

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Karina Lopes Dornelas

**FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS A BASE DE  
PAPEL UTILIZANDO MATERIAIS DE BAIXO CUSTO**

Belo Horizonte

2013

UFMG/ICEx/DQ 999<sup>a</sup>

D 543<sup>a</sup>

Karina Lopes Dornelas

**FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS A BASE DE  
PAPEL UTILIZANDO MATERIAIS DE BAIXO CUSTO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Piccin

Belo Horizonte

2013

Dornelas, Karina Lopes  
D713f      Fabricação de dispositivos microfluídicos a base de  
2013      papel utilizando materiais de baixo custo [manuscrito]  
D      / Karina Lopes Dornelas. 2013.  
            xiv, 82 f. : il.

Orientador: Evandro Piccin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais. Departamento de Química.

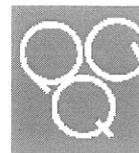
Bibliografia: f. 72-82.

1. Química Analítica - Teses 2. Cromatografia em  
papel - Teses 3. Acetaminofen - Teses 4. Substratos -  
Teses I. Piccin, Evandro, Orientado II. Título.

CDU 043

U F *m* G

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3409-5732  
FAX: 031 - 3409-5711  
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



**"Fabricação de Dispositivos Microfluídicos à Base de Papel Utilizando Materiais de Baixo Custo"**

**Karina Lopes Dornelas**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Evandro Piccin - Orientador  
UFMG

Profa. Adriana Ferreira Faria  
UFMG

Prof. Rodinei Augusti  
UFMG

Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2013.

## **DEDICO ESSE TRABALHO**

*À Deus, porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas.*

*Aos meus pais, Levê Alves Dornelas (in memoriam) e Cenira Lopes Dornelas, por todo amor, confiança e por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui.*

*Aos meus irmãos, Kezia, Kássio e Caio, cunhadas, Kele e Paula, cunhado João e meus queridos sobrinhos, Keila, Cássio, Felipe e Bianca, por todo incentivo e carinho.*

*Ao meu querido esposo, Filipe, pelo amor, compreensão, paciência e apoio ao longo dessa jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Evandro Piccin, pela orientação. Obrigada pela oportunidade, paciência, ensinamentos e pela confiança depositada em mim para execução deste trabalho.

Aos colegas de laboratório: Keila, Lilian, Cristiane, Bruno e Roberta, pela companhia e por toda a ajuda.

Às minhas amigas Cíntia e Raquel, por estarem sempre prontas a me ouvirem, por todas as dicas e apoio.

As minhas amigas Izabella, Ludmilla, Aline e ao meu amigo Luiz, pelas palavras de incentivo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química, pela contribuição na minha formação científica.

Aos funcionários do Departamento de Química que, de alguma forma, me ajudaram a concretizar este trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

*“A glória de Deus está nas coisas encobertas;  
mas a honra dos reis, está em descobri-las.”*

*(Provérbios 25:2)*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Miniaturização em química analítica.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Microfluídica.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Dispositivos microfluídicos.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.1. Substratos.....</b>	<b>4</b>
1.3.1.1. <i>Vidro.....</i>	4
1.3.1.2. <i>Polímeros.....</i>	6
1.3.1.3. <i>Papel.....</i>	8
<b>1.4. Dispositivos microfluídicos a base de papel.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.1. Um pouco de história.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.2. Fabricação de <math>\mu</math>PADs.....</b>	<b>11</b>
1.4.2.1. <i>Fotolitografia .....</i>	12
1.4.2.2. <i>Plotagem mecânica.....</i>	14
1.4.2.3. <i>Impressão a cera.....</i>	16
1.4.2.4. <i>Serigrafia ou silk-screen.....</i>	17
1.4.2.5. <i>Recorte.....</i>	18
1.4.2.6. <i>Fabricação de <math>\mu</math>PADs usando canetas marcadoras.....</i>	19
<b>1.4.3. Métodos de detecção em <math>\mu</math>PADs.....</b>	<b>20</b>
1.4.3.1. <i>Detecção Colorimétrica.....</i>	21
1.4.3.2. <i>Detecção Eletroquímica.....</i>	24
<b>1.4.4. Aplicações dos <math>\mu</math>PADs.....</b>	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>29</b>

<b>3. EXPERIMENTAL.....</b>	<b>30</b>
3.1. Reagentes e soluções.....	30
3.2. Construção dos microdispositivos.....	31
3.3. Resolução do método.....	35
3.4. Detecção colorimétrica.....	35
3.5. Detecção eletroquímica.....	37
3.5.1. Preparação das amostras.....	40
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
4.1. Resolução do método.....	43
4.2. Detecção colorimétrica.....	48
4.3. Detecção eletroquímica.....	52
4.3.1. Voltametria Cíclica.....	52
4.3.2. Amperometria.....	57
4.3.2.1. <i>Análise de formulações farmacêuticas</i> .....	67
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>6. ATIVIDADES FUTURAS.....</b>	<b>71</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Exemplo de um microssistema fabricado em três camadas usando substratos de vidro, silício e placa de circuito integrado para análise de DNA (Adaptado de BURNS <i>et al.</i> , 1998).....	5
<b>Figura 1.2.</b> Fabricação de moldes por prototipagem rápida em fotolitografia seguida da construção de microdispositivos através do processo de moldagem polimérica (PICCIN, 2008).....	8
<b>Figura 1.3.</b> Leitura de um teste de gravidez de farmácia feito em uma tira de papel. O resultado positivo se deve a presença do hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG).....	10
<b>Figura 1.4.</b> Esquema que descreve o método para a fabricação de canais hidrofóbicos em papel por fotolitografia (MARTINEZ <i>et al.</i> , 2007).....	13
<b>Figura 1.5.</b> Ilustração esquemática do processo de adaptação de uma caneta usada para fabricar canais hidrofílicos em papel. (A) À esquerda, uma caneta original. À direita, uma caneta original contendo PDMS (em azul) em sua volta para moldagem. (B) Molde de PDMS curado contendo o formato da caneta original (esquerda). Tubo de vidro inserido no molde de PDMS. (C) O molde de PDMS contendo o tubo de vidro é preenchido por um polímero rígido a base de poliuretano e curado em luz ultravioleta. Finalmente, a caneta é preenchida com PDMS e está pronta para ser adaptada na <i>plotter</i> x,y (Adaptado de BRUZEWICZ <i>et al.</i> , 2008).....	15
<b>Figura 1.6.</b> Representação esquemática das etapas necessárias para a impressão a cera (Adaptado de CARRILHO <i>et al.</i> , 2009).....	17
<b>Figura 1.7.</b> Diagrama esquemático do método de fabricação de $\mu$ PADs por serigrafia ou <i>silk-screen</i> (Adaptado de DUNGCHAI, CHAILAPAKUL, HENRY, 2011).....	18
<b>Figura 1.8.</b> $\mu$ PADs obtidos pelo método de corte (FENTON <i>et al.</i> , 2009).....	19
<b>Figura 1.9.</b> Esquema do método de fabricação de $\mu$ PADs descrito por Nie <i>et al.</i> (2012) (Adaptado de NIE <i>et al.</i> , 2012).....	20

<b>Figura 1.10.</b> Teste positivo para glicose (esquerda) e proteína (direita), utilizando uma solução contendo 550 mmol L <sup>-1</sup> de glicose e 75 μmol L <sup>-1</sup> de proteína em urina artificial (5 μL) (MARTINEZ <i>et al.</i> , 2007).....	22
<b>Figura 1.11.</b> (A) Esquema da detecção colorimétrica para PSA: 1. Adição do anticorpo monoclonal para PSA (mAb); 2. Adição do antígeno (PSA); 3. Adição do anticorpo policlonal para PSA e de nanopartículas de ouro (pAb-GNP); 4. Amplificação da coloração. (B) Os resultados de coloração obtidos para o imunoensaio do tipo sanduíche para detecção de PSA (NIE <i>et al.</i> , 2012).....	23
<b>Figura 1.12.</b> (A) Configuração básica da célula de detecção eletroquímica em um μPAD. WE: Eletrodo de trabalho; RE: Eletrodo de referência; CE: Contra-eletrodo. (B) Imagem de um μPAD com detecção eletroquímica utilizado para determinação de glicose, lactato e ácido úrico (DUNGCHAI <i>et al.</i> , 2009). Nesse dispositivo, um volume de apenas 5 μL de amostra é aplicado no centro, sendo que a mesma se distribui por capilaridade para as regiões que contém os eletrodos e as enzimas.....	25
<b>Figura 1.13.</b> Etapas da construção dos μPADs com detecção eletroquímica. (a) Canais hidrofílicos obtidos pelo método de impressão a cera. (b) Máscara de cobre com as delimitações para os três eletrodos. (c) Posicionamento da máscara na extremidade do canal hidrofílico. (d) <i>Sputtering</i> de ouro e a remoção da máscara (Adaptado de SHIROMA <i>et al.</i> , 2012).....	26
<b>Figura 3.1.</b> Esquema do método proposto para fabricação de μPADs..	32
<b>Figura 3.2.</b> Carimbos utilizados para fabricação de μPADs pelo método proposto.....	33
<b>Figura 3.3.</b> Principais etapas envolvidas na fabricação de um carimbo.	34
<b>Figura 3.4.</b> Etapas envolvidas no ensaio colorimétrico da proteína BSA.....	36

<b>Figura 3.5.</b> Desenho esquemático da obtenção do $\mu$ PAD com detecção eletroquímica utilizado nos estudos de voltametria cíclica. Eletrodos de grafite feitos a mão utilizando lápis. ER, ET e CE são os eletrodos de referência, trabalho e contra-eletrodo, respectivamente....	38
<b>Figura 3.6.</b> Desenho esquemático do $\mu$ PAD com detecção eletroquímica utilizado para a determinação amperométrica de paracetamol. R, T e CE representam os eletrodos de referência, trabalho e contra-eletrodo, respectivamente, feitos a mão com lápis de grafite (Adaptado de DOSSI <i>et al.</i> , 2013).....	39
<b>Figura 4.1.</b> $\mu$ PADs fabricados para demonstrar a efetividade do método proposto no controle da dispersão de líquidos.....	42
<b>Figura 4.2.</b> Estudo da resolução das linhas hidrofóbicas obtidas utilizando o método proposto. (a) Desenho feito no <i>software</i> Corel Draw 11.0 (intervalo de estudo 200-1400 $\mu$ m, com incrementos de 200 $\mu$ m). (b) Imagem da parte de frente do dispositivo obtida por <i>scanner</i> . (c) Imagem do verso do dispositivo obtida por <i>scanner</i> . (d, e) Avaliação gráfica do espalhamento de PDMS em papel de cromatografia. Gráficos da largura resultante da barreira hidrofóbica <i>versus</i> largura nominal da parte da frente (d) e da parte de trás (e) dos dispositivos de papel. As barras de erro representam o desvio padrão para medidas realizadas em três diferentes pontos de três linhas hidrofóbicas obtidas independentemente.....	44
<b>Figura 4.3.</b> Estudo da resolução de linhas hidrofílicas obtidas utilizando o método proposto. (a) Desenho feito no <i>software</i> Corel Draw 11.0 (intervalo de estudo 1600-2200 $\mu$ m, com incrementos de 200 $\mu$ m). (b) Imagem da frente do dispositivo obtida por <i>scanner</i> . (c) Imagem do verso do dispositivo obtida por <i>scanner</i> . (d, e) Avaliação gráfica do espalhamento de PDMS em papel de cromatografia. Gráficos da largura resultante do canal hidrofílico <i>versus</i> largura nominal da parte da frente (d) e do verso (e) dos dispositivos de papel. As barras de erro representam o desvio padrão para medidas realizadas em três diferentes pontos de três canais hidrofílicos obtidos independentemente.....	46

<b>Figura 4.4.</b> Ensaio colorimétrico para proteína BSA nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 mg mL <sup>-1</sup> . (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o $\mu$ PAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear: $y_{\text{proteína}} = 2,7585 + 1,9106 \times [\text{proteína}]$ ; $R^2 = 0,9895$ .....	50
<b>Figura 4.5.</b> (a) Voltamogramas cíclicos registrados em um $\mu$ PAD com detecção eletroquímica para 0,50 mol L <sup>-1</sup> de NaCl e concentrações crescentes de K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] (1, 2 e 3 mmol L <sup>-1</sup> ), $vv = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . (b) Voltamograma cíclico registrado em solução contendo 4,0 mmol/L de K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] (KNO <sub>3</sub> 1,0 mol L <sup>-1</sup> ) utilizando uma célula eletroquímica com eletrodo de trabalho de ouro (diâmetro = 2 mm), eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS) e eletrodo auxiliar de platina ( $vv = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ).....	54
<b>Figura 4.6.</b> Estrutura química do paracetamol e algumas propriedades físico-químicas (LORPHENSRI <i>et al.</i> , 2006. VILLAESCUSA <i>et al.</i> , 2011).....	58
<b>Figura 4.7.</b> Mecanismo de oxidação eletroquímica do paracetamol (LOURENÇÃO, 2009).....	59
<b>Figura 4.8.</b> Cromatogramas registrados em $\mu$ PADs com detecção amperométrica para concentrações crescentes de paracetamol de 100 a 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com incrementos de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Foram realizadas três injeções para cada concentração. Potencial de detecção +0,70 V, tampão acetato 0,001 mol L <sup>-1</sup> (pH 4,7). Volume de injeção: 750 nL.....	60
<b>Figura 4.9.</b> Curva de calibração obtida para o paracetamol utilizando os $\mu$ PADs com detecção amperométrica. As condições estão descritas na Figura 4.8.....	61
<b>Figura 4.10.</b> Cromatogramas registrados em um mesmo $\mu$ PAD com detecção amperométrica para injeções consecutivas de uma solução padrão de paracetamol na concentração de 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Potencial de detecção +0,70 V, tampão acetato 0,001 mol L <sup>-1</sup> (pH 4,7), alíquotas de 750 nL.....	62

**Figura 4.11.** Cromatogramas registrados em três diferentes  $\mu$ PADs com detecção amperométrica para solução padrão de paracetamol na concentração de  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Potencial de detecção  $+0,70 \text{ V}$ , tampão acetato  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,7), alíquotas de  $750 \text{ nL}$ ..... 64

**Figura 4.12.** Cromatogramas registrados em  $\mu$ PADs com detecção eletroquímica com eletrodos feitos com lápis para as amostras (a) A e (b) B. Potencial de detecção  $+0,70 \text{ V}$ , tampão acetato  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,7), alíquotas de  $750 \text{ nL}$ ..... 68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1.</b> Comparação de parâmetros analíticos de trabalhos encontrados na literatura para detecção colorimétrica de proteína (BSA).....	52
<b>Tabela 4.2.</b> Comparação de parâmetros analíticos de trabalhos encontrados na literatura para detecção eletroquímica de paracetamol.....	66
<b>Tabela 4.3.</b> Resultados obtidos na determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas utilizando $\mu$ PADs com detecção amperométrica com eletrodos de grafite feitos com lápis.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$ PADs	Dispositivos microfluídicos à base de papel ( <i>microfluidic paper-based devices</i> )
$\mu$ TAS	Microssistemas de análises totais ( <i>micro total analysis system</i> )
AgNP	Nanopartículas de prata
BHT	Azul de tetrabromofenol ( <i>tetrabromophenol blue</i> )
BSA	Albumina sérica bovina ( <i>bovine serum albumin</i> )
CE	Eletroforese capilar ( <i>capillary electrophoresis</i> )
CEA	Carcinoembrionário
CG	Cromatografia gasosa
DARPA	<i>Defense Advanced Research Projects Agency</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPR	Desvio padrão relativo
DTT	Ditiotreitol
EA/CE	Eletrodo auxiliar/contra-eletrodo
ER/RE/R	Eletrodo de referência
ET/WE/T	Eletrodo de trabalho
FLASH	<i>Fast Lithographic Activation of Sheets</i>
hCG	Hormônio gonadotrofina coriônica humana
Hcy	Homocisteína
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HSA	Albumina sérica humana ( <i>human serum albumin</i> )
LD	Limite de detecção
LOC	<i>Lab-on-a-chip</i> (laboratório em um chip)
LQ	Limite de quantificação
mAb	Anticorpo monoclonal para PSA
MEMS	Sistemas microeletromecânicos ( <i>microelectromechanical systems</i> )
NC	Nitrocelulose
pAb-GNP	Anticorpo policlonal para PSA e nanopartículas de ouro
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano

PSA	Antígeno específico da próstata
RGB	<i>Red-Green-Blue</i>
UV	Ultravioleta
VC	Voltametria Cíclica

## RESUMO

Nos últimos seis anos, dispositivos microfluídicos à base de papel (*microfluidic paper-based devices*,  $\mu$ PADs), fabricados através da aplicação de materiais hidrofóbicos em papel hidrofílico, surgiram como uma plataforma promissora para diagnósticos do tipo *point-of-care* em países em desenvolvimento, onde a disponibilidade de recursos é limitada. Esses dispositivos apresentam características atraentes, como baixo custo, facilidade de uso, baixo consumo de reagente e de amostra, portabilidade e descartabilidade. Este trabalho descreve um método alternativo para fabricação de  $\mu$ PADs utilizando materiais de baixo custo. Para formar barreiras hidrofóbicas em papel de cromatografia, foram utilizados carimbos de borracha e madeira, e uma mistura de polidimetilsiloxano (PDMS)/hexano. Os padrões desejados para os  $\mu$ PADs, desenhados em um *software* gráfico, foram confeccionados em carimbos de borracha/madeira, utilizados para marcar o papel com PDMS/hexano. Para determinar a resolução do método proposto, as larguras das barreiras hidrofóbicas e dos canais hidrofílicos foram estudadas no intervalo de 200-1400  $\mu\text{m}$  e 1600-2200  $\mu\text{m}$ , respectivamente. A menor barreira hidrofóbica obtida foi de  $948 \pm 112 \mu\text{m}$  ( $n = 9$ ), resultante de uma largura nominal de 200  $\mu\text{m}$ . A menor largura obtida para o canal hidrofílico foi de  $721 \pm 111 \mu\text{m}$  ( $n = 9$ ), sendo originado por um canal de largura nominal de 1600  $\mu\text{m}$ . Os  $\mu$ PADs foram avaliados na determinação colorimétrica da proteína albumina sérica bovina (BSA) no intervalo de concentrações de 0 a 50  $\text{mg mL}^{-1}$ . Nesse estudo, o limite de detecção (LD) obtido foi de 7,2  $\text{mg mL}^{-1}$ . Além disso, foram fabricados  $\mu$ PADs com detecção eletroquímica, com eletrodos de trabalho, referência e contra-eletródo feitos a mão utilizando o grafite de lápis 5B comercial. O desempenho destes dispositivos foi avaliado através

da técnica de voltametria cíclica (VC), utilizando o  $K_3[Fe(CN)_6]$  como composto modelo e, também, para a determinação amperométrica de paracetamol em formulações farmacêuticas. Para isso, uma curva analítica foi construída no intervalo de concentrações de paracetamol entre 100 e 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , obtendo um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9977, LD e limite de quantificação (LQ) de 6,52  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 21,72  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Palavras-chave: microfluídica,  $\mu\text{PADs}$ , instrumentação analítica, miniaturização, PDMS, detecção eletroquímica, paracetamol.

## ABSTRACT

Over the past six years, paper-based microfluidic devices ( $\mu$ PADs), manufactured by applying hydrophilic materials on hydrophobic paper, have emerged as a promising platform for point-of-care diagnostics in developing countries, where the availability of resources is limited. These devices have attractive features such as low cost, ease of use, low consumption of reagents and sample, portability, and disposability. This work describes an alternative method for fabricating  $\mu$ PADs by using low cost materials. In order to make the hydrophobic barriers on the chromatography paper, rubber/wood stamps and a mixture of polydimethylsiloxane (PDMS)/hexane have been used. The desired standards for  $\mu$ PADs, drawn using graphic software, were made in rubber/wood stamps, whose were used to mark the paper with PDMS/hexane. In order to determine the resolution of the proposed method, the widths of hydrophobic barriers and the widths of hydrophilic channels were studied in the range of 200-1400  $\mu\text{m}$  and 1600-2200  $\mu\text{m}$ , respectively. The smallest hydrophobic barrier was obtained with  $948 \pm 112 \mu\text{m}$  ( $n=9$ ), that resulted from a line with nominal width of 200  $\mu\text{m}$ . The smallest width obtained for the hydrophilic channel was  $721 \pm 111 \mu\text{m}$  ( $n=9$ ), which originated from a channel with nominal of 1600  $\mu\text{m}$ . The  $\mu$ PADs were tested in the colorimetric determination of bovine serum albumin (BSA). In this study the concentration range of the calibration curve varied from 0 to 50  $\text{mg mL}^{-1}$ , and the limit of detection (LD) was 7.2  $\text{mg mL}^{-1}$ . Moreover,  $\mu$ PADs were fabricated with electrochemical detection, with working, reference, and auxiliary electrodes made by hand using 5B graphite pencil. The performance of these devices was evaluated by cyclic voltammetry (CV) of  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  as model compound, and by the amperometric determination of acetaminophen in

pharmaceutical formulations. For this, a calibration curve was constructed with concentrations of acetaminophen ranging between 100 and 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The obtained coefficient of determination ( $R^2$ ) was 0.9977, and the limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ) were determined as 6.52  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 21.72  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively.

Keywords: microfluidics,  $\mu\text{PADs}$ , analytical instrumentation, miniaturization, electrochemical detection, paracetamol.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Miniaturização em química analítica

Os *microchips* analíticos têm impulsionado a química analítica nos últimos anos, da mesma forma com que os *microchips* eletrônicos desenvolveram o universo dos computadores e da eletrônica. Isso devido à demanda contínua por respostas e medições rápidas, em amostras com concentrações baixas de analitos e utilização de pequenos volumes de reagentes. Nesse contexto, surgiram os chamados microssistemas de análises totais (*micro total analysis system -  $\mu$ TAS*), capazes de realizar todas as etapas de uma análise completa de forma automatizada, constituindo-se de um sistema integrado. Essas etapas podem incluir a introdução da amostra, pré-tratamento da amostra, reações químicas, separações analíticas e detecção (COLTRO *et al.*, 2007, 2008; RÍOS; ZOUGAGH; AVILA, 2012).

Em 1979, foi apresentado o primeiro dispositivo analítico miniaturizado, um cromatógrafo a gás a base de silício, com capacidade de realizar separações rápidas. Contudo, esse primeiro microdispositivo não foi prontamente aceito pela comunidade científica e, durante a década de 80, a pesquisa em miniaturização em química analítica se resumiu no desenvolvimento de micro-bombas, micro-válvulas e sensores químicos (REYES *et al.*, 2002).

No início da década de 90, Manz *et al.* (1990) apresentaram um microssistema para cromatografia em fase líquida e propuseram o termo  $\mu$ TAS, marcando o início do renascimento dos microdispositivos analíticos, também hoje conhecidos como “*lab-on-a-chip*” (LOC), por inserirem várias etapas, normalmente

desenvolvidas em um laboratório, em um *chip* (DITTRICH, TACHIKAWA, MANZ, 2006).

