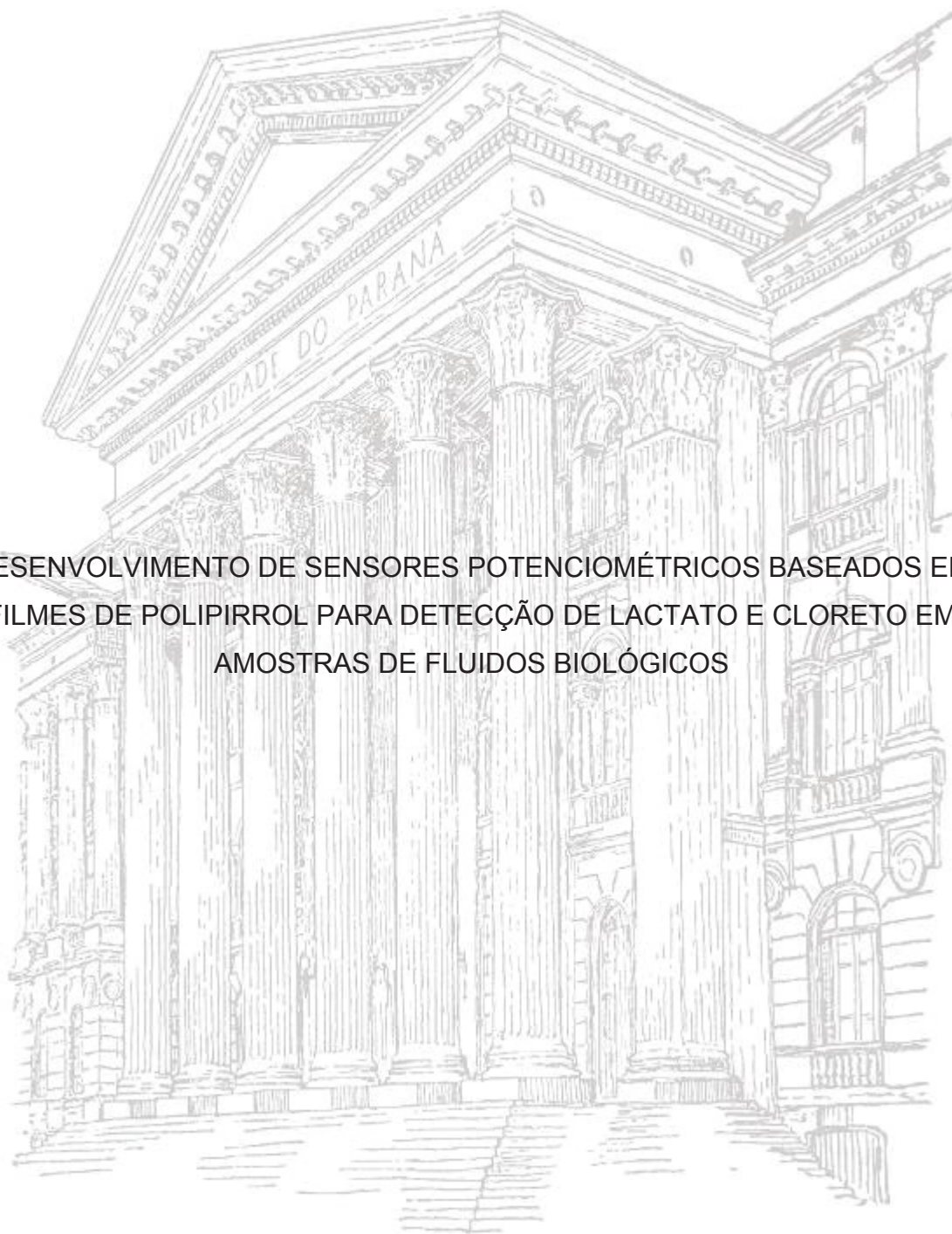


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILLA MENGARDA

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES POTENCIOMÉTRICOS BASEADOS EM
FILMES DE POLIPIRROL PARA DETECÇÃO DE LACTATO E CLORETO EM
AMOSTRAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS



CURITIBA

2018

PRISCILLA MENGARDA

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES POTENCIOMÉTRICOS BASEADOS EM
FILMES DE POLIPIRROL PARA DETECÇÃO DE LACTATO E CLORETO EM
AMOSTRAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutora em Química, no
Programa de Pós-Graduação em Química, Setor
de Ciências Exatas, da Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino
Junior

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Fernando
Bergamini

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

M544d Mengarda, Priscilla
Desenvolvimento de sensores potenciométricos baseados em filmes de polipirrol para detecção de lactato e cloreto em amostras de fluidos biológicos / Priscilla Mengarda – Curitiba, 2018.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2018.

Orientador: Luiz Humberto Marcolino Junior
Coorientador: Márcio Fernando Bergamini

1. Polipirrol. 2. Lactato. 3. Cloreto. 4. Fluidos biológicos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marcolino Junior, Luiz Humberto. III. Bergamini, Márcio Fernando. IV. Título.

CDD: 547.7

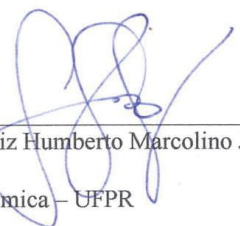
TERMO DE APROVAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES POTENCIOMÉTRICOS
BASEADOS EM FILMES DE POLIPIRROL PARA DETECÇÃO DE
LACTATO E CLORETO EM AMOSTRAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS**

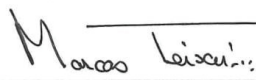
por

PRISCILLA MENGARDA

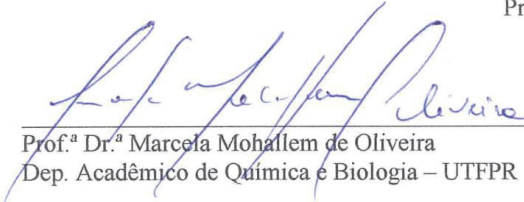
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:




Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Jr.
Orientador
Dep. de Química – UFPR



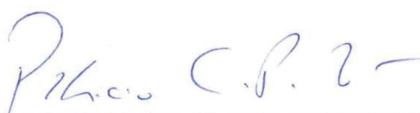
Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira
Dep. de Química e Bioquímica – UNESP



Prof.ª Dr.ª Marcela Mohallem de Oliveira
Dep. Acadêmico de Química e Biologia – UTFPR



Prof. Dr. Marcio Eduardo Vidotti Miyata
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta-Zamora
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 31 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Jr. pelos conhecimentos transmitidos, pelas experiências compartilhadas e pela oportunidade em me abrir as portas do doutorado no grupo Labsense. Ao Prof. Dr. Márcio F. Bergamini, meu co-orientador, igualmente pela oportunidade e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos componentes da banca de defesa Prof. Dr. Marcos F. de Souza Teixeira, Prof. Dra. Marcela Mohallem Oliveira, Prof. Dr. Marcio E. Vidotti Miyata e Prof. Dr. Patricio G. Peralta Zamora pela riquíssima contribuição para o aperfeiçoamento da tese. Igualmente aos componentes da banca de qualificação Prof. Dra. Marcela Mohallem Oliveira, Prof. Dr. Marcio E. Vidotti Miyata e Prof. Dr. Patricio G. Peralta Zamora pela disponibilidade e valiosas contribuições.

Ao Prof. Dr. Fernando Dias e ao doutorando João Peixoto (Departamento de Fisiologia – UFPR), ao Prof. Dr. Raul Osieck (Departamento de Ed. Física – UFPR) e à Prof. Dra Silvia Valderramas (Departamento de Prevenção e Reabilitação em Fisioterapia – UFPR), não consigo mensurar a gratidão que tenho por vocês, que me receberam, disponibilizaram seus laboratórios e contatos, trocaram conhecimento e acreditaram em meu trabalho. Obrigada por todo acesso e pelo crescimento enorme que tive com vocês!

À Associação Brasileira de Mucoviscidose (Fibrose Cística) e presidente responsável Sr. Sérgio H. Sampaio por viabilizar acesso à associação e aos pacientes fibrocísticos.

A todos os voluntários que aceitaram participar deste trabalho, especialmente aos voluntários fibrocísticos que, mesmo apresentando limitações de saúde, aceitaram prontamente e acreditaram nesta pesquisa. Também a vocês não consigo mensurar minha gratidão! Dedico este trabalho a vocês!

Aos meus amigos e companheiros do Labsense, pelo grande apoio dentro e fora da vida acadêmica. Obrigada por literalmente me fornecerem sangue, suor e lágrimas nesta jornada. Sentirei muito a falta deste ambiente (dos amigos e da bancada também).

Ao Fernando, meu amor e amigo, por todo companheirismo, incentivo e apoio. Não é o homem ou a mulher que toma a frente; grandes amores caminham lado a lado.

À minha família, especialmente aos meus pais Ursula e Elcio e ao meu irmão Elinton pelo amor, paciência pelas minhas ausências, dedicação e luta durante a vida, contribuindo grandemente para minha estruturação até aqui.

Aos meus queridos amigos-irmãos “cães”, agradeço por constituírem a extensão de minha família aqui em Curitiba, por todo companheirismo e amizade.

Aos amigos dos tempos de mestrado no Laboratório de Pilhas e Baterias e que me acompanham até hoje, como uma família científica e de coração.

Ao Departamento de Química da UFPR, incluindo amigos, professores e funcionários técnico-administrativos, pelo auxílio no desenvolvimento do meu trabalho e pelo bom ambiente e companheirismo.

À UFPR e aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, por viabilizar minha inserção em uma instituição de excelência enquanto bolsista no doutorado e contribuir para o desenvolvimento de meu trabalho. Sem o apoio e incentivo da instituição pública, jamais teria a oportunidade em dedicar exclusivamente meu tempo e meus esforços para meu doutorado, o que faz uma diferença significativa.

Aos amigos da vida, de luta e resistência, e a todos os demais que fizeram parte de minha história e contribuíram para a realização deste trabalho.

“A Terra é um palco muito pequeno em uma vasta arena cósmica. Pense nas incontáveis crueldades infligidas pelos habitantes de um canto deste pixel aos habitantes praticamente indistinguíveis de algum outro canto. O quanto seus desentendimentos são frequentes, o quanto desejam matar uns aos outros, o quanto fervorosamente se odeiam. [...] Não há talvez melhor demonstração das tolas e vãs soberbas humanas do que esta distante imagem do nosso miúdo mundo. Para mim, acentua nossa responsabilidade para nos portarmos mais amavelmente uns para com os outros e para protegermos e acarinharmos o pálido ponto azul.”

(Carl Sagan, em “Pale Blue Dot”, referindo-se a uma imagem da Terra – do tamanho de um pixel – tirada pela Voyager I em 1990, que, na época, estava 40,5 vezes mais distante que a distância entre o Sol e a Terra. Em 2013, a Voyager I alcançou o espaço interestelar.)

RESUMO

Neste trabalho, sensores potenciométricos seletivos a lactato e cloreto baseados em filmes de polipirrol foram apresentados como alternativas promissoras para aplicação em diferentes fluidos biológicos. A determinação dessas duas espécies apresenta importante relevância devido ao lactato ser um indicador de produção de energia pelo sistema glicolítico anaeróbio e tem sido amplamente utilizado para avaliar a capacidade de exercício e monitorar a intensidade de treinamento de atletas, além de ser um biomarcador de algumas doenças. O cloreto é um marcador padrão para o diagnóstico de fibrose cística, uma doença genética sem cura, que requer diagnóstico precoce e métodos precisos de análise. A seletividade dos sensores propostos foi baseada em uma matriz de polipirrol dopada com esses íons em sua estrutura, que ocorre durante a etapa de polimerização galvanostática ($1,2 \text{ mA cm}^{-2}$, 720 s). Após a otimização, ambos os sensores seletivos aos íons foram analisados sob condições potenciométricas e mostraram uma ampla faixa linear entre 0,1 e 10,0 mmol L^{-1} com inclinação de $23,7 \pm 0,2 \text{ mV déc}^{-1}$ e limite de detecção (LD) de $78 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ para o sensor de lactato e uma inclinação de $35,0 \pm 1,3 \text{ mV déc}^{-1}$ e LD de $85 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ para o sensor de cloreto. Excelente repetibilidade, reprodutibilidade e seletividade também foram obtidas. O primeiro sensor foi aplicado para avaliar os níveis de lactato em amostras de lágrima humana e uma correlação linear com os níveis de lactato em amostras de sangue ($R^2 = 0,977$) foi encontrada. A fim de avaliar os níveis de lactato antes e após a atividade física intensa, foram analisadas amostras de sangue de ratos e amostras de suor humano. Para ambos os fluidos, a variação potencial foi obtida, e em comparação com a análise de lactato no sangue por dispositivo portátil, a resposta em suor humano foi confirmada pelo método proposto. O segundo sensor foi aplicado em amostras de lágrimas e saliva de grupos saudáveis e fibrocísticos para determinar a concentração de cloreto. Os resultados mostraram maior concentração de cloreto na saliva dos voluntários fibrocísticos e podem validar os valores de referência limítrofes e melhorar a análise da resposta. Um estudo comparativo foi realizado entre o método potenciométrico utilizando o sensor proposto e o método coulométrico e apresentou uma correlação significativa para a determinação de cloreto neste fluido ($R^2 = 0,892$). Dessa forma, os sensores potenciométricos desenvolvidos demonstraram uma ferramenta eletroanalítica viável e eficiente para os atuais dispositivos e metodologias comerciais, especialmente para suporte em avaliações de desempenho físico - sensor de lactato - e como um novo método para o diagnóstico de fibrose cística - sensor de cloreto.

Palavras-chave: Lactato, cloreto, polipirrol, eletrodos seletivos a íons, sensor, potencimetria, fluidos biológicos.

ABSTRACT

In this work, selective potentiometric sensors to lactate and chloride based on polypyrrole films were presented as promising alternatives for application in different biological fluids. The determination of these two species presents important relevance due to lactate is an indicator of energy production by the anaerobic glycolytic system and has been extensively used to evaluate exercise capacity and to monitor the training intensity of athletes, besides being a biomarker of some diseases. Chloride is a standard marker for the diagnosis of cystic fibrosis, a genetic disease without cure, which requires early diagnosis and accurate methods of analysis. The selectivity of proposed sensors was based on a polypyrrole matrix doped with these ions in its structure which occurs during galvanostatic polymerization step (1.2 mA cm^{-2} , 720 s). After optimization, both ion-selective sensors were analyzed under potentiometric conditions and showed a wide linear range between 0.1 and 10.0 mmol L^{-1} with a slope of $23.7 \pm 0.2 \text{ mV dec}^{-1}$ and a limit of detection (LOD) of $78 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ to lactate sensor and a slope of $35.0 \pm 1.3 \text{ mV dec}^{-1}$ and a LOD of $85 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ to chloride sensor. Excellent repeatability, reproducibility and selectivity were also achieved. The first sensor was applied to evaluate lactate levels in human tear samples and a linear correlation with lactate levels in blood samples ($R^2 = 0.977$) was found. In order to assess lactate levels before and after intense physical activity, blood samples from rats and human sweat samples were analyzed. For both fluids the potential variation was obtained, and in comparison to the lactate analysis in blood by portable device, the human sweat response was confirmed by the proposed method. The second sensor was performed in tears and saliva samples of healthy and fibrocystic groups to determinate chloride concentration. The results showed a higher chloride concentration in saliva of fibrocystic volunteers and can validate the borderline reference values and improve the analysis of the response. A comparative study between the potentiometric method using the proposed sensor and the coulometric method was performed and showed a significant correlation for the determination of chloride in this fluid ($R^2 = 0.892$). Thus, the developed potentiometric sensors demonstrated a viable and efficient electroanalytical tool to the current commercial devices and methodologies, especially to support in physical performance evaluations – lactate sensor – and as a new method for Cystic Fibrosis diagnosis – chloride sensor.

