analítica obtida foi adequada para a quantificação de glicose nas amostras analisadas. A Tabela 6 mostra os valores de concentração, com seus respectivos desvios padrões relativos, obtidos para D-glicose em cada uma das amostras analisadas via amperometria e espectrofotometria. Para comparar os resultados, uma avaliação estatística baseada no teste t-pareado foi aplicada. O valor obtido mostrou que os métodos não apresentam divergências significativas entre si ($t_{\text{calculado}, 0,05, 4} = 0,73 < t_{\text{tabelado}, 0,05, 4} = 2,78$).

Tabela 6: Valores obtidos para as amostras de refrigerante analisadas pelo método proposto e por análise fotométrica.

Amostra	Análise amperométrica		Análise fotométrica	
	\bar{X} (g L ⁻¹)	d.p.r. (%)	\bar{X} (g L ⁻¹)	d.p.r. (%)
Sp ₁	95,9	1,1	88,3	1,2
Sp ₂	304,6	1,3	310,1	0,8
Sp ₃	63,2	2,6	58,7	1,4
Sp ₄	123,3	2,0	115,2	1,0
Sp ₅	111,9	1,5	120,1	0,9

5.4 CONCLUSÃO

Um microreator enzimático de baixo custo e fácil preparação, baseado na polimerização de uma resina epóxido com PEI, foi desenvolvido. O material obtido, em uma mistura final de proporção 3:2 PEI:BADGE (m/m), mostrou boa resistividade física podendo ser utilizadas para microfabricação com laser de CO₂. *Glicose oxidase* (GOx) foi imobilizada com sucesso no dispositivo proposto mostrando uma boa perspectiva para a aplicação deste dispositivo. Uma diminuição na resposta analítica, após uma semana de intensa utilização, foi observada (cerca de 41%), porém sem demonstrar um aspecto crítico para o dispositivo, uma vez que a substituição por uma nova resina não é trabalhosa. Mesmo assim, a atividade remanescente ainda foi suficiente para a quantificação de concentrações de glicose de 0,10 mmol L⁻¹, requerendo apenas uma nova calibragem do reator antes da sua utilização.

6 Conclusões finais e perspectivas futuras

Foi possível através dos resultados encontrados nesse trabalho mostrar o sucesso da imobilização de diferentes enzimas [*glicose oxidase* (GOx), *ascorbato oxidase* (AAO), *catalase* (CAT), *peroxidase* (HRP) e *glutamato dehidrogenase* (GDH)] em microcanais confeccionados sobre duas diferentes bases poliméricas: poli(metil metacrilato) modificado com polietilenoimina (PEI) e uma resina de éter diglicídico do bisfenol-A (BADGE) também modificada com polietilenoimina (PEI). Um simplificado processo de imobilização baseado na funcionalização de ambas superfícies modificadas com um agente espaçador (glutaraldeído), permitiu uma rápida e eficiente imobilização, mostrando a grande versatilidade das metodologias descritas.

Condições de construção e aplicação dos microcanais foram estudadas a fim de se extrair a melhor performance do sistema. Além disso, efeitos da imobilização enzimática sobre a resposta analítica e, logo, sobre a ação catalítica das enzimas empregadas foi avaliado. Com os valores obtidos, foi possível inferir que os métodos apresentaram parâmetros cinéticos próximos ou superiores aos relatados na literatura. As determinações desses parâmetros foram feitas em sistemas analíticos baseados em detecções eletroquímicas (GOx, AAO e CAT) e espectrofotométricas (GOx-PER). Tais sistemas foram também empregados para a realização de análises em amostras reais para mostrar a potencialidade de aplicação dos microdispositivos confeccionados.

Os resultados mostrados nesse trabalho revelam o potencial de aplicação dos sistemas enzimáticos desenvolvidos como dispositivos microanalíticos e até como futura base para sistema “lab-on-a-chip”.

Em cima dos pontos abordados no presente trabalho, tem-se como perspectiva futura:

- Aplicação dos microreatores já estudados para análise de diferentes amostras de interesse analítico;
- Avaliar a possibilidade de imobilização de diferentes classes de enzima e possíveis novas aplicações;
- Estudo de diferentes bases poliméricas para a imobilização de enzimas;
- Incorporação de microeletrodos aos sistemas de análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKYILMAZ, E.; DINCKAYA, E. A new enzyme electrode based on ascorbate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of L-ascorbic acid. *Talanta*, v. 50, n. 1, p. 87-93, Aug 1999. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000082773700010 >.