De início, a principal razão para miniaturização era aumentar a frequência analítica. Entretanto, a redução da escala macro para a escala micro pode oferecer outras vantagens como a análise em tempo reduzido, redução do volume de reagentes e amostras (da ordem de pL-nL) e, por consequência, reduzido volume de resíduos e baixo custo. Além disso, devido à portabilidade, é possível realizar análises em campo. Com os avanços no desenvolvimento de novos materiais e métodos de fabricação, o custo final de cada microdispositivo pode ser desprezível, o que viabiliza seu uso como dispositivo descartável (COLTRO *et al.*, 2007).

## **1.2. Microfluídica**

A microfluídica é definida como a ciência e tecnologia de sistemas que processam e manipulam pequenas quantidades de fluidos ( $10^{-9}$  a  $10^{-18}$  L), utilizando canais com dimensões de dezenas a centenas de micrômetros, com aplicações nas áreas de biologia, medicina, eletrônica e química. Em química analítica a microfluídica têm se destacado, devido à capacidade de usar quantidades muito pequenas de amostras e reagentes, realizar separações e detecções com alta resolução e sensibilidade, baixo custo, tempos curtos de análise e portabilidade (CREVILLÉN *et al.*, 2007; WHITESIDES, 2006).

O campo da microfluídica tem quatro pilares, os quais impulsionaram o seu desenvolvimento, são eles: análise molecular, bio-defesa, biologia molecular e microeletrônica. Primeiramente, iniciou-se com a análise molecular, pois a origem da microfluídica está nos métodos de separação: cromatografia gasosa (CG),

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE). Esses métodos de separação, combinados com o poder dos métodos de detecção, tornaram possível a obtenção de alta sensibilidade e resolução, usando quantidades muito pequenas de amostras. O sucesso desses métodos desenvolvidos em microcanais estimulou o desenvolvimento de sistemas microfluídicos ainda mais compactos e mais versáteis, com aplicações em química e bioquímica (WHITESIDES, 2006).

A segunda motivação para o desenvolvimento da microfluídica surgiu após o fim da guerra fria. Devido às ameaças terroristas com armas químicas e biológicas, o Departamento de Defesa dos EUA (*Defense Advanced Research Projects Agency - DARPA*) apoiou uma série de programas na década de 1990 que visavam o desenvolvimento de sistemas microfluídicos projetados para utilização no campo de guerra, que serviriam como detectores de ameaças químicas e biológicas. Estes programas foram o principal estímulo para o rápido crescimento da tecnologia microfluídica no meio acadêmico (WHITESIDES, 2006).

O terceiro pilar que colaborou para o crescimento da microfluídica veio do campo da biologia molecular, com a explosão da genômica na década de 1980. O sequenciamento de DNA exigiu métodos analíticos com maior rendimento, sensibilidade e resolução. A microfluídica oferece métodos capazes de superar essas expectativas (WHITESIDES, 2006).

A quarta contribuição veio da microeletrônica. A fotolitografia e outras tecnologias de microfabricação associadas à microeletrônica, que tinham sido tão bem sucedidas em silício e em sistemas microeletromecânicos (MEMS), seriam diretamente aplicáveis à microfluídica. De fato, os primeiros trabalhos em microfluídica usaram *microchips* de silício e vidro, sendo que esses materiais foram,

em algumas aplicações, substituídos por plásticos. O silício, em particular, é caro e opaco a luz visível e ultravioleta, por isso não pode ser utilizado em métodos ópticos de detecção convencionais. Além disso, é mais fácil fabricar os componentes requeridos para sistemas de microanálises - especialmente bombas e válvulas – em elastômeros do que em materiais rígidos (WHITESIDES, 2006).

### **1.3. Dispositivos microfluídicos**

#### **1.3.1. Substratos**

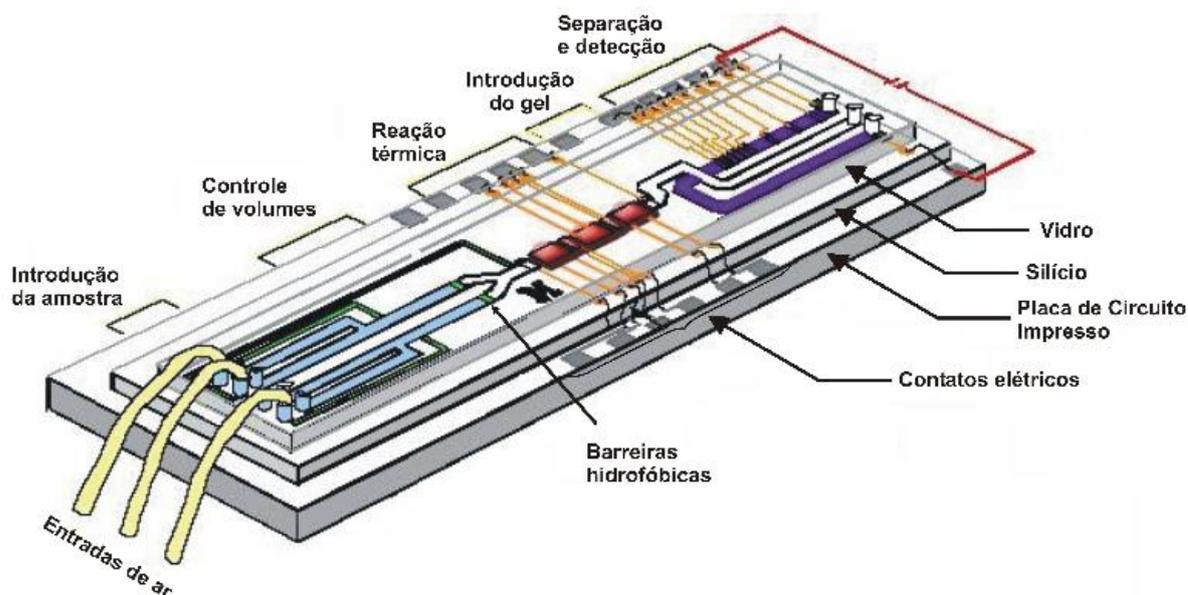
Na escolha do material para a fabricação de dispositivos microfluídicos, várias características devem ser consideradas: custo, superfície química, propriedades ópticas e elétricas, biocompatibilidade, facilidade de fabricação e integração e a viabilidade de produção em grande escala. Dependendo da aplicação, os dispositivos podem ser fabricados a partir de vidro, silício, polímeros, papel, entre outros, ou até mesmo por uma combinação destes materiais (KOVARIK *et al.*, 2012).

##### *1.3.1.1 Vidro*

O vidro é muito utilizado para construção de *microchips* analíticos, contudo os procedimentos de fabricação, baseados na fotolitografia, demandam infraestrutura especializada e de alto custo. Mesmo assim, características como a boa transparência óptica, eficiente dissipação de calor, propriedades de superfície bem conhecidas e excelentes resistências química e ao *stress* mecânico, ainda fazem do vidro o material mais popular e a primeira opção na grande maioria das aplicações

(BECKER, GARTNER, 2008). Recentemente, alguns processos alternativos de microfabricação em vidro têm sido desenvolvidos, com o objetivo de contornar a desvantagem do alto custo da fotolitografia (SANTANA *et al.*, 2013).

A Figura 1.1 apresenta um dos primeiros *microchips* analíticos desenvolvidos para realização das múltiplas etapas de uma análise de DNA. Trata-se de um exemplo de uma combinação dos materiais vidro, silício e placas de circuito impresso. O microdispositivo representado contém conectores para entrada de ar, canais microfluídicos, barreiras hidrofóbicas para filtração, sensores de temperatura, controlador de volume, eletrodos para o controle de temperatura para PCR (“*polymerase chain reaction*”), sistema para preenchimento com gel e eletrodos para controle eletrocinético. Uma amostra de 120 nL contendo DNA é inserida no dispositivo e detectada após a reação de PCR. O limite de detecção descrito pelos autores foi igual a  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  (BURNS *et al.*, 1998).



**Figura 1.1.** Exemplo de um microsistema fabricado em três camadas usando substratos de vidro, silício e placa de circuito integrado para análise de DNA (Adaptado de BURNS *et al.*, 1998).

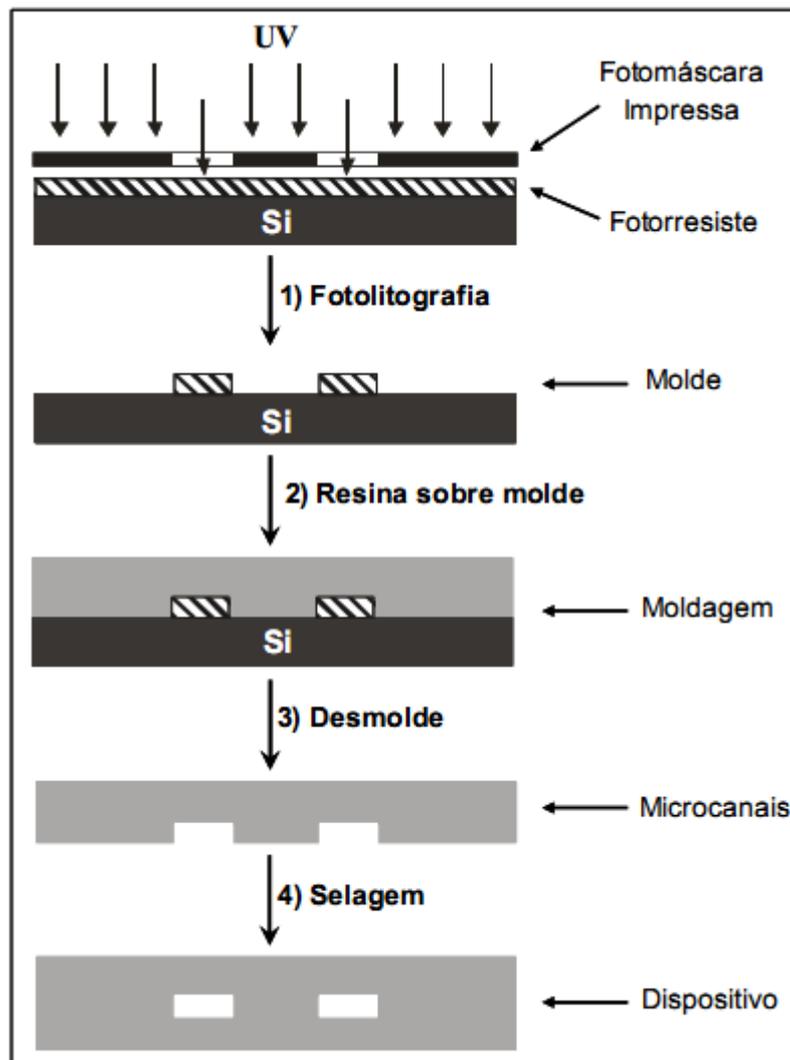
### 1.3.1.2 Polímeros

Os substratos poliméricos surgiram como uma alternativa ao vidro na fabricação de *microchips* usados em aplicações analíticas e bioanalíticas. A enorme quantidade de materiais disponíveis no mercado, a ampla variedade de propriedades químicas, mecânicas, elétricas e ópticas, bem como as várias possibilidades em métodos de microfabricação, permite a seleção do material ótimo para a grande maioria das aplicações. Adicionalmente, microdispositivos poliméricos são mais baratos e de fácil manipulação quando comparados ao vidro, além de permitirem a fabricação em massa (PICCIN, 2008).

Os polímeros comumente utilizados em microfabricação se dividem em três classes principais de acordo com suas propriedades físicas: polímeros elastoméricos, polímeros termoplásticos e polímeros termofixos. Cadeias moleculares entrelaçadas de maneira mais física do que química, formam os polímeros elastoméricos, que possuem a capacidade de retornarem a sua forma original depois de terem sofrido a aplicação de uma força externa. O polidimetilsiloxano (PDMS) possui baixa temperatura de cura, excelente transparência ótica, elasticidade, não é tóxico e possui baixo custo. Essas características o tornam o polímero mais utilizado na fabricação de dispositivos microfluídicos (PICCIN, 2008).

O método mais usado para a construção de *microchips* em PDMS é o processo de moldagem através da aplicação da resina polimérica sobre moldes microfabricados por fotolitografia. A Figura 1.2 mostra uma representação esquemática da fabricação de microdispositivos através do processo de moldagem polimérica. O processo se inicia pela construção de um molde através de

prototipagem rápida em fotolitografia. Para isso, uma camada de fotoresiste, depositada sobre uma placa de silício, é irradiada com uma fonte de luz UV, usando como anteparo a fotomáscara contendo o desenho do microdispositivo. Como o fotoresiste é uma resina que sofre polimerização apenas quando irradiada por luz UV, a parte protegida pela fotomáscara é removida em um processo denominado revelação. O fotoresiste polimerizado sobre a placa de silício, remanescente do processo de revelação, constitui o alto relevo do molde. Uma resina contendo os constituintes monoméricos do polímero e um agente de cura são misturados e aplicados sobre o molde, sendo deixados em repouso até que ocorra a total polimerização. Após cura completa, as réplicas moldadas são retiradas do molde e os microcanais formados no polímero são selados usando uma peça lisa do mesmo polímero ou de outro material (PICCIN, 2008).



**Figura 1.2.** Fabricação de moldes por prototipagem rápida em fotolitografia seguida da construção de microdispositivos através do processo de moldagem polimérica (PICCIN, 2008).

### 1.3.1.3 Papel

Recentes desenvolvimentos sugerem que substratos à base de papel podem ser uma alternativa interessante para fabricação de dispositivos microfluídicos. Papel, feito de fibras de celulose, é abundante, barato e sustentável, descartável, fácil de usar, armazenar e transportar, fácil de modificar quimicamente e é familiar

para o público. Ensaios realizados em dispositivos à base de papel dispensam a utilização de bombas e válvulas, devido à ação capilar (KOVARIK *et al.*, 2012).

#### **1.4. Dispositivos microfluídicos à base de papel**

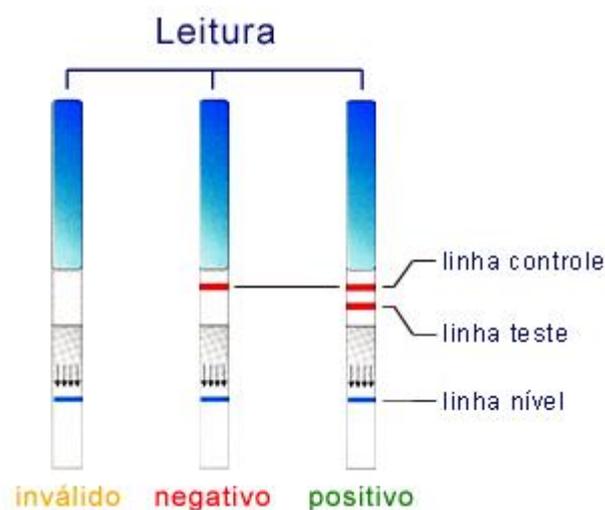
Nos últimos anos, existe um interesse crescente no desenvolvimento de dispositivos microfluídicos à base de papel (*microfluidic paper-based devices*,  $\mu$ PADs), fabricados pela aplicação de materiais hidrófobicos sobre o papel hidrofílico. Estes sistemas podem combinar algumas das capacidades tradicionais de dispositivos microfluídicos, como por exemplo, utilização de pequenos volumes de amostras e reagentes, com o baixo custo, simplicidade, facilidade de utilização, portabilidade e descartabilidade. Eles são considerados como sendo ideais para o desenvolvimento de diagnósticos por meio de bioensaios em áreas remotas e ambientes de recursos limitados, ou até mesmo para diagnósticos feitos em casa, tendo um grande potencial para aplicação em pequenos laboratórios de países menos desenvolvidos e com recursos limitados (LIANA *et al.*, 2012).

##### **1.4.1. Um pouco de história**

A invenção da cromatografia em papel, por Martin e Synge, que foram premiados com o Prêmio Nobel de química em 1952, marca o começo da utilização de diagnósticos utilizando dispositivos a base de papel. (KRICKA, SIA, 2008; PAROLO, MERKOÇI, 2013)

O primeiro teste em papel foi apresentado em 1956 para a determinação de glicose em urina, seguido da introdução no mercado consumidor em 1960. Hoje,

testes em tiras de papel (também chamados testes de fluxo lateral ou imunoenaios) são muito utilizados. Um exemplo bem conhecido é o teste de gravidez (Figura 1.3). Tipicamente, esses ensaios são baseados na imobilização em uma tira de papel do anticorpo de captura específico a um antígeno de interesse presente na amostra. Os resultados são comparados a um código de cores e fornecem uma detecção qualitativa do tipo “sim/não”. Estes testes são vantajosos devido à sua simplicidade e baixo custo. Contudo, não são quantitativos e nem suficientemente sensíveis para certos biomarcadores, além de não terem capacidade para múltiplas análises (LIANA *et al.*, 2012; YETISEN, AKRAM, LOWE, 2013).



**Figura 1.3.** Leitura de um teste de gravidez de farmácia feito em uma tira de papel. O resultado positivo se deve a presença do hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG).

Recentemente, com o interesse por testes quantitativos e o advento das técnicas de microfabricação, surgiram os  $\mu$ PADs (*microfluidic paper-based devices*,  $\mu$ PADs), dispositivos que integram as vantagens do papel com as da microfluídica (KRICKA, SIA, 2008; PAROLO, MERKOÇI, 2013).

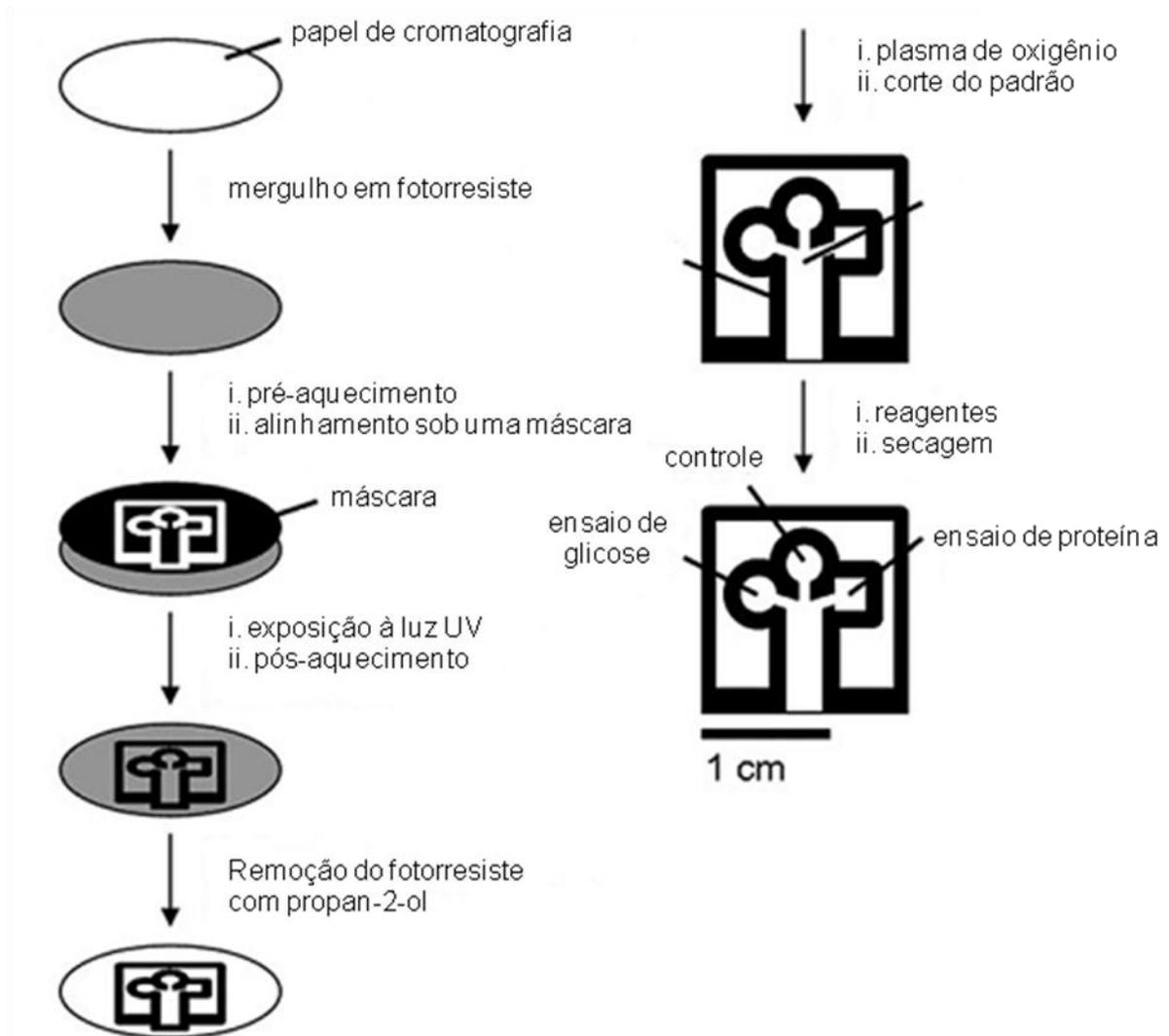
### 1.4.2. Fabricação de $\mu$ PADs

Na escolha de técnicas e materiais para fabricação de  $\mu$ PADs deve-se considerar os critérios de simplicidade, baixo custo e eficiência no processo de produção em massa. Existem várias técnicas e processos de modificação química e/ou deposição física de polímeros que podem ser usados para ajustar as propriedades do papel, de tal modo que este se torne disponível para modificação adicional ou utilização direta em várias aplicações (LIANA *et al.*, 2012; KWONG, GUPTA, 2012).

Martinez *et al.* (2007) foram os pioneiros na fabricação dos  $\mu$ PADs, sendo que para tal processo utilizaram a fotolitografia. Desde então foram relatados na literatura uma série de métodos para a fabricação de  $\mu$ PADs, como a impressão a cera (CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009; DUNGCHAI; CHAILAPAKUL; HENRY, 2011; LEWIS *et al.*, 2012), serigrafia ou “*silk-screen*” (DUNGCHAI; CHAILAPAKUL; HENRY, 2011), impressão a laser (SCHILLING *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2012), impressão flexográfica (OLKKONEN; LEHTINEN; ERHO, 2010), tratamento por plasma (LI *et al.*, 2008), recorte a laser (FENTON *et al.*, 2009), plotagem mecânica (BRUZEWICZ; RECHES; WHITESIDES, 2008), entre outros (LIANA *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2009; MAEJIMA *et al.*, 2013; SONGJAROEN *et al.*, 2011; YETISEN; AKRAM; LOWE, 2013). Cada um desses métodos possui suas vantagens e limitações.

#### 1.4.2.1 Fotolitografia

A fotolitografia (*foto*: luz; *lito*: pedra; *grafia*: escrita) consiste fundamentalmente na gravação de estruturas micrométricas em um substrato plano com auxílio de raios-x ou radiação ultravioleta (COLTRO *et al.*, 2007). A Figura 1.4 mostra uma representação esquemática do processo fotolitográfico para fabricação de  $\mu$ PADs, proposto por Martinez *et al.* (2007). Como observado, inicialmente, o papel de cromatografia é embebido com fotorresiste, um polímero sensível à radiação ultravioleta (UV). Em seguida, uma máscara fotolitográfica é colocada sobre o papel e esse conjunto é exposto à radiação para gravação da imagem desejada. Essas máscaras fotolitográficas são obtidas pela impressão direta em transparências usando impressoras de alta resolução. A exposição à radiação promove uma interação entre o feixe incidente e o polímero fotossensível. Conseqüentemente, a estrutura química do polímero exposto à radiação sofre polimerização. Após aquecimento, o fotorresiste contido nas áreas não polimerizadas (protegidas pela máscara) é removido com o uso de um solvente adequado e, por fim, toda a superfície é exposta a um plasma de oxigênio para retirar polímeros remanescentes no canal hidrofílico (MARTINEZ *et al.*, 2007).