Keywords: Lactate, chloride, polypyrrole, ion-selective electrode, sensor, potentiometry, biological fluids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – POLÍMEROS CONDUTORES E MATERIAIS OBTIDOS	19
FIGURA 2 – SÍNTESE DO POLIPIRROL VIA ELETROPOLIMERIZAÇÃO	20
FIGURA 3 – FUNCIONALIZAÇÃO DO POLIPIRROL POR INCORPORAÇÃO DO CONTRA-ÍON	22
FIGURA 4 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA PARA FILMES DE POLIPIRROL FORMADOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE CRESCIMENTO	24
FIGURA 5 – DIFERENTES TIPOS DE ELETRODOS SELETIVOS A ÍONS	27
FIGURA 6 – ESQUEMA ILUSTRATIVO RESUMIDO DOS PROCESSOS METABÓLICOS DURANTE ATIVIDADE FÍSICA	34
FIGURA 7 – GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO EM FUNÇÃO DO INCREMENTO DE VELOCIDADE DE TREINAMENTO	35
FIGURA 8 – FUNCIONAMENTO DA PROTEÍNA TRANSMEMBRANAR CFTR EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E APÓS MUTAÇÃO GENÉTICA EM FIBROCÍSTICOS	38
FIGURA 9 – PROTOCOLO DE TREINAMENTO DE NATAÇÃO UTILIZADO EM RATOS PARA DETERMINAÇÃO DE LACTATO BASAL E PÓS- TREINAMENTO	49
FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE CLORETO EM SALIVA PELO MÉTODO COULOMÉTRICO.....	53
FIGURA 11 – GRÁFICO DA DENSIDADE DE CARGA VS CONCENTRAÇÃO DO MONÔMERO COMO REPRESENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA FORMAÇÃO DOS FILMES DE PPI:CI PELO MÉTODO GALVANOSTÁTICO. OS SÍMBOLOS “■” CORRESPONDEM ÀS MEDIDAS REALIZADAS	55
FIGURA 12 – PERFIL ELETROQUÍMICO DURANTE CRESCIMENTO DO FILME DE PPI:CI PELO MÉTODO GALVANOSTÁTICO E POTENCIODINÂMICO A PARTIR DE SOLUÇÕES 0,1 mol L ⁻¹ DE PIRROL E 0,1 mol L ⁻¹ DE KCl	56
FIGURA 13 – ESTRUTURA DO PPI E CONTRA-ÍONS UTILIZADOS DURANTE A ELETROPOLIMERIZAÇÃO	58

FIGURA 14 – IMAGENS DE SEM APÓS CRESCIMENTO GALVANOSTÁTICO DOS FILMES DE POLIPIRROL INCORPORADOS COM DIFERENTES CONTRA-ÍONS.....	58
FIGURA 15 – IMAGENS DE AFM E KFM DOS FILMES DE POLIPIRROL FORMADOS PELO MÉTODO GALVANOSTÁTICO, DENSIDADE DE CORRENTE DE 0,7 mA cm ⁻² , 720 s, EM SOLUÇÃO DE 0,1 mol L ⁻¹ DE PIRROL COM DIFERENTES ELETRÓLITOS.....	60
FIGURA 16 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DE AMOSTRAS DE PPI:LAC E PPI:Cl	62
FIGURA 17 – DIAGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES PARA O SISTEMA ÁCIDO LÁTICO/LACTATO	64
FIGURA 18 – VARIAÇÃO DA SENSIBILIDADE EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE CORRENTE APLICADA PARA A FORMAÇÃO DO FILME DE PPI:LAC EM ELETRODO DE GRAFITE	65
FIGURA 19 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA OBTIDA UTILIZANDO SENSOR DE PPI:LAC FORMADO EM DIFERENTES ELETRÓLITOS.....	67
FIGURA 20 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA OBTIDA UTILIZANDO SENSOR DE PPI:LAC FORMADO EM SULFATO DE AMÔNIO E EM NITRATO DE POTÁSSIO	67
FIGURA 21 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA E CURVA DE CALIBRAÇÃO APÓS UM CONJUNTO DE ADIÇÕES DE PADRÃO LACTATO UTILIZANDO O SENSOR DE PPI:LAC EM NITRATO DE POTÁSSIO 0,1 mol L ⁻¹ EM DIFERENTES VALORES DE pH.....	69
FIGURA 22 – COMPORTAMENTO DO SENSOR PPI:LAC EM NITRATO DE POTÁSSIO (SENSIBILIDADE - <i>SLOPE</i>) PARA DIFERENTES VALORES DE pH	71
FIGURA 23 – COMPORTAMENTO DO SENSOR PPI:LAC EM NITRATO DE POTÁSSIO (FAIXA LINEAR ABRANGENTE) PARA DIFERENTES VALORES DE pH	72
FIGURA 24 – REPETIBILIDADE REPRODUTIBILIDADE DO SENSOR DE PPI:LAC.....	73

FIGURA 25 – GRÁFICO DE BARRAS OBTIDOS A PARTIR DA SENSIBILIDADE EM FUNÇÃO DA REPETIBILIDADE E DA REPRODUTIBILIDADE	74
FIGURA 26 – ESTUDO DE POTENCIAIS INTERFERENTES UTILIZANDO ADIÇÃO DE LACTATO $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ INTERCALADO PELA ADIÇÃO DE GLICOSE $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, UREIA $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ÁCIDO ASCÓRBICO $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ E CLORETO $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	76
FIGURA 27 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA A PARTIR DE AMOSTRA DE LÁGRIMA HUMANA (AMOSTRA SEGUIDA DE ADIÇÃO DE PADRÃO LACTATO E AMOSTRA FORTIFICADA)	78
FIGURA 28 – GRÁFICO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE LACTATO EM AMOSTRAS DE LÁGRIMA E DE SANGUE HUMANO	80
FIGURA 29 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA A PARTIR DE AMOSTRA DE SANGUE DE RATOS NA REGIÃO BASAL E APÓS TREINAMENTO	82
FIGURA 30 – GRÁFICO DE CONCENTRAÇÃO DE LACTATO E FREQUÊNCIA CARDÍACA VS VELOCIDADE DA ESTEIRA CONTENDO A REGIÃO DE COLETA (A, B, C). RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA A PARTIR DE AMOSTRA DE SUOR HUMANO NA REGIÃO BASAL E APÓS TREINAMENTO (D, E, F) ..	84
FIGURA 31 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA DO SENSOR PPI:CI EM ELETRÓLITO DE KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 APÓS ADIÇÕES DE PADRÃO CLORETO EM CONCENTRAÇÕES ENTRE $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ E $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	86
FIGURA 32 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA E CURVA DE CALIBRAÇÃO APÓS UM CONJUNTO DE ADIÇÕES DE PADRÃO CLORETO UTILIZANDO O SENSOR DE PPI:CI EM SULFATO DE AMÔNIO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PARA DIFERENTES VALORES DE pH	88
FIGURA 33 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA OBTIDA UTILIZANDO O SENSOR DE PPI:CI EM SULFATO DE AMÔNIO, pH 2,0 A 7,0	90
FIGURA 34 – COMPORTAMENTO DO SENSOR DE PPI:CI (SENSIBILIDADE – SLOPE) OBTIDO EM DIFERENTES VALORES DE pH PARA O ELETRÓLITO SULFATO DE AMÔNIO	91

FIGURA 35 – COMPORTAMENTO DO SENSOR DE PPI:CI (FAIXA LINEAR DE TRABALHO) OBTIDO EM DIFERENTES VALORES DE pH PARA O ELETRÓLITO SULFATO DE AMÔNIO.....	91
FIGURA 36 – REPETIBILIDADE REPRODUTIBILIDADE DO SENSOR DE PPI:CI	93
FIGURA 37 – GRÁFICO DE BARRAS OBTIDOS PARA O SENSOR DE PPI:CI A PARTIR DA SENSIBILIDADE EM FUNÇÃO DA REPETIBILIDADE E DA REPRODUTIBILIDADE.....	94
FIGURA 38 – ESTUDO DE POTENCIAIS INTERFERENTES UTILIZANDO ADIÇÃO DE CLORETO $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ INTERCALADO PELA ADIÇÃO DE GLICOSE $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, LACTATO $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, UREIA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ÍONS SÓDIO $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ÍONS POTÁSSIO $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ E ÍONS CÁLCIO $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	95
FIGURA 39 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA (VARIAÇÃO DE POTENCIAL) OBTIDA A PARTIR DE AMOSTRAS DE LÁGRIMA HUMANA DE GRUPO NÃO-FIBROCÍSTICO E DE GRUPO FIBROCÍSTICO	97
FIGURA 40 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA (VARIAÇÃO DE POTENCIAL) OBTIDA A PARTIR DE AMOSTRAS DE LÁGRIMA HUMANA DE GRUPO NÃO-FIBROCÍSTICO E DE GRUPO FIBROCÍSTICO	99
FIGURA 41 – CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE CLORETO OBTIDAS PELO MÉTODO POTENCIOMÉTRICO VIA ADIÇÃO DE PADRÃO DE CLORETO A PARTIR DE AMOSTRAS DE SALIVA HUMANA DE GRUPO NÃO-FIBROCÍSTICO E DE GRUPO FIBROCÍSTICO	101
FIGURA 42 – CORRELAÇÃO ENTRE O MÉTODO PROPOSTO UTILIZANDO O SENSOR DE PPI:CI E O MÉTODO COULOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CLORETO EM AMOSTRAS DE SALIVA HUMANA.....	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ELETRÓLITOS TESTADOS EM DIFERENTES FAIXAS DE pH	47
TABELA 2 – ATRIBUIÇÕES DOS GRUPOS FUNCIONAIS REFERENTES ÀS REGIÕES DO ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	62
TABELA 3 – TAXA DE RECUPERAÇÃO DE LACTATO EM AMOSTRAS DE LÁGRIMA POR INTERPOLAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA	79
TABELA 4 – TAXA DE RECUPERAÇÃO DE CLORETO EM AMOSTRAS DE LÁGRIMA DE VOLUNTÁRIOS NÃO-FIBROCÍSTICOS POR INTERPOLAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA	97
TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DE CLORETO OBTIDA EM AMOSTRAS DE LÁGRIMA DE VOLUNTÁRIOS NÃO-FIBROCÍSTICOS E FIBROCÍSTICOS POR ADIÇÃO DE PADRÃO	98
TABELA 6 – TAXA DE RECUPERAÇÃO DE CLORETO EM AMOSTRAS DE SALIVA DE VOLUNTÁRIOS NÃO-FIBROCÍSTICOS POR INTERPOLAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA	99
TABELA 7 – CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE CLORETO OBTIDA EM AMOSTRAS DE SALIVA DE VOLUNTÁRIOS NÃO-FIBROCÍSTICOS E FIBROCÍSTICOS POR INTERPOLAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA...	100

LISTA DE ABREVIATURAS

\bar{c}_i	- Fase da membrana ou filme
$K_{i,j}^{pot}$	- Coeficiente de seletividade
a_i	- Atividade do íon
k_i	- Constante de partição iônica
z_i	- Valência do íon
μ_i^0	- Potencial químico na fase nas condições padrão
μ_i	- Potencial químico na fase
μ_i^0 e $\bar{\mu}_i^0$	- Potenciais químicos padrão do íon “i”
ΔE	- Variação de potencial
A^-	- Ânion
AC	- Corrente alternada
Acetil-CoA	- Acetil coenzima A
ADP	- Difosfato de adenosina
AFM	- Microscopia de força atômica
a_i	- Atividade iônica
AMP	- Monofosfato de adenosina
ATP	- Trifosfato de adenosina
C^+	- Cátion
CEP/UFPR	- Comitê de Ética de Pesquisa da Universidade Federal do Paraná
CEPEFIS	- Centro de Estudos da Performance Física da UFPR
CEUA/UFPR	- Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPR
CFTR	- Regulador da Condutância da Transmembrana da Fibrose Cística
c_i	- Concentração de um ânion “i”
Cl	- Cloreto
DC	- Corrente contínua
DLM	- Modelo de camada de difusão (<i>Diffusion-Layer Model</i>)
DQUI/UFPR	- Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná
E_D	- Potencial de difusão dentro da membrana ou filme
EDS	- Espectroscopia de energia dispersiva
E_{ind}	- Eletrodo indicador
E_{LF}	- Potencial limítrofe de fase

E_M	- Potencial elétrico da membrana de um sensor de íons
F	- Constante de Faraday
FADH ₂	- Dinucleotídeo de flavina e adenina reduzida
FC	- Fibrose Cística
FEG/SEM	- Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução
FTIR	- Espectroscopia na região do infravermelho
i	- Espécie “ i ”
ISE's	- Eletrodos seletivos a íons (<i>Ion-selective-electrodes</i>)
ITO	- Óxido de índio e estanho
j	- Espécie “ j ”
KFM	- Microscopia de força Kelvin
$K_{i,j}$	- Constante de equilíbrio
LAC	- Lactato
MC	- Massa corporal
NAD ⁺	- Dinucleótido de nicotinamida e adeninaoxidada
NaDBS	- Dodecilbenzenossulfonato de sódio
NADH	- Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida
NaPSS	- Poliestirenosulfonato de sódio
NPP	- Sistema de equações de Nernst-Planck e Poisson
NPs	- Nanopartículas
PBS	- Solução tampão fosfato salino
PPI	- Filmes de polipirrol
PPI:Cl	- Filmes de polipirrol incorporados com cloreto
PPI:LAC	- Filmes de polipirrol incorporados com lactato
PPI:PSS	- Filmes de polipirrol incorporados com poliestirenosulfonato
R	- Constante universal dos gases
R_a	- Rugosidade média
RSD	- Desvio padrão relativo
T	- Temperatura absoluta
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
φ	- Potencial elétrico na fase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	SENSORES POTENCIOMÉTRICOS E POLÍMEROS CONDUTORES BASEADOS EM ELETRODOS SELETIVOS A ÍONS.....	26
1.2	LACTATO EM FLUIDOS CORPORAIS.....	33
1.3	CLORETO E A PARTICULARIDADE PARA O DIAGNÓSTICO DE FIBROSE CÍSTICA.....	37
2	OBJETIVO	43
2.1	OBJETIVO GERAL.....	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	REAGENTES	44
3.2	SÍNTESE ELETROQUÍMICA DOS FILMES DE POLIPIRROL.....	44
3.2.1	Sistema eletroquímico	44
3.2.2	Eletropolimerização e incorporação dos contra-íons	44
3.2.3	Caracterização	45
3.3	SENSOR POTENCIOMÉTRICO DE LACTATO	45
3.3.1	Sistema eletroquímico	45
3.3.2	Determinação potenciométrica de lactato.....	46
3.3.3	Estudo do eletrólito e efeito do pH.....	46
3.3.4	Desempenho analítico do sensor proposto	47
3.3.5	Aplicação em amostras biológicas.....	47
3.3.5.1	Lágrima humana.....	47
3.3.5.2	Sangue de ratos	48
3.3.5.3	Suor humano	50
3.4	SENSOR POTENCIOMÉTRICO DE CLORETO	50
3.4.1	Desempenho analítico do sensor de cloreto.....	51
3.4.2	Determinação de cloreto em amostras biológicas	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	FORMAÇÃO DOS FILMES DE POLIPIRROL.....	54
4.1.1	Caracterização dos filmes de polipirrol por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica	57