AKYILMAZ, E.; DINÇKAYA, E. Development of a catalase based biosensor for alcohol determination in beer samples. *Talanta*, v. 61, n. 2, p. 113-118, 10/17/ 2003. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914003002455> >.

ASANOMI, Y. et al. Enzyme-Immobilized Microfluidic Process Reactors. *Molecules*, v. 16, n. 7, p. 6041-6059, 2011. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/7/6041> >.

BAI, Y. L. et al. Surface modification for enhancing antibody binding on polymer-based microfluidic device for enzyme-linked immunosorbent assay. *Langmuir*, v. 22, n. 22, p. 9458-9467, Oct 2006. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241325200060 >.

BARBEHENN, R. et al. Evaluating Ascorbate Oxidase as a Plant Defense Against Leaf-Chewing Insects Using Transgenic Poplar. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, n. 10, p. 1331-1340, 2008/10/01 2008. ISSN 0098-0331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-008-9539-7> >.

BARHAM, D.; TRINDER, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*, v. 97, n. 1151, p. 142-145, 1972. ISSN 0003-2654. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/AN9729700142> >.

BENZ, C. et al. Chip-Based Free-Flow Electrophoresis with Integrated Nanospray Mass-Spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 54, n. 9, p. 2766-2770, 2015. ISSN 1521-3773. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201409663> >.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, Vol 11, v. 11, p. 127-152, 2005. Disponível em: < <Go to ISI>://CCC:000235654600004 <http://www.elsevier.nl> >.

BIBI, N. S. et al. Synthesis and performance of 3D-Megaporous structures for enzyme immobilization and protein capture. *Biotechnology Progress*, v. 27, n. 5, p. 1329-1338, 2011. ISSN 1520-6033. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.648> >.

BLANK, K.; MORFILL, J.; GAUB, H. E. Site-Specific Immobilization of Genetically Engineered Variants of *Candida antarctica* Lipase B. *ChemBioChem*, v. 7, n. 9, p. 1349-1351, 2006. ISSN 1439-7633. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200600198> >.

BOERIS, V. et al. The formation of non-soluble complexes between polyethyleneimine–anions and their potential use to isolate enzymes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 82, n. 2, p. 354-358, 2/1/ 2011. ISSN 0927-7765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776510005151> >.

BORREBAECK, C. A. K. Antibodies in diagnostics – from immunoassays to protein chips. *Immunology Today*, v. 21, n. 8, p. 379-382, 8/1/ 2000. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167569900016832> >.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KIPP, A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1790, n. 11, p. 1555-1568, 11// 2009. ISSN 0304-4165. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416509000592> >.

BROWN, L. et al. Fabrication and characterization of poly(methylmethacrylate) microfluidic devices bonded using surface modifications and solvents. *Lab on a Chip*, v. 6, n. 1, p. 66-73, 2006. ISSN 1473-0197. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235506300008 >.

BULMUS, V.; AYHAN, H.; PISKIN, E. Modified PMMA monosize microbeads for glucose oxidase immobilization. *Chemical Engineering Journal*, v. 65, n. 1, p. 71-76, Jan 1997. ISSN 0923-0467. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WQ37000009 >.

CAMARERO, J. A. NEW DEVELOPMENTS FOR THE SITE-SPECIFIC ATTACHMENT OF PROTEIN TO SURFACES. *Biophysical Reviews and Letters*, v. 01, n. 01, p. 1-28, 2006. Disponível em: < <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S1793048006000045> >.

CERDEIRA FERREIRA, L. M. et al. Miniaturized flow system based on enzyme modified PMMA microreactor for amperometric determination of glucose. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 47, n. 0, p. 539-544, 9/15/ 2013. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566313002224> >.

CERQUEIRA, M. R. F. et al. A novel functionalisation process for glucose oxidase immobilisation in poly(methyl methacrylate) microchannels in a flow system for amperometric determinations. *Talanta*, v. 126, n. 0, p. 20-26, 8/1/ 2014. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014001465> >.

CHAUHAN, N. et al. Fabrication of an amperometric ascorbate biosensor using egg shell membrane bound *Lagenaria siceraria* fruit ascorbate oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, n. 1–2, p. 66-71, 11// 2010. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117710001888> >.

CHEN, G.; LIN, Y.; WANG, J. Monitoring environmental pollutants by microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Talanta*, v. 68, n. 3, p. 497-503, 1/15/ 2006. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914005004194> >.