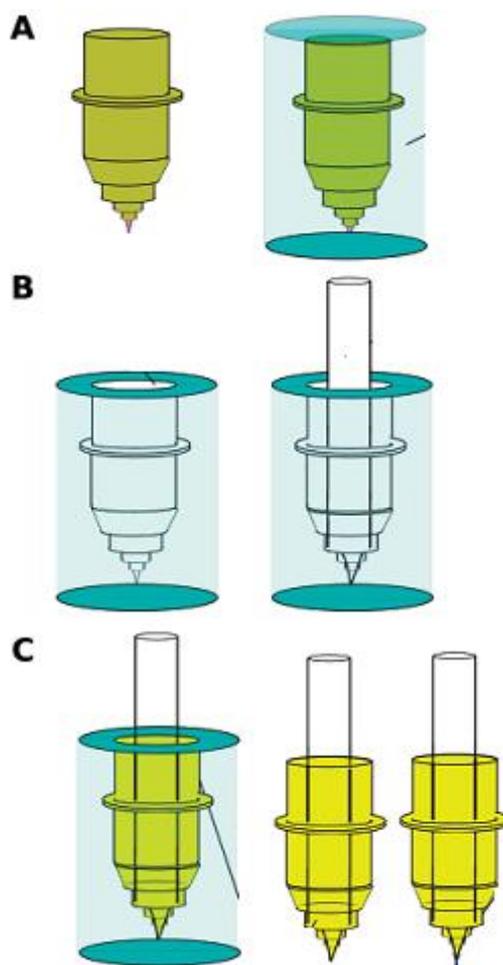
**Figura 1.4.** Esquema que descreve o método para a fabricação de canais hidrofóbicos em papel por fotolitografia (MARTINEZ *et al.*, 2007).

O método baseado em fotolitografia fornece elevada resolução entre as áreas hidrofílicas e hidrofóbicas (aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de largura mínima da barreira hidrofóbica). No entanto, requer a utilização de equipamentos e reagentes de alto custo, como reveladores, fotorresistes, foto-alinhadoras, plasma de oxigênio, sala limpa, que tornam o método, muitas vezes, inviável. Com o objetivo de contornar algumas dessas limitações, em 2008, Martinez *et al.* descreveram um método rápido para prototipagem de dispositivos microfluídicos em papel, denominado FLASH (*Fast Lithographic Activation of Sheets*). O método FLASH é baseado em

fotolitografia, mas requer apenas uma lâmpada de UV e uma placa de aquecimento, não necessitando sala limpa e aparelhos sofisticados. Com isso, mantém-se a maior vantagem da fotolitografia, que é a alta resolução, com canais com dimensões tão pequenas quanto 200  $\mu\text{m}$  (MARTINEZ *et al.*, 2008).

#### 1.4.2.2 Plotagem mecânica

Em 2008, Bruzewicz *et al.* realizaram uma modificação mecânica em uma *plotter* do tipo *x,y* (modelo Hewlett-Packard 7550A) para fabricar canais hidrofílicos em papel cromatográfico, por meio da impressão de uma solução de polímero hidrofóbico, o polidimetilsiloxano (PDMS), dissolvido em hexano. O PDMS penetra nos poros do papel e, depois de curado, forma uma parede hidrofóbica que soluções aquosas não podem cruzar. Esse tipo de *plotter* faz a impressão por meio de um braço mecânico que movimenta uma caneta sobre a folha de papel a ser impressa. Um motor separado move o papel ao longo de um eixo perpendicular ao movimento do braço mecânico. Uma vez que o braço mecânico reconhece as canetas que carregam as tintas pela sua forma, foi criada uma réplica das canetas originais para que fossem carregadas com a mistura PDMS/hexano, utilizada na fabricação dos  $\mu\text{PADs}$  (Figura 1.5). Os canais formados exibiram uma largura mínima de 1 mm, e o espaçamento mínimo entre dois canais foi de 1 mm. Estas dimensões são grandes quando comparadas às que normalmente se verificam em sistemas microfluídicos, mas são de tamanho adequado para dispositivos básicos feitos em papel para diagnósticos clínicos. Isso porque a leitura desses dispositivos, muitas vezes, envolve observações visuais e/ou ensaios colorimétricos (BRUZEWICZ; RECHES; WHITESIDES, 2008).



**Figura 1.5.** Ilustração esquemática do processo de adaptação de uma caneta usada para fabricar canais hidrofílicos em papel. (A) À esquerda, uma caneta original. À direita, uma caneta original contendo PDMS (em azul) em sua volta para moldagem. (B) Molde de PDMS curado contendo o formato da caneta original (esquerda). Tubo de vidro inserido no molde de PDMS. (C) O molde de PDMS contendo o tubo de vidro é preenchido por um polímero rígido a base de poliuretano e curado em luz ultravioleta. Finalmente, a caneta é preenchida com PDMS e está pronta para ser adaptada na *plotter* x,y (Adaptado de BRUZEWICZ *et al.*, 2008).

### 1.4.2.3 Impressão a cera

Com o crescente interesse na utilização de  $\mu$ PADs em análises clínicas, surge uma metodologia bastante simples baseada na impressão a cera utilizando impressoras de cera sólida (essas impressoras são comumente comercializadas pela Xerox). Nessa metodologia, Carrilho *et al.* (2009) imprimiram padrões de cera sólida sobre a superfície do papel cromatográfico e, em seguida, utilizaram uma placa de aquecimento para fundir essa cera impressa, de modo que penetrasse nos poros do papel (Figura 1.6). Este processo possibilita a criação de barreiras hidrofóbicas no papel, que definem os canais hidrofílicos. Essa metodologia envolve um pequeno número de passos, sendo adequada para a fabricação de grandes quantidades ( $> 100$ ) de  $\mu$ PADs em um único lote.

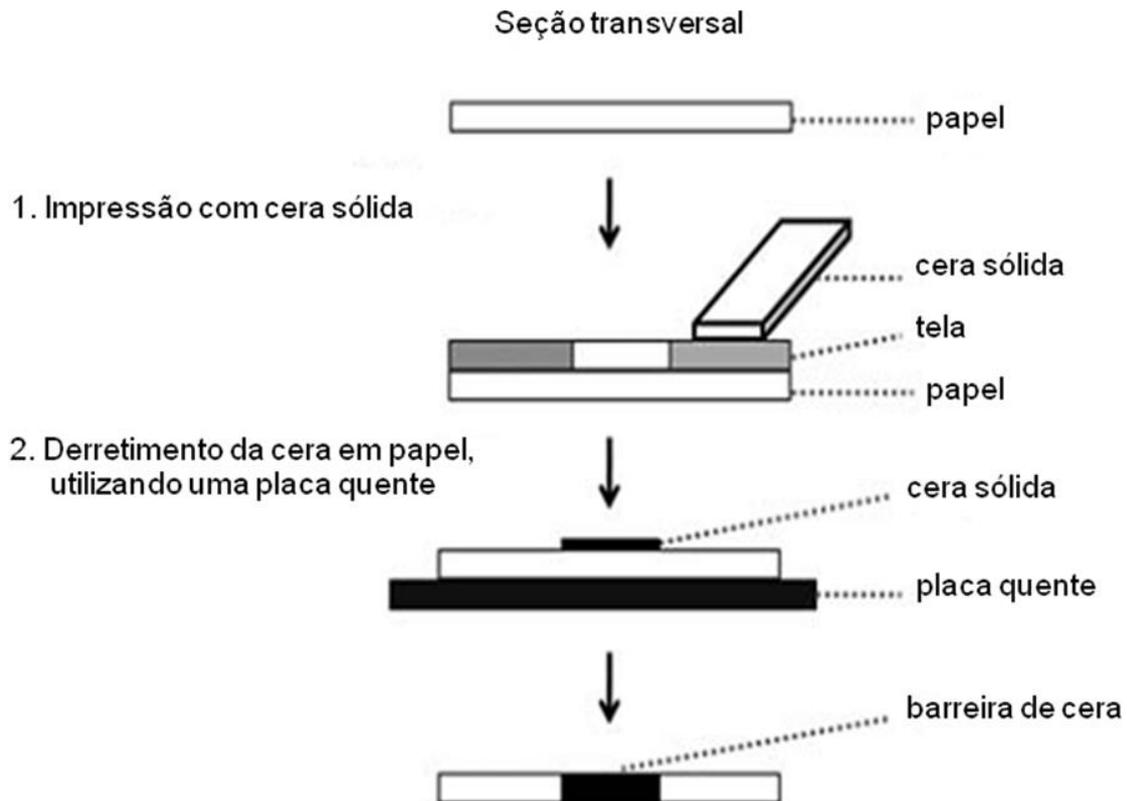
Nessa metodologia, há um certo espalhamento lateral da cera, quando a mesma é aquecida, resultando em barreiras hidrofóbicas mais largas do que os padrões originalmente impressos. Assim, o processo permite a fabricação de barreiras hidrofóbicas com espessuras mínimas de  $850 \mu\text{m}$  e canais hidrofílicos de  $561 \mu\text{m}$ . Dessa maneira, o método não possui resolução tão alta quanto ao método fotolitográfico, o que não é um impedimento para a maioria das aplicações (CARRILHO *et al.*, 2009).



**Figura 1.6.** Representação esquemática das etapas necessárias para a fabricação de  $\mu$ PADs por impressão a cera (Adaptado de CARRILHO *et al.*, 2009).

#### 1.4.2.4 Serigrafia ou silk-screen

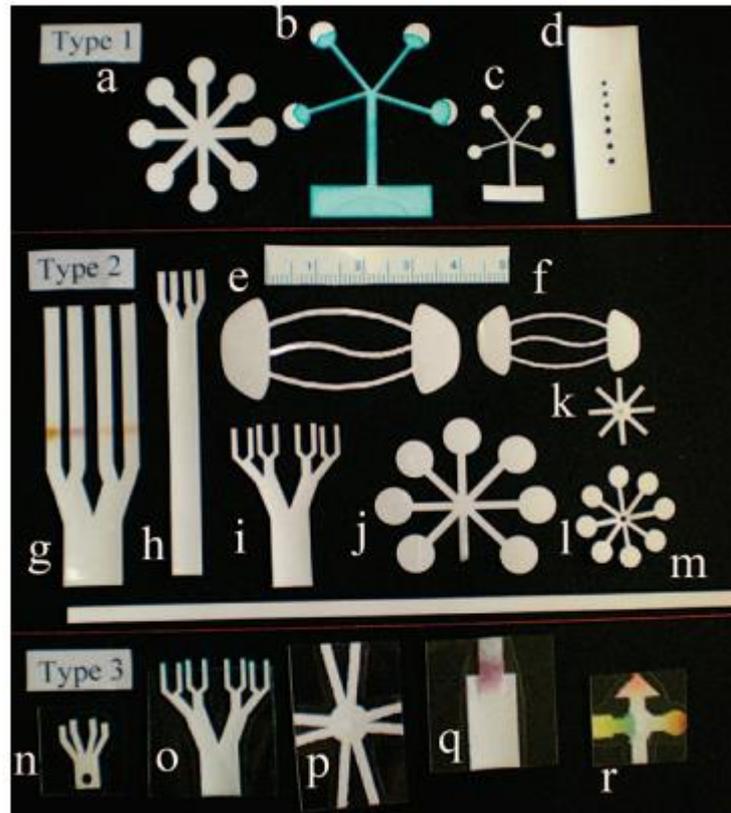
Em 2011, Henry *et al.* descreveram um método utilizando serigrafia ou “*silk-screen*” para criar barreiras hidrofóbicas em papel. A serigrafia é um método bem conhecido e de baixo custo utilizado para a impressão de imagens em roupas e outros materiais do cotidiano, bem como para criação de eletrodos *screen-printed*. Esse método de fabricação consiste de três passos: (1) fabricação de uma tela em *nylon* contendo o modelo (“*screens*”) dos dispositivos. (2) utilizando giz de cera convencional, a cera é depositada manualmente sobre o papel cromatográfico através da tela de *nylon* que contém o modelo do dispositivo (Figura 1.7), e (3) a cera é derretida no papel utilizando uma placa de aquecimento, de modo a formar barreiras hidrofóbicas. Um esquema do método é mostrado na Figura 1.7.



**Figura 1.7.** Diagrama esquemático do método de fabricação de  $\mu$ PADs por serigrafia ou *silk-screen* (Adaptado de DUNGCHAI, CHAILAPAKUL, HENRY, 2011).

#### 1.4.2.5 Recorte

Uma *plotter* do tipo *x,y* foi modificada por Fenton *et al.* (2009) para a fabricação de  $\mu$ PADs por meio do recorte do substrato de papel. Os autores trocaram a caneta à tinta que faz parte da *plotter* por uma lâmina, comumente utilizada em impressoras de recorte. Com isso, foi possível realizar o recorte preciso das estruturas desejadas em papel cromatográfico. O próprio recorte delimita o fluxo da solução no papel. A Figura 1.8 mostra os dispositivos obtidos pelos autores através do método de recorte.

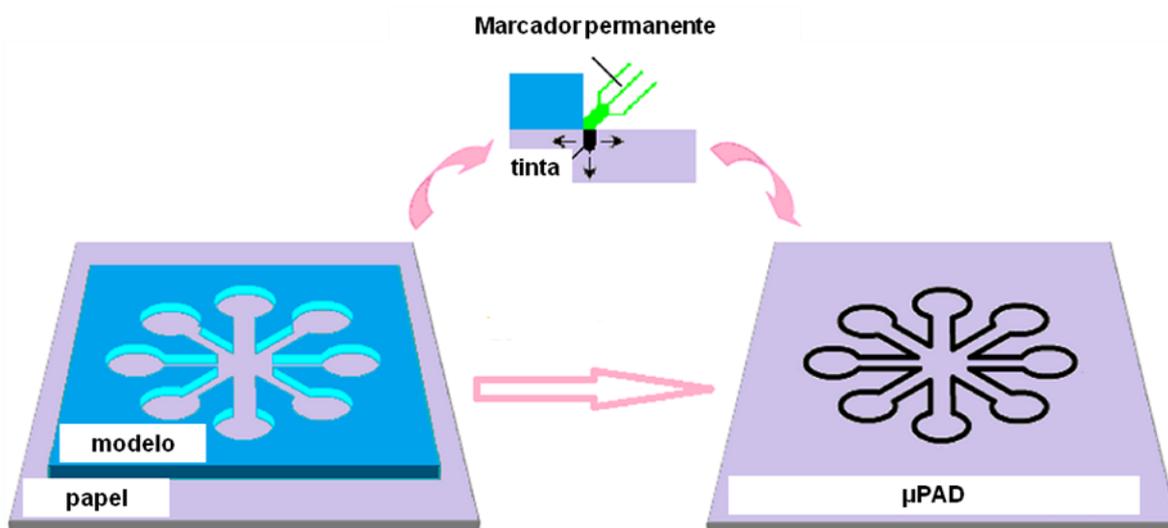


**Figura 1.8.**  $\mu$ PADs obtidos pelo método de corte (FENTON *et al.*, 2009).

#### 1.4.2.6 Fabricação de $\mu$ PADs usando canetas marcadoras

Em 2012, Nie *et al.* descreveram um método para a fabricação de  $\mu$ PADs utilizando marcadores permanentes e placas de ferro contendo os padrões desejados para os microdispositivos. Esses marcadores permanentes são canetas que contém uma tinta resistente à água, formada por um corante, um solvente (tipicamente etanol) e uma resina hidrofóbica. Com o auxílio dos modelos de ferro, fabricados por usinagem, contendo os padrões desejados para os  $\mu$ PADs, os marcadores foram utilizados para desenhar diretamente sobre o papel cromatográfico os dispositivos contendo os padrões desenvolvidos. A tinta da caneta permanente penetra nos poros do papel e, depois da evaporação rápida do solvente,

as resinas remanescentes formam as barreiras hidrofóbicas que definem os canais hidrofílicos ou zonas de teste independentes. O processo de fabricação descrito por Nie *et al.* (2012) está esquematizado na Figura 1.9.



**Figura 1.9.** Esquema do método de fabricação de  $\mu$ PADs descrito por Nie *et al.* (2012) (Adaptado de NIE *et al.*, 2012).

#### 1.4.3. Métodos de detecção em $\mu$ PADs

Métodos ópticos e eletroquímicos são os mais adequados para detecção em  $\mu$ PADs, pois esses mantêm a simplicidade e portabilidade dos dispositivos. Entre os métodos mais comumente encontrados na literatura, destacam-se o colorimétrico com análise de imagens (LEWIS *et al.*, 2012; SONGJAROEN *et al.*, 2011; NIE *et al.*, 2012), eletroquímico (LU *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2012; NIE *et al.*, 2010; DUNGCHAI *et al.*, 2009) quimioluminescência (YU *et al.*, 2011a,b) e eletroquimioluminescência (YAN *et al.*, 2012, 2013; XU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013).

#### 1.4.3.1 Detecção Colorimétrica

A colorimetria em  $\mu$ PADs é a mais simples, rápida e barata das metodologias, pois baseia-se apenas na medida da intensidade de cor em função da concentração da substância analisada. Basicamente, o fluxo de amostra contendo o analito de interesse é dirigido até a zona de teste que contém o reagente colorimétrico e, após o desenvolvimento de cor devido à reação química entre o analito e o reagente, a imagem do  $\mu$ PAD é registrada usando um *scanner* de mesa ou uma câmera fotográfica. A imagem é então analisada quanto à intensidade de coloração utilizando um software gráfico e, finalmente, essa intensidade de coloração é relacionada com a concentração do analito na amostra.

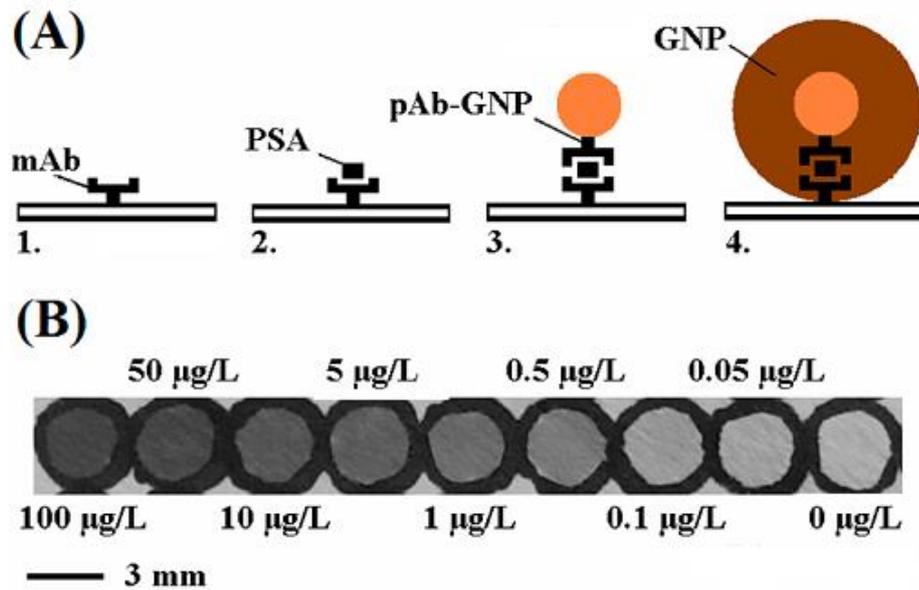
Martinez *et al.* (2007) foram os primeiros a demonstrar a detecção colorimétrica em  $\mu$ PADs para análise de glicose e proteínas totais. O ensaio de glicose baseia-se na oxidação enzimática de iodeto a iodo, em que uma mudança de cor de transparente/branco para marrom é associada à presença de glicose. No ensaio de proteína totais, o reagente azul de tetrabromofenol (*tetrabromophenol blue, BHT*), quando se ioniza, liga-se às proteínas, ocorrendo uma alteração de cor de amarelo para azul (Figura 1.10).



exposto a uma solução  
de urina artificial contendo  
glicose e proteína

**Figura 1.10.** Teste positivo para glicose (esquerda) e proteína (direita), utilizando uma solução contendo  $550 \text{ mmol L}^{-1}$  de glicose e  $75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de proteína em urina artificial ( $5 \text{ } \mu\text{L}$ ) (MARTINEZ *et al.*, 2007).

Nie *et al.* (2012) fabricaram zonas circulares hidrofóbicas em papel cromatográfico ( $\sim 3 \text{ mm}$  diâmetro) para a detecção colorimétrica e quantificação do antígeno específico da próstata (PSA). O método foi baseado em um imunensaio do tipo sanduíche, sendo que na zona de teste adicionaram um primeiro anticorpo (anticorpo monoclonal para PSA), depois o antígeno, um segundo anticorpo (anticorpo policlonal para PSA) e, por fim, uma solução contendo nanopartículas de ouro, que foram utilizadas para realçar e amplificar a coloração (Figura 1.11).



**Figura 1.11.** (A) Esquema da detecção colorimétrica para PSA: 1. Adição do anticorpo monoclonal para PSA (mAb); 2. Adição do antígeno (PSA); 3. Adição do anticorpo policlonal para PSA e de nanopartículas de ouro (pAb-GNP); 4. Amplificação da coloração. (B) Os resultados de coloração obtidos para o imunoenensaio do tipo sanduíche para detecção de PSA (NIE *et al.*, 2012).

Ratnarathorn *et al.* (2012) demonstraram a análise colorimétrica de cobre usando nanopartículas de prata (AgNP) em  $\mu$ PADs. Os dispositivos à base de papel foram fabricados por imobilização das AgNP funcionalizadas com homocisteína (Hcy) e ditiotretol (DTT) na zona de teste. Uma mudança de cor é observada após a adição de solução de cobre sobre a superfície do papel revestido com Hcy-DTT-AgNP. Essa metodologia foi utilizada para determinação de cobre em amostras de água de torneira e lago.