4.1.2	Caracterização dos filmes de polipirrol por espectroscopia na região do infravermelho	61
4.2	SENSOR POTENCIOMÉTRICO DE LACTATO	63
4.2.1	Substrato e estudo do eletrólito	64
4.2.2	Efeito da variação do pH do eletrólito	68
4.2.3	Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade	73
4.2.4	Seletividade do sensor proposto	75
4.2.5	Análise em amostras biológicas	77
4.2.5.1	Amostras de lágrima humana	77
4.2.5.2	Amostras de sangue animal e de suor humano	81
4.3	SENSOR POTENCIOMÉTRICO DE CLORETO	86
4.3.1	Estudo da natureza e do pH do eletrólito.....	86
4.3.2	Estudo da repetibilidade e reprodutibilidade	92
4.3.3	Avaliação da seletividade do sensor.....	94
4.3.4	Análise em amostras biológicas de voluntários não-fibrocísticos e fibrocísticos.....	96
4.3.4.1	Avaliação do sensor de PPI:Cl em amostras de lágrima	96
4.3.4.2	Avaliação do sensor de PPI:Cl em amostras de saliva.....	98
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXO 1 – ANÁLISE ELEMENTAR PONTUAL DA REGIÃO “1”	
	OBTIDA A PARTIR DE FILME DE PPI:LAC	120
	APÊNDICE 1 – DIREITOS AUTORAIS DAS IMAGENS UTILIZADAS NA	
	TESE	121

1 INTRODUÇÃO

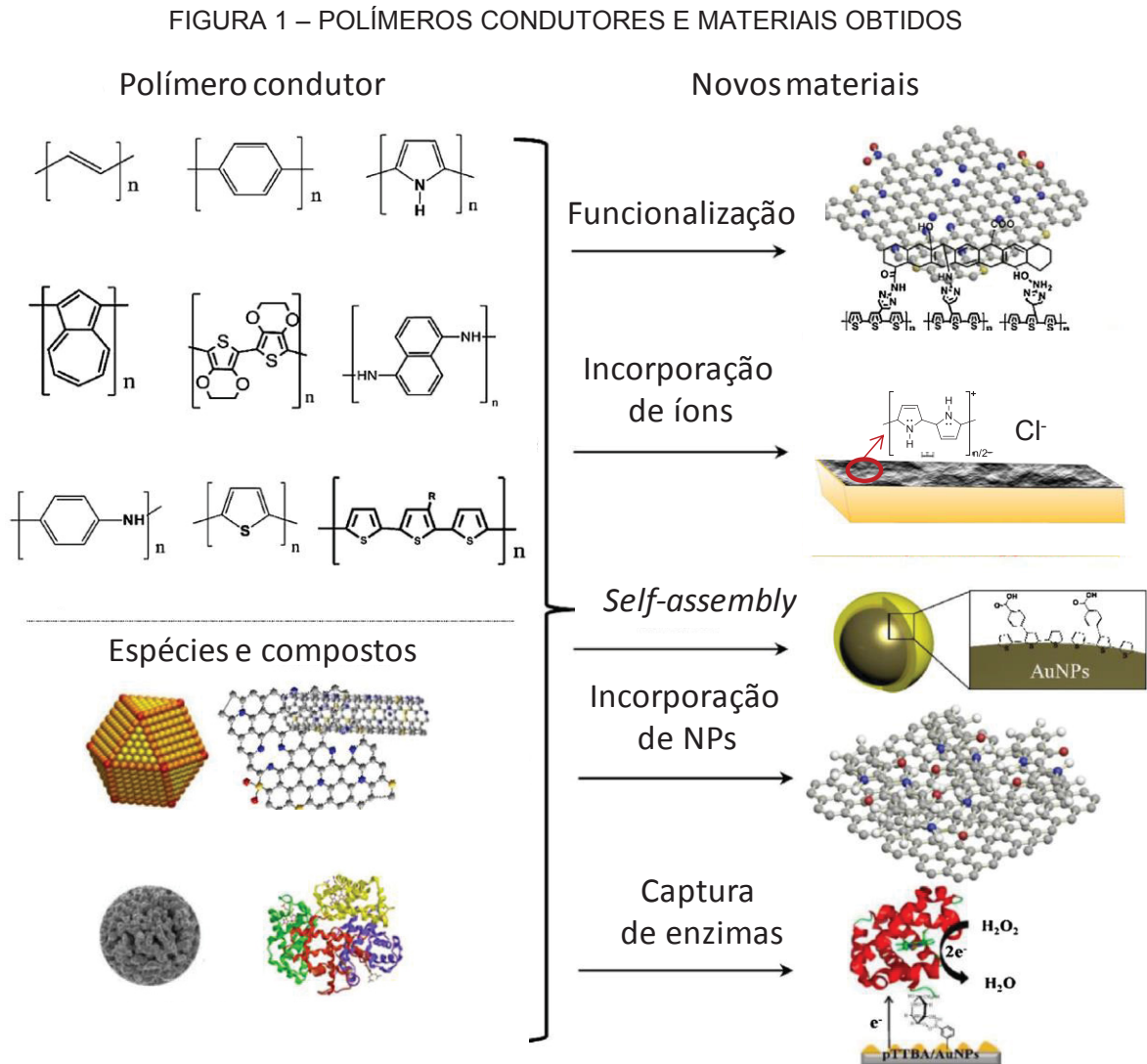
A crescente busca pelo aperfeiçoamento de sensores com características como alta seletividade, sensibilidade e estabilidade associadas à possibilidade de miniaturização e portabilidade vem impulsionando amplo estudo na área da eletroanalítica. Neste contexto, os sensores eletroquímicos ganharam novos espaços, possibilitando seu desenvolvimento para diferentes finalidades e aplicações importantes nos campos de análises clínicas, farmacêutico, ambiental e agrícola, dentre outros. [1-7]

O termo “sensor” corresponde a um dispositivo que responde a um estímulo, como calor, luz, som, pressão, magnetismo ou movimento, e transmite um sinal resultante como forma de medir a alteração da propriedade intrínseca do material constituinte. Os sensores eletroquímicos, em particular, são uma classe de sensores químicos nos quais um eletrodo é utilizado como elemento transdutor na presença de um analito. [8] O sinal de resposta pode ser monitorado por técnicas eletroquímicas baseadas em métodos regidos por controle de potencial ou de corrente, como os voltamétricos e amperométricos, pela leitura de potencial interfacial sem a aplicação de uma corrente (potenciométricos), pela aplicação de um sinal alternado (impedimétricos), ou pela medida da condutividade iônica de espécies em uma solução (condutométricos).

Materiais baseados em polímeros condutores têm recebido ampla atenção nos últimos anos pelas potenciais aplicações no campo do desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Desde a exposição do poliacetileno a agentes oxirredutores, em que foi obtido o primeiro polímero condutor em 1977 (cujo trabalho resultou aos autores o Prêmio Nobel de Química em 2000), outras espécies vêm sendo empregadas no desenvolvimento de polímeros condutores. [9] No contexto dos sensores eletroquímicos, estes polímeros conjugados podem conferir um estado condutivo e são especialmente atraentes, pois combinam em um único material tanto a condutividade eletrônica quanto a iônica. [10] Devido às suas propriedades condutoras únicas, geralmente são utilizados em aplicações significativas em química, física, eletrônica, óptica, e ciências biomédicas. [11-12]

As técnicas eletroquímicas fornecem uma abordagem conveniente para desenvolver novos materiais utilizando polímeros condutores, os quais podem influenciar a morfologia, a espessura, o estado químico e a condutividade dos

materiais. Diferentes tipos de materiais são apresentados na FIGURA 1 a partir de polímeros condutores e íons orgânicos e inorgânicos, nanopartículas e nanoestruturas, materiais de carbono, espécies moleculares e componentes biologicamente ativos, tais como enzimas, proteínas, anticorpos e antígenos. [13]

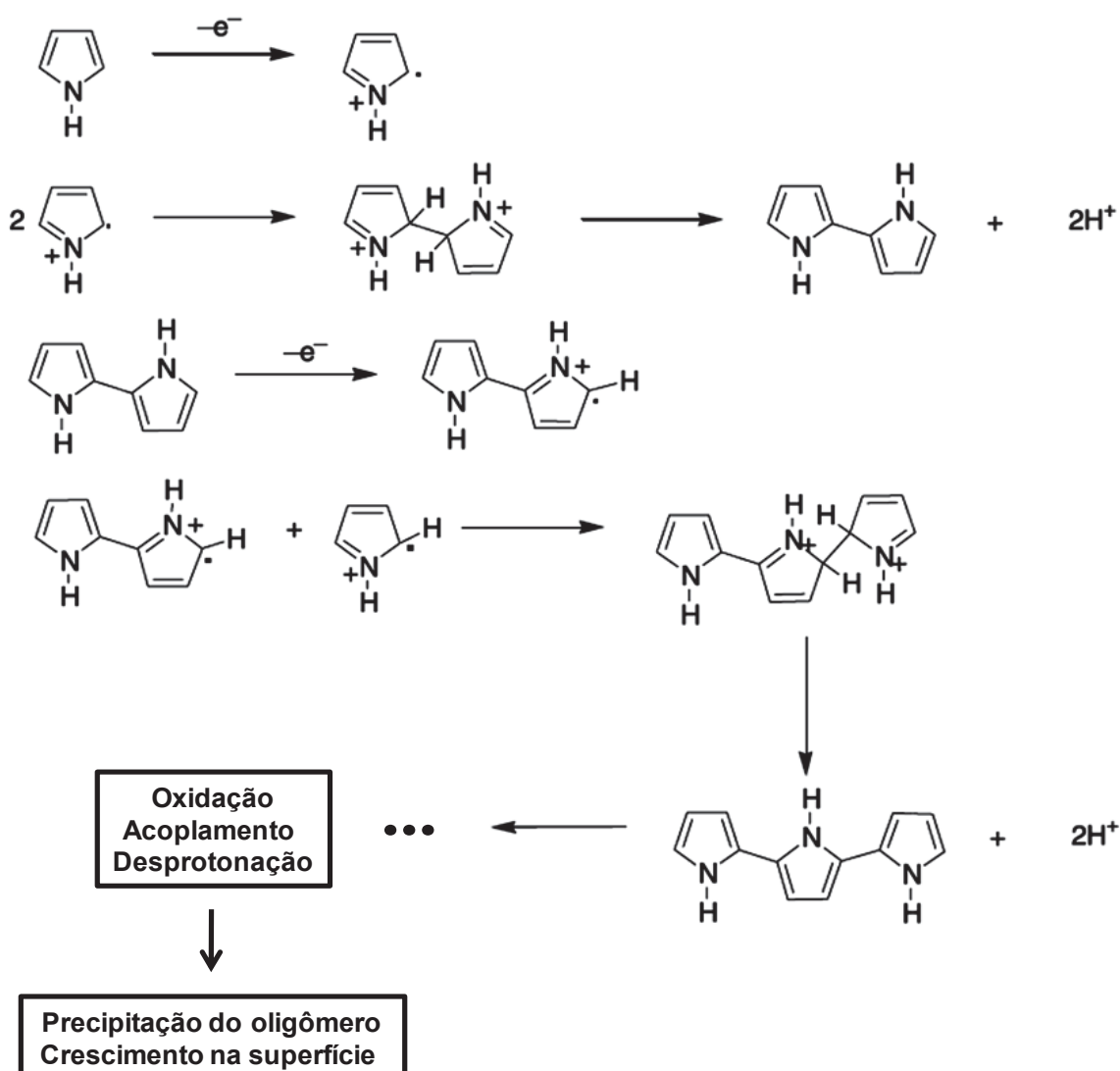


FONTE: Modificado de NAVEEN *et al.* (2017). Adaptado com autorização da *Elsevier*.

O polipirrol é um dos polímeros condutores que constantemente atrai a atenção de pesquisadores, tanto do ponto de vista fundamental quanto aplicado, devido a sua alta condutividade, estabilidade química e síntese relativamente simples. Suas propriedades redox, ópticas e elétricas os tornam potenciais para diversas aplicações, tais como, dispositivos electrocrômicos, baterias, capacitores e sensores, abrindo novas perspectivas para diferentes áreas. [14-16]

Os filmes de polipirrol podem ser obtidos por síntese química ou eletroquímica. A síntese eletroquímica é um método simples, rápido e controlável. Estes filmes são facilmente depositados a partir de meios aquosos e não aquosos, aderentes a vários tipos de substratos, condutores e estáveis. A polimerização eletroquímica produz filmes com uma espessura de alguns micrômetros sobre uma superfície do eletrodo, enquanto que a oxidação química produz um material de maior espessura, com controle limitado de crescimento da cadeia polimérica. [17] O rendimento e a qualidade dos filmes poliméricos resultantes são influenciados por vários fatores, tais como a natureza e concentração de monômero e o contra-íon. [18-20] Na FIGURA 2 está apresentado o mecanismo da síntese eletroquímica do polipirrol.

FIGURA 2 – SÍNTESE DO POLIPIRROL VIA ELETROPOLIMERIZAÇÃO



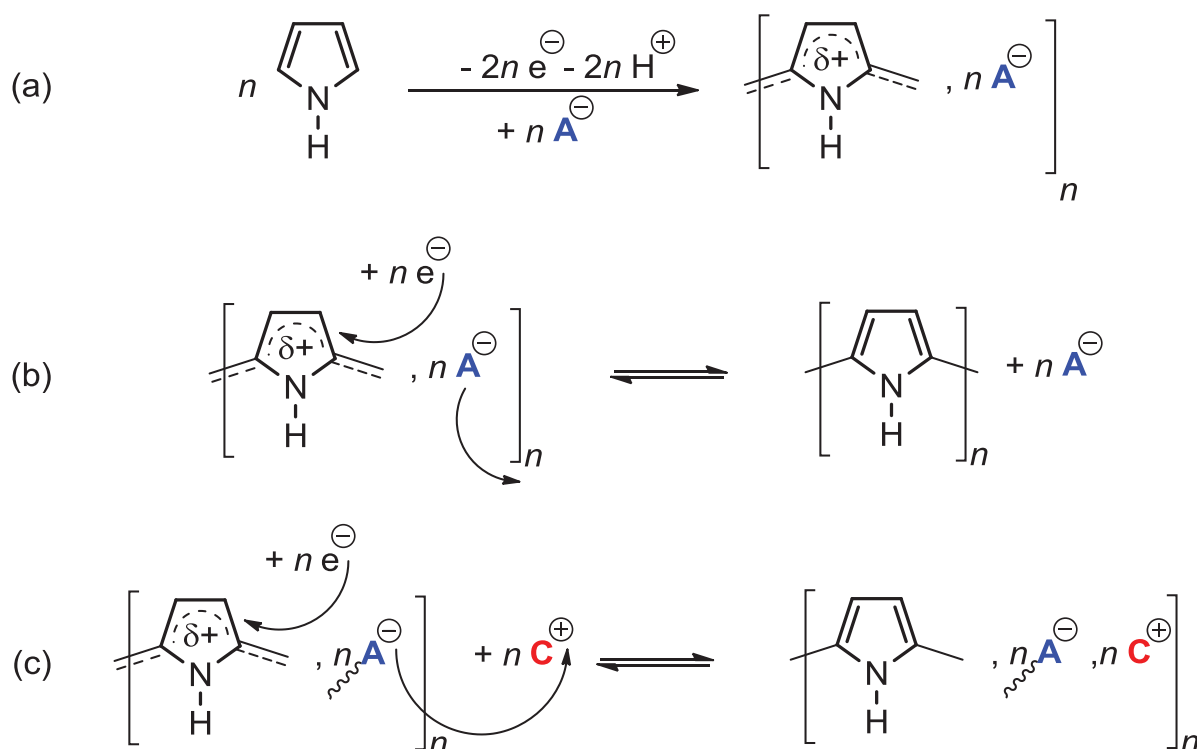
FONTE: Adaptado de Diaz (1979).