CHEN, Y.; ZHANG, L. Y.; CHEN, G. Fabrication, modification, and application of department of analytical poly(methyl methacrylate) microfluidic chips. *Electrophoresis*, v. 29, n. 9, p. 1801-1814, May 2008. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256510000005 >.

CHENG, J. Y. et al. Direct-write laser micromachining and universal surface modification of PMMA for device development. *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 99, n. 1, p. 186-196, Apr 2004. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221398700026 >.

CHUI, W. K.; WAN, L. S. C. Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres. *Journal of Microencapsulation*, v. 14, n. 1, p. 51-61, Jan-Feb 1997. ISSN 0265-2048. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WB93400005 >.

COLTRO, W. K. T. et al. Microsistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. *Química Nova*, v. 30, p. 1986-2000, 2007. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000800034&nrm=iso >.

COSTA, E. T. D. Processo de fabricação de mini e microdispositivos fluídicos por ablação a laser de dióxido de carbono. 2009. 114 (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo, Instituto de Química.

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 52, n. 1, p. 59-62, 6/28/ 2002. ISSN 0165-022X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165022X02000325> >.

DELATTRE, C.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Monolith enzymatic microreactor at the frontier of glycomic toward a new route for the production of bioactive oligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 60, n. 3-4, p. 97-105, 10// 2009. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117709001362> >.

DI, J. et al. Direct voltammetry of catalase immobilized on silica sol-gel and cysteine modified gold electrode and its application. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n. 2, p. 247-252, 8/15/ 2006. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566306000030> >.

DOMINGUEZ, R. B. et al. Design of a novel magnetic particles based electrochemical biosensor for organophosphate insecticide detection in flow injection analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 208, p. 491-496, 3/1/ 2015. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092540051401449X> >.

DRAGER, G. et al. Enzyme-purification and catalytic transformations in a microstructured PASSflow reactor using a new tyrosine-based Ni-NTA linker system attached to a polyvinylpyrrolidinone-based matrix. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 5, n. 22, p. 3657-3664, 2007. ISSN 1477-0520. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000250589100020 >.

EHLERS, J.-E. et al. Theoretical Study on Mechanisms of the Epoxy-Amine Curing Reaction. *Macromolecules*, v. 40, n. 12, p. 4370-4377, 2007/06/01 2007. ISSN 0024-9297. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ma070423m> >.

EKSTROM, S. et al. Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification. *Analytical Chemistry*, v. 72, n. 2, p. 286-293, Jan 2000. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000084855300004 >.

FELHOFER, J. L.; CARANTO, J. D.; GARCIA, C. D. Adsorption Kinetics of Catalase to Thin Films of Carbon Nanotubes. *Langmuir*, v. 26, n. 22, p. 17178-17183, 2010/11/16 2010. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/la103035n> >. Acesso em: 2014/04/16.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, n. 7, p. 546-550, 1993/07/01 1993. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014102299390016U> >.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, v. 597, n. 2, p. 179-186, 8/10/ 2007. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267007011671> >.

FIGEYS, D.; PINTO, D. Lab-on-a-chip: A revolution in biological and medical sciences. *Analytical Chemistry*, v. 72, n. 9, p. 330A-335A, May 2000. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000086927300005 >.

FIXE, F. et al. Functionalization of poly(methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. 1, Jan 2004. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000188988700009 >.

FLEMING, S. A. Chemical reagents in photoaffinity labeling. *Tetrahedron*, v. 51, n. 46, p. 12479-12520, 1995/11/13 1995. ISSN 0040-4020. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040402095005983> >.

FOO, H. C.; SMITH, N. W.; STANLEY, S. M. R. Fabrication of an on-line enzyme micro-reactor coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the digestion of recombinant human erythropoietin. *Talanta*, v. 135, p. 18-22, 4/1/ 2015. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014010169> >.

FUJISHIMA, A. et al. Electroanalysis of dopamine and NADH at conductive diamond electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 473, n. 1-2, p. 179-185, Sep 1999. ISSN 0022-0728. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000082908500026 >.

GAO, J. et al. Integrated microfluidic system enabling protein digestion, peptide separation, and protein identification. *Analytical Chemistry*, v. 73, n. 11, p. 2648-2655, Jun 2001. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000169063000050 >.

GAUVREAU, V. et al. Engineering Surfaces for Bioconjugation: Developing Strategies and Quantifying the Extent of the Reactions. *Bioconjugate Chemistry*, v. 15, n. 5, p. 1146-1156, 2004/09/01 2004. ISSN 1043-1802. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/bc049858u> >.