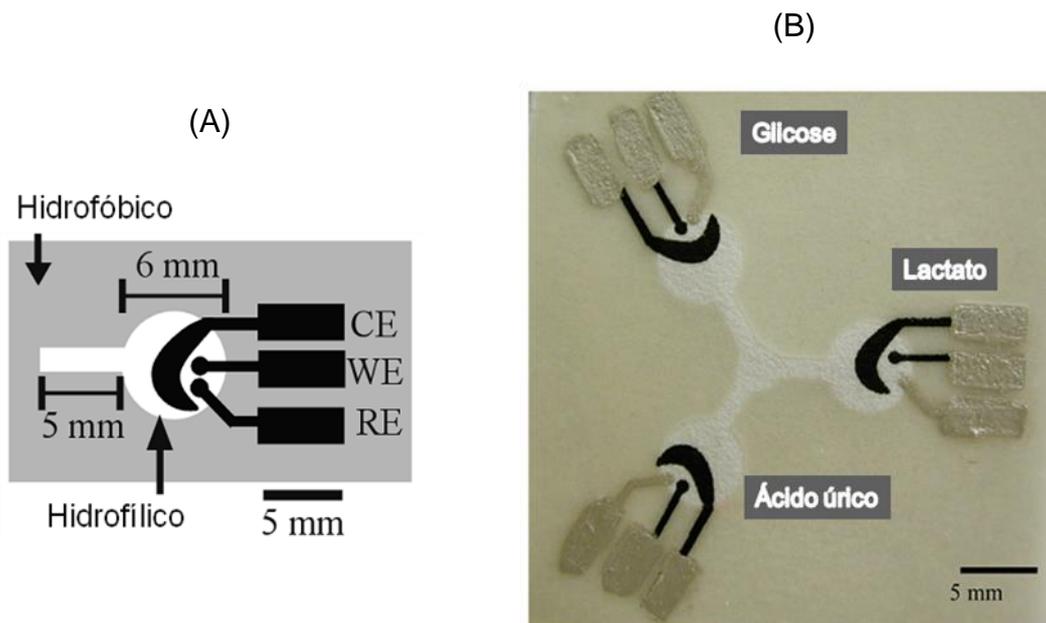
Como outro exemplo de aplicação, em 2012, Henry *et al.* demonstraram a detecção colorimétrica em  $\mu$ PADs de diferentes patógenos de origem alimentar, como os agentes bacterianos *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*. As zonas de teste foram criadas pelo método de impressão a cera

em papel cromatográfico. A detecção foi feita através da medição da alteração de cor quando uma enzima, associada com o agente patogênico de interesse, reage com um substrato cromogênico.

#### 1.4.3.2 Detecção Eletroquímica

As técnicas eletroquímicas geralmente necessitam de um sistema de três eletrodos, sendo um eletrodo de referência (ER), um eletrodo auxiliar (EA) e um eletrodo de trabalho (ET). Na fabricação de um  $\mu$ PAD com detecção eletroquímica, esse sistema de três eletrodos é fabricado sobre a parte hidrofílica do papel, geralmente utilizando tintas condutoras a base de carbono (ET e EA) e prata (ER). Isto significa que um  $\mu$ PAD com detecção eletroquímica pode substituir células eletroquímicas convencionais, onde grandes volumes de soluções e eletrodos de estado sólido são comumente utilizados (LU *et al.* 2012; NIE *et al.*, 2010).

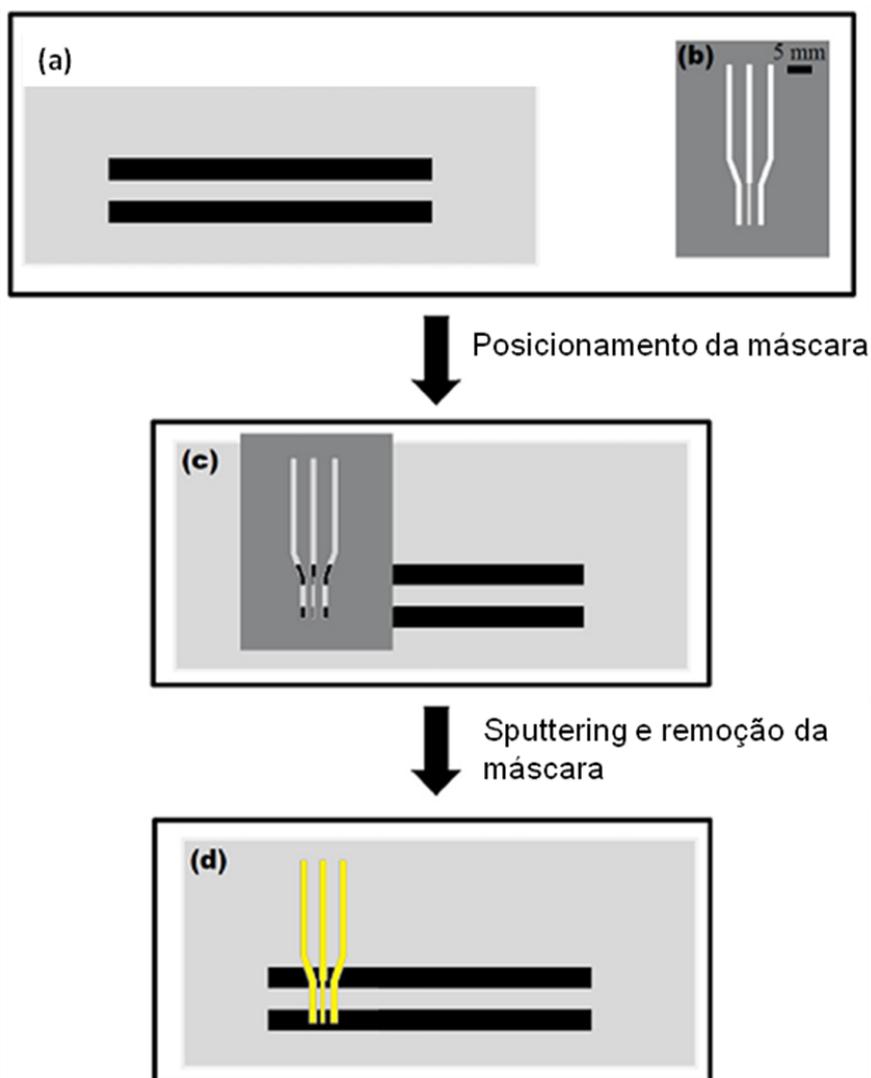
Dungchai *et al.* (2009) foram os primeiros a demonstrar a detecção eletroquímica em  $\mu$ PADs. A Figura 1.12 mostra imagens desses dispositivos que foram utilizados na determinação de glicose, ácido úrico e ácido láctico em amostras de soro. A fotolitografia foi usada para criar os canais microfluídicos em papel e a tecnologia de serigrafia (ou “*silk-screen*”) foi utilizada para fabricar os eletrodos utilizando tintas condutoras de carbono e prata. A determinação de glicose, lactato e ácido úrico em amostras biológicas baseou-se na oxidação dessas espécies pelas enzimas glicose-oxidase, lactato-oxidase e uricase, respectivamente. A oxidação dessas espécies produz o  $H_2O_2$  que foi medido por amperometria.



**Figura 1.12.** (A) Configuração básica da célula de detecção eletroquímica em um  $\mu$ PAD. WE: Eletrodo de trabalho; RE: Eletrodo de referência; CE: Contra-eletrodo. (B) Imagem de um  $\mu$ PAD com detecção eletroquímica utilizado para determinação de glicose, lactato e ácido úrico (DUNGCHAI *et al.*, 2009). Nesse dispositivo, um volume de apenas 5  $\mu$ L de amostra é aplicado no centro, sendo que a mesma se distribui por capilaridade para as regiões que contém os eletrodos e as enzimas.

Shiroma *et al.* (2012), utilizando o processo de impressão de cera, fabricaram canais de separação com larguras de 2,0 mm em papel cromatográfico (Figura 1.13 a), sendo que no final desses canais foram fabricados sistemas de detecção eletroquímica. Uma máscara feita de cobre (Figura 1.13 b) foi utilizada para delimitar a área dos três eletrodos (ET, ER e EA). Essa máscara foi posicionada na extremidade do canal hidrofílico (Figura 1.13 c) e uma fina camada de ouro foi depositada sobre a máscara através de um processo conhecido como *sputtering*. A máscara foi removida, deixando uma fina película de ouro de aproximadamente 200 nm sobre o papel, que consiste no sistema de três eletrodos utilizados para detecção eletroquímica (Figura 1.13 d). Com esse dispositivo os autores realizaram

a separação cromatográfica e detecção amperométrica de paracetamol e 4-aminofenol.



**Figura 1.13.** Etapas da construção dos  $\mu$ PADs com detecção eletroquímica. (a) Canais hidrofílicos obtidos pelo método de impressão a cera. (b) Máscara de cobre com as delimitações para os três eletrodos. (c) Posicionamento da máscara na extremidade do canal hidrofílico. (d) *Sputtering* de ouro e a remoção da máscara (Adaptado de SHIROMA *et al.*, 2012).

Dossi *et al.* (2013) descreveram um procedimento bem mais simples e rápido para a fabricação de  $\mu$ PADs com detecção eletroquímica. Células eletroquímicas foram replicadas em papel cromatográfico através do método de impressão a cera e

os eletrodos de trabalho, de referência e auxiliar foram desenhados a mão usando lápis comercial. Assim, o grafite dispensado sobre a parte hidrofílica do papel foi utilizado como substrato para os eletrodos da célula eletroquímica.

#### **1.4.4. Aplicações dos $\mu$ PADs**

Como discutido anteriormente, o papel cromatográfico apresenta-se como uma boa alternativa para substratos de dispositivos microfluídicos porque é relativamente barato, descartável, fácil de usar, armazenar e transportar. Sua estrutura e porosidade são controláveis e a natureza da sua superfície apresenta potencial para modificação. Ensaio realizados em dispositivos à base de papel dispensam a utilização de bombas e válvulas, pois o movimento dos fluidos ocorre devido à ação capilar. Por tudo isso, os  $\mu$ PADs tem sido uma plataforma promissora para a aplicação em diversas áreas, se destacando principalmente em diagnósticos clínicos (KHAN *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2013 ) e monitoramento ambiental (SARFRAZ *et al.*, 2012).

Na área de diagnósticos clínicos, destacam-se a determinação de glicose (MARTINEZ *et al.*, 2007; DUNGCHAI, CHAILAPAKUL, HENRY, 2011; Fenton *et al.*, 2009; NIE *et al.*, 2010), ácido úrico (Dungchai, Chailapakul, Henry, 2009; YU *et al.*, 2011), proteínas totais (CARRILHO, MARTINEZ, WHITESIDES, 2009; FANG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010), enzimas (NIE *et al.*, 2012) e DNA (LU *et al.*, 2012; ALLEN *et al.*, 2012), em amostras como urina, saliva e sangue (KLASNER, *et al.*, 2010).

Lu *et al.* 2012, por exemplo, desenvolveram um sensor eletroquímico a base de papel para análise de DNA, por meio da modificação do eletrodo de trabalho com nanopartículas de ouro e grafeno. Além de excelente sensibilidade, esse dispositivo

apresentou também boas precisão, estabilidade, e reprodutibilidade em amostras de soro humano.

Em análises ambientais, as condições da amostra podem variar ao longo do dia e também durante o tempo de coleta e transporte para o laboratório. Assim, existe uma necessidade no desenvolvimento de dispositivos que realizem análise em campo. Os  $\mu$ PADs com detecções colorimétrica e eletroquímica atendem bem a essa demanda. No monitoramento ambiental utilizando  $\mu$ PADs destacam-se os trabalhos que envolvem a determinação de metais (ZHANG *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2012; Ratnarathorn *et al.*, 2012). Shi *et al.* (2012), por exemplo, recortaram tiras de papel com 8 mm de largura e 10 cm de comprimento e posicionaram cada tira sobre uma superfície que contém um sistema de três eletrodos de carbono impressos. Uma das extremidades da tira de papel foi mergulhada em solução aquosa contendo os analitos de interesse (Pb(II) e Cd(II)) e, por capilaridade, a solução percorre o papel até atingir os eletrodos de carbono impressos, permitindo a quantificação dos analitos por voltametria de redissolução anódica de onda quadrada. O  $\mu$ PAD desenvolvido foi testado na quantificação direta de Pb(II) e Cd(II) em amostras aquosas contaminadas sem pré-tratamento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo desenvolver um método alternativo, simples, rápido e de baixo custo para fabricação de dispositivos microfluídicos a base de papel ( $\mu$ PADs). Para isso, utilizou-se carimbos de madeira e uma mistura de PDMS/hexano para formar barreiras hidrofóbicas em papel cromatográfico.

### 2.2. Objetivos específicos

- Fabricação de  $\mu$ PADs utilizando tecnologia alternativa de baixo custo.
- Avaliação da resolução do método desenvolvido para a fabricação dos  $\mu$ PADs.
- Aplicação dos  $\mu$ PADs na determinação colorimétrica da proteína albumina sérica bovina (*bovine serum albumin, BSA*).
- Fabricação de  $\mu$ PADs com detecção eletroquímica utilizando a tecnologia proposta e eletrodos de grafite feitos com lápis.
- Avaliação do desempenho dos  $\mu$ PADs com detecção eletroquímica utilizando voltametria cíclica de sistemas modelos.
- Determinação amperométrica de paracetamol em formulações farmacêuticas utilizando  $\mu$ PADs com detecção eletroquímica.

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água destilada.

As soluções de calibração da proteína BSA (Sigma-Aldrich), usadas nos testes colorimétricos, foram preparadas nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 mg mL<sup>-1</sup> dissolvendo-se a quantidade necessária de proteína em água destilada.

A solução de tampão citrato 250 mmol L<sup>-1</sup> (pH 1,8), utilizada nos testes com a proteína BSA, foi preparada pela mistura de ácido cítrico 99% (Sigma-Aldrich) e citrato de sódio 99,5% (Sigma-Aldrich) em 92% de água e 8% de etanol (Sigma-Aldrich) em volume. O ajuste do pH da solução foi realizado com HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>.

A solução do reagente azul de tetrabromofenol (*tetrabromophenol blue, BHT*) (Sigma-Aldrich) 9 mmol L<sup>-1</sup>, também utilizada nos testes para BSA, foi preparada pela diluição do reagente em 95% de etanol e 5% de água em volume.

A solução de cloreto de sódio (Synth) 0,50 mol L<sup>-1</sup>, utilizada como eletrólito suporte nas medidas voltamétricas, foi preparada pela dissolução do sal em água destilada.

As soluções de hexacianoferrato (III) de potássio (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) (Merck) foram preparadas pela dissolução do reagente em solução de NaCl 0,50 mol L<sup>-1</sup>, de acordo com a concentração desejada.

As soluções de tampão acetato 0,001 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,7), utilizadas nos testes com o paracetamol, foram preparadas utilizando como componentes o ácido acético

99,7% (Synth) e o acetato de sódio (Synth). O pH desejado foi ajustado usando solução de HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>.

Soluções estoque de paracetamol na concentração de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> foram preparadas previamente ao uso. Estas soluções foram preparadas dissolvendo-se 0,0076 g de paracetamol em 50 mL de tampão acetato 0,001 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,7). Soluções de calibração foram obtidas pela diluição da solução estoque de paracetamol em tampão acetato (pH 4,7), obtendo-se concentrações finais que variaram entre 100 e 800 µmol L<sup>-1</sup>.

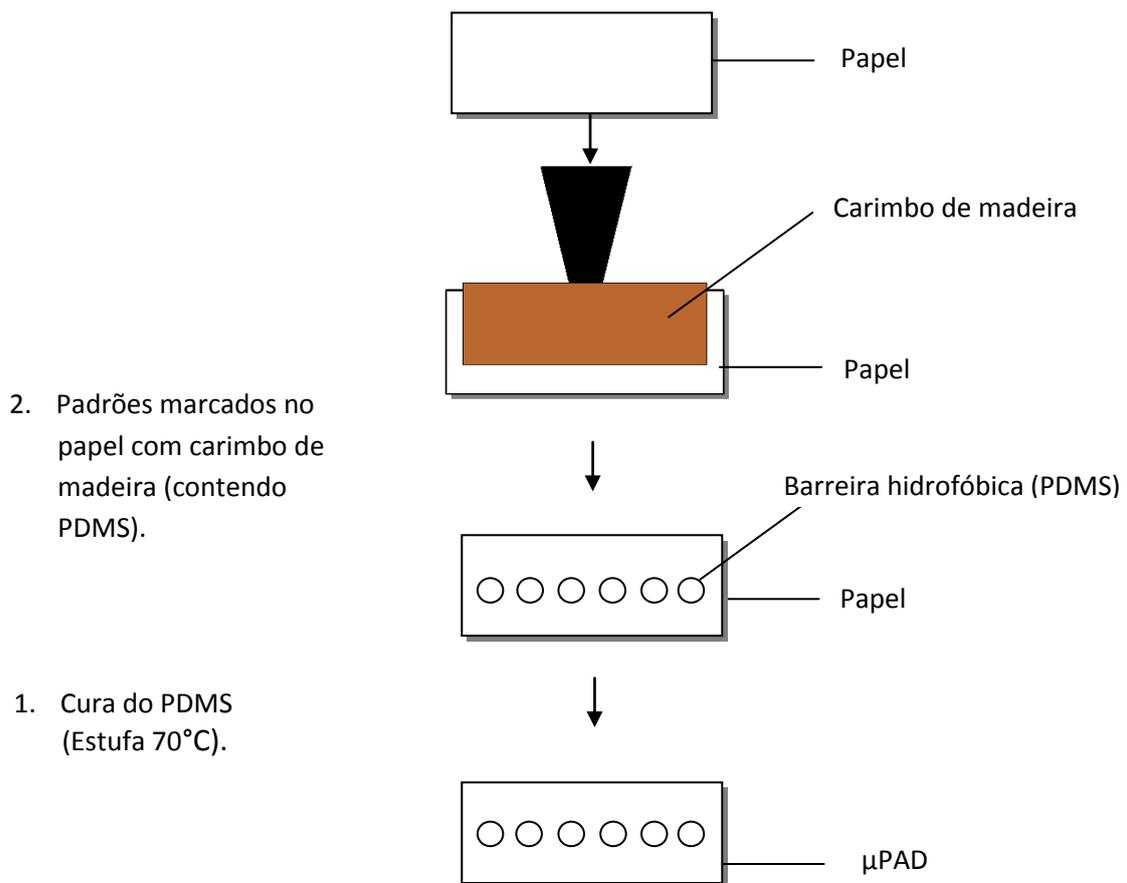
As soluções dos tampões tiveram seus valores de pH ajustados utilizando um pHmêtro modelo MB10 (Marte Científica, São Paulo, SP). O pHmêtro foi diariamente calibrado com soluções tampão comerciais de pH 4,0 e 7,0.

Todos os experimentos foram executados em temperatura ambiente.

### **3.2. Construção dos microdispositivos**

Os dispositivos microfluídicos à base de papel (µPADs) foram construídos utilizando-se carimbos convencionais fabricados em borracha e fixos em suporte de madeira, papel de cromatografia (Whatman n<sup>o</sup>1) e, para a formação das barreiras hidrofóbicas, polidimetilsiloxano (PDMS) (Sylgard 184). O padrão desejado para o microdispositivo, desenhado no *software* Corel Draw 11.0 (Corel Corporation, Ottawa, Canadá), foi confeccionado em um carimbo de madeira, na escala de 1:1. Uma mistura contendo o pré-polímero do PDMS e seu catalisador, na proporção de 10:1 (m/m), foi misturada com hexano 98,5% (Synth), na proporção de 10 g do pré-polímero de PDMS para 1,3 g de hexano (10:1,3 (m/m)). Essa mistura foi aplicada sobre uma espuma polimérica (esponja) comercial e, utilizando o carimbo contendo

o modelo do dispositivo, foi transferida para a superfície do papel cromatográfico. Após um tempo de 15 segundos, suficientes para que a mistura penetrasse nos poros do papel, o mesmo foi levado à estufa a 70°C por 15 minutos para cura do PDMS. Após retirá-lo da estufa, o dispositivo estava pronto para ser usado. O processo de fabricação dos  $\mu$ PADs está esquematizado na Figura 3.1.



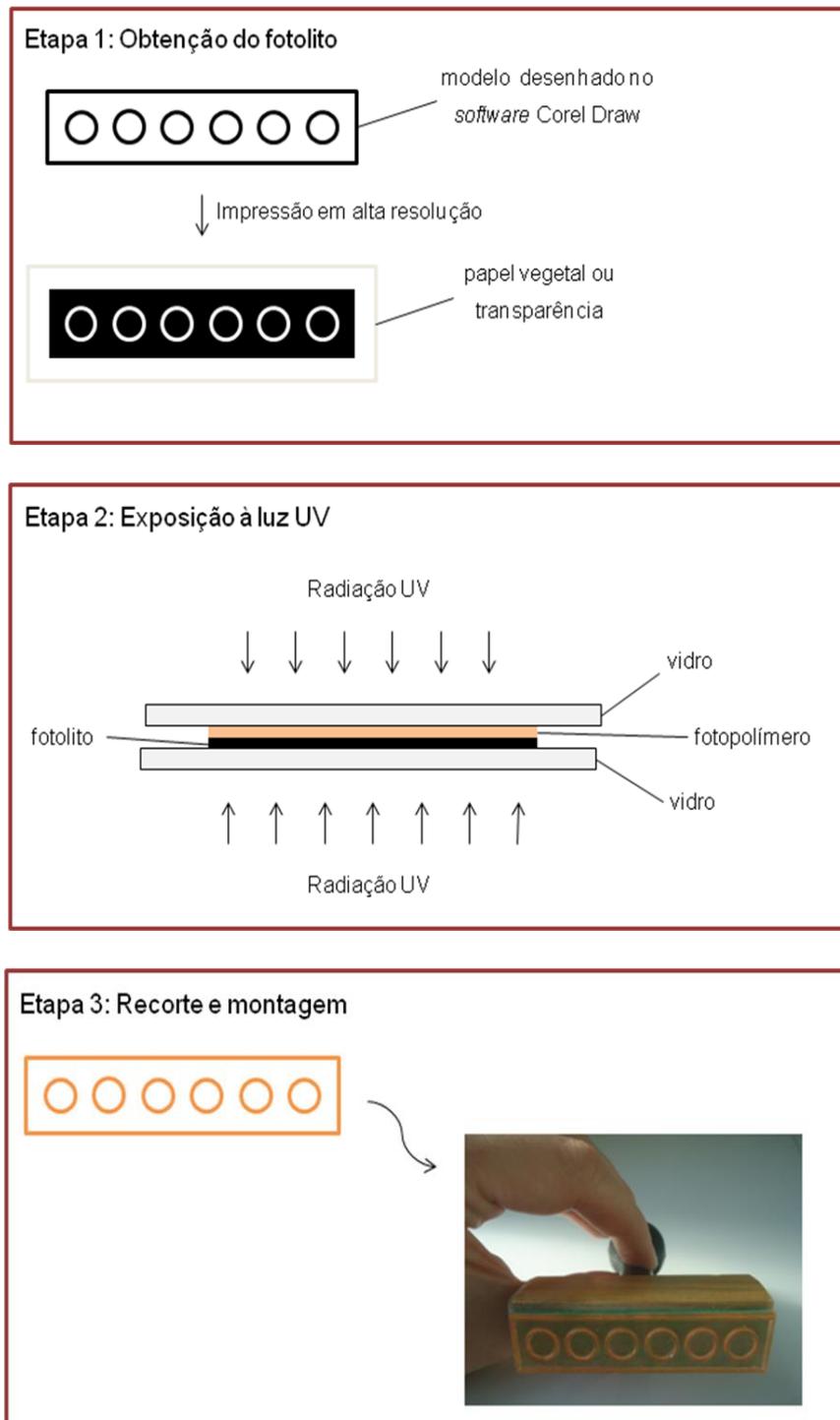
**Figura 3.1.** Esquema do método proposto para fabricação de  $\mu$ PADs.

Na Figura 3.1 está esquematizado apenas um dos modelos de  $\mu$ PADs utilizados nesse trabalho. Outros padrões utilizados estão mostrados na figura 3.2.