No mecanismo apresentado, as unidades monoméricas são adsorvidas sobre a superfície do eletrodo de trabalho, resultando na oxidação de um elétron para formar um cátion-radical do pirrol. O cátion-radical reage com outro cátion-radical ou com um monômero neutro em solução. Em cada caso, leva-se à formação de um dímero cátion-radical, que sofre uma dupla desprotonação para uma obtenção de uma molécula neutra. Os radicais do dímero são mais estáveis e tem um potencial de oxidação mais baixo em comparação aos monômeros e, em seguida, o crescimento da cadeia ocorre através de acoplamento preferencial entre os dímeros e monômeros. Paralelamente, ânions (A^-) são incorporados à matriz polimérica concomitante à polimerização para manter a neutralidade do sistema. [17, 21-22]

O crescimento de espécies oligoméricas por meio da oxidação e reação com unidades de pirrol resulta na formação de cadeias que atingem um tamanho crítico, tornam-se insolúveis e precipitam sobre a superfície do eletrodo, ocorrendo a nucleação e posterior crescimento do filme polimérico na superfície do eletrodo. O término da polimerização ainda não está bem compreendido na literatura e diferentes hipóteses têm sido propostas. De forma geral considera-se que o crescimento da cadeia cessa porque o radical catiônico torna-se não reativo em relação à propagação da cadeia (combinação entre radicais), ou porque as extremidades da cadeia ficam estericamente bloqueadas. [23]

As propriedades do filme de polipirrol são influenciadas pela natureza do contra-íon incorporado durante a polimerização, tornando possível sua funcionalização de acordo com a aplicação desejada. Na FIGURA 3 está apresentado um modelo esquemático da funcionalização do polipirrol pela incorporação de contra-íons contidos no eletrólito e participação durante a eletropolimerização. [24]

FIGURA 3 – FUNCIONALIZAÇÃO DO POLIPIRROL POR INCORPORAÇÃO DO CONTRA-ÍON



FONTE: Adaptado de COSNIER *et al.* (2011).

Após o processo de eletropolimerização, iniciado pela aplicação de um sinal elétrico no sistema contendo o monômero e os contra-íons “C⁺” e “A⁻” de um eletrólito, o polímero torna-se condutor e em um estado oxidado. A carga total do sistema é neutra pela presença de ânions incorporados durante a eletropolimerização (FIGURA 3a). Quando ocorre a redução, ânions podem ser expelidos (FIGURA 3b) ou ficar imobilizados no filme. Neste caso os cátions serão incorporados (FIGURA 3c). No processo de reoxidação, o polipirrol torna-se novamente positivo e os cátions previamente incorporados são expelidos (no caso de ânions imobilizados) ou os ânions presentes na solução são incorporados (quando há mobilidade do ânion).^[24-25] Filmes incorporados com ânions pequenos, como o cloreto, possuem propriedades de troca aniônica.^[26] Contra-íons grandes, dentre eles surfactantes como o dodecilbenzenossulfonato de sódio (NaDBS), incorporados ao polipirrol, podem caracterizar o filme polimérico como um trocador de cátions, devido a múltiplas interações eletrostáticas ou por processos físicos que tornam o ânion dopante imobilizado na matriz.^[25] Quando um ânion de tamanho intermediário, como, por exemplo, *p*-toluenossulfonato, é incorporado à matriz

polimérica, ambas as propriedades de troca de ânions e cátions dos filmes são observadas nos processos redox. [27]

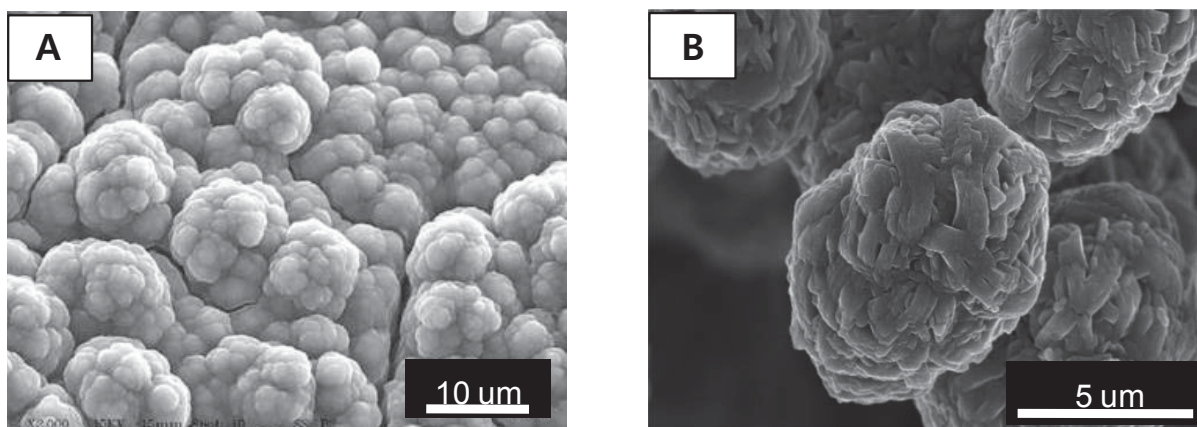
Otero e colaboradores (2004), em um estudo com aplicação de filmes de polipirrol para a fabricação de músculos artificiais, ressaltaram a influência dos contra-íons no volume do filme. [28] Durante a oxidação, a alta concentração de cargas no interior do material oxidado induz a entrada de água, que é necessária para manter a pressão osmótica, a partir da solução. O volume do material aumenta durante a oxidação e diminui durante a redução. Os macro ânions permanecem no interior do material, seja qual for o estado de oxidação, devido às suas dimensões em relação às distâncias entre as cadeias do polímero ou por forte intermoleculares interações Van der Waals. [28-29]

As propriedades físicas dos filmes de polipirrol, como morfologia, porosidade, propriedade mecânica e estabilidade térmica, também são influenciadas pelos contra-íons incorporados. É relatado que as propriedades mecânicas e térmicas podem ser otimizadas utilizando filmes incorporados com contra-íons sulfonados aromáticos. [19] Interações específicas ou locais de reconhecimento molecular podem ser conferidas por incorporação de contra-íons, como em sensores baseados em filmes de polipirrol aplicados para reconhecimento de metais pela incorporação de contra-íons como reagentes de complexação de metais, conferindo elevada seletividade. [30] Grupos bioativos, como enzimas e anticorpos, também podem ser incorporados para o desenvolvimento de biossensores e fases estacionárias para medidas cromatográficas. [31-32] Contra-íons opticamente ativos também podem ser incorporados nos filmes poliméricos para induzir a quiralidade em materiais. [33]

São ainda reportados outros fatores que podem influenciar a formação dos filmes de polipirrol como a temperatura, pH e método de crescimento. [34-35] Em relação a este último fator, a formação do polipirrol por eletropolimerização pode ser feita por medidas galvanostáticas, potenciostáticas ou potenciodinâmicas. Processos como o de nucleação e crescimento do filme a partir de diferentes métodos de formação podem alterar a morfologia do polímero. [36] Shan e colaboradores (1997) apresentaram diferentes padrões fractais de crescimento dos filmes de polipirrol a partir da variação dos potenciais aplicados. Esses padrões foram classificados em sete tipos, de acordo com a morfologia e estrutura e apresentaram significativa modificação morfológica do filme de polipirrol. [37]

Sadki e colaboradores (2000) também apontaram que a escolha do método eletroquímico tem uma influência sobre a morfologia, adesão e aparência do filme de polipirrol formado. No estudo, quando se aplicava um potencial constante, um tipo de polímero dendrítico, com baixa aderência e heterogêneo era formado. [19] Os autores referenciaram Kiani e Mitchell (1992), os quais apresentaram a hipótese de que as melhorias estruturais do filme podem ser obtidas a partir do maior número de sítios de nucleação e do processo de crescimento. [38] Ainda os autores referenciaram Zhou e Heinz (1999), os quais verificaram que o regime eletroquímico aplicado controla a forma estrutural dos filmes de polipirrol. [39] Na FIGURA 4 estão representadas micrografias que indicam diferenças morfológicas em filmes poliméricos crescidos pelo método galvanostático e potenciostático. [40-41]

FIGURA 4 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA PARA FILMES DE POLIPIRROL FORMADOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE CRESCIMENTO



FONTE: Adaptado de Chen *et al.* (2004) e Dubal *et al.* (2012). Adaptado com permissão da Springer Nature e da Royal Society of Chemistry.

LEGENDA: A) Imagens para filmes de PPI formados pelo método galvanostático (5mA cm^{-2} , 300 s). B) Imagens para filmes de PPI formados pelo método potenciostático (varredura de 0 a 1,2 V; 50 mV s^{-1}).

Patra e colaboradores (2008) reforçaram que os filmes poliméricos formados pelo método potenciostático apresentaram estrutura fibrosa e em forma de haste, e atribui ao crescimento camada por camada. Já os filmes crescidos pelos processos galvanostático e potenciostático apresentaram estrutura globular característica de polímeros condutores, conforme visualizado na FIGURA 4. [42]

Conforme apresentado, as propriedades dos polímeros condutores como o polipirrol permitem que espécies sejam incorporadas facilmente à matriz, o que leva a uma vasta aplicação para a construção de sensores e biossensores

eletroquímicos. [43-47] Nesta direção, desde o início da década de 1990, os polímeros condutores vêm sendo abordados para o desenvolvimento de eletrodos seletivos a íons (*Ion-selective-electrodes, ISE's*) tornando-se amplamente aplicáveis em sensores potenciométricos. [47-48]

No presente trabalho investigou-se a formação de filmes de polipirrol pelo método galvanostático em que foram incorporados separadamente lactato e cloreto, íons de interesse analítico voltados para o desenvolvimento de sensores potenciométricos. Uma das razões para a escolha do primeiro contra-íon se justifica na direção de o lactato ser um metabólito produzido naturalmente pelo corpo humano como subproduto do metabolismo da glicose e liberado na corrente sanguínea quando a via anaeróbica é acionada, como em exercícios de grande intensidade e curta duração. O acúmulo desta substância nos músculos pode gerar uma hiperacidez, que causa dor e desconforto logo após o exercício. A determinação da concentração sanguínea (ou em alguns casos no suor e lágrima) do lactato permite avaliar a capacidade de exercício e monitorar a intensidade de treinamento de atletas. [49] A escolha do cloreto é justificada, pois este íon é um dos marcadores para o diagnóstico de Fibrose Cística (FC). Esta doença é genética e gera um descontrole do fluxo de cloreto entre células epiteliais, causando sérias complicações em órgãos como pulmão, intestino e pâncreas. A FC não possui cura, mas quando diagnosticada precocemente há aumento da sobrevida e melhora na qualidade de vida dos pacientes. O método usual de diagnóstico é feito pelo teste do suor, coletado por iontoforese e quantificado por titulação coulométrica. No entanto ainda apresenta limitações e incertezas quanto à confirmação do resultado para FC. [50]

A proposta neste trabalho é a construção de sensores potenciométricos para detecção de lactato e cloreto baseados na incorporação destes ânions como contra-íons em um filme de polipirrol e aplicação em amostras biológicas.

1.1 SENSORES POTENCIOMÉTRICOS E POLÍMEROS CONDUTORES BASEADOS EM ELETRODOS SELETIVOS A ÍONS

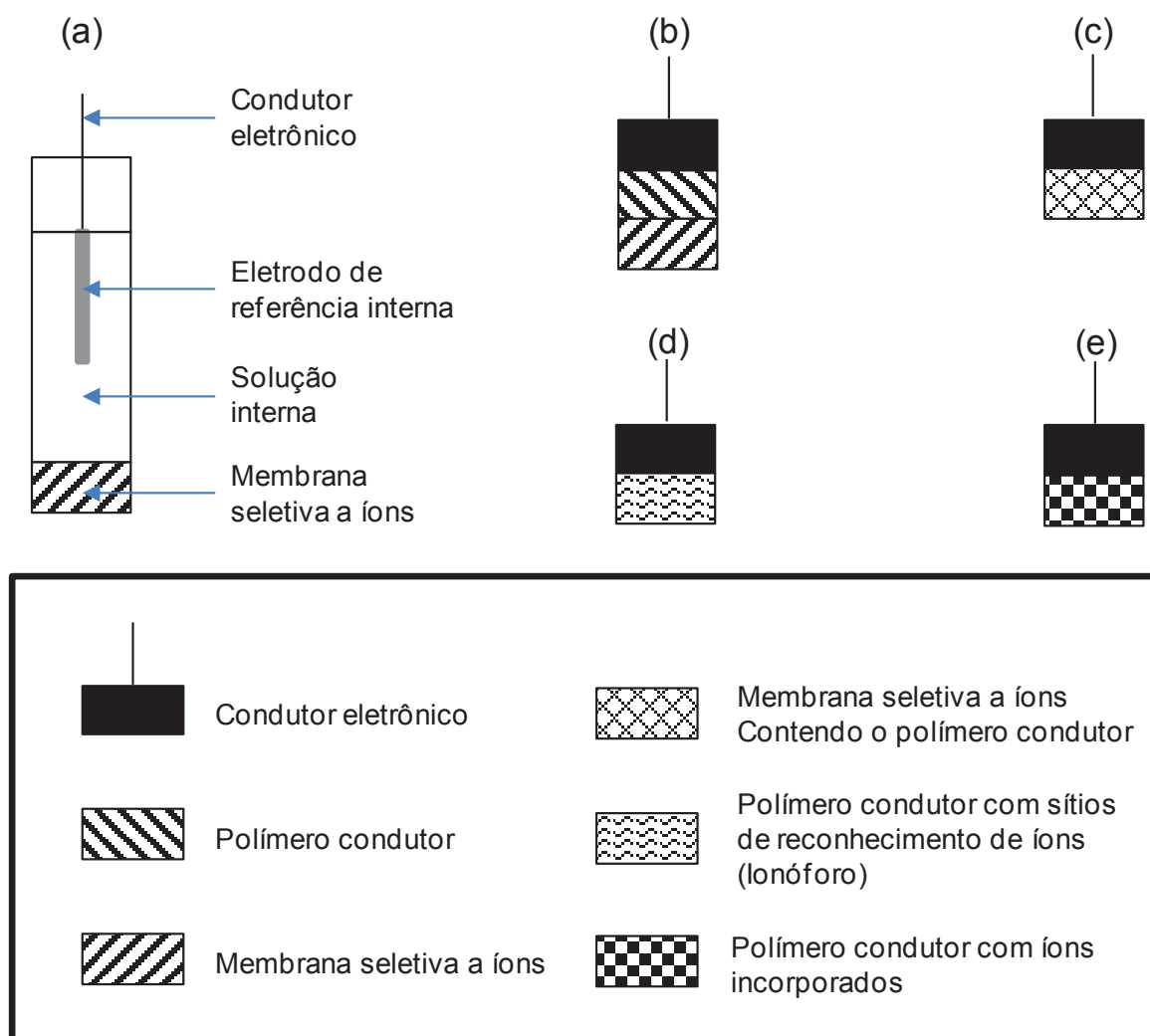
Os sensores seletivos a íons são sensores eletroquímicos em que a atividade de um íon de interesse é convertida em um potencial elétrico como sinal mensurável. Na potenciometria, o sistema é acoplado a um eletrodo de referência em condições de corrente desprezível. ^[51] São atrativos para aplicações práticas, pois apresentam seletividade e reprodutibilidade, podendo ser portáteis e miniaturizados, além de apresentarem baixo consumo de energia e baixo custo, quando comparados a muitas outras técnicas analíticas. ^[52-53]

A base da potenciometria foi estabelecida no fim do século XIX por Walther Nernst, o qual descreveu o potencial do eletrodo gerado entre um metal e uma solução contendo íons desse metal, e o potencial redox entre um metal inerte e uma solução contendo um sistema redox. Nernst, em 1897, também propôs o primeiro sensor potenciométrico para medir a acidez de soluções aquosas utilizando um sensor a gás de hidrogênio. No entanto, a descoberta dos eletrodos de vidro para medir pH por Max Cremer em 1907 e o posterior registro há cerca de um século realizado por Fritz Haber das curvas de titulação ácido-base utilizando estes eletrodos foram os marcos de uma nova era na potenciometria. Os primeiros trabalhos descrevendo o uso de eletrodos de vidro em combinação com medidores comerciais de pH foram publicados cerca de 20 anos depois. ^[54-55]

O subsequente período revolucionário na potenciometria deu-se a partir da década de 1960, quando novos eletrodos seletivos a íons foram reportados (primeira publicação de Erno Pungnor em 1961 sobre o eletrodo seletivo a iodeto baseado em iodeto de prata) e posteriormente comercializados (dentre os primeiros o eletrodo de membrana líquida seletiva a cálcio, eletrodo de fluoreto à base de cristal de LaF_3 , e eletrodo seletivo a íons potássio). ^[54, 56] Na década de 1970, Moody, Oke e Thomas utilizaram pela primeira vez eletrodos de membrana líquida à base do polímero PVC, poli(cloreto de vinila), matriz empregada até os anos recentes em quase todos os analisadores clínicos comerciais. ^[57]

Do desenvolvimento dos primeiros eletrodos seletivos a íons aos tempos atuais diferentes configurações utilizando polímeros condutores foram investigadas, dentre elas constam na FIGURA 5 as principais utilizadas para diversos tipos de aplicação. ^[52, 58]

FIGURA 5 – DIFERENTES TIPOS DE ELETRODOS SELETIVOS A ÍONS



FONTE: Adaptado de COSNIER (2011).