GREEN, N. M. Avidin. In: C.B. ANFINSEN, J. T. E. e FREDERIC, M. R. (Ed.). *Advances in Protein Chemistry: Academic Press*, v. Volume 29, 1975. p.85-133. ISBN 0065-3233.

GREENWAY, G. M.; HASWELL, S. J.; PETSUL, P. H. Characterisation of a micro-total analytical system for the determination of nitrite with spectrophotometric detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 387, n. 1, p. 1-10, 4/16/1999. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267099000471> >.

GROLL, J. et al. Biofunctionalized, Ultrathin Coatings of Cross-Linked Star-Shaped Poly(ethylene oxide) Allow Reversible Folding of Immobilized Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, n. 13, p. 4234-4239, 2004/04/01 2004. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ja0318028> >. Acesso em: 2014/09/03.

GUEBELI, T.; CHRISTIAN, G. D.; RUZICKA, J. Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 21, p. 2407-2413, 1991/11/01 1991. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac00021a005> >. Acesso em: 2014/12/06.

GUISAN, J. M. et al. Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 11, n. 4-6, p. 817-824, Jan 2001. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000167014100086 >.

GUO, D. et al. Characterization of microRNA expression profiling in peripheral blood lymphocytes in rats with experimental autoimmune uveitis. *Inflammation Research*, v. 64, n. 9, p. 683-696, 2015. ISSN 1420-908X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-015-0848-3> >.

HARPER, A.; ANDERSON, M. R. Electrochemical Glucose Sensors-Developments Using Electrostatic Assembly and Carbon Nanotubes for Biosensor Construction.

Sensors, v. 10, n. 9, p. 8248-8274, Sep 2010. ISSN 1424-8220. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282218800021 >.

HENRY, A. C. et al. Surface modification of poly(methyl methacrylate) used in the fabrication of microanalytical devices. Analytical Chemistry, v. 72, n. 21, p. 5331-5337, Nov 2000. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165094000036 >.

HOROZOVA, E.; DIMCHEVA, N.; JORDANOVA, Z. Study of catalase electrode for organic peroxides assays. Bioelectrochemistry, v. 58, n. 2, p. 181-187, 12// 2002. ISSN 1567-5394. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539402001536> >.

ICHIHARA, T. et al. A Novel Approach of Protein Immobilization for Protein Chips Using an Oligo-Cysteine Tag. Journal of Proteome Research, v. 5, n. 9, p. 2144-2151, 2006/09/01 2006. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/pr0504889> >.

ILIEVA, S. et al. Computational study of the aminolysis of esters. The reaction of methylformate with ammonia. Journal of Organic Chemistry, v. 68, n. 4, p. 1496-1502, Feb 2003. ISSN 0022-3263. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181061700041 >.

JACKSON, J. C. et al. Changes in chemical composition of coconut (*Cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 84, n. 9, p. 1049-1052, Jul 2004. ISSN 0022-5142. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222377500018 >.

JAEGFELDT, H. ADSORPTION AND ELECTROCHEMICAL OXIDATION BEHAVIOR OF NADH AT A CLEAN PLATINUM-ELECTRODE. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 110, n. 1-3, p. 295-302, 1980. ISSN 0022-0728. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1980KD58600021 >.

JANSMA, A. et al. Automated Microflow NMR: Routine Analysis of Five-Microliter Samples. Analytical Chemistry, v. 77, n. 19, p. 6509-6515, 2005/10/01 2005. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac050936w> >.

JIANG, K. et al. Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. Journal of Materials Chemistry, v. 14, n. 1, p. 37-39, 2004. ISSN 0959-9428. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/B310359E> >.

JONKHEIJM, P. et al. Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. Angewandte Chemie International Edition, v. 47, n. 50, p. 9618-9647, 2008. ISSN 1521-3773. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200801711> >.

JUNG, Y.; JEONG, J. Y.; CHUNG, B. H. Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. Analyst, v. 133, n. 6, p. 697-701, 2008. ISSN 0003-2654. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/B800014J> >.

KAMEOKA, J. et al. A Polymeric Microfluidic Chip for CE/MS Determination of Small Molecules. *Analytical Chemistry*, v. 73, n. 9, p. 1935-1941, 2001/05/01 2001. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac001533t> >. Acesso em: 2014/09/03.

KARUPPIAH, C. et al. A novel enzymatic glucose biosensor and sensitive non-enzymatic hydrogen peroxide sensor based on graphene and cobalt oxide nanoparticles composite modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 196, p. 450-456, Jun 2014. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000333652400060 >.