**Figura 3.2.** Carimbos utilizados para fabricação de  $\mu$ PADs pelo método proposto.

Os carimbos de madeira utilizados foram adquiridos de uma loja especializada. O processo de fabricação de um carimbo consiste de três etapas principais: 1) o modelo é elaborado utilizando-se um *software*, como por exemplo, o Corel Draw, sendo impresso em alta resolução em papel vegetal ou transparência para obtenção do fotolito. Esse fotolito contém áreas transparentes e outras impressas que barram a passagem de luz, permitindo a transferência da imagem do fotolito para um polímero fotossensível, que será utilizado como borracha para o carimbo (Figura 3.3, Etapa 1); 2) o fotolito obtido é colocado sobre uma base de vidro. Uma fina camada de poliéster (que pode ser uma transparência) é colocada sobre o fotolito para sua proteção. Guarnições são utilizadas para limitar a área em que o fotopolímero será adicionado. Depois da adição do polímero fotossensível, outro vidro é utilizado para fechar o sistema (Figura 3.3, Etapa 2). Todo o sistema é colocado em uma câmara e exposto à luz UV para polimerização. A parte impressa do fotolito serve como barreira (ou máscara) para a luz UV, de modo que não há polimerização na região impressa do fotolito; 3) um solvente é utilizado para retirar a parte não polimerizada protegida pelo fotolito, dando forma ao modelo no carimbo. Essa etapa é denominada revelação. Finalmente, a borracha (o polímero curado) é recortada e colada a uma base de madeira (Figura 3.3, Etapa 3).



**Figura 3.3.** Principais etapas envolvidas na fabricação de um carimbo.

A maioria destes fotopolímeros são elastômeros poliuretânicos fotossensíveis na forma de líquidos viscosos coloridos ou não. Este líquido viscoso polimeriza quando exposto a uma fonte de luz UV-A com um intervalo do espectro entre 315 a

380 nm. Sua composição é pouco divulgada, pois os produtos são todos patenteados (BRITO, GHELLER, 2008).

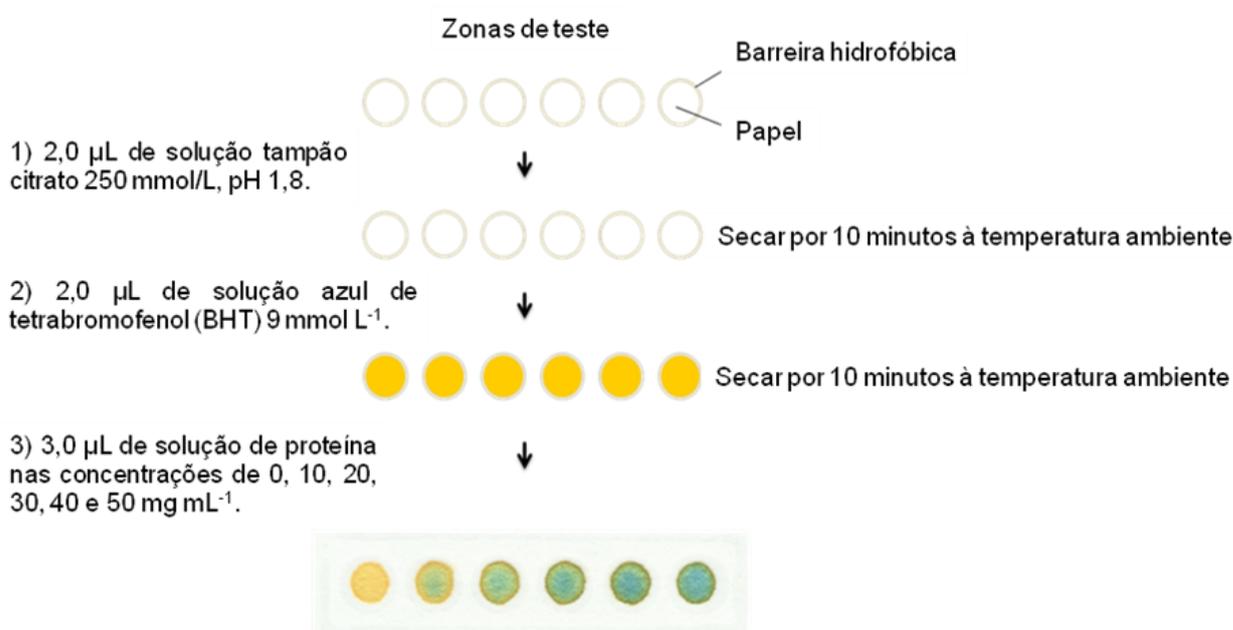
### **3.3. Resolução do método**

Com o objetivo de determinar a resolução das estruturas fabricadas utilizando o método proposto, realizou-se um estudo para verificar o espalhamento horizontal do PDMS quando aplicado ao papel cromatográfico. Para isso, foram avaliadas larguras de barreiras hidrofóbicas e de canais hidrofílicos nos intervalos de 200 a 1400  $\mu\text{m}$  e 1600 a 2200  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Após a fabricação dos dispositivos, contendo essas barreiras hidrofóbicas e canais hidrofílicos, um corante vermelho foi adicionado para melhor visualização. As imagens foram obtidas utilizando um *scanner* de mesa e as larguras avaliadas utilizando um programa de edição de imagens. Esse estudo de resolução foi realizado tendo como base o trabalho desenvolvido por DUNGCHAI, CHAILAPAKUL, HENRY, 2011.

### **3.4. Detecção colorimétrica**

Os estudos de detecção colorimétrica da proteína BSA foram realizados utilizando procedimento similar ao descrito por Carrilho *et al.* (2009). Os  $\mu\text{PADs}$  foram fabricados com padrões de seis círculos com diâmetros de, aproximadamente, 6,0 mm. Foram construídas curvas de calibração para a proteína BSA no intervalo de concentrações variando entre 0 e 50  $\text{mg mL}^{-1}$ , com incrementos de 10  $\text{mg mL}^{-1}$ . Para isso, nas zonas de teste determinadas pelas barreiras hidrofóbicas foram transferidos 2,0  $\mu\text{L}$  de solução tampão citrato 250  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 1.8), deixando secar

em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, 2,0  $\mu\text{L}$  de uma solução do reagente azul de tetrabromofenol 9 mmol/L foi transferida sobre as mesmas zonas de teste, deixando também secar por 10 minutos em temperatura ambiente. Realizadas essas etapas, 3,0  $\mu\text{L}$  de cada solução padrão de proteína, preparadas nas concentrações 0, 10, 20, 30, 40 e 50  $\text{mg mL}^{-1}$ , foi aplicada sobre as zonas de teste. A Figura 3.4 apresenta um desenho esquemático das etapas envolvidas nos estudos de detecção colorimétrica da proteína BSA utilizando os  $\mu\text{PADs}$ . Os ensaios foram realizados em triplicata.



**Figura 3.4.** Etapas envolvidas no ensaio colorimétrico da proteína BSA.

A ligação do reagente BHT à proteína, em meio ácido, produz uma coloração azul, cuja intensidade depende da concentração de BSA. Com o objetivo de quantificar a cor produzida pelos ensaios da proteína BSA, foram obtidas imagens digitais dos  $\mu\text{PADs}$  em um *scanner* de mesa da HP (modelo 2050), com 1200 dpi de resolução. As imagens foram geradas a uma resolução de 600 dpi. Após a digitalização, uma área no centro de cada zona de teste da imagem obtida foi

selecionada utilizando-se o programa de tratamento de imagens Adobe Photoshop. Os valores médios das cores primárias, vermelha (R), verde (G) e azul (B) foram obtidos com esse mesmo programa para cada zona de teste. A cor azul (B) foi utilizada para relacionar a intensidade de cor com a concentração de BSA.

Uma cor no modelo de cores RGB é descrita indicando o quanto ela representa de cada uma das cores vermelha, verde e azul. A cor é expressa como um tripleto de RGB, onde cada componente pode variar entre zero e um valor máximo de 255. Se todos os componentes forem zero, o resultado é preto, se todos são 255, o resultado é o branco (GOMES *et al.*, 2008).

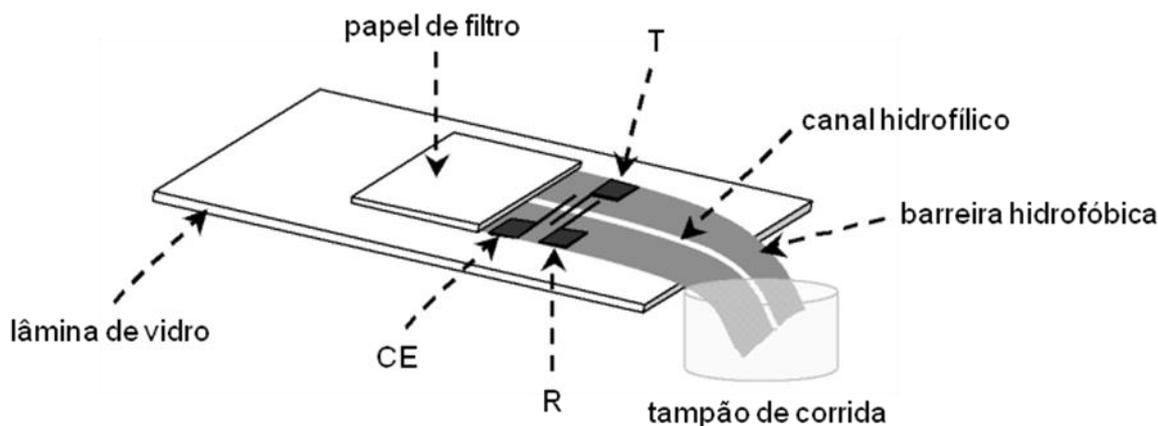
### **3.5. Detecção eletroquímica**

Para utilização dos  $\mu$ PADs como detectores eletroquímicos, sistemas de três eletrodos foram fabricados sobre o papel utilizando o grafite de lápis do tipo 5B da marca Faber Castel, de acordo com um método proposto por Dossi *et al.* (2013). As células eletroquímicas consistiram de círculos de 7 mm de diâmetro definidos por barreiras hidrofóbicas de PDMS aplicadas sobre o papel cromatográfico usando o método proposto. Os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar foram feitos à mão utilizando o lápis. As conexões elétricas para todos os eletrodos foram feitas fora das barreiras hidrofóbicas, fixando o conector do tipo “jacaré” diretamente no grafite aplicado sobre o papel. O *layout* dessa célula eletroquímica em papel é mostrado na Figura 3.5. O desempenho desses  $\mu$ PADs com detecção eletroquímica foi avaliado em estudos de voltametria cíclica (VC) do composto modelo hexacianoferrato (III) de potássio. Como eletrólito suporte utilizou-se 4,0  $\mu$ L de solução de NaCl 0,50 mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 3.5.** Desenho esquemático da obtenção do  $\mu$ PAD com detecção eletroquímica utilizado nos estudos de voltametria cíclica. Eletrodos de grafite feitos a mão utilizando lápis. ER, ET e CE são os eletrodos de referência, trabalho e contra-eletrodo, respectivamente.

Além dos estudos envolvendo voltametria cíclica do hexacianoferrato (III) de potássio, os  $\mu$ PADs também foram utilizados na determinação amperométrica de paracetamol em formulações farmacêuticas. Para isso, canais hidrofílicos com, aproximadamente, 80 mm de comprimento e 3 mm de largura, definidos por duas barreiras hidrofóbicas longitudinais, foram fabricados em papel utilizando carimbo de madeira e PDMS. Em procedimento similar ao descrito por Dossi *et al.* (2013), um sistema de três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) foi feito à mão com lápis 5B a, aproximadamente, 30 mm de uma das extremidades do canal. Esses eletrodos foram feitos com largura de 1 mm e com distâncias de 1 mm um do outro (aproximadamente). A Figura 3.6 apresenta um desenho do sistema utilizado nas medidas amperométricas.



**Figura 3.6.** Desenho esquemático do  $\mu$ PAD com detecção eletroquímica utilizado para a determinação amperométrica de paracetamol. R, T e CE representam os eletrodos de referência, trabalho e contra-eletródo, respectivamente, feitos a mão com lápis de grafite (Adaptado de DOSSI *et al.*, 2013).

Como observado na Figura 3.6, para executar os experimentos amperométricos, os dispositivos foram apoiados em lâminas de vidro, sendo que uma das extremidades do papel foi dobrada e mergulhada no reservatório contendo o tampão de corrida (solução tampão acetato  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,7). A outra extremidade do canal, apoiada em uma lâmina de vidro, foi colocada em contato com uma extensão de papel de filtro, cuja função foi drenar o tampão de corrida que se movimenta por ação capilar. Um volume controlado (750 nL) da solução contendo o analito foi aplicada a 2 mm do detector eletroquímico com uma micropipeta. Para a detecção amperométrica, foi aplicado no eletrodo de trabalho um potencial de + 0,70 V em relação ao eletrodo de referência. As amostras foram sempre aplicadas após a estabilização da linha de base.

Todas as medidas eletroquímicas foram executadas em um potenciostato/galvanostato Autolab® modelo PGSTAT 20 (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, Holanda). A aquisição dos dados e o controle do potenciostato foram realizados utilizando o *software* GPES versão 4.9 (Metrohm Autolab B.V.).

### 3.5.1. Preparação das amostras

Foram realizadas determinações de paracetamol em duas amostras de formulações farmacêuticas adquiridas em farmácias locais, sendo uma amostra na forma de comprimido e outra em forma de pó contido em cápsula, denominadas amostras A e B, respectivamente.

Para o preparo da amostra A, primeiramente, cinco comprimidos foram macerados utilizando um almofariz. Uma massa, correspondente a aproximadamente um comprimido, foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL contendo tampão acetato  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,7). Em seguida, o balão volumétrico, contendo a solução preparada, foi colocado em banho de ultrassom por 5 minutos. E, por fim, uma alíquota de interesse foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com tampão acetato  $0,001 \text{ mol/L}$  (pH 4,7).

Para o preparo da amostra B, não foi necessária a etapa de pulverização. As outras etapas foram similares às descritas para a amostra A.

Os cálculos de diluição foram feitos a fim de se obter soluções para análise com concentrações teóricas de  $500$  e  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$  para as amostras A e B, respectivamente.

A amostra A é constituída de  $500 \text{ mg}$  de paracetamol e excipientes e a amostra B trata-se de um antigripal e, segundo o fabricante, cada cápsula continha  $400 \text{ mg}$  de paracetamol,  $4 \text{ mg}$  de cloridrato de fenilefrina,  $4 \text{ mg}$  de maleato de clorfenamina e excipientes.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

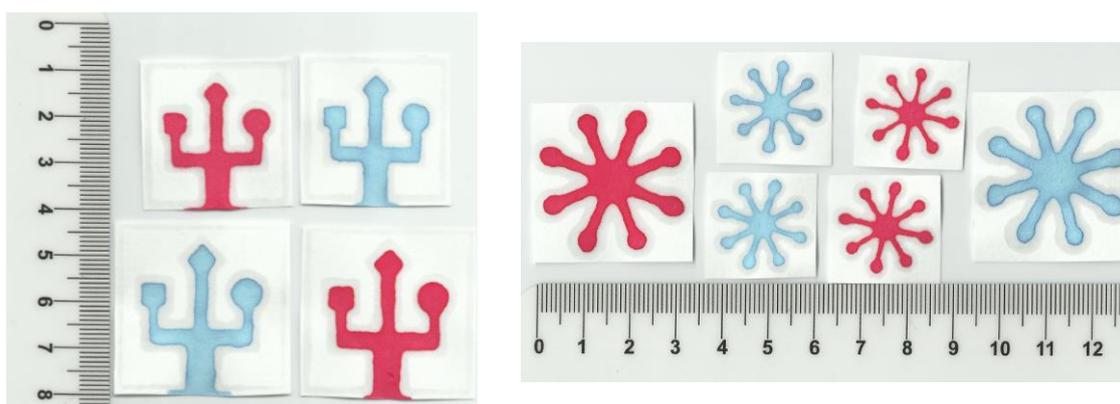
Neste trabalho, o polidimetilsiloxano (PDMS) foi utilizado para criar barreiras hidrofóbicas em papel cromatográfico, uma vez que é um material de baixo custo e bastante comum em laboratórios de microfluídica. O preço de um *kit* contendo 500 g de pré-polímero e catalisador é comercializado em torno de R\$ 200,00. Essa quantidade de material é suficiente para fabricar uma infinidade de dispositivos. Existem no mercado outros silicones, comumente utilizados em artesanato, que também poderiam ser empregados com um custo ainda menor. Além disso, tintas a prova de água poderiam ser testadas para criar as barreiras hidrofóbicas utilizando o método proposto. Além do baixo custo, quando curado, o PDMS oferece flexibilidade ao microdispositivo, que pode ser dobrado e desdobrado sem romper as barreiras, não é tóxico e é facilmente diluído em hexano ou outros solventes orgânicos (BRUZEWICZ; RECHES; WHITESIDES, 2008).

Quando misturado com seu catalisador, o pré-polímero do PDMS é bastante viscoso, o que dificulta sua penetração nos poros do papel cromatográfico. Para contornar essa limitação, Bruzewicz *et al.* (2008) propuseram a adição de pequenas porções de hexano à mistura pré-polímero e agente de cura, antes da aplicação sobre o papel. Nesse trabalho, utilizando procedimento similar ao descrito por Bruzewicz *et al.* (2008), diferentes proporções de PDMS/hexano foram avaliadas e a proporção de 10:1,3 (m/m) foi a que apresentou melhores resultados, sendo capaz de penetrar nos poros do papel e formar estruturas hidrofílicas com diferentes complexidades.

Carimbos de madeira foram utilizados para transferir à superfície do papel cromatográfico a estrutura desejada para o microdispositivo, pois são fáceis de

serem manipulados e possuem um custo reduzido ( $\sim R\$0,67/cm^2$ ). Além disso, não são descartáveis e ficam prontos rapidamente (em média, 30 minutos). Assim, o procedimento proposto nesse trabalho para fabricação de  $\mu$ PADs representa uma simplificação ao procedimento de impressão a cera (CARRILHO *et al.*, 2009), que é o mais utilizado segundo a literatura. Essa simplificação se deve ao fato de que as impressoras de cera térmica possuem um custo relativamente alto e não são de fácil acesso.

Para demonstrar a eficiência das barreiras hidrofóbicas no controle da dispersão de líquidos sobre o papel cromatográfico, dois padrões de  $\mu$ PADs comumente utilizados em análises clínicas (CARRILHO *et al.*, 2009 e NIE *et al.*, 2012) foram fabricados em carimbos de madeira, os quais foram usados para replicar a estrutura em PDMS sobre o papel cromatográfico. A Figura 4.1 apresenta imagens registradas em um *scanner* de mesa desses dispositivos. Como observado, corantes nas cores vermelho e azul foram utilizados para melhor visualização do controle de dispersão de líquidos proporcionado pelas barreiras hidrofóbicas.



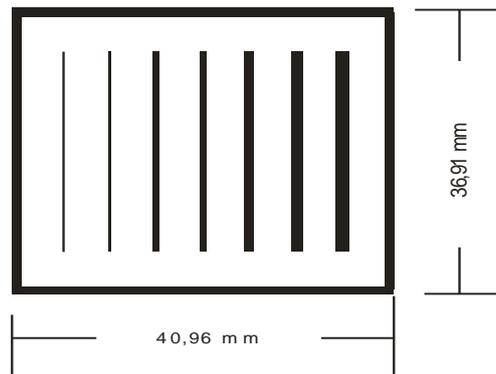
**Figura 4.1.**  $\mu$ PADs fabricados para demonstrar a efetividade do método proposto no controle da dispersão de líquidos.

Como observado na Figura 4.1, a fabricação de  $\mu$ PADs utilizando carimbos e a mistura PDMS/hexano mostrou-se efetiva tanto na replicação de estruturas de formas circulares e retangulares, como no controle da dispersão de fluidos.

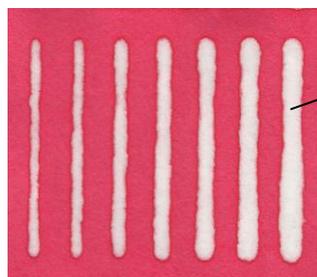
#### **4.1. Resolução do método**

Dependendo da aplicação, é desejável que se obtenham  $\mu$ PADs com canais hidrofílicos com dimensões mínimas (CARRILHO *et al.*, 2009; DUNGCHAI, CHAILAPAKUL, HENRY, 2011). Quando aplicada sobre o papel cromatográfico, a mistura PDMS/hexano sofre espalhamentos vertical e horizontal. O espalhamento horizontal causa um aumento na barreira hidrofóbica e diminuição do canal hidrofílico. Para avaliar a extensão desse espalhamento, dois modelos de  $\mu$ PADs foram fabricados. O primeiro modelo continha sete linhas com larguras nominais (desenhadas usando Corel Drawn) variando entre 200 e 1400  $\mu$ m (incrementos de 200  $\mu$ m), separadas entre si por 5000  $\mu$ m e com 26000  $\mu$ m de comprimento (Figura 4.2 a). Após a fabricação do carimbo nesse padrão, o modelo foi transferido para a superfície do papel cromatográfico. Após a cura do polímero, um corante vermelho foi adicionado aos dispositivos para melhor visualização das barreiras hidrofóbicas formadas. Imagens desses  $\mu$ PADs foram obtidas por um scanner de mesa (Figura 4.2 b,c) e as larguras das barreiras foram medidas utilizando o software Corel Drawn. As larguras das linhas medidas foram correlacionadas com as larguras nominais das linhas utilizadas para fabricação dos carimbos. Os resultados estão apresentados na Figura 4.2 (d, e).

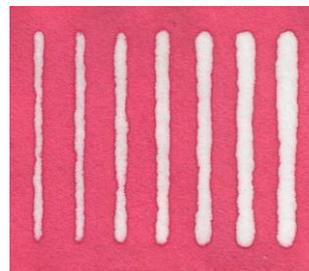
(a)



(b)

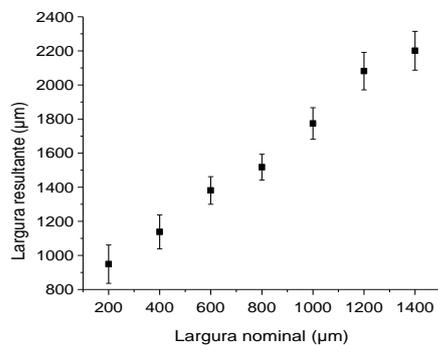


(c)

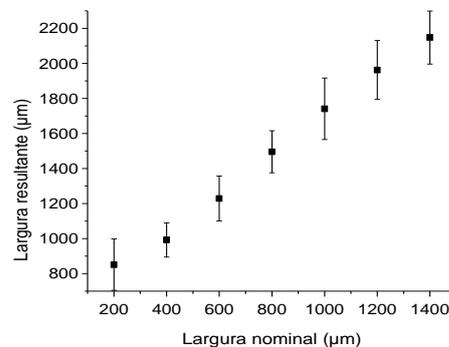


Barreira  
hidrofóbica  
(PDMS)

(d)



(e)

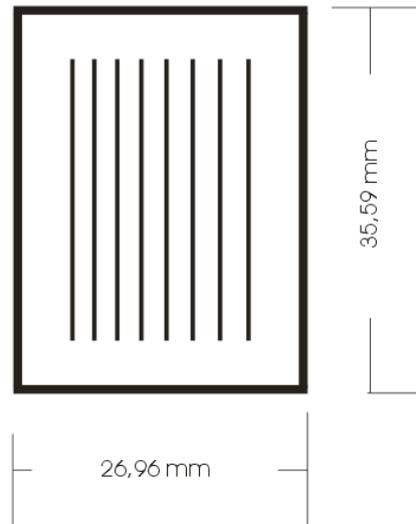


**Figura 4.2.** Estudo da resolução das linhas hidrofóbicas obtidas utilizando o método proposto. (a) Desenho feito no *software* Corel Draw 11.0 (intervalo de estudo 200-1400  $\mu\text{m}$ , com incrementos de 200  $\mu\text{m}$ ). (b) Imagem da parte de frente do dispositivo obtida por *scanner*. (c) Imagem do verso do dispositivo obtida por *scanner*. (d, e) Avaliação gráfica do espalhamento de PDMS em papel de cromatografia. Gráficos da largura resultante da barreira hidrofóbica *versus* largura nominal da parte da frente (d) e da parte de trás (e) dos dispositivos de papel. As barras de erro representam o desvio padrão para medidas realizadas em três diferentes pontos de três linhas hidrofóbicas obtidas independentemente.