LEGENDA: (a) ISE preenchido com líquido e com membrana seletiva na interface.

(b) ISE preenchido com contato sólido e com membrana seletiva na interface.

(c) ISE de peça única.

(d) Polímero condutor contendo íonóforos.

(e) Polímero condutor contendo íons incorporados durante eletropolimerização.

Na FIGURA 5a consta um ISE convencional (preenchido com líquido) contendo uma membrana seletiva na interface. A substituição da solução interna de enchimento dos ISE's convencionais por um contato sólido resulta em sensores iônicos mais duráveis, mais susceptíveis para miniaturização e fabricação (FIGURA 5b). Estes sensores apresentam os receptores iônicos em uma membrana separada que está em contato com o polímero condutor. Nesta configuração, o polímero condutor atua como um transdutor de elétrons-íons no estado sólido e a membrana externa determina a seletividade do sensor. Outra possibilidade é integrar o transdutor polimérico condutor na membrana seletiva de íons na forma de uma

mistura de polímeros, resultando no chamado ISE de peça única (FIGURA 5c). Também neste caso, o papel do polímero condutor é converter um sinal iônico em um sinal eletrônico. Ainda, os polímeros condutores podem ser funcionalizados por ligantes de complexação iônica ou por receptores supramoleculares altamente seletivos (ionóforos) formando complexos do tipo hospedeiro-hóspede com o analito (FIGURA 5d). A ligação covalente de receptores iônicos a polímeros conjugados oferece possibilidades de construção de sensores onde tanto o reconhecimento molecular quanto a transdução de sinal ocorrem em uma única macromolécula, o que é de particular interesse para o desenvolvimento de sensores nanométricos.

A configuração representada na FIGURA 5e refere-se a um eletrodo condutor revestido com um polímero condutor no qual são incorporados durante a eletropolimerização íons da mesma natureza contida em determinada amostra da qual se deseja obter o sinal analítico. O sinal de resposta obtido pode ser explicado, conforme relatado por Bendikov e colaboradores (2005), a partir de um sensor de nitrato baseado em filmes de polipirrol. ^[59] De acordo com os autores, a alta seletividade é conferida uma vez que é esperado que o filme incorporado com nitrato apresente poros que são complementares ao tamanho do analito. Assim, quando o sensor é exposto à solução de nitrato, esses íons se movem da região de maior atividade para a de menor atividade de nitrato (do filme polimérico para a solução ou no sentido contrário) Como resultado, uma diferença de potencial na interface é formada. ^[59]

Esta configuração será utilizada nesta tese para aplicação em amostras biológicas. Diferentes trabalhos desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Sensores Eletroquímicos da UFPR sinalizaram a potencialidade de aplicação em amostras farmacêuticas utilizando filmes de polipirrol no qual foram incorporados diferentes íons. Aplicações como determinação de dipirona, pantoprazol, diclofenaco e citrato de sildenafila apresentaram seletividade, sensibilidade, ampla faixa linear de concentração, reprodutibilidade e repetibilidade. ^[60-64]

Em medidas potenciométricas, a resposta analítica corresponde à variação de potencial entre o eletrodo indicador (E_{ind}) e a solução, ambos contendo a espécie de interesse, em relação a um eletrodo de referência. ^[65] O eletrodo indicador corresponde ao sensor seletivo a íons. Ao se adicionar a um eletrólito uma solução contendo íons da mesma natureza daquela referente aos incorporados na matriz, um

salto potenciométrico é observado. Alguns modelos foram reportados por Bobacka e colaboradores (2008), previamente sustentados por Bakker (2007), para determinar a concentração das espécies de interesse utilizando sensores seletivos a íons. [66-67] Para todos os modelos, assume-se que a resposta potenciométrica apresenta-se em condições de potencial de circuito aberto (sem passagem de corrente), que a pressão e temperatura são constantes, e o fluxo do solvente (efeitos osmóticos) é ignorado.

O primeiro modelo é denominado “modelo em total equilíbrio”, e é considerado o modelo clássico para grande parte dos artigos publicados. [66]

Neste modelo, o potencial elétrico da membrana de um sensor de íons (E_M) é representado pela soma do potencial limítrofe de fase (E_{LF}) entre amostra e membrana íon-seletiva (ou filme) e do potencial de difusão dentro da membrana ou filme (E_D).

$$E_M = E_{LF} + E_D \quad (1)$$

Duas possibilidades são abordadas na Equação 1, em que uma desconsidera o potencial de difusão e a outra o inclui. Os dois pressupostos implementam o conceito de potencial eletroquímico entre duas fases, $\tilde{\mu}_i$:

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i + z_i F \varphi = \mu_i^0 + RT \ln(a_i) + z_i F \varphi \quad (2)$$

em que μ_i é o potencial químico na fase (μ_i^0 nas condições padrão), z_i é a valência do íon, a_i a atividade do íon, φ o potencial elétrico na fase, R , T e F a constante universal dos gases, temperatura absoluta e constante de Faraday, respectivamente.

Considerando que há a transferência de somente um íon “ i ” na interface (suposição de seletividade do íon ideal); que a transferência iônica é rápida e reversível (suposição cinética infinita); que as fases em contato são imiscíveis (suposição de imiscibilidade ideal); adotando-se a convenção para uma única atividade de íon, em vez de uma atividade iônica média, e assumindo que a atividade iônica única (a_i) em cada fase é igual à sua concentração (c_i) (a suposição da fase ideal); e que não há fluxo de solvente através da membrana ou filme (suposição de impermeabilidade do solvente), é possível derivar “ E_{LF} ” como uma função de “ c_i ”, conceito originalmente empregado por Guggenheim (1928). [68]

Utilizando a Equação 2 para cada fase, em condição de equilíbrio eletroquímico entre as fases e reconhecendo que eles são quimicamente distintas, após a separação de termos elétricos e químicos chega-se à equação de Nernst para a diferença de potencial elétrico na interface íon-sensor:

$$E_M = E_{LF} = \frac{RT}{z_i F} \ln(k_i) + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i}{\bar{c}_i}\right) \quad (3)$$

em que ' c_i ' é a concentração de um ânion " i " na solução e o símbolo de barra é a fase da membrana ou filme e " k_i " a constante de partição iônica definida como $k_i = \exp\{(\mu_i^0 - \bar{\mu}_i^0)/RT\}$, em que " μ_i^0 " e " $\bar{\mu}_i^0$ " são os potenciais químicos padrão do íon " i " das fases.

Os modelos teóricos de respostas entre íon e sensor abordando o conceito de Guggenheim iniciaram com o trabalho publicado por Nikolskii e reportado por Schwabe e colaboradores (1964). [69] O autor considerou o contato de uma membrana de vidro sensível ao pH com a solução contendo majoritariamente íons H^+ (i) e íons interferentes monovalentes Na^+ (j) e obteve a equação para a resposta na forma:

$$\begin{aligned} E_M = E_{LF} &= \frac{RT}{z_i F} \ln(k_i) + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i}{\bar{c}_i}\right) = \frac{RT}{z_i F} \ln(k_i) + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i (\bar{c}_i + \bar{c}_j)}{\bar{c}_i (\bar{c}_i + \bar{c}_j)}\right) \\ &= \frac{RT}{z_i F} \ln(k_i) + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i + \frac{c_i \bar{c}_j}{\bar{c}_i}}{\bar{c}_i + \bar{c}_j}\right) \\ &= \frac{RT}{z_i F} \ln(k_i) + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i + K_{i,j} c_j}{\bar{c}_i + \bar{c}_j}\right) \\ &= const + \frac{RT}{z_i F} \ln(c_i + K_{i,j} c_j) \end{aligned} \quad (4)$$

em que " $K_{i,j}$ " é a constante de equilíbrio

$$K_{i,j} = \frac{k_j}{k_i} = \frac{c_i \bar{c}_j}{c_j \bar{c}_i} \quad (5)$$

para a reação de troca iônica



e " $\bar{c}_i + \bar{c}_j$ " = constante.

Após três décadas, Eisenman (1969) estendeu a equação 4 de Nikolskii considerando o potencial de difusão da membrana (E_D). [70] Eisenman considerou diferentes tipos de membrana, relacionando casos com e sem associação entre íons na membrana, bem como a mobilidade iônica de " i^+ " e " j^+ ". A modelagem de Eisenman feita sob pressupostos clássicos de um equilíbrio total produziu, para a maioria dos casos considerados, as equações na forma obtida primeiramente por Nikolskii.

As equações semi-empíricas refletem a ênfase nas aplicações práticas de eletrodos de membrana seletiva a íons. Conforme decisão da IUPAC postulou-se fundir e estender a Equação 4, ou as configuradas considerando o potencial de difusão da membrana, na forma de uma equação geral para todos os eletrodos seletivos a íons e sensores iônicos. (equação de Nikolskii-Eisenman) quando é considerado o efeito de um íon interferente contido em uma amostra: [71]

$$E_M = const + \frac{RT}{z_i F} \ln \left(c_i + K_{i,j}^{pot} c_j^{z_i/z_j} \right) \quad (7)$$

em que $K_{i,j}^{pot} c_j^{z_i/z_j}$ corresponde ao coeficiente de seletividade.

Outros dois modelos foram reportados por Bobacka e colaboradores (2009). [66] Em um deles, chamado de modelo da camada de difusão (*DLM – Diffusion-Layer Model*), considera-se o equilíbrio local nas interfaces dos sensores. Assume-se neste modelo que a concentração de íons na fase de membrana e fase de contato são dependentes da distância. Este modelo, em contraste com os modelos de equilíbrio total, contém o tempo como um parâmetro introduzido para descrever a obtenção de equilíbrio através do transporte iônico controlado por difusão. Do ponto de vista teórico, as vantagens do modelo DLM não compensam as limitações dos modelos de equilíbrio total. No entanto, o DLM permite que a resposta do sensor seja teoricamente modelada de uma forma que não era possível para modelos de equilíbrio total, gerando avanços práticos na potenciometria de não-equilíbrio, uma vez que explora as propriedades de fluxo próximo à membrana e transmembranar. [66]

Modelos avançados baseados em estado de não-equilíbrio foram desenvolvidos e vêm sendo aplicados na área de sensores seletivos a íons. Nestes modelos, duas condições constitutivas são excluídas: a eletroneutralidade e a condição de equilíbrio total ou local. É possível fazê-los, considerando a premissa de separação de carga da equação de Poisson e também as taxas finitas de transferência de íons descritas pelas constantes de taxa de transferência de íons heterogêneas apropriadas. [72] A modelagem da resposta potenciométrica de não-equilíbrio dos sensores seletivos a íons requer o emprego de domínios explícitos de espaço e tempo, que fornecem a plataforma para um conjunto de dados termodinâmicos e cinéticos relevantes. Essa plataforma pode ser construída pelo uso do sistema de equações de Nernst-Planck e Poisson (NPP). [72] Este modelo vem sendo utilizado para simular processos de membranas celulares, também para modelagem de difusão de biomoléculas solvatadas em sistemas biológicos, além de ser abordado para descrição teórica de ISE's contendo ionóforos. [73-75]

Nesta tese será utilizada uma aproximação da Equação 7, recomendada pela IUPAC para sensores seletivos a íons: [71]

$$E_{ind} = const + \left(\frac{2,303 R T}{z_i F} \right) \log c_i \quad (8)$$

Na Equação 8, o valor da constante inclui todas as contribuições de potenciais da cela, incluindo o potencial do eletrodo de referência e o potencial de junção líquida (potencial de interface com duas soluções eletrolíticas distintas). Os valores de “ z_i ” e “ c_i ” correspondem à carga iônica e a concentração iônica respectivamente, “R” a constante universal dos gases, “T” a temperatura absoluta e “F” a constante de Faraday.

Uma relação linear entre o potencial do eletrodo indicador (do sensor seletivo a íons) e o logaritmo da concentração da espécie de interesse pode ser determinada. A expressão correspondente ao coeficiente de seletividade não consta na Equação 8, pois seu efeito será minimizado pelo estudo dos potenciais interferentes para cada sensor, bem como pelo estudo do eletrólito, que serão discutidos na parte dos resultados.