KENIS, P. J. A.; ISMAGILOV, R. F.; WHITESIDES, G. M. Microfabrication Inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning. *Science*, v. 285, n. 5424, p. 83-85, 1999-07-02 00:00:00 1999. Disponível em: < <http://science.sciencemag.org/content/sci/285/5424/83.full.pdf> >.

LASCH, J.; KOELSCH, R. THEORETICAL AND EXPERIMENTAL ANALYSIS OF CONTINUOUS-FLOW ENZYME REACTOR KINETICS .1. NON-DIFFUSION CONTROLLED SYSTEMS. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 2, n. 1, p. 71-77, 1973. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1973R297000008 >.

LAURELL, T.; DROTT, J.; ROSENGREN, L. SILICON-WAFER INTEGRATED ENZYME REACTORS. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 10, n. 3-4, p. 289-299, Spr 1995. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995QU11300007 >.

LEE, E. et al. Hydrogen peroxide interference in chemical oxygen demand during ozone based advanced oxidation of anaerobically digested livestock wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 8, n. 2, p. 381-388, Spr 2011. ISSN 1735-1472. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287841400015 >.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman, 2008. Disponível em: < <http://www.amazon.ca/exec/obidos/redirect?tag=citeulike09-20&path=ASIN/1429224169> >.

LI, S.; HU, J.; LIU, B. Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization. *Biosystems*, v. 77, n. 1-3, p. 25-32, 11// 2004. ISSN 0303-2647. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303264704000334> >.

LI, Y. et al. Microchip Reactor Packed with Metal-Ion Chelated Magnetic Silica Microspheres for Highly Efficient Proteolysis. *Journal of Proteome Research*, v. 6, n. 6, p. 2367-2375, 2007/06/01 2007. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/pr060558r> >. Acesso em: 2014/09/03.

LIN, P.-C.; WEINRICH, D.; WALDMANN, H. Protein Biochips: Oriented Surface Immobilization of Proteins. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 211, n. 2, p.

136-144, 2010. ISSN 1521-3935. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/macp.200900539> >.

LUEKING, A.; CAHILL, D. J.; MÜLLNER, S. Protein biochips: A new and versatile platform technology for molecular medicine. *Drug Discovery Today*, v. 10, n. 11, p. 789-794, 6/1/ 2005. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644605034495> >.

MADOU, M. J. *Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Manufacturing Techniques for Microfabrication and Nanotechnology*. 3rd. 2012a. 646.

_____. *Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Solid-State Physics, Fluidics, and Analytical Techniques in Micro- and Nanotechnology*. 3rd. 2012b. 646.

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, Jan 1990. ISSN 0925-4005. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990DB80000048 >.

MARTINELLO, F.; DA SILVA, E. L. Ascorbic acid interference in the measurement of serum biochemical parameters: In vivo and in vitro studies. *Clinical Biochemistry*, v. 39, n. 4, p. 396-403, 4// 2006. ISSN 0009-9120. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912005003383> >.

MARTINELLO, F.; LUIZ DA SILVA, E. Mechanism of ascorbic acid interference in biochemical tests that use peroxide and peroxidase to generate chromophore. *Clinica Chimica Acta*, v. 373, n. 1-2, p. 108-116, 11// 2006. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898106002671> >.

MATEO, C. et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. *Biochemical Society Transactions*, v. 35, p. 1593-1601, Dec 2007. ISSN 0300-5127. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251875100048 >.

MATEO, C. et al. Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. *Biomacromolecules*, v. 4, n. 3, p. 772-777, 2003/05/01 2003. ISSN 1525-7797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/bm0257661> >. Acesso em: 2014/09/03.

MATSUSHITA, A. et al. Two-dimensional Fourier-transform Raman and near-infrared correlation spectroscopy studies of poly (methyl methacrylate) blends 1. Immiscible blends of poly(methyl methacrylate) and atactic polystyrene. *Vibrational Spectroscopy*, v. 24, n. 2, p. 171-180, Dec 2000. ISSN 0924-2031. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000165524100002 >.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, v. 37, n. 5, p. 790-

+, Nov 2004. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225090900017 >.

MIRÓ, M.; HANSEN, E. H. Miniaturization of environmental chemical assays in flowing systems: The lab-on-a-valve approach vis-à-vis lab-on-a-chip microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta*, v. 600, n. 1-2, p. 46-57, 9/26/ 2007. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267007003327> >.