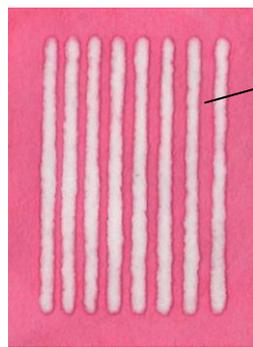
Como observado, as larguras obtidas para as barreiras hidrofóbicas foram sempre maiores do que aquelas desenhadas usando o editor gráfico (nominais), devido ao espalhamento da mistura PDMS/hexano. Observa-se também que há uma relação linear entre a largura nominal ( $L_N$ ) e largura resultante ( $L_R$ ) dessas linhas hidrofóbicas ( $L_N = 1,0747L_R + 711,56743$ ,  $R^2 = 0,99$ ). A menor barreira hidrofóbica obtida foi de  $948 \pm 112 \mu\text{m}$  ( $n = 9$ ), que é resultante de uma largura nominal de  $200 \mu\text{m}$ .

Para determinar a medida do menor canal hidrofílico possível de ser obtido utilizando o método, fabricou-se um segundo carimbo contendo oito linhas com  $400 \mu\text{m}$  de largura nominal, separadas entre si por distâncias nominais que variaram de  $1600$  a  $2200 \mu\text{m}$  (incrementos de  $200 \mu\text{m}$ ) e com comprimentos de  $26000 \mu\text{m}$  (Figura 4.3 a). Em procedimento similar ao utilizado anteriormente, as larguras dos canais hidrofílicos foram correlacionadas com as larguras nominais. Os resultados estão apresentados na Figura 4.3.

(a)

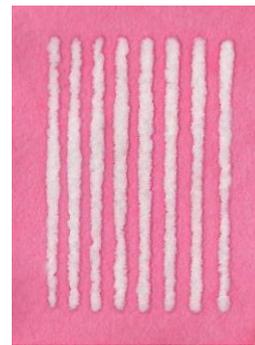


(b)

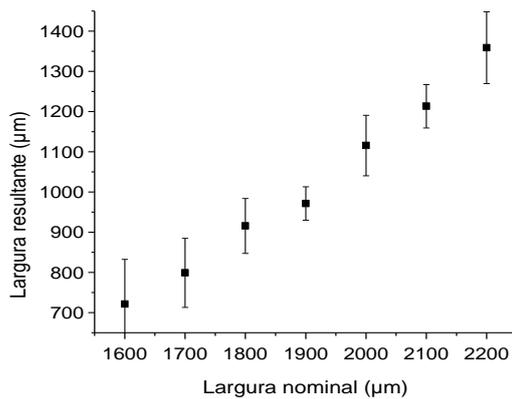


Canal hidrofílico

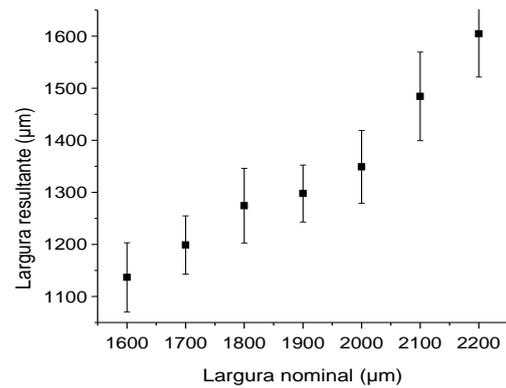
(c)



(d)



(e)



**Figura 4.3.** Estudo da resolução de linhas hidrofílicas obtidas utilizando o método proposto. (a) Desenho feito no *software* Corel Draw 11.0 (intervalo de estudo 1600-2200  $\mu\text{m}$ , com incrementos de 200  $\mu\text{m}$ ). (b) Imagem da frente do dispositivo obtida por *scanner*. (c) Imagem do verso do dispositivo obtida por *scanner*. (d, e) Avaliação

gráfica do espalhamento de PDMS em papel de cromatografia. Gráficos da largura resultante do canal hidrofílico versus largura nominal da parte da frente (d) e do verso (e) dos dispositivos de papel. As barras de erro representam o desvio padrão para medidas realizadas em três diferentes pontos de três canais hidrofílicos obtidos independentemente.

Devido ao espalhamento da mistura PDMS/hexano, observa-se que os canais hidrofílicos obtidos foram sempre menores quando comparados aos nominais. Observa-se que há uma relação linear entre a largura nominal ( $L_N$ ) e a largura resultante ( $L_R$ ) dos canais hidrofílicos ( $L_N = 1,0623L_R + 1018,4647$ ,  $R^2 = 0,98$ ). A menor largura obtida para o canal hidrofílico foi de  $721 \pm 111 \mu\text{m}$  ( $n = 9$ ). Esse canal foi originado por um canal de largura nominal de  $1600 \mu\text{m}$  (Figura 4.3 d). Deve-se notar que estes resultados só se aplicam para o papel Whatman nº1 e será diferente para outros papéis.

Em estudo semelhante, Carrilho *et al.* (2009) obtiveram em método que utiliza impressão a cera uma largura de barreira hidrofóbica mínima de  $850 \mu\text{m}$  e  $561 \mu\text{m}$  para o menor canal hidrofílico. Henry *et al.* (2011), em método que utiliza a serigrafia ou *silk-screen*, obtiveram  $1300 \mu\text{m}$  e  $650 \mu\text{m}$ , para largura mínima de barreira e menor canal hidrofílico, respectivamente. Portanto, a resolução obtida no método proposto utilizando carimbos se aproxima dos estudos encontrados na literatura. Contudo, nenhum dos métodos descritos na literatura alcançaram melhor resolução do que o método fotolitográfico ( $200 \mu\text{m}$  para a menor barreira hidrofóbica e também para o menor canal hidrofílico). Entretanto, vale ressaltar que a resolução obtida nesse trabalho é adequada para a utilização dos  $\mu\text{PADs}$  em ensaios de diagnósticos clínicos com detecção colorimétrica e em sistemas microfluídicos com

detecção eletroquímica (CARRILHO *et al.*, 2009; DUNGCHAI, CHAILAPAKUL, HENRY, 2011; BRUZEWICZ; RECHES; WHITESIDES, 2008).

#### **4.2. Detecção colorimétrica**

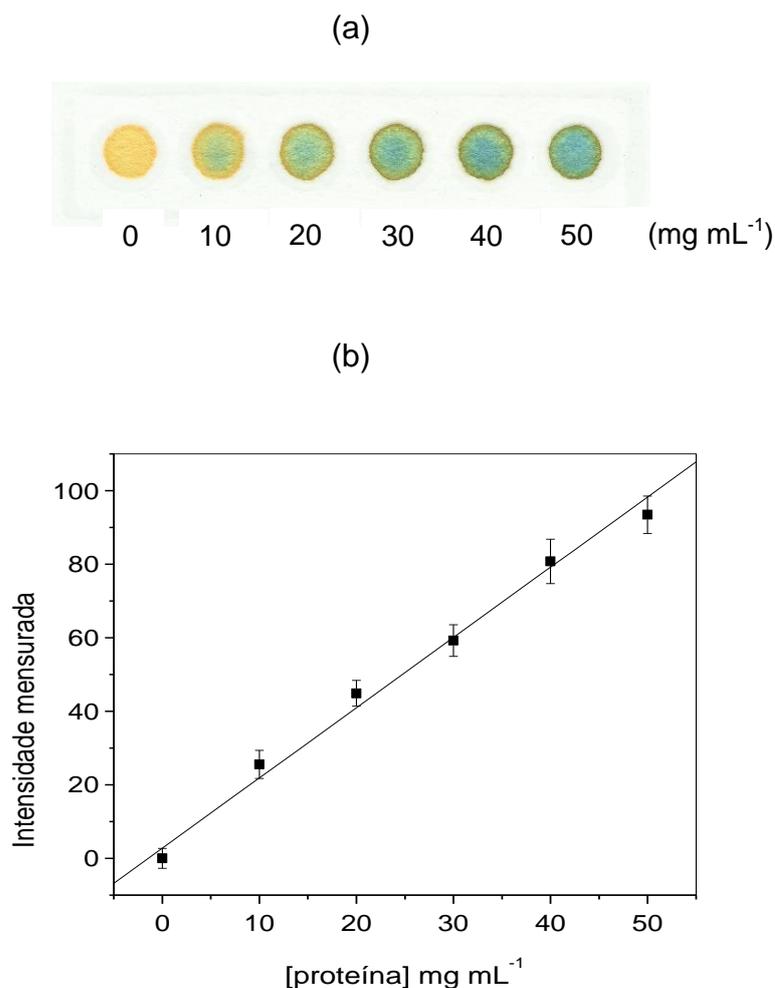
Com o objetivo de aplicar os  $\mu$ PADs construídos usando o método proposto, realizou-se alguns estudos de detecção colorimétrica da proteína albumina sérica bovina (BSA). Para isso, zonas de testes circulares (~6 mm de diâmetro) foram fabricadas em papel cromatográfico.

A albumina sérica é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo. Talvez sua propriedade mais interessante seja a capacidade de ligar-se reversivelmente a uma grande variedade de ligantes e fármacos, transportando inúmeras substâncias para diversos órgãos através do sistema circulatório. É também a principal proteína que contribui para a pressão osmótica do sangue. A BSA possui uma cisteína livre e dois resíduos de triptofano, sendo muito semelhante à albumina sérica humana (*human serum albumin, HSA*), que possui uma cisteína livre na mesma posição da cadeia que a BSA, mas com apenas um resíduo de triptofano. A molécula de BSA tem uma massa molecular de 66 kDa e é constituída por uma única cadeia polipeptídica contendo cerca de 580 aminoácidos (NAKAMURA *et al.*, 1997).

A determinação de uma proteína específica no plasma sanguíneo é muito importante uma vez que alterações em sua concentração podem evidenciar algumas doenças relacionadas com o funcionamento de alguns órgãos. Dois diagnósticos de proteínas podem ser realizados: para proteínas totais e para proteínas específicas (teste para albumina, por exemplo). Testes para proteínas específicas fornecem informações mais precisas sobre o estado de saúde do paciente, enquanto que o

teste de proteínas totais fornece informações clínicas do estado geral do paciente, podendo ser um pré diagnóstico rápido. O ensaio de proteínas totais é realizado utilizando a albumina como padrão (DE SOUZA, 2013).

O ensaio colorimétrico de proteínas baseia-se na ligação não específica do azul de tetrabromofenol (BHT) às proteínas. Quando livre e em condições ácidas, o BHT apresenta-se na coloração amarela, e em condições básicas ou quando ligado a proteínas, torna-se azul (MARTINEZ *et al.*, 2008). A variação na intensidade da coloração azul produzida pela reação com concentrações crescentes de BSA, permite uma análise quantitativa para proteínas totais, como pode ser visto na Figura 4.4.



**Figura 4.4.** Ensaio colorimétrico para proteína BSA nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 mg mL<sup>-1</sup>. (a) Imagem das zonas de testes obtidas com o  $\mu$ PAD fabricado pelo método proposto (b) Curva de calibração obtida, com equação linear:  $y_{\text{proteína}} = 2,7585 + 1,9106 \times [\text{proteína}]$ ;  $R^2 = 0,9895$ .

Como observado, as barreiras hidrofóbicas fabricadas sobre o papel cromatográfico utilizando o método proposto são resistentes às soluções utilizadas nos ensaios para BSA, o que possibilita a análise por imagem das zonas de testes. De acordo com os resultados mostrados na Figura 4.4, o ensaio de proteína apresentou uma boa correlação linear no intervalo de concentrações estudado (de 0 a 50 mg mL<sup>-1</sup>), com um limite de detecção (LD) de 7,2 mg mL<sup>-1</sup>, obtido a partir do desvio padrão de 7 medidas do branco (0 mg mL<sup>-1</sup> de BSA), sendo este valor

multiplicado por 3 e dividido pela inclinação da curva de calibração. O intervalo de concentrações e LD obtidos estão adequados para avaliação clínica de certas condições do paciente. Por exemplo, o nível de proteínas séricas totais inferiores a  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  representa uma condição clínica de hipoproteinemia. Isto pode ocorrer devido a uma produção insuficiente de proteínas ou pela perda de proteína na urina (albuminúria), causada por doenças hepáticas e renais, respectivamente. Este ensaio pode ser útil para investigar e distinguir diferentes doenças renais, no entanto, um diagnóstico mais completo, utilizando proteínas específicas (albumina e globulina, por exemplo) e outros indicadores colorimétricos, precisa ser realizado (DE SOUZA, ALVES, COLTRO, 2012).

A Tabela 4.1 apresenta uma comparação entre os parâmetros analíticos obtidos para detecção colorimétrica de BSA utilizando o  $\mu$ PAD construído usando o método proposto, com alguns trabalhos semelhantes presentes na literatura. Como observado, o intervalo de concentração estudado foi menor apenas quando comparado ao trabalho de Fang *et al.* (2011), que utilizaram um sensor de fibra ótica para medir a luz refletida pela amostra e correlacionaram esse valor com a concentração de BSA. Os três parâmetros demonstrados (faixa linear, LD e R) estão muito próximos aos valores encontrados por De Souza *et al.* (2012), que utilizaram um scanner de mesa para aquisição das imagens, assim como no método desenvolvido. Por fim, o trabalho de Martinez *et al.* (2008), os pioneiros a utilizarem uma câmera de celular para aquisição das imagens.

**Tabela 4.1.** Comparação de parâmetros analíticos de trabalhos encontrados na literatura para detecção colorimétrica de proteína (BSA).

Referência	Faixa linear (mg mL <sup>-1</sup> )	LD (mg mL <sup>-1</sup> )	Coefficiente de correlação (R)	Substrato
Fang <i>et al.</i> , 2011	1-100	-	0,993	Placa de sílica gel e caneta
De Souza <i>et al.</i> , 2012	0-40	8	0,998	Dispositivo microfluídico a base de toner
Martinez <i>et al.</i> , 2008	0-4	-	0,986	μPAD
Neste trabalho	0-50	7,2	0,995	μPAD

Em estudos futuros, o método desenvolvido será validado em amostras de urina artificial.

### 4.3. Detecção eletroquímica

Os μPADs fabricados utilizando o método proposto também foram avaliados em sistemas de detecção eletroquímica. Para isso, duas técnicas foram utilizadas: (i) voltametria cíclica (VC), para avaliar o comportamento eletroquímico de compostos modelo e (ii) amperometria, para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas.

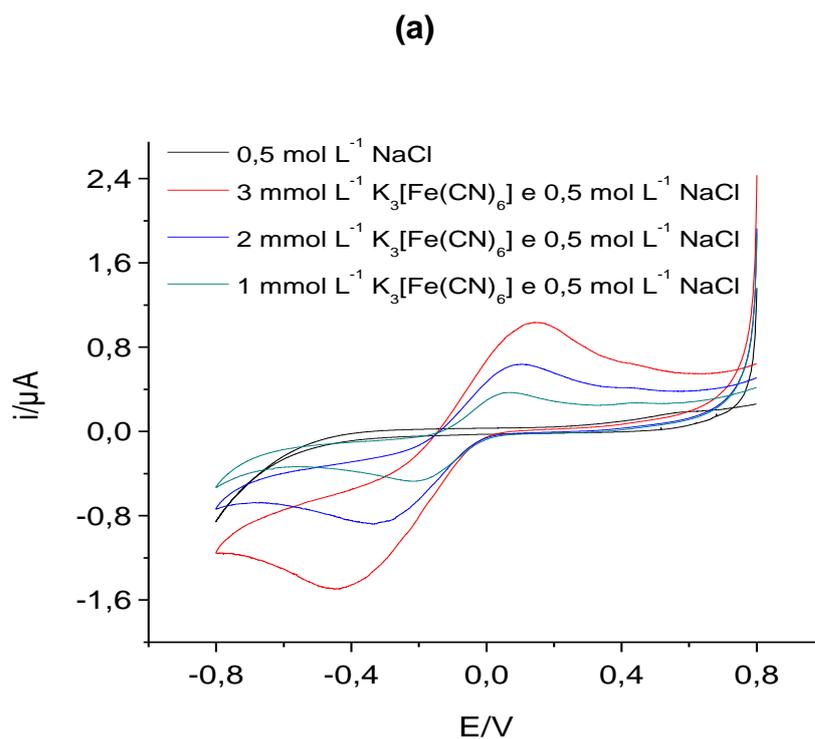
#### 4.3.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica que consiste na aplicação de um potencial variável ao eletrodo de trabalho em função do tempo, com

medida simultânea da corrente originada. A aplicação do potencial no sistema voltamétrico conduz a ocorrência de uma corrente capacitiva relacionada com a formação de uma dupla camada elétrica na superfície do eletrodo e geração de correntes faradaicas devido às reações de oxidação ou de redução de espécies eletroativas contidas na solução (BARD, FAULKNER, 2001).

A eficiência da VC é resultado de sua rapidez em medidas do comportamento redox de uma espécie em um amplo intervalo de potenciais (BRETT, A. M. O. BRETT, C. M. A., 1996). Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para verificar a reversibilidade dos processos redox do sistema  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , com o objetivo de avaliar o desempenho dos  $\mu\text{PADs}$  com eletrodos de grafite feitos a mão com lápis 5B. O sistema  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  foi utilizado nesse estudo pois seu mecanismo redox é bastante conhecido, envolvendo um processo reversível de transferência de apenas um elétron.

A Figura 4.5 apresenta voltamogramas cíclicos registrados utilizando os  $\mu\text{PADs}$  com eletrodos de grafite, para o NaCl 0,50 mol/L (eletrólito suporte) e  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  em três diferentes concentrações. A velocidade de varredura de potencial utilizada foi de 50 mV/s. Para fins de comparação, a Figura 4.5 (b) apresenta um voltamograma cíclico para o  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  utilizando um eletrodo de ouro como eletrodo de trabalho (SANTANA, P. P. 2013).

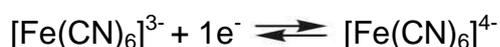


**Figura 4.5.** (a) Voltamogramas cíclicos registrados em um  $\mu$ PAD com detecção eletroquímica para  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl e concentrações crescentes de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1, 2 e  $3 \text{ mmol L}^{-1}$ ),  $v_v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . (b) Voltamograma cíclico registrado em solução contendo  $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $\text{KNO}_3 \text{ } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) utilizando uma célula

eletroquímica com eletrodo de trabalho de ouro (diâmetro = 2 mm), eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS) e eletrodo auxiliar de platina (vv = 50 mV/s).

No voltamograma cíclico obtido para o eletrólito suporte utilizando o  $\mu$ PAD (Figura 4.5 a), observa-se que nenhuma corrente faradaica ( $I_{pa}$  ou  $I_{pc}$ , intensidade de corrente anódica ou intensidade de corrente catódica) é gerada, apontando, assim, que nenhuma espécie com característica eletroativa foi liberada pelos eletrodos de grafite feitos com lápis 5B. Nesse caso, observa-se apenas uma corrente capacitiva pequena, referente ao rearranjo das cargas na superfície do eletrodo e que está relacionada com a formação da dupla camada elétrica. Essa é uma característica interessante do dispositivo desenvolvido, pois possibilita a sua aplicação na investigação do comportamento voltamétrico de espécies eletroativas na faixa de potencial entre -0,8 e +0,8 V, tendo como vantagem a ausência de outros processos redox que possam mascarar o sinal eletroquímico de interesse.

Os resultados obtidos para o  $\mu$ PAD mostram que, para a concentração de 1,0 mmol/L, o pico de oxidação do íon  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  encontra-se aproximadamente em 0,06 V e o respectivo pico de redução em -0,20 V. Esses potenciais de pico encontram-se deslocados para região catódica quando comparados com aqueles obtidos para o eletrodo de ouro (+0,27 V para oxidação e +0,15 V para redução). Esse comportamento era esperado, uma vez que no  $\mu$ PAD utilizou-se um eletrodo de grafite como pseudo-referência, enquanto que para o eletrodo de ouro utilizou-se um eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS). A reação redox envolvida no sistema pode ser representada da seguinte forma:



A variação de potencial entre os picos anódico e catódico ( $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ ) obtida para o  $\mu$ PAD para a concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  foi de, aproximadamente, 260 mV. Essa variação aumenta com a concentração do analito, sugerindo que o sistema redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  é quase-reversível para os eletrodos de grafite desenhados a lápis, ao contrário de eletrodos de ouro e platina, que comumente apresentam respostas reversíveis para o mesmo sistema (DOSSI *et al.*, 2013). No caso ideal, denominado como *comportamento reversível*, os picos de redução e oxidação têm magnitude semelhante e são separados por um pequeno incremento de potencial, o qual é geralmente de  $(59 \text{ mV})/n$  a  $25^\circ\text{C}$ , onde  $n$  é o número de elétrons transferidos durante a reação no eletrodo. Nesta situação, a transferência de elétrons no eletrodo é rápida o suficiente para que o equilíbrio seja sempre mantido durante toda a varredura de potencial. Processos no eletrodo com cinética lenta resultam numa grande separação dos picos de redução e oxidação, separação esta que aumenta com o aumento da velocidade de varredura. Esta separação ocorre porque é necessária uma sobretensão para superar as barreiras à transferência de elétrons em ambas as direções (ATKINS *et al.*, 2008). Para que o comportamento reversível seja observado, condições experimentais como temperatura, pureza de reagentes e superfície dos eletrodos, devem ser bem conhecidas e controladas.