1.2 LACTATO EM FLUIDOS CORPORAIS

O monitoramento dos níveis de lactato no corpo humano é uma importante ferramenta na área da saúde. Nesta direção, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem sido aperfeiçoado tanto para avaliar o desempenho físico em atividades esportivas quanto para auxiliar no diagnóstico de doenças, especialmente em técnicas que possam fornecer uma avaliação não invasiva e em tempo real. [76-78]

O lactato é um composto orgânico resultante da desprotonação do ácido láctico. No corpo humano, o lactato é um metabólito chave da via glicolítica anaeróbica. Em condições estáveis, quando o nível de oxigênio excede a necessidade biológica, o metabolismo aeróbio é predominante nas células musculares. Durante condições em que os níveis de oxigênio são reduzidos, a atividade mitocondrial diminui e a glicólise (degradação da glicose) se torna a principal via metabólica para gerar energia (ATP). A glicólise converte uma molécula de glicose de seis carbonos em duas moléculas de piruvato, com três carbonos cada. Sua regulação é determinada por enzimas chave como hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato quinase. A atividade destas enzimas é regulada por múltiplos fatores como hipóxia, níveis de ATP, ADP e AMP, insulina, lactato e ácido cítrico. [79-81]

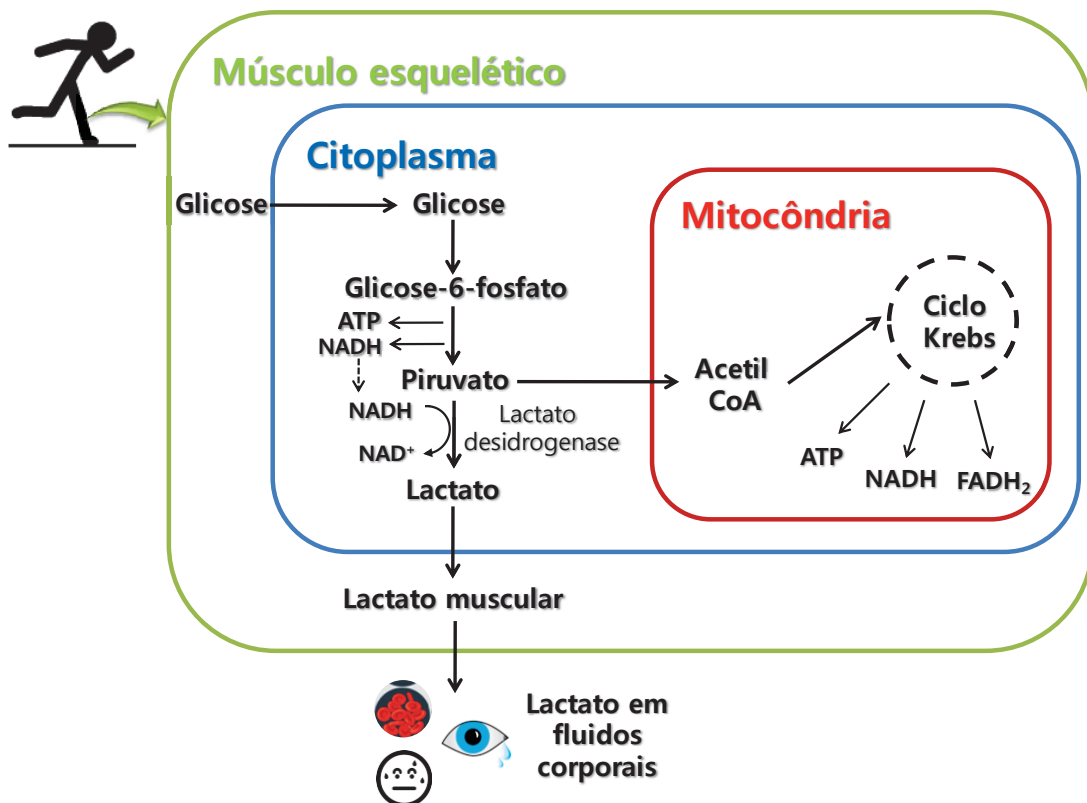
Durante o exercício, a utilização de ATP pelo músculo esquelético aumenta em grandes proporções e é abastecida pelo catabolismo de carboidratos. A primeira fonte são os estoques de glicogênio muscular que, quando fosforilados, liberam glicose 1 fosfato para síntese de ATP. Com a redução dos estoques de glicogênio muscular, a glicose sanguínea se torna o principal contribuinte para a manutenção do metabolismo de carboidratos. [82-83]

A captação de glicose do sangue para o citoplasma da célula muscular ocorre via transportador de glicose. No citoplasma a glicose é fosforilada pela enzima hexoquinase e convertida em glicose 6 fosfato. Durante o repouso, a glicose 6 fosfato é armazenada como glicogênio. Em condição de exercício, a glicose 6 fosfato é decomposta em duas moléculas de piruvato no citoplasma da célula, gerando 2 ATP e 2 NADH. [79, 82]

A intensidade do exercício determina o destino do piruvato. Quando a intensidade do exercício é baixa ou moderada, o NADH segue para a mitocôndria, transportando prótons para a cadeia de transporte de elétrons, onde será sintetizado

ATP. O piruvato é reduzido para acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase e metabolizado no ciclo do ácido cítrico nas mitocôndrias, gerando 1 ATP, 3 NADH e 1 FADH₂. [79, 82, 84] Nesta situação, a frequência de formação do piruvato está em equilíbrio com sua oxidação. No entanto, quando a intensidade do exercício é incrementada acima do limiar anaeróbico, ou seja, quando a frequência de formação do piruvato ultrapassa a sua frequência máxima de oxidação, a glicólise ocorre rapidamente e a disponibilidade de NAD⁺ na célula é limitada. Se o NADH formado pela glicólise não for reoxidado em NAD⁺ na mesma velocidade, o prosseguimento da glicólise é impedido. Um processo para a oxidação do NADH e a regeneração do NAD⁺ é a redução do piruvato para lactato pela enzima lactato desidrogenase, reação que ocorre na ausência de oxigênio. O lactato formado difunde-se para fora da célula e é diluído nos líquidos corporais, que são transportados a outras áreas do organismo para serem metabolizados. [79, 84] Na FIGURA 6 está apresentado um esquema resumido dos processos que ocorrem durante uma atividade física.

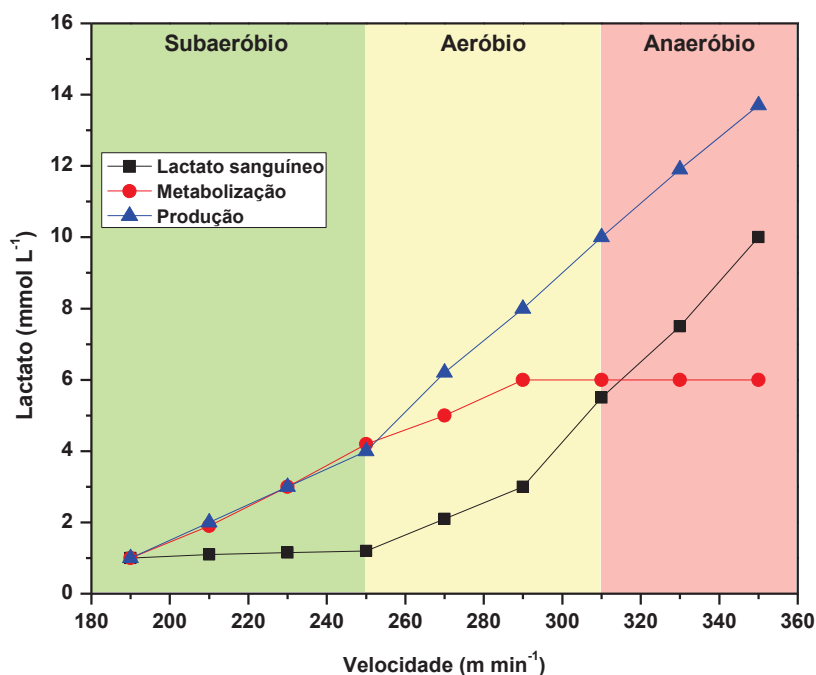
FIGURA 6 – ESQUEMA ILUSTRATIVO RESUMIDO DOS PROCESSOS METABÓLICOS DURANTE ATIVIDADE FÍSICA



FONTE: O autor.

Em atividades físicas de alto desempenho, como os testes de esforço máximo em esteira ergométrica, um gráfico característico da concentração de lactato pelo aumento da carga de trabalho é gerado, conforme apresentado na FIGURA 7. [85]

FIGURA 7 – GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO EM FUNÇÃO DO INCREMENTO DE VELOCIDADE DE TREINAMENTO



FONTE: Adaptado de BENEKE *et al.* (2011).

De acordo com a FIGURA 7, a concentração de lactato é constante no início da atividade física, uma vez que as taxas de produção e metabolização aumentam na mesma proporção. A partir do primeiro limiar de lactato a concentração começa a aumentar e, em uma carga de trabalho correspondente ao segundo limiar, a concentração aumenta em maior magnitude. A produção de lactato aumenta desde o início da atividade e, a partir do primeiro limiar, aumenta em maior proporção, pois os transportadores de piruvato para o interior da mitocôndria estão saturados. Dessa forma, a concentração de lactato aumenta no citoplasma. A produção de lactato durante o exercício está relacionada à condição física do indivíduo, diferentes adaptações metabólicas dependem do treinamento de cada indivíduo, o que pode acelerar ou retardar o processo de fadiga. [85]

Conforme apresentado anteriormente, o lactato é um indicador da produção de energia pelo sistema anaeróbio glicolítico e tem sido extensivamente utilizado

para estabelecer parâmetros de desempenho. A determinação da concentração do lactato permite avaliar a capacidade de exercício e monitorar a intensidade de treinamento de atletas. Além disso, sua concentração no sangue é um importante indicador de isquemia e oxigenação inadequada. Níveis elevados de lactato estão associados a várias perturbações tais como choque, insuficiência respiratória, insuficiência e parada cardíaca e isquemia miocárdica e de pressão. Pela importância dessa associação, o lactato também é um dos indicadores de morte celular e sua análise, dentre outras, é solicitada em hospitais para casos de ressuscitação. [78, 86-87]

A dosagem de lactato sanguíneo é obtida principalmente por técnicas cujo sinal de resposta provém de reação enzimática de conversão do lactato a piruvato. Os dispositivos comerciais portáteis usualmente utilizados são baseados na determinação da concentração de lactato por fotometria de reflectância, em que o lactato é convertido em piruvato e azul de molibdênio pela ação da enzima mediadora lactato oxidase, e a leitura fotométrica é feita a partir do azul de molibdênio, que é proporcional à concentração de lactato. [88] Outra técnica utilizada com frequência para determinação de lactato sanguíneo, especialmente para validação de outros métodos, é a espectrofotometria enzimática, em que a enzima lactato desidrogenase cataliza a oxidação do lactato a piruvato, com conseqüente redução de NAD^+ a NADH . A concentração de lactato é medida pelo aumento da absorbância a 340 nm, a partir da formação de NADH . [87, 89]

Além do lactato sanguíneo, cuja concentração normal varia entre 0,5 e 2,5 mmol L^{-1} e maior que 5 mmol L^{-1} para condições alteradas, outros fluidos vem sendo estudados como alternativa e apresentam concentrações similares de lactato em sua matriz. Um deles é a lágrima, que apresenta faixa normal de concentração de lactato corresponde a 1 a 5 mmol L^{-1} . Outro fluido biológico que vem sendo estudado é o suor, cuja faixa normal de lactato corresponde entre 23 e 27 mmol L^{-1} e entre 46 e 78 mmol L^{-1} para condições de pico de lactato. [78, 87, 90-92]

Durante as últimas décadas foi dada grande atenção para o desenvolvimento dos biossensores eletroquímicos para a detecção de níveis de lactato em diferentes materiais biológicos. Recentemente, biossensores amperométricos baseados dispositivos miniaturizados foram desenvolvidos, e que fornecem análise em tempo real de concentrações de lactato a partir do suor durante o exercício. Os dispositivos desenvolvidos necessitam, de acordo com os autores,

melhor integração da interface eletrônica, processamento de dados e transmissão sem fio. [78, 93] Foi desenvolvido também um biossensor amperométrico para determinar lactato em lágrima utilizando protótipos do tipo lentes de contato. Os resultados apresentaram sensibilidade, faixa linear e tempo de resposta concordantes para o analito estudado e indicaram uma ferramenta promissora para a determinação dos níveis de lactato em lágrima, com limitações experimentais a serem contornadas, como a opacidade do material empregado na construção das lentes para garantir boa condutividade do substrato. [94]

Dentre as técnicas eletroquímicas, a determinação potenciométrica de lactato é uma alternativa interessante para o desenvolvimento de sensores *in situ*, miniaturizados, e que não dependem de atividade enzimática para se obter a resposta eletroquímica. Além disso, o uso de eletrodos seletivo a íons aplicado a esta técnica possibilita o desenvolvimento de sensores de baixo custo, com sensibilidade e seletividade adequados.

1.3 CLORETO E A PARTICULARIDADE PARA O DIAGNÓSTICO DE FIBROSE CÍSTICA

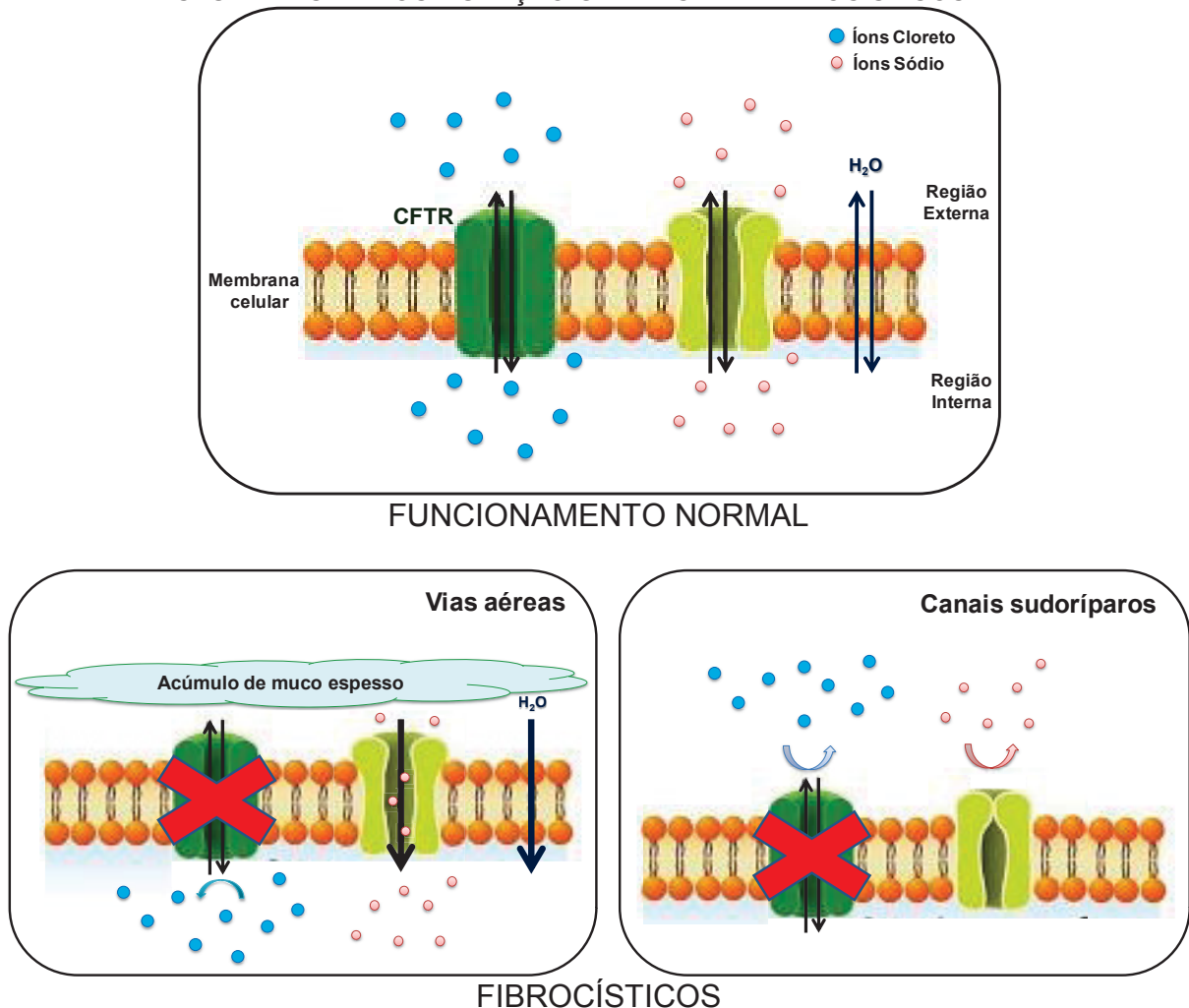
A abordagem científica relacionada aos íons cloreto engloba uma vasta área do conhecimento. O número de publicações consultadas a partir da base de dados do portal Scopus (<https://www.scopus.com>) para os últimos 50 anos é de 31128 utilizando como palavra-chave “*chloride ions*”. Deste número, as publicações na área de Química abrangem 19,8% da totalidade, seguidas das áreas de Bioquímica (16,4%), Ciência dos Materiais (12,5%), Engenharia (10,6%), Medicina (7,7%), dentre outras.