MUIR, T. W. Semisynthesis of Proteins by Expressed Protein Ligation. *Annual Review of Biochemistry*, v. 72, n. 1, p. 249-289, 2003. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161900> >.

NICOLI, R. et al. Development of immobilized enzyme reactors based on human recombinant cytochrome P450 enzymes for phase I drug metabolism studies. *Journal of Chromatography A*, v. 1206, n. 1, p. 2-10, 10/3/ 2008. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730800976X> >.

O'NEILL, R. D. et al. Designing sensitive and selective polymer/enzyme composite biosensors for brain monitoring in vivo. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v. 27, n. 1, p. 78-88, Jan 2008. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254764600019 >.

OKUDA, K. et al. Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 71, n. 2, p. 100-105, 1991/01/01 1991. ISSN 0922-338X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0922338X91902315> >.

OLIVEIRA, H. D. S. et al. CARBOHYDRATE MEASUREMENTS ON FOUR BRANDS OF COCONUT WATER. *Ciencia E Agrotecnologia*, v. 27, n. 5, p. 1063-1067, Sep-Oct 2003. ISSN 1413-7054. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000207766000013 >.

OLSON, D. L. et al. Microflow NMR: Concepts and Capabilities. *Analytical Chemistry*, v. 76, n. 10, p. 2966-2974, 2004/05/01 2004. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac035426l> >.

OZONER, S. K.; KESKINLER, B.; ERHAN, E. HRP immobilized microporous Poly(styrene-divinylbenzene-polyglutaraldehyde) monolith for forced flow injected phenol biosensing. *Materials Science and Engineering: C*, v. 31, n. 3, p. 663-668, 4/8/ 2011. ISSN 0928-4931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493111000117> >.

POPPE, H. Characterization and design of liquid phase flow-through detector systems. *Analytica Chimica Acta*, v. 114, n. 0, p. 59-70, 2/15/ 1980. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267001842793> >.

PRASERTBOONYAI, K. et al. Miniaturization of spectrophotometry based on micro flow analysis using norfloxacin as less-toxic reagent for iron determination. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 151, p. 532-537, 12/5/ 2015. ISSN 1386-1425. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138614251530069X> >.

RAJ, C. R.; OHSAKA, T. Facilitated electrochemical oxidation of NADH and its model compound at gold electrode modified with terminally substituted electroinactive self-assembled monolayers. *Bioelectrochemistry*, v. 53, n. 2, p. 251-256, Mar 2001. ISSN 0302-4598. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168332200016 >.

RAVALLI, A.; LOZZI, L.; MARRAZZA, G. Micro-flow Immunosensor Based on Thin-film Interdigitated Gold Array Microelectrodes for Cancer Biomarker Detection. *Current Drug Delivery*, v. 13, n. 3, p. 400-408, // 2016. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdd/2016/00000013/00000003/art00014> >.

REICHERT, B. et al. Validation and application of micro flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams. *Talanta*, v. 134, p. 415-424, 3/1/ 2015. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014009588> >.

REIDY, S. et al. High-Performance, Static-Coated Silicon Microfabricated Columns for Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 8, p. 2623-2630, 2006/04/01 2006. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac051846u> >. Acesso em: 2014/12/06.

RICHTER, T. et al. Bi-enzymatic and capillary electrophoretic analysis of non-fluorescent compounds in microfluidic devices - Determination of xanthine. *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 81, n. 2-3, p. 369-376, Jan 2002. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173264100036 >.

ROVER, L. et al. Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design. *Analytical Biochemistry*, v. 260, n. 1, p. 50-55, Jun 1998. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074272500007 >.

ROZKIEWICZ, D. I. et al. Covalent Microcontact Printing of Proteins for Cell Patterning. *Chemistry – A European Journal*, v. 12, n. 24, p. 6290-6297, 2006. ISSN 1521-3765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200501554> >.

SANTOS, A. C. V. D.; MASINI, J. C. A análise por injeção sequencial (SIA): vinte anos em uma perspectiva brasileira. *Química Nova*, v. 33, p. 1949-1956, 2010. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000900023&nrm=iso >.

SCHOENHERR, R. M. et al. CE-Microreactor-CE-MS/MS for Protein Analysis. *Analytical Chemistry*, v. 79, n. 6, p. 2230-2238, 2007/03/01 2007. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac061638h> >.