Além desses estudos qualitativos utilizando VC, foram realizados alguns testes para avaliar a possibilidade de realizar análises quantitativas utilizando o  $\mu$ PAD e VC. Entretanto, até o momento, não obteve-se sucesso nas tentativas de calibração do sistema pela adição de concentrações crescentes de analito sobre os eletrodos do  $\mu$ PAD. O melhores resultados obtidos são aqueles apresentados na Figura 4.5 (b). Acredita-se que a dificuldade esteja relacionada ao fato de que a

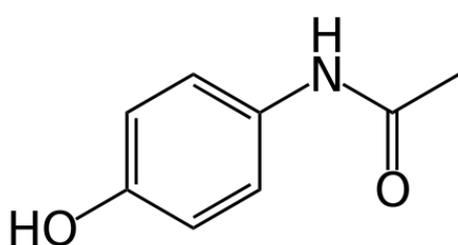
adição de volumes crescentes da solução do analito sobre o papel ocasiona mudanças no grau de umidade do mesmo. Essas diferenças no grau de umidade pode estar ocasionando diferenças de condução de corrente entre os eletrodos. Como poderá ser observado a seguir, essa dificuldade não é observada na amperometria, pois a medida é feita em fluxo.

#### **4.3.2. Amperometria**

A amperometria é uma técnica eletroquímica que consiste no registro da corrente gerada, em função do tempo, pela oxidação ou redução de espécies devido a um potencial externo aplicado (EO, de oxidação ou ER, de redução) (GIROTTO, DE PAOLI, 1999). Normalmente, observa-se um aumento instantâneo de corrente e depois um decaimento rápido, devido ao consumo das espécies eletroativas junto à interface eletrodo/solução (BARD, FAULKNER, 2001). A oxidação ou redução das espécies, devido ao potencial aplicado no eletrodo de trabalho de uma célula eletroquímica, gera respostas de corrente proporcionais à concentração do analito (VANDAVEER IV *et al.*, 2004). Neste trabalho, essa técnica foi utilizada para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas, empregando os  $\mu$ PADs fabricados como descrito na seção 3.5 (Figura 3.6).

O paracetamol (acetaminofeno, N-acetil-p-aminofenol) (Figura 4.6) apresenta-se na forma de um pó branco cristalino e inodoro, moderadamente solúvel em água (1 g por 70 mL a 25°C), com grande estabilidade em solução aquosa de pH entre 5 e 7. O paracetamol é um medicamento com efeito antitérmico e analgésico bastante utilizado, sendo, por isso, muito importante desenvolver métodos de determinação

simples, rápidos, e de baixo custo, que sejam úteis para seu controle de qualidade em formulações farmacêuticas. (SHANGGUAN, ZHANG, ZHENG, 2008).



Fórmula:  $C_8H_9NO_2$

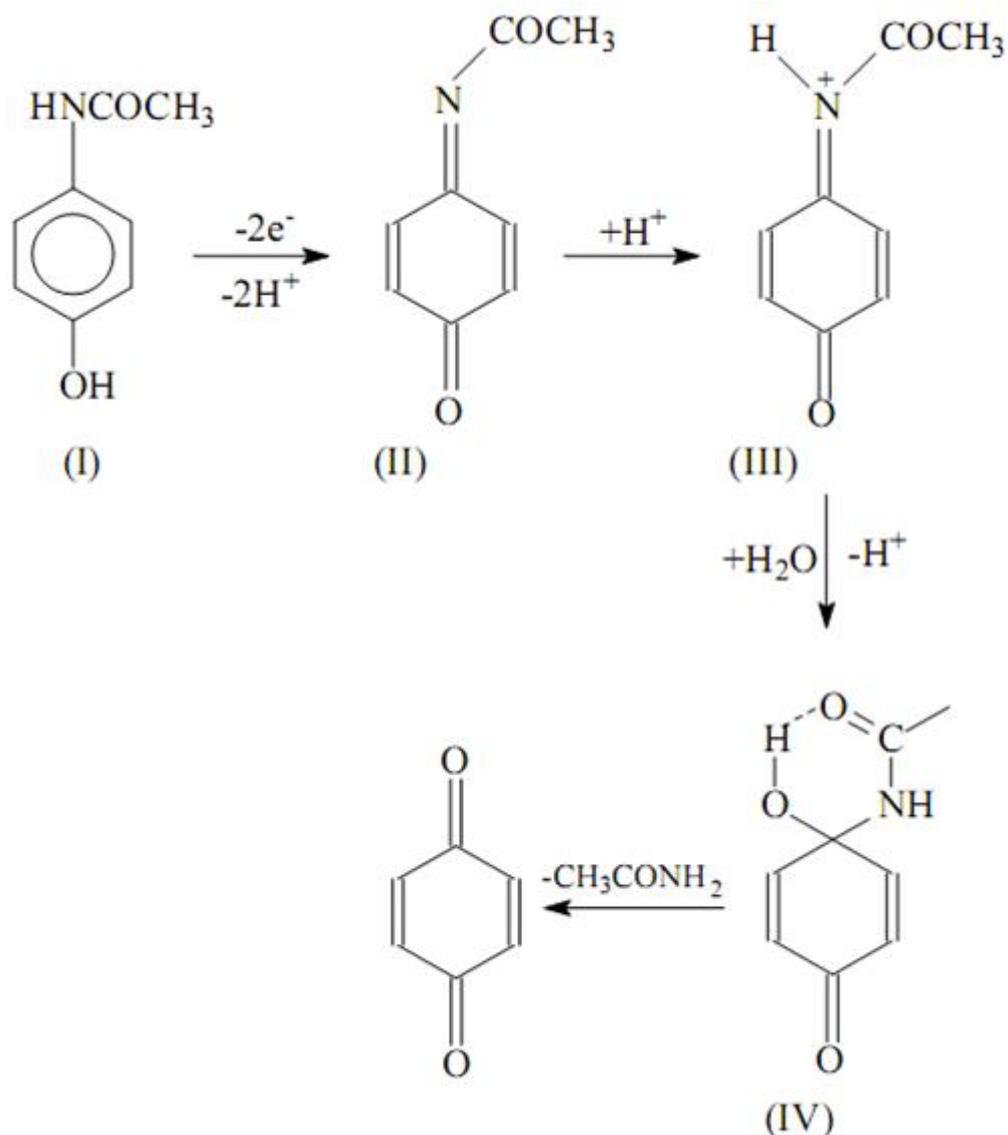
Massa molar: 151,17 g/mol

Densidade: 1,293 g/mL

Constante de dissociação  $pK_a$  (25°C): 9,38

**Figura 4.6.** Estrutura química do paracetamol e algumas propriedades físico-químicas (LORPHENSRI *et al.*, 2006. VILLAESCUSA *et al.*, 2011).

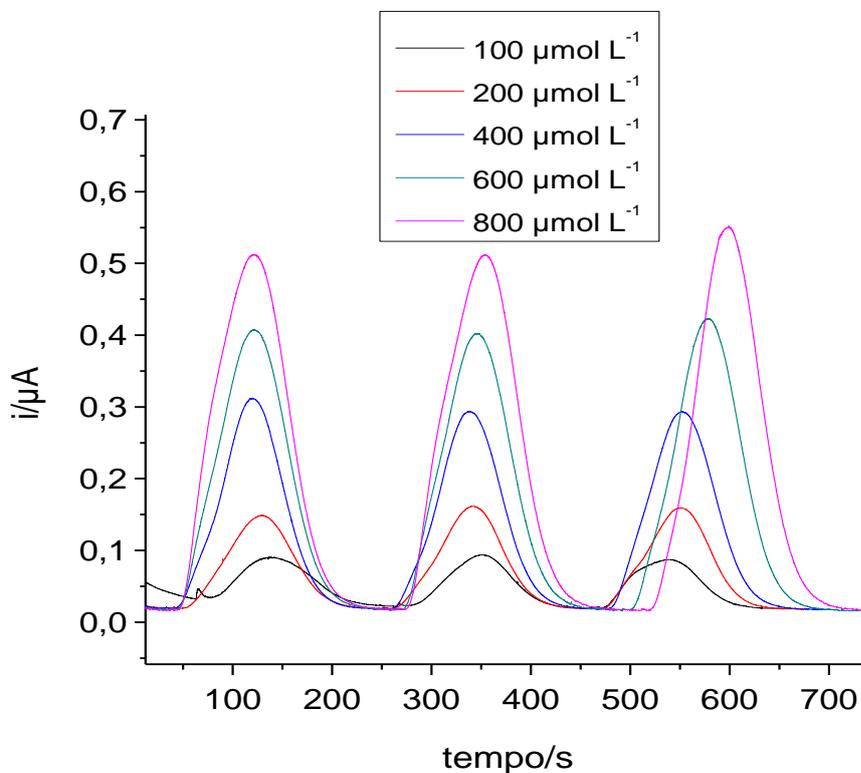
A Figura 4.7 mostra o mecanismo de oxidação eletroquímica do paracetamol. Como observado, a molécula de paracetamol (I) é eletroquimicamente oxidada em um processo que envolve a perda de dois elétrons e dois prótons, produzindo a espécie N-acetil-p-quinoneimina (II), que é estável na forma desprotonada em pHs maiores ou iguais a 6. Em soluções mais ácidas a substância (II) é rapidamente protonada produzindo a espécie (III), menos estável, porém, eletroquimicamente ativa, que produz imediatamente a forma hidratada (IV), eletroquimicamente inativa, que se converte, finalmente, a benzoquinona (LOURENÇÃO, 2009).



**Figura 4.7.** Mecanismo de oxidação eletroquímica do paracetamol (LOURENÇÃO, 2009).

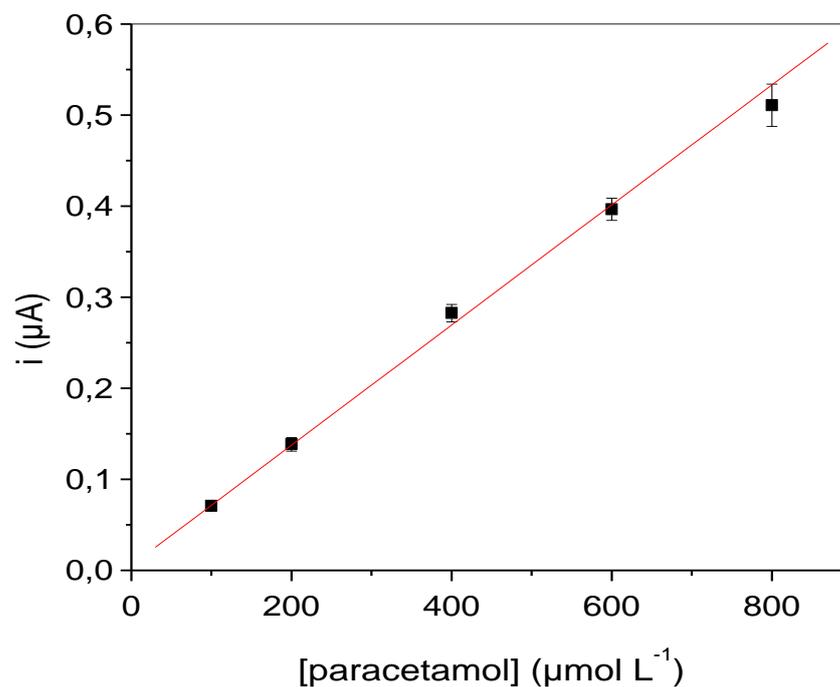
Para a realização de medidas amperométricas de paracetamol utilizando o sistema apresentado na Figura 3.6 da seção 3.5, um potencial de +0,70 V foi aplicado no eletrodo de trabalho e alíquotas de 750 nL das soluções padrão contendo o fármaco foram adicionadas a uma distância de 2 mm do ET. A Figura 4.8 apresenta cromatogramas obtidos para injeções sucessivas de soluções contendo concentrações crescentes (100, 200, 400, 600 e 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) de paracetamol. Como observado,

foram realizadas três medidas para cada concentração. O tampão de corrida utilizado foi tampão acetato  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 4,7.



**Figura 4.8.** Cromatogramas registrados em  $\mu\text{PADs}$  com detecção amperométrica para concentrações crescentes de paracetamol de  $100$  a  $800 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , com incrementos de  $100 \text{ } \mu\text{mol/L}$ . Foram realizadas três injeções para cada concentração. Potencial de detecção  $+0,70 \text{ V}$ , tampão acetato  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,7). Volume de injeção:  $750 \text{ nL}$ .

Como observado, foram obtidos picos bem definidos e proporcionais à concentração do fármaco. As larguras dos picos cromatográficos na linha de base, de aproximadamente  $160 \text{ s}$ , refletem a passagem da zona de amostra ao longo do eletrodo de trabalho. A Figura 4.9 mostra uma curva de calibração obtida utilizando os valores das alturas dos picos obtidos nas diferentes concentrações de paracetamol. As medidas foram realizadas em triplicata.

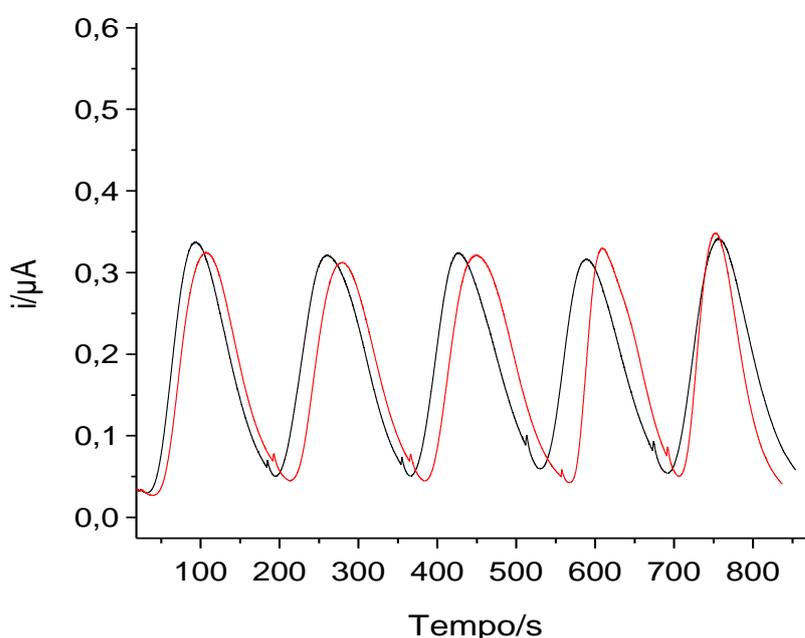


**Figura 4.9.** Curva de calibração obtida para o paracetamol utilizando os  $\mu$ PADs com detecção amperométrica. As condições estão descritas na Figura 4.8.

Como observado, obteve-se uma resposta linear dentro do intervalo de concentrações de paracetamol estudado ( $100$  a  $800 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de  $0,9977$ . A equação da reta obtida foi:  $i_{pa} (\mu\text{A}) = 0,00568 (\pm 0,00411) + 6,59 \times 10^{-4} (\pm 1,81 \times 10^{-5}) [\text{paracetamol}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ .

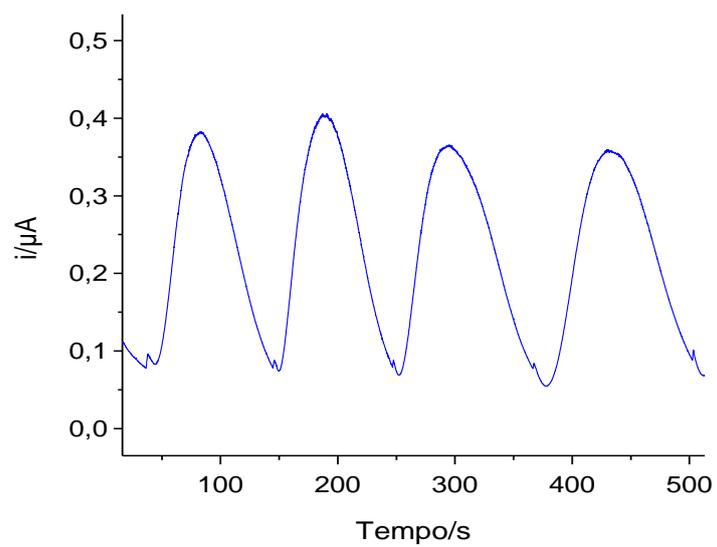
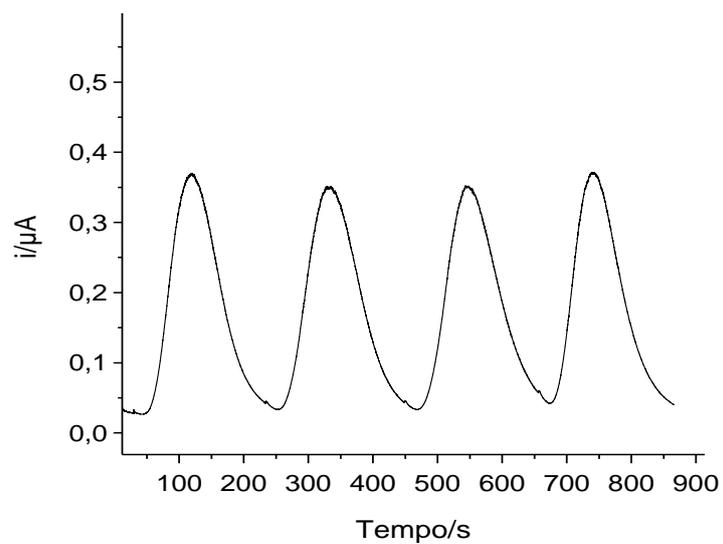
O LD foi determinado a partir do desvio padrão de 10 medidas da linha de base, sendo este valor multiplicado por 3 e dividido pela inclinação da curva de calibração. Para obter o limite de quantificação (LQ), o desvio padrão encontrado para a linha de base foi multiplicado por 10 e dividido pela inclinação da reta. Dessa forma, o LD e LQ encontrados foram de  $6,52 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $21,72 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

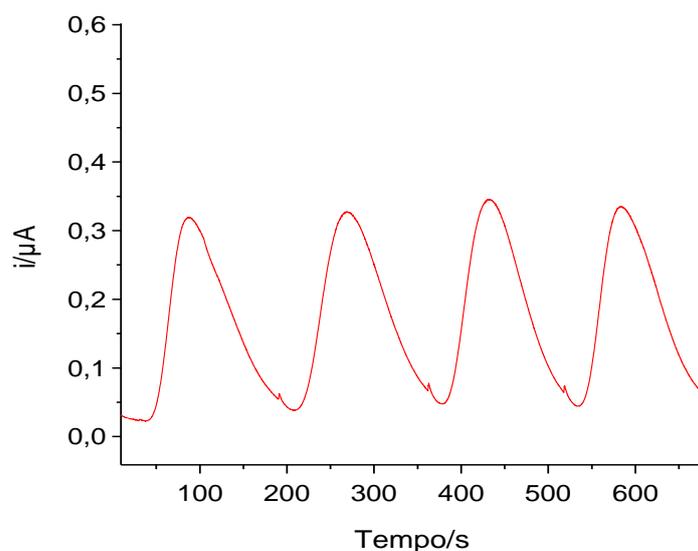
A repetibilidade foi avaliada pela medida das correntes de picos cromatográficos obtidos em dez injeções consecutivas, em um mesmo  $\mu$ PAD, de uma solução de paracetamol na concentração de  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 4.10. O desvio padrão relativo (DPR), que descreve a dispersão das medidas individuais ao redor da média, foi de 3,06% ( $n = 10$ ).



**Figura 4.10.** Cromatogramas registrados em um mesmo  $\mu$ PAD com detecção amperométrica para injeções consecutivas de uma solução padrão de paracetamol na concentração de  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Potencial de detecção  $+0,70 \text{ V}$ , tampão acetato  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,7), alíquotas de  $750 \text{ nL}$ .

Para avaliar a reprodutibilidade entre diferentes  $\mu$ PADs, avaliou-se as correntes de picos cromatográficos obtidos para a concentração de  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de paracetamol em três dispositivos diferentes. Os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 4.11. O DPR calculado foi de 5,4%.





**Figura 4.11.** Cromatogramas registrados em três diferentes  $\mu$ PADs com detecção amperométrica para solução padrão de paracetamol na concentração de  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Potencial de detecção  $+0,70 \text{ V}$ , tampão acetato  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,7), alíquotas de  $750 \text{ nL}$ .

Observa-se que ocorreram variações nas larguras de linha de base dos picos, quando comparados os cromatogramas obtidos para os três dispositivos diferentes. Esse comportamento provavelmente seja um efeito de diferentes larguras dos eletrodos de trabalho. Como são feitos a mão, a reprodutibilidade fica comprometida.

A Tabela 4.2 apresenta uma comparação entre alguns parâmetros analíticos obtidos nesse trabalho para a detecção de paracetamol, com outros trabalhos que utilizaram a detecção eletroquímica para esse mesmo analito. Como observado, o método desenvolvido, utilizando eletrodos de grafite desenhados à mão com lápis, apresentou faixa linear maior quando comparado a alguns trabalhos como os de Chu *et al.* (2008), Özcan *et al.* (2011), Kachosangi *et al.* (2008), que utilizaram eletrodos que apresentam maior custo e complexidade, sendo eles, respectivamente, eletrodo de disco de carbono (EDC), eletrodo de grafite

eletroquimicamente modificado (EGEM) e eletrodo de grafite pirolítico modificado com nanotubo de carbono (EGP-NC).

O limite de detecção obtido foi menor quando comparado ao trabalho de Shiroma *et al.* (2012), que utilizaram eletrodos de ouro depositados sobre o papel cromatográfico e detecção amperométrica, sendo este o estudo que mais se aproxima do desenvolvido neste trabalho. Os demais trabalhos apresentaram menores limites de detecção, o que pode ser explicado pelo fato de que, enquanto o método desenvolvido utilizou amperometria direta, a maioria dos outros métodos listados utilizaram técnicas voltamétricas de pulso com eletrodos modificados. Entretanto, cabe ressaltar que a análise de paracetamol em formulações farmacêuticas não exige limites de detecção e/ou quantificação tão baixos quanto aqueles obtidos nesses trabalhos.

**Tabela 4.2.** Comparação de parâmetros analíticos de trabalhos encontrados na literatura para detecção eletroquímica de paracetamol.