A concentração de íons cloreto é um importante parâmetro para várias aplicações analíticas em diferentes tipos de amostras, desde ambientais, industriais, alimentícias a biológicas. [95-99] Em águas de rios, por exemplo, elevadas concentrações de cloreto podem sinalizar contaminação por resíduos domiciliares ou industriais, o que pode acarretar corrosão em materiais metálicos e também prejudicar o crescimento de plantas, dentre outras consequências. [100-101]

Em especial na aplicação clínica, a concentração de íons cloreto em fluidos biológicos é conferida como um marcador para o diagnóstico de Fibrose Cística (FC). Esta é uma doença hereditária recessiva causada por mutações no gene da

CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), cuja função é codificar esta proteína transmembranar responsável pelo transporte eletrolítico de íons cloreto na membrana de células epiteliais. [102] A interrupção do transporte de cloreto resulta na condução de íons sódio e água para a região interna das células para manter a homeostase, e, por consequência, há acúmulo de um muco espesso em diferentes órgãos, como fígado, pâncreas, intestinos e pulmões, criando-se condições propícias para infecções severas. Além disso, concentrações elevadas de cloreto são encontradas em fluidos corporais como o suor, pela disfunção da CFTR nos canais sudoríparos. [103-105] Na FIGURA 8 está representado um esquema contendo o funcionamento normal da CFTR em células epiteliais e em fibrocísticos, em que mutações no gene geram disfunções no corpo humano.

FIGURA 8 – FUNCIONAMENTO DA PROTEÍNA TRANSMEMBRANAR CFTR EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E APÓS MUTAÇÃO GENÉTICA EM FIBROCÍSTICOS



FONTE: O autor.

A FC não possui cura, mas quando diagnosticada precocemente há um aumento na idade de sobrevivência (média atual de 36,5 anos) e melhora na qualidade de vida dos pacientes, por meio de tratamento medicamentoso e acompanhamento fisioterápico específicos. [106-107] No Brasil, estima-se que a incidência de FC seja de 1:7576 nascidos vivos. No entanto, é possível que este valor seja significativamente maior pelo número elevado de pacientes sem diagnóstico. [108]

Atualmente, o diagnóstico de FC se inicia pela triagem neonatal, por meio do Teste do Pezinho. [109] O teste corresponde a um exame preventivo feito a partir do sangue do recém nascido para diagnosticar doenças graves que não apresentam sintomas ao nascimento. É gratuito em todo território nacional e faz parte do Programa Nacional de Triagem Neonatal, implantado pelo Governo Federal em 2001. [110] A triagem para FC baseia-se na quantificação dos níveis de tripsinogênio imunorreativo em duas dosagens feitas em até 30 dias de vida. O tripsinogênio é uma forma precursora da enzima pancreática tripsina. Frente a duas dosagens positivas, faz-se o teste do suor e o teste de mutação do gene da CFTR para confirmação ou exclusão da doença. [106]

O teste genético é caracterizado pela identificação de pelo menos duas mutações no gene da CFTR. No entanto, há mais de 1000 mutações neste gene que podem causar FC, o que dificulta a confirmação da doença. Além disso, já foram registrados casos de pacientes com FC não-clássica sem evidência das mutações já mapeadas. [106]

O teste do suor é considerado padrão ouro para o diagnóstico de FC. [108-109] A técnica, desenvolvida por Gibson e Cooke (1959), é realizada pela indução de sudorese por iontoforese, que consiste na utilização de dois eletrodos pelos quais se aplica uma baixa corrente elétrica. Um estimulante (nitrato de pilocarpina) é alocado em um dos eletrodos e transportado até as glândulas sudoríparas. [111] A coleta é realizada em um período de 30 minutos, e uma amostra de aproximadamente 15 μL de suor é encaminhada a testes quantitativos para determinação de íons cloreto, dentre os quais métodos colorimétricos e titulação coulométrica são usualmente utilizados. [112] A dosagem de cloreto no suor maior ou igual a 60 mmol L^{-1} em duas amostras coletadas em dias distintos confirma o diagnóstico de FC. [109]

A literatura sinaliza algumas limitações do diagnóstico via teste de suor. Falso-positivos podem ser obtidos pela presença de outras doenças que podem aumentar a concentração de cloreto no suor, além de erros metodológicos e técnicos

como a evaporação e contaminação da amostra, problemas de calibração do equipamento analisador ou erros técnicos humanos. Falso-negativos também já foram observados e estão relacionados à presença de edema, uso de alguns corticóides, coleta e análise de quantidade insuficiente de suor e outros problemas técnicos. [50, 108, 113]

Na direção de propor alternativas, pesquisas realizadas por grupos de variadas áreas vêm sendo desenvolvidas para o diagnóstico de FC. Gonzalo-Ruiz e colaboradores (2009) descreveram uma abordagem para quantificar a concentração de cloreto no suor, por meio de um dispositivo impresso contendo um sensor potenciométrico de cloreto e um eletrodo indicador de Ag/AgCl. Neste dispositivo foi utilizado ainda o método clássico de iontoforese para o estímulo das glândulas sudoríparas por pilocarpina. Foi aplicado em suor sintético e em seis voluntários, cujo resultado foi comparado com o obtido pelo método tradicional de coleta e quantificação, apresentando um erro de 8%. [114]

Mu e colaboradores (2015) desenvolveram um dispositivo colorimétrico em papel para triagem de fibrose cística, realizada diretamente na pele. A detecção colorimétrica foi baseada pela troca iônica entre os íons contidos no suor e os íons hidroxila do papel funcionalizado com dietilaminoetilcelulose. Paralelamente, a região de coleta continha um indicador de papel de pH, cuja mudança de cor resultante da alcalinização foi relacionada com a concentração dos ânions existentes no suor. A coleta foi realizada por iontoforese e com o uso de pilocarpina. No entanto, o dispositivo apresentou baixa seletividade, pela detecção de diferentes ânions contidos no suor sem discriminá-los. [115]

De Matteis e colaboradores (2016) reportaram um dispositivo colorimétrico do tipo “*point-of-care*” baseado no princípio de eletrocromismo, utilizando as propriedades cromogênicas do trióxido de tungstênio para determinar íons sódio presentes no suor, coletado por iontoforese por pilocarpina. Geralmente os íons sódio são confirmatórios aos íons cloreto pelo método tradicional de quantificação. No trabalho, pela aplicação de um potencial ao dispositivo, as propriedades ópticas do óxido foram alteradas como resultado da inserção de cargas negativas e da intercalação de cátions da solução eletrolítica, que correspondeu a suor artificial e também humano. A concentração de íons sódio foi mensurada e comparada de acordo com a escala cromática de filmes obtidos após intercalação de sódio utilizando amostras de suor artificial. Os resultados foram promissores, no entanto

apresentaram leitura incerta para a concentração de 60 mmol L⁻¹, indicando aprimoramento da técnica. [116]

Outros marcadores biológicos vêm sendo amplamente estudados para o diagnóstico de FC. Recentemente, Esteves e colaboradores (2018) realizaram uma abordagem exploratória para estudar um conjunto de marcadores químicos para FC, a partir de um método de coleta não invasivo, sem estímulo de suor, que avaliou espécies presentes na pele de fibrocísticos e de grupos controle. A análise das amostras foi realizada utilizando espectrômetro de massas, em que moléculas distintas foram identificadas como biomarcadoras de FC, e estão associadas a disfunções metabólicas observadas na doença, indicando que o método não-invasivo e sem o estímulo de suor feito pelo método clássico de análise pode ser uma alternativa para triagem e auxílio no diagnóstico. [117]

Além do estudo de diferentes biomarcadores, grandes esforços vêm sendo dedicados utilizando amostras biológicas alternativas para o diagnóstico de FC. Um fluido apontado pela literatura que pode configurar uma ferramenta promissora é a saliva, uma vez que a mutação do gene da CFTR já foi mapeada em glândulas submandibulares, e também devido à sua fácil e não-invasiva acessibilidade, associada à ampla presença de biomarcadores em sua matriz. [118-119] Alguns deles, especialmente proteínas existentes em pacientes com FC, já foram reportados. [120]

Gonçalves e colaboradores (2018) publicaram recentemente um estudo em que é feita a quantificação de íons cloreto e íons sódio em saliva de voluntários fibrocísticos e não-fibrocísticos seguida de uma correlação com os teores desses íons em amostras de suor, utilizando o método coulométrico de titulação para análise quantitativa dos dois fluidos. O estudo apresentou valores similares para a diferença entre a concentração de íons cloreto e concentração de íons de sódio entre pacientes com FC e grupos não-fibrocísticos em relação à saliva e ao suor. [121]

Nesta contextualização, a proposta do trabalho é desenvolver um novo método de quantificação de cloreto, e aplicar em amostras alternativas ao suor. A aplicação de um sensor potenciométrico seletivo a estes íons apresenta vantagens em relação aos métodos existentes, especialmente ao padrão-ouro, minimizando as limitações de resultados falso-positivos ou falso-negativos sinalizados em determinações colorimétricas e coulométricas, e também por minimizar os efeitos das espécies interferentes, uma vez que estes sensores apresentam excelente seletividade. Associada ao novo método, a proposta é de aplicar em amostras

alternativas, como lágrima e suor, em voluntários não-fibrocísticos e fibrocísticos, o que pode contribuir como uma ferramenta de avanços no campo de diagnóstico, pela substituição do método tradicional de coleta por iontoforese em suor, cuja limitação é significativa, conforme reportado.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar sensores potenciométricos seletivos baseados em filmes de polipirrol incorporados com espécies de interesse utilizando eletrodo de grafite para aplicação em amostras biológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os parâmetros de formação dos filmes de polipirrol (concentração do monômero, método de deposição e densidade de carga);
- Caracterizar os filmes formados por técnicas microscópicas – microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica – e espectroscópica – espectroscopia na região do infravermelho;
- Construir um sensor potenciométrico de lactato utilizando eletrodo de grafite e avaliar a resposta de acordo com o tipo e pH do eletrólito, sensibilidade, faixa linear de trabalho, repetibilidade, reprodutibilidade e seletividade;
- Avaliar o sensor de lactato em amostras de sangue de ratos e de lágrima e suor humanos;
- Realizar testes de adição e recuperação de lactato e correlacionar a concentração de lactato obtida em uma das amostras biológicas (teste em lágrima) com concentração em amostras de sangue humano;
- Construir e avaliar um sensor potenciométrico de cloreto de acordo com os parâmetros de otimização similares aos avaliados para o sensor de lactato;
- Avaliar a potencialidade do sensor de cloreto em amostras de lágrima e saliva humanas de voluntários não-fibrocísticos e fibrocísticos;
- Realizar testes de adição e recuperação e correlacionar os resultados obtidos em saliva entre o método proposto e o método coulométrico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Todos os reagentes apresentaram grau analítico e foram utilizados sem purificação prévia (exceto o pirrol, previamente destilado).

As soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (milli Q[®]) com resistividade específica superior a 18 MΩ cm obtida por um sistema purificador de água (EMD Millipore).

3.2 SÍNTESE ELETROQUÍMICA DOS FILMES DE POLIPIRROL

3.2.1 Sistema eletroquímico

O sistema utilizado para as medidas eletroquímicas foi composto de três eletrodos conectados a um potenciostato/galvanostato, marca AUTOLAB[®]. Como contra-eletrodo foi utilizado uma placa de platina de 1,5 cm de largura por 3 cm de comprimento presa a uma haste metálica. O eletrodo de referência foi de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹ como eletrólito). A formação dos filmes foi feita sob eletrodo de trabalho de ITO, cuja área de deposição (1,125 cm²) foi delimitada.

3.2.2 Eletropolimerização e incorporação dos contra-íons

A polimerização do pirrol foi realizada pelo método galvanostático. Foram aplicados diferentes valores de corrente em diferentes tempos de deposição, correspondendo a densidades de carga de 35,6, 120, 245, 356, 360, 504 e 864 mC cm⁻² para otimização dos filmes formados. Paralelamente ao método galvanostático foram feitas medidas pelo método potenciostático (potencial fixo de 0,8 V por 720 s) e potenciodinâmico (entre 0 V e 0,9 V, 10 ciclos, 50 mV s⁻¹). A adição de pirrol a cada solução foi realizada mediante agitação magnética anterior às medidas. O volume fixo utilizado contendo pirrol e a solução composta dos íons de interesse para a incorporação foi de 10 mL, sendo que as concentrações estudadas do pirrol foram de 0,4 mol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹. O contra-íon utilizado para a otimização foi o cloreto.

Para incorporação dos íons cloreto foi utilizada uma solução aquosa de KCl, 0,1 mol L⁻¹. Para a do lactato, 0,1 mol L⁻¹ de ácido láctico, em que o pH foi ajustado a 7,4. Para a do PSS, 1,0 mmol L⁻¹ de NaPSS, cujo valor da concentração foi ajustado principalmente pela elevada massa molar do NaPSS. A densidade de corrente utilizada foi de 1,2 mA cm⁻² e tempo de deposição de 720 s, em solução contendo 0,1 mol L⁻¹ do monômero pirrol.

3.2.3 Caracterização

As propriedades dos filmes depositados foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (*Scanning Electron Microscopy* - FEG/SEM – FEI QUANTA 450). Também foi realizada análise química elementar da superfície da amostra por espectroscopia de energia dispersiva (*Energy Dispersive Spectroscopy* - EDS).

Para a análise de rugosidade e espessura, as amostras foram submetidas à técnica de microscopia de força atômica (*Atomic Force Microscopy* - AFM – Shimadzu SPM 9700), no modo não contato, em frequência de 84 kHz. Foram realizadas imagens da topografia (AFM) e da distribuição das cargas na superfície do eletrodo após a deposição dos filmes (*Kelvin Probe Force Microscopy* – KFM).

A caracterização espectroscópica foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram obtidos a partir de um espectrômetro HARTMAN & BRAUN – BOMEM MB-100 (DQUI/UFPR) com 32 varreduras, resolução de 4 cm⁻¹, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹. As amostras foram preparadas na forma de pastilha por prensagem da amostra sólida dispersa em KBr pulverizado.

3.3 SENSOR POTENCIOMÉTRICO DE LACTATO

3.3.1 Sistema eletroquímico

A formação dos filmes de polipirrol incorporados com íons lactato e a detecção potenciométrica foram realizadas em eletrodo de grafite, de 2,0 mm de diâmetro e de 0,659 cm² de área geométrica delimitada. Anterior a cada conjunto de medidas, o substrato foi previamente lixado.

A determinação de lactato pelo método potenciométrico foi também realizada em um potenciostato/galvanostato, marca AUTOLAB®, utilizando uma célula contendo dois eletrodos: eletrodo de grafite sobre o qual foi depositado um filme de PPI:LAC como eletrodo indicador e eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Para esta etapa, foi construída uma gaiola de Faraday para minimizar os efeitos de interferências eletromagnéticas.

3.3.2 Determinação potenciométrica de lactato

Para este estudo foi desenvolvido um eletrodo de grafite do tipo escolar de 2,0 mm de diâmetro, modificado com um filme de PPI:LAC via eletropolimerização. Os eletrodos foram lixados e sua área foi delimitada em 0,659 cm². O efeito da densidade de corrente de formação dos filmes para este eletrodo foi avaliado entre 0,7 e 2,2 mA cm⁻².

A deposição do filme foi feita em regime galvanostático. A densidade de corrente utilizada foi de 1,2 mA cm⁻² e tempo de deposição de 720 s, em solução contendo 0,1 mol L⁻¹ de pirrol e 0,1 mol L⁻¹ de ácido láctico, com valor de pH ajustado em 7,4. Após as deposições, os filmes formados foram mantidos em solução contendo íons lactato por cerca de 15 h.