SINITSYNA, E. S. et al. Monolithic methacrylate polymeric sorbents: Development of methods for chemical modification of the surface for the subsequent bioaffine functionalization. *Russian Journal of Applied Chemistry*, v. 81, n. 8, p. 1403-1409, 2008/08/01 2008. ISSN 1070-4272. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1134/S1070427208080168> >.

SLOCIK, J. M. et al. Site-Specific Patterning of Biomolecules and Quantum Dots on Functionalized Surfaces Generated by Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition. *Advanced Materials*, v. 18, n. 16, p. 2095-2100, 2006. ISSN 1521-4095. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200600077> >.

SOPER, S. A. et al. Surface modification of polymer-based microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta*, v. 470, n. 1, p. 87-99, Oct 2002. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178229100010 >.

SORNAMBIKAI, S.; KUMAR, A. S. Simple Electro-Assisted Immobilization of Ciprofloxacin on Carbon Nanotube Modified Electrodes: Its Selective Hydrogen Peroxide Electrocatalysis. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 14, n. 9, p. 6574-6585, Sep 2014. ISSN 1533-4880. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000335873900011 >.

STEUER, A. E. et al. Comparison of conventional liquid chromatography–tandem mass spectrometry versus microflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry within the framework of full method validation for simultaneous quantification of 40 antidepressants and neuroleptics in whole blood. *Journal of Chromatography A*, v. 1381, p. 87-100, 2/13/ 2015. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967315000254> >.

STILLMAN, T. J. et al. CONFORMATIONAL FLEXIBILITY IN GLUTAMATE-DEHYDROGENASE - ROLE OF WATER IN SUBSTRATE RECOGNITION AND CATALYSIS. *Journal of Molecular Biology*, v. 234, n. 4, p. 1131-1139, Dec 1993. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993MN26500022 >.

SUH, J. et al. Polar and hydrophobic effects on ester aminolysis in dimethyl sulfoxide. *Bioorganic Chemistry*, v. 14, n. 1, p. 33-45, 3// 1986. ISSN 0045-2068. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0045206886900167> >.

SZEKELY, L.; GUTTMAN, A. New advances in microchip fabrication for electrochromatography. *Electrophoresis*, v. 26, n. 24, p. 4590-4604, Dec 2005. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234466300003 >.

TALVIK, A. T.; TUULMETS, A.; VAINO, E. Kinetics and mechanism of aminolysis of aliphatic esters in aprotic solvents. *Journal of Physical Organic Chemistry*, v. 12, n. 10, p. 747-750, Oct 1999. ISSN 0894-3230. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083384400003 >.

TANYANYIWA, J.; HAUSER, P. C. High-Voltage Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection for Microchip Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 24, p. 6378-6382, 2002/12/01 2002. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac020489+> >. Acesso em: 2014/12/06.

TEMPORINI, C. et al. Chymotrypsin immobilization on epoxy monolithic silica columns: Development and characterization of a bioreactor for protein digestion. *Journal of Separation Science*, v. 30, n. 17, p. 3069-3076, 2007. ISSN 1615-9314. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200700337> >.

TERRY, S. C.; JERMAN, J. H.; ANGELL, J. B. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE Transactions on Electron Devices*, v. 26, n. 12, p. 1880-1886, 1979. ISSN 0018-9383.

THOMSEN, M. S.; POLT, P.; NIDETZKY, B. Development of a microfluidic immobilised enzyme reactor. *Chemical Communications*, n. 24, p. 2527-2529, 2007. ISSN 1359-7345. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247187900029 >.

TOMIZAKI, K.-Y.; USUI, K.; MIHARA, H. Protein-Detecting Microarrays: Current Accomplishments and Requirements. *ChemBioChem*, v. 6, n. 5, p. 782-799, 2005. ISSN 1439-7633. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200400232> >.

TZENG, T. H. et al. A Portable Micro Gas Chromatography System for Lung Cancer Associated Volatile Organic Compound Detection. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, v. 51, n. 1, p. 259-272, 2016. ISSN 0018-9200.

UM, I. H.; LEE, E. J.; JEON, S. E. Effect of solvent on reactivity and basicity: aminolyses of p-nitrophenyl acetate in H₂O and in DMSO. *Journal of Physical Organic Chemistry*, v. 15, n. 8, p. 561-565, Aug 2002. ISSN 0894-3230. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177073000019 >.

URBAN, J.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J. A monolithic lipase reactor for biodiesel production by transesterification of triacylglycerides into fatty acid methyl esters. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 109, n. 2, p. 371-380, 2012. ISSN 1097-0290. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bit.23326> >.