Referência	Faixa Linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Limite de detecção ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Coefficiente de correlação (R)	Método de detecção
Neste trabalho	100 - 800	6,52	0,999	$\mu\text{PAD/DA}$
Shiroma <i>et al.</i> , 2012	50 – 2000	25	0,999	$\mu\text{PAD/DA}$
Chu <i>et al.</i> , 2008	0,59 – 1,4	0,59	0,999	EDC/DA
Bolado <i>et al.</i> , 2009	2,5 - 1000	1	0,999	EC*/VC
Messina <i>et al.</i> , 2006	3,5 – 100	0,3	0,994	SEM/DA
Habibi <i>et al.</i> , 2011	0,2 - 100	0,12	0,996	ECC-NC/VPD
Guan <i>et al.</i> , 2008	1 - 2000	0,3	0,999	ECLI/VPD
Ghadimi <i>et al.</i> , 2013	0,02 – 450	0,00169	0,997	ECV-PVP-NCM/VPD
Özcan <i>et al.</i> , 2011	0,05 – 2,5	0,0025	0,999	EGEM/ATSDPV
Kachosangi <i>et al.</i> , 2008	0,1 – 25	0,045	0,996	EGP-NC/VC

EDC: Eletrodo de disco de carbono

DA: Detecção amperométrica

EC\*: Eletrodo de carbono impresso modificado com nanotubos de carbono

VC: Voltametria cíclica

SEM: Sensor modificado com enzima

ECC-NC: Eletrodo de carbono cerâmico modificado com nanotubo de carbono

VPD: Voltametria de pulso diferencial

ECLI: Eletrodo de carbono líquido iônico

ECV-PVP-NCM: Eletrodo de carbono vítreo modificado com poli(4-vinilpiridina) e multicamadas de nanotubos de carbono

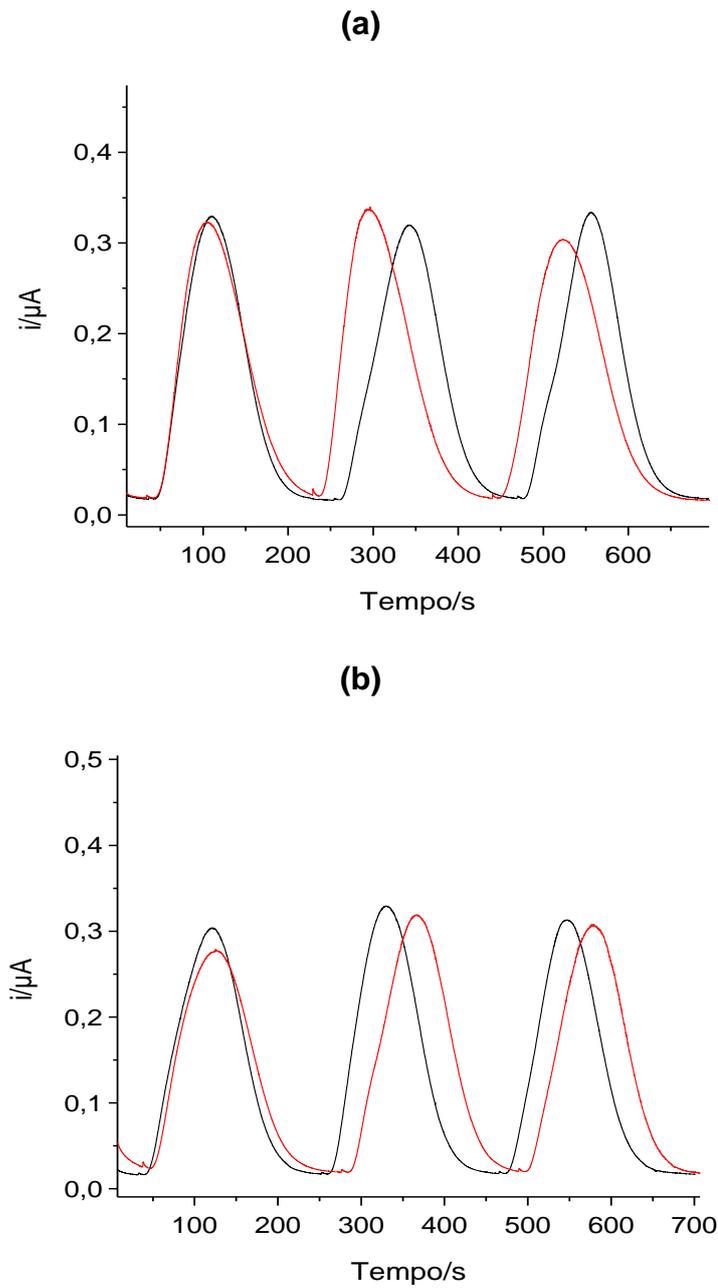
ATSDPV: Adsorptive transfer stripping differential pulse voltammetry (voltametria de pulso diferencial adsortiva)

EGEM: Eletrodo de grafite de lápis eletroquimicamente modificado

EGP-NC: Eletrodo de grafite pirolítico modificado com nanotubo de carbono

#### *4.3.2.1 Análise de formulações farmacêuticas*

Formulações farmacêuticas comerciais (amostra A e amostra B) contendo paracetamol foram analisadas usando os  $\mu$ PADs com detecção amperométrica, sendo que os resultados foram comparados com os valores contidos na bula. Para cada amostra, foram realizadas seis determinações. A Figura 4.12 mostra os cromatogramas obtidos e a Tabela 4.3 apresenta as concentrações calculadas, em mg/comprimido, para cada amostra.



**Figura 4.12.** Cromatogramas registrados em  $\mu$ PADs com detecção eletroquímica com eletrodos feitos com lápis para as amostras (a) A e (b) B. Potencial de detecção +0,70 V, tampão acetato 0,001 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,7), alíquotas de 750 nL.

**Tabela 4.3.** Resultados obtidos na determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas utilizando  $\mu$ PADs com detecção amperométrica com eletrodos de grafite feitos com lápis.

Amostra	Valor obtido (mg/compr)	Valor tabelado (mg/compr)	Erro (%)*
A	459,4 $\pm$ 17,0	500	- 8,1
B	432,1 $\pm$ 26,3	400	8,0

\*Erro % = (valor obtido x 100)/(valor tabelado)

Como observado na tabela 4.3, foi possível a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas com erros relativos menores que 10%, quando comparados com os valores contidos na bula. Observa-se também que a precisão para seis determinações dos fármacos foi bastante satisfatória, ficando abaixo de 6,1%. Cabe ressaltar que a comparação dos resultados obtidos nas análises utilizando os  $\mu$ PADs seria mais adequada, com possibilidades de utilização de ferramentas estatísticas como o teste-t, se um método de comparação tivesse sido desenvolvido. Entretanto, o objetivo nesse momento foi apenas mostrar que os  $\mu$ PADs desenvolvidos possuem potencial para análise quantitativa.

## 5. CONCLUSÕES

Várias propriedades fazem do papel um material adequado para a realização de ensaios de diagnóstico: possui baixo custo, é leve, biodegradável, familiar e sua superfície possui potencial para modificação química. O PDMS utilizado nesse trabalho para criar barreiras hidrofóbicas no papel, é transparente, facilmente disponível, não é tóxico, é inodoro e mecanicamente flexível. Neste trabalho foi apresentado um método simples e de baixo custo para fabricação de  $\mu$ PADs utilizando carimbos de madeira e uma mistura de PDMS/hexano, unindo as vantagens do papel às de PDMS. Esses materiais de fácil aquisição e baixo custo permitem a implementação da metodologia em laboratórios de pesquisa, sem o emprego de equipamentos sofisticados.

Ao aplicar PDMS/hexano sobre a superfície do papel, há um espalhamento vertical e lateral do mesmo. O espalhamento vertical, cria barreiras hidrofóbicas ao longo da espessura do papel. O espalhamento lateral diminui a resolução do método, pois resulta em barreiras hidrofóbicas que são mais largas do que os padrões contidos nos carimbos. Contudo, a resolução obtida foi adequada para os objetivos propostos: realizar ensaios colorimétricos para a determinação da proteína BSA, construção de  $\mu$ PADs com detecção eletroquímica e detecção amperométrica de paracetamol em formulações farmacêuticas.

Nas determinações de paracetamol em formulações farmacêuticas utilizando o sistema microfluídico desenvolvido, com eletrodos de grafite feitos a mão com lápis, não foi necessária nenhuma etapa de pré-tratamento da amostra, que após diluição em tampão acetato foi colocada diretamente sobre o microdispositivo.

## 6. ATIVIDADES FUTURAS

Como discutido anteriormente, o objetivo do trabalho foi o de propor uma nova metodologia para fabricação de  $\mu$ PADs. Ficam como perspectivas para complementação do trabalho as seguintes atividades:

- Determinação de proteínas totais em amostras de urina artificial, para que a parte de detecção colorimétrica fique mais completa.

- Realização de estudos adicionais em voltametria cíclica, inclusive em experimento de calibração.

- Aplicar a metodologia de determinação de paracetamol em pelo menos mais uma amostra, comparando os resultados (inclusive das amostras já analisadas) com aqueles obtidos utilizando um método comparativo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, P. B.; ARSHAD, S. A.; LI, B.; CHEN, X.; ELLINGTON, A.D. DNA circuits as amplifiers for the detection of nucleic acids on a paperfluidic platform. **Lab on a Chip**, v. 12, p. 2951–2958, 2012.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2 ed. New York: Wiley, 2001. 718p.

BECKER, H.; GARTNER, C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 89-111, 2008.

BOLADO, P. F.; ARDISAN, J. L.; SANTOS, D. H.; GARCÍA, A. C. Electrochemical study and flow injection analysis of paracetamol in pharmaceutical formulations based on screen-printed electrodes and carbon nanotubes. **Analytica Chimica Acta**, v. 638, p. 133–138, 2009.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. Coimbra: Almedina, 1996. 471p.

BRITO, K. J. S.; GUELLER, J. Resposta técnica. Resina para borracha de carimbos. Disponível em <<http://www.bristein.com.br/uploads/6/8/8/0/6880073/12786.pdf>>. Acesso em: 11 set. 2013.

BRUZEWICZ, D. A.; RECHES, M.; WHITESIDES, G. M. Low-Cost Printing of Poly(dimethylsiloxane) Barriers To Define Microchannels in Paper. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 3387–3392, 2008.

BURNS, M. A.; JOHNSON, B. N.; BRAHMASANDRA, S. N.; HANDIQUE, K.; WEBSTER, J. R.; KRISHNAN, M.; SAMMARCO, T. S.; MAN, P. M.; JONES, D.; HELDSINGER, D.; MASTRANGELO, C. H.; BURKE, D. T. An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device. **Science**, v. 282, p. 484-487, 1998.

CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 7091–7095, 2009.

CHU, Q.; JIANG, L.; TIAN, X.; YE, J. Rapid determination of acetaminophen and p-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 246–251, 2008.

COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; CARRILHO, E.; DE JESUS, D. P.; DA SILVA, J. A. F.; DA SILVA, H. D. T.; DO LAGO, C. L. Microssistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1986-2000, 2007.

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

COLTRO, Wendell Karlos Tomazelli. Detecção condutométrica sem contato: uma nova ferramenta para monitoramento de interações biomoleculares em microssistemas analíticos. Orientador: Emanuel Carrilho. 2008, 248 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

CREVILLEN, A. G.; HERVÁS, M.; LÓPEZ, M. A.; GONZÁLEZ, A. C.; ESCARPA, A. Real sample analysis on microfluidic devices. **Talanta**, v. 74, p. 342–357, 2007.

DE SOUZA, Fabrício Ribeiro. Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos em poliéster-toner para diagnósticos clínicos com detecção colorimétrica. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

DITTRICH, P.S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A. Micro Total Analysis Systems. Latest Advancements and Trends. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 3887-3907, 2006.

DOSSI, N.; TONIOLO, R.; PIZZARIELLO, A.; IMPELLIZZIERI, F.; PICCIN, E.; BONTEMPELLI, G. Pencil-drawn paper supported electrodes as simple electrochemical detectors for paper-based fluidic devices. **Electrophoresis**, v. 34, p. 1-7, 2013.

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

DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S. Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 5821–5826, 2009.

FANG, X.; CHEN, H.; JIANG, X.; KONG, J. Microfluidic Devices Constructed by a Marker Pen on a Silica Gel Plate for Multiplex Assays. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 3596–3599, 2011.

FENTON, E. M.; MASCARENAS, M. R.; LOPEZ, G. P.; SIBBETT, S. S. Multiplex Lateral-Flow Test Strips Fabricated by Two-Dimensional Shaping. **American Chemical Society**, v. 1, p. 124–129, 2009.

GHADIMI, H.; TEHRANI, R. M. A.; ALI, A. S. M.; MOHAMED, N. GHANI, S. A. Sensitive voltammetric determination of paracetamol by poly (4-vinylpyridine)/multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 765, p. 70 -76, 2013.

GIROTTI, E. M.; DE PAOLI, M. A. Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: Importância, técnicas e modelos teóricos. **Química nova**, v. 22, p. 358-368, 1999.

GOMES, M. S.; TREVIZAN, L. C.; NÓBREGA, J. A.; KAMOGAWA, M. Y. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, v. 31, p. 1577-1581, 2008.

GUAN, X. S.; ZHANG, H.; ZHENG, J. Electrochemical behavior and differential pulse voltammetric determination of paracetamol at a carbon ionic liquid electrode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, p. 1049–1055, 2008.

HABIBI, B.; JAHANBAKHSI, M.; AZAR, M. H. P. Simultaneous determination of acetaminophen and dopamine using SWCNT modified carbon–ceramic electrode by differential pulse voltammetry. **Electrochimica Acta**, v. 28, p. 2888 – 2894, 2011.

JOKERST, J. C.; ADKINS, J. A.; BISHA, B.; MENTELE, M. M.; GOODRIDGE, L. D.; HENRY, C. S. Development of a Paper-Based Analytical Device for Colorimetric Detection of Select Foodborne Pathogens. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 2900–2907, 2012.

KACHOOSANGI, R. T.; WILDGOOSE, G. G.; COMPTON, R. G. Sensitive adsorptive stripping voltammetric determination of paracetamol at multiwalled carbon nanotube modified basal plane pyrolytic graphite electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 16, p. 54 – 60, 2008.

KHAN, M. S.; THOUAS, G.; SHEN, W.; WHITE, G.; GARNIER, G. Paper Diagnostic for Instantaneous Blood Typing. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 4158–4164, 2010.

KLASNER, S. A.; PRICE, A. K.; HOEMAN, K. W.; WILSON, R. S.; BELL, K. J.; CULBERTSON, C. T. Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 1821–1829, 2010.

KOVARIK, M. L.; GACH, P. C.; ORNOFF, D. M.; WANG, Y.; BALOWSKI, J.; FARRAG, L.; ALLBRITTON, N. L. Micro Total Analysis Systems for Cell Biology and Biochemical Assays. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 516–540, 2012.

KRICKA; SIA. Lab on paper. **Lab on a Chip**, v. 8, p. 1988–1991, 2008. doi: 10.1039/b814043j

KWONG, P.; GUPTA, M. Vapor Phase Deposition of Functional Polymers onto Paper-Based Microfluidic Devices for Advanced Unit Operations. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 10129–10135, 2012.

LAGO, C. L.; DA SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A. A Dry Process for Production of Microfluidic Devices Based on the Lamination of Laser-Printed Polyester Films. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 3853–3858, 2003.

LEWIS, G.G.; DITUCCI, M. J.; BAKER, M. S.; PHILLIPS, S. T. High throughput method for prototyping three-dimensional, paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**. v. 12, p. 2630–2633, 2012.

LI, X.; TIAN, J.; NGUYEN, T.; SHEN, W. Paper-Based Microfluidic Devices by Plasma Treatment. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 9131–9134, 2008.

LIANA, D. D.; RAGUSE. B.; GOODING, J. J.; CHOW, E. Recent Advances in Paper-Based Sensors. **Sensors**, v.12, p. 11505-11526, 2012.

LORPHENSRI, O.; INTRAVIJIT, J.; SABATINI, D. A.; KIBBEYB, T. C. G.; OSATHAPHANC, K.; SAIWAND, C. Sorption of acetaminophen, 17 $\alpha$ -ethynyl estradiol, nalidixic acid, and norfloxacin to silica, alumina, and a hydrophobic medium. **Water research**, v. 40, p. 1481– 1491, 2006.

LOURENÇÃO, Bruna Cláudia. Determinação voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado com boro. 2009. 140f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

LU, J.; GE, S.; GE, L.; YAN, M.; YU, J. Electrochemical DNA sensor based on three-dimensional folding paper device for specific and sensitive point-of-care testing. **Electrochimica Acta**, v. 80, p. 334-341, 2012.

LU, W.; SHI, W.; JIANG, L.; QIN, J.; LIN, B. Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. **Electrophoresis**, v. 30, p. 1497–1500, 2009.

LU, Y.; LIN, B.; QIN, J. Patterned Paper as a Low-Cost, Flexible Substrate for Rapid Prototyping of PDMS Microdevices via “Liquid Molding”. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 1830–1835, 2011.

MAEJIMA, K.; TOMIKAWA, S.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. Inkjet printing: an integrated and green chemical approach to microfluidic paper-based analytical devices. **RSC Advances**, 2013, doi: 10.1039/c3ra40828k.

MANZ, A.; MIYAHARA, Y.; MIURA, J.; WATANABE, Y.; MIYAGI, H.; SATO, K. Design of an Open-tubular Column Liquid Chromatograph Using Silicon Chip Technology. **Sensors and Actuators, B**, v. 1, p. 249-255, 1990.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: a Novel Concept for Chemical Sensing. **Sensors and Actuators, B**, v. 1, p. 244-248, 1990.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WILEY, B. J.; GUPTA, M.; WHITESIDES, G. M. FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**. v. 8, p. 2146–2150, 2008.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; BUTTE, M. J.; WHITESIDES, G. M. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. **Communications Angewandte Chemie**, v. 46, p.1318 –1320, 2007.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS III, S. W.; SIND, H.; WHITESIDES, G. M. Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 3699–3707, 2008.

MESSINA, G. A.; VITO, I. E.; RABA, J. On-line microfluidic sensor integrated with an enzyme-modified pre-cell for the monitoring of paracetamol in pharmaceutical samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, p. 152–158, 2006.

NAKAMURA, K.; ERA, S.; OZAKI, Y.; SOGAMI, M.; HAYASHI, T.; MURAKAMI, M. Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. **FEBS Letters**, v. 417, p. 375-

NIE, J.; ZHANG, Y.; LIN, L.; ZHOU, C.; LI, S.; ZHANG, L.; LI, J. Low-Cost Fabrication of Paper-Based Microfluidic Devices by One-Step Plotting. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 6331–6335, 2012.

NIE, Z.; NIJHUIS, C. A.; GONG, J.; CHEN, X.; KUMACHEV, A.; MARTINEZ, A. W.; NAROVLYANSKY, M.; WHITESIDES, G. M. Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 10, p. 477–483, 2010.

OLKKONEN, J.; LEHTINEN, K.;ERHO, T. Flexographically Printed Fluidic Structures in Paper. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 10246–10250, 2010.

OZCAN, A.; SAHIN, Y. A novel approach for the determination of paracetamol based on the reduction of N-acetyl-*p*-benzoquinoneimine formed on the electrochemically treated pencil graphite electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 685, p. 9 – 14, 2011.

PAROLO, C.; MERKOÇI, A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 450-457, 2013.

PICCIN, Evandro. Novas metodologias de fabricação de microssistemas analíticos e detecção eletroquímica. Orientador: Emanuel Carrilho. 2008, 181 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

RATNARATHORN, N.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S.; DUNGCHAI, W. Simple silver nanoparticle colorimetric sensing for copper by paper-based devices. **Talanta**, v. 99, p. 552–557, 2012.

REYES, D. R.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S.; DUNGCHAI, W. Micro Total Analysis Systems: Introduction, Theory, and Technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 2623–2636, 2002.

RÍOS, A.; ZOUGAGH, M.; AVILA, M. Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 740, p. 1–11, 2012.

SANTANA, Phillipe Pessoa. Fabricação de eletrodos de ouro descartáveis e *microchips* para eletroforese em vidro usando adesivos de vinil como máscaras para controle de área e corrosão química via úmida. 2011. 127f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SANTANA, P. P.; SEGATO, T. P.; CARRILHO, E.; LIMA, R. S.; DOSSI, N.; KAMOGAWA, M. Y.; GOBBI, A. L.; PIAZZETA, M. H.; PICCIN, E. Fabrication of glass microchannels by xurography for electrophoresis applications. **Analyst**, v. 138, p. 1660 – 1664, 2013.

SARFRAZ, J.; MÄÄTTÄNEN, A.; IHALAINEN, P.; KEPPELER, M.; LINDÉN, M.; PELTONENA, J. Printed copper acetate based H<sub>2</sub>S sensor on paper substrate. **Sensors and Actuators B**, v. 173, p. 868–873, 2012.

SCHILLING, K. M.; LEPORE, A. L.; KURIAN, J. A.; MARTINEZ, A. W. Fully Enclosed Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 1579–1585, 2012.

SHANGGUAN, X.; ZHANG, H.; ZHENG, J. Electrochemical behavior and differential pulse voltammetric determination of paracetamol at a carbon ionic liquid electrode. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 1049–1055, 2008.

SHI, C. G.; SHAN, X.; PAN, Z. Q.; XU, J. J.; LU, C.; BAO, N.; GU, H. Y. Quantum Dot (QD)-Modified Carbon Tape Electrodes for Reproducible Electrochemiluminescence (ECL) Emission on a Paper- Based Platform. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 3033–3038, 2012.

SHI, J.; TANG, F.; XING, H.; ZHENG, H.; BI, L.; WANG, W. Electrochemical Detection of Pb and Cd in Paper-Based Microfluidic Devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 6, p. 1124-1130, 2012.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. 847p.

SHIROMA, L. Y.; SANTHIAGO, M.; GOBBI, A. L.; KUBOTA, L. T. Separation and electrochemical detection of paracetamol and 4-aminophenol in a paper-based microfluidic device. **Analytica Chimica Acta**, v. 725, p. 44-50, 2012.

SONGJAROEN, T.; Dungchai, W.; Chailapakul, O.; Laiwattanapaisal, W. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. **Talanta**, v. 85, p. 2587–2593, 2011.

VILLAESCUSA, I.; FIOL, N.; POCH, J.; BIANCHI, A.; BAZZICALUPI, C. Mechanism of paracetamol removal by vegetable wastes: The contribution of  $\pi$ - $\pi$  interactions, hydrogen bonding and hydrophobic effect. **Desalination**, v. 270, p. 135–142, 2011.

VANDAVEER IV, W. R.; FARMER, S. A. P.; FISCHER, D. J.; FRANKENFELD, C. N.; LUNTE, S. M. Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3528–3549, 2004.

WANG, W.; WU, W. Y.; WNAG, W.; ZHU, J. J. Tree-shaped paper strip for semiquantitative colorimetric detection of protein with self-calibration. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3896–3899, 2010.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, p. 368-373, 2006.

XU, Y. LOU, B.; LV. Z.; ZHOU, Z.; ZHANG, L.; WANG, E. Paper-based solid-state electrochemiluminescence sensor using poly(sodium 4-styrenesulfonate) functionalized graphene/nafion composite film. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 20–27, 2013.

YAN, J.; YAN, M.; GE, L.; YU, J.; GE, S.; HUANG, J. A microfluidic origami electrochemiluminescence aptamer-device based on a porous Au-paper electrode and a phenyleneethynylene derivative. **ChemComm Communication**, v. 49, p.1383-1385, 2013.

YAN, J.; GE, L.; SONG, X.; YAN, M.; GE, S.; YU, J. Paper-Based Electrochemiluminescent 3D Immunodevice for Lab-on-Paper, Specific, and Sensitive Point-of-Care Testing. **Chemistry European Journal**, v. 18, p. 4938 – 4945, 2012.

YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. **Lab on a Chip**, 2013, doi: 10.1039/c3lc50169h.

YU, J.; WANG, S.; GE, L.; GE, S. A novel chemiluminescence paper microfluidic biosensor based on enzymatic reaction for uric acid determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 3284–3289, 2011.

YU, J.; GE, L.; HUANG, J.; WANG, S.; GE, S. Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid. **Lab on a Chip**, v. 11, p. 1286–1291, 2011.

YU, W. W.; WHITE, I. M. Inkjet-printed paper-based SERS dipsticks and swabs for trace chemical detection. **Analyst**, v. 138, p. 1020–1025, 2013.

ZHANG, M.; GE, L.; GE, S.; YAN, M.; HUANG, J.; LIU, S. Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence device for simultaneous detection of  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  based on potential-control technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 544–550, 2013.