VANDAVEER, W. R. et al. Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, v. 25, n. 21-22, p. 3528-3549, 2004. ISSN 1522-2683. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200406115> >.

VERPOORTE, E. Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *ELECTROPHORESIS*, v. 23, n. 5, p. 677-712, 2002. ISSN 1522-2683. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/1522-2683\(200203\)23:5<677::AID-ELPS677>3.0.CO;2-8](http://dx.doi.org/10.1002/1522-2683(200203)23:5<677::AID-ELPS677>3.0.CO;2-8) >.

VLADISAVLJEVIĆ, G. T.; KOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M. Generation of highly uniform droplets using asymmetric microchannels fabricated on a single crystal silicon plate: Effect of emulsifier and oil types. *Powder Technology*, v. 183,

n. 1, p. 37-45, 3/18/ 2008. ISSN 0032-5910. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591007005876> >.

WACKER, R.; SCHRÖDER, H.; NIEMEYER, C. M. Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin–biotin attachment: a comparative study. *Analytical Biochemistry*, v. 330, n. 2, p. 281-287, 7/15/ 2004. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269704002490> >.

WANG, J. Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review. *Talanta*, v. 56, n. 2, p. 223-231, 2/11/ 2002. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914001005926> >.

WANG, X. Y.; WATANABE, H.; UCHIYAMA, S. Amperometri L-ascorbic acid biosensors equipped with enzyme micelle membrane. *Talanta*, v. 74, n. 5, p. 1681-1685, Feb 2008. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253514700082 >.

WANG, Y.; LI, W. G.; IRINI, A. A novel and quick method to avoid H₂O₂ interference on COD measurement in Fenton system by Na₂SO₃ reduction and O₂ oxidation. *Water Science and Technology*, v. 68, n. 7, p. 1529-1535, 2013. ISSN 0273-1223. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000327140100012 >.

YAM, C. M. et al. Preparation, characterization, resistance to protein adsorption, and specific avidin–biotin binding of poly(amidoamine) dendrimers functionalized with oligo(ethylene glycol) on gold. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 296, n. 1, p. 118-130, 4/1/ 2006. ISSN 0021-9797. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979705009033> >.

ZHANG, L. et al. Electrocatalytic Oxidation of NADH on Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide Modified Screen-Printed Electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 6, n. 3, p. 819-829, Mar 2011. ISSN 1452-3981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287820500024 >.

ZHANG, W. et al. Tuning the redox and enzymatic activity of glucose oxidase in layered organic films and its application in glucose biosensors. *Analytical Biochemistry*, v. 329, n. 1, p. 85 - 90, 2004. ISSN - 0003-2697. Disponível em: < - <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269704001320> >.

ANEXO I: Produção gerada

- Cerqueira, Marcos Rodrigues Facchini; Santos, Mauro Sérgio Ferreira; Matos, Renato Camargo; Gutz, Ivano Gebhardt Rolf; Angnes, Lúcio. Use of poly(methyl methacrylate)/polyethyleneimine flow microreactors for enzyme immobilization. *Microchemical Journal (Print)*, v. 118, p. 231-237, 2015.
- Cerqueira, Marcos Rodrigues Facchini; Grasseschi, Daniel; Matos, Renato Camargo; Angnes, Lúcio. A novel functionalisation process for glucose oxidase immobilisation in poly(methyl methacrylate) microchannels in a flow system for amperometric determinations. *Talanta (Oxford)*, v. 126, p. 20-26, 2014.

ANEXO II: Participação em congresso

- CERQUEIRA, MARCOS R. F.; ANGNES, LUCIO; MATOS, R. C. Functionalization of Poly(methylmethacrylate) (PMMA) for the Usage as a Glucose Biosensor. In: PITTCON 2014, 2014, Chicago. PITTCON 2014, 2014.
- CERQUEIRA, MARCOS R. F.; ANGNES, LUCIO; MATOS, R. C. Study of an epoxy/polyethyleneimine system as basis for enzyme microreactors. In: Flow Analysis XIII, 2015, Praga. Flow Analysis XIII, 2015
- CERQUEIRA, M. R. F.; SANTOS, M. S. F. ; MATOS, R. C. ; GUTZ, I. G. R. ; ANGNES, L. . Use of Polymethyl Methacrylate (PMMA) / Polyethyleneimine (PEI) Microreactors for Multiple enzymes Immobilization. In: XXIII International Materials Research Congress, 2014, Cancun. Technical Program of XXIII International Materials Research Congress, 2014.