A determinação de íons lactato em solução foi realizada pelo método potenciométrico, em que, após a estabilização do potencial, foram feitas adições a partir da solução estoque de lactato pH 7,4 de concentrações entre 1,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ (valores de pLAC: 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0). O eletrólito utilizado após otimização foi KNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0).

Para intensificar o sinal de resposta foram realizados estudos do efeito do eletrólito, para diferentes soluções e diferentes valores de pH para o eletrólito otimizado.

3.3.3 Estudo do eletrólito e efeito do pH

Neste estudo, foram testadas diferentes soluções como eletrólito, em diferentes valores de pH, para a detecção potenciométrica de lactato, conforme apresentado na TABELA 1. A concentração para todas as soluções foi de 0,1 mol L⁻¹ e cada grupo de medidas foi realizado em triplicata.

TABELA 1 – ELETRÓLITOS TESTADOS EM DIFERENTES FAIXAS DE pH

Eletrólito	pH
Tampão Fosfato	5,4
	7,4
Tampão Fosfato + NaCl	7,4
Tampão Acetato	4,5
	6,0
Tampão Sulfato de Amônio	5,5
Nitrato de Potássio	2,0
	3,0
	4,0
	5,0
	6,0
	7,0

FONTE: O autor.

3.3.4 Desempenho analítico do sensor proposto

Para os testes realizados em nitrato de potássio foram feitas medidas de reprodutibilidade e repetibilidade ($n = 5$), e uma curva analítica foi obtida. Para avaliar o desempenho analítico do eletrodo modificado em relação à resposta potenciométrica para os íons lactato, alguns parâmetros experimentais foram obtidos baseados nos valores de sensibilidade (*slope*) e faixa linear de concentração.

O sensor otimizado de PPI:LAC foi submetido a testes para avaliar a influência de alguns potenciais interferentes. Adicionou-se ao sistema potenciométrico $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de lactato, seguidos pela adição de glicose ($2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), ureia ($2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹), ácido ascórbico ($2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) e cloreto ($2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹), seguidos de outra adição de lactato $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

3.3.5 Aplicação em amostras biológicas

3.3.5.1 Lágrima humana

A coleta de lágrima humana foi realizada em 10 participantes, de ambos os sexos. Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa – CEP/UFPR, CAAE número 82693418.7.0000.0102.

A produção de lágrimas foi estimulada utilizando-se vapor de cebola, a coleta feita com auxílio de pipeta de *Pasteur* polimérica e a amostra transferida para tubos tipo *ependorf* para posterior análise. ^[122] Para os testes de determinação de lactato, foram adicionados ao sistema eletroquímico 10 μL de lágrima não diluída em béquer contendo 10 mL de KNO_3 e o sinal de E vs t foi obtido para cada amostra. O valor da variação do potencial foi interpolado na curva analítica e o valor da concentração de lactato na região basal foi obtido.

Dos 10 participantes, em 4 foi coletada maior quantidade de lágrima (cerca de 100 μL) para os testes de adição e recuperação. Neste teste, foram adicionadas à cela potenciométrica (contendo 10 mL de KNO_3) 10 μL de lágrima, seguidos de adição de 10 μL ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) de solução padrão de lactato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e o sinal E vs t foi obtido. Outra medida foi realizada pela adição da amostra fortificada (10 μL de lágrima e 10 μL de solução padrão de lactato) em 10 mL de KNO_3 , e a leitura E vs t foi realizada. A partir dos resultados obtidos pela interpolação do sinal de variação de potencial para a amostra fortificada e não fortificada foi calculada a taxa de recuperação de lactato na amostra.

Em relação aos outros 6 participantes, coletou-se de 10 a 15 μL de lágrima e também uma gota de sangue para correlação dos valores de lactato entre os dois fluidos. As amostras de lágrima foram analisadas para determinação de lactato conforme descrito anteriormente. As amostras de sangue foram analisadas para determinação de lactato sanguíneo em aparelho portátil, marca Roche, modelo Accutrend Plus.

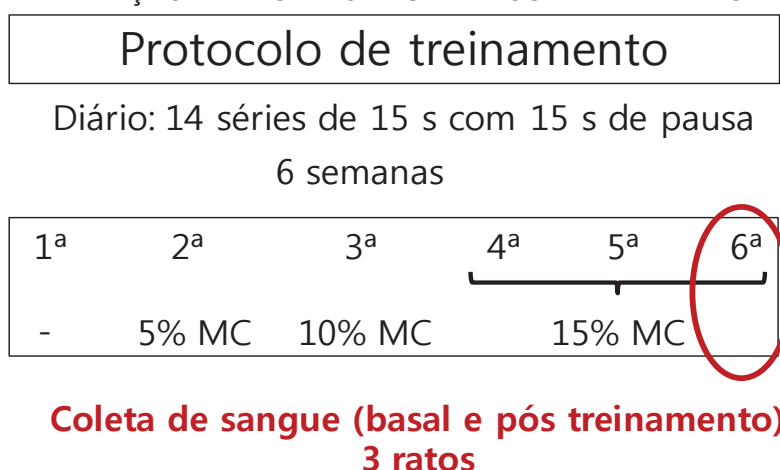
3.3.5.2 Sangue de ratos

As etapas deste trabalho, de condicionamento e coleta de amostra dos ratos, foram realizadas no Departamento de Fisiologia da UFPR, Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardiovascular.

Foram utilizados três ratos machos *Wistar* adultos, mantidos em gaiolas coletivas, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os procedimentos utilizados no estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFPR número 866, e pelo CEUA/UFPR número 971.

Os ratos foram adaptados ao meio líquido ($31 \pm 1^\circ\text{C}$) por três semanas em tanques cilíndricos individuais profundos (120 x 60 cm). A partir da segunda semana de adaptação, os animais suportaram sobrecarga equivalente a 2% do peso corporal (PC), a qual foi presa à cauda de cada rato. O protocolo de treinamento consta na FIGURA 9.

FIGURA 9 – PROTOCOLO DE TREINAMENTO DE NATAÇÃO UTILIZADO EM RATOS PARA DETERMINAÇÃO DE LACTATO BASAL E PÓS-TREINAMENTO



FONTE: O autor.

Os estímulos aplicados durante as sessões de treinamento foram divididos em séries para o desenvolvimento da aptidão aeróbia e anaeróbia. Os treinamentos anaeróbios tiveram esforços intervalados com duração de quinze segundos e pausa de quinze segundos, em uma série de catorze repetições por dia. O protocolo foi realizado em seis semanas, sendo que na primeira semana foi realizado sem incremento de carga no animal, na segunda semana com um incremento de sobrecarga de 5% do PC, terceira semana de 10% do PC, quarta, quinta e sexta semanas de 15% do PC.

Na sexta semana de treinamento foram feitas as coletas de sangue. Para cada rato foram feitas duas coletas, uma na região basal (anterior ao treino) e outra após a sessão das 14 repetições. As amostras sanguíneas (20 μL) foram coletadas por punção caudal em tubos tipo *ependorf* contendo heparina sódica e encaminhadas para análise potenciométrica.

Foram adicionados ao sistema eletroquímico 10 μL de sangue não fracionado em béquer contendo 10 mL de KNO_3 e o sinal de E vs t foi obtido para cada amostra.

3.3.5.3 Suor humano

As etapas de treinamento em esteira ergométrica e coleta de amostra de suor dos atletas foram realizadas no Departamento de Educação Física da UFPR, no Centro de Estudos da Performance Física – CEPEFIS, laboratório voltado à pesquisa na área da Fisiologia do Exercício.

A coleta das amostras foi realizada em três participantes de sexo masculino, de 14 a 19 anos, atletas tenistas. Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa – CEP/UFPR, CAAE número 69743517.6.0000.0102.

Os participantes completaram teste de corrida incremental de esforço máximo em esteira ergométrica, com velocidade inicial de $6,0 \text{ km h}^{-1}$, aumentada em $1,2 \text{ km h}^{-1}$ a cada três minutos até exaustão voluntária (teste de percepção subjetiva ao esforço utilizando escala de Borg de 10 pontos), com trinta segundos de intervalo entre cada estágio. Neste intervalo foram coletadas amostras de sangue e analisadas para determinação de lactato sanguíneo em aparelho portátil, marca Roche, modelo Accutrend Plus. Registrou-se também a frequência cardíaca por meio de frequencímetro acomodado no tórax do participante. Ainda foram coletadas amostras de suor na região basal de lactato e após o término do treinamento, utilizando pipetas de *Pasteur* poliméricas e armazenadas em tubos tipo *ependorf*.

As amostras de suor foram encaminhadas para análise potenciométrica, em que foram adicionados ao sistema eletroquímico $10 \mu\text{L}$ de suor em béquer contendo 10 mL de KNO_3 e o sinal de E vs t foi obtido para cada amostra.

3.4 SENSOR POTENCIOMÉTRICO DE CLORETO

Para a construção do sensor de PPI:Cl e determinação potenciométrica de cloreto foi utilizado o sistema eletroquímico de mesma conformação àquela apresentada no item 3.3.1, em que o eletrodo indicador correspondeu ao eletrodo de grafite, sobre o qual foi depositado um filme de PPI:Cl.

A eletropolimerização dos filmes foi realizada em regime galvanostático de crescimento, com densidade de corrente aplicada de $1,2 \text{ mA cm}^{-2}$ por 720 s , resultando em uma densidade de carga de 864 mC cm^{-2} . A solução continha $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de potássio. Após formação, os filmes foram mantidos em solução contendo íons cloreto por aproximadamente 15 h .

A determinação potenciométrica foi realizada por adições de solução estoque de cloreto de potássio, concentrações entre $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. O eletrólito utilizado foi tampão sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 5,0 após otimização da natureza do eletrólito (nitrato de potássio pH 4,0) e do pH do eletrólito de resposta mais pronunciada ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 2,0 a pH 8,0).

3.4.1 Desempenho analítico do sensor de cloreto

Foram realizados testes de repetibilidade ($n = 6$) e reprodutibilidade ($n = 6$) utilizando o sensor de PPI:Cl em eletrólito $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 5,0.

O sensor otimizado foi submetido a testes para avaliar possíveis interferentes. Foram adicionados ao sistema potenciométrico $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto, seguidos pela adição de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de glicose, $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de lactato, $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ureia, $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de íons sódio, $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de íons potássio e $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de íons cálcio, seguidos de outra adição de cloreto $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

3.4.2 Determinação de cloreto em amostras biológicas

Amostras de lágrima e saliva humana foram coletadas de 10 voluntários de ambos os sexos, idade entre 18 e 72 anos. Dentre os 10 voluntários, 5 deles são diagnosticados com FC. Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa – CEP/UFPR, CAAE número 82693418.7.0000.0102, e a condução da pesquisa com pacientes fibrocísticos aprovada pela Associação Brasileira de Assistência à Mucoviscidose (Fibrose Cística).

A produção de lágrima foi estimulada pelo uso de vapor de cebola, a coleta feita com auxílio de pipeta de *Pasteur* e a amostra transferida para tubos tipo *eppendorf* para posterior análise. ^[122] Para os testes de determinação de cloreto, foram adicionados ao sistema potenciométrico 10 μL de lágrima não diluída em béquer contendo 10 mL de sulfato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 e o sinal de E vs t foi obtido para cada amostra. A concentração de cloreto nas amostras foi quantificada pelo método de interpolação da curva analítica, em que foi obtida a taxa de recuperação de cloreto. Também foi obtida pelo método de adição de padrão, que consistiu na adição de 10 μL da amostra no sistema potenciométrico, seguida

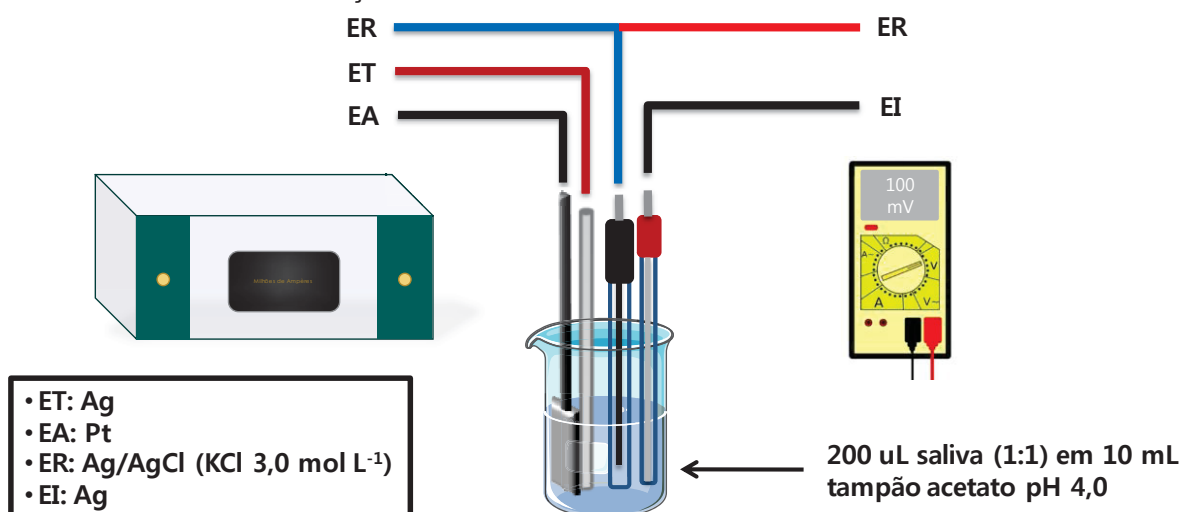
por quatro adições de padrão cloreto nas seguintes concentrações: $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Gráficos de “ $10^{-[(\Delta E-a)/b]}$ ” vs “ C_{cloreto} ” foram obtidos, em que ΔE corresponde à variação de potencial após adição da amostra, “a” e “b” os coeficientes linear e angular da curva obtida pela adição de padrão de cloreto. A extrapolação da reta obtida em $y = 0$ corresponde à concentração de cloreto na amostra.

Para a coleta de saliva, os voluntários foram orientados a realizar higiene oral até meia hora anterior à coleta e a não ingerirem alimento ou bebida, exceto água, até o procedimento. A coleta foi realizada após a lavagem da boca com água por cerca de um minuto para eliminar a contaminação. [121] A produção foi estimulada pela simulação dos movimentos de mastigação e uma quantidade de saliva produzida foi recolhida em frascos para posterior análise.

Para os testes de determinação de cloreto, foram adicionados ao sistema potenciométrico (contendo 10 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0) 200 μL de solução contendo saliva e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em proporção 1:1 e o sinal de E vs t foi obtido para cada amostra. Testes de adição e recuperação pelo método de interpolação da curva analítica foram realizados. A concentração de cloreto também foi calculada pelo método de adição de padrão, em que a adição de 200 μL de amostra foi seguida de adições de padrão cloreto nas concentrações: $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A determinação de cloreto na amostra foi igualmente obtida conforme apresentado para amostras de lágrima.

Uma correlação entre o método proposto e a determinação coulométrica de cloreto foi realizada. Esta consistiu em um sistema contendo 10 mL de tampão acetato $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 e quatro eletrodos: um eletrodo de prata (eletrodo de trabalho) e um de platina (contra eletrodo) compondo a parte coulométrica do sistema; um eletrodo de prata (eletrodo indicador) e um eletrodo de referência de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) compondo a detecção potenciométrica, conforme apresentado na FIGURA 10.

FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA CONSTRUÍDO PARA DETERMINAÇÃO DE CLORETO EM SALIVA PELO MÉTODO COULOMÉTRICO



FONTE: O autor.

Foram adicionados 200 µL de solução contendo a amostra e (NH₄)₂SO₄ (proporção 1:1) e, sob agitação, uma corrente de 4,0 mA foi aplicada à parte coulométrica e corresponde à liberação de íons Ag⁺ à solução os quais formaram AgCl insolúvel a partir dos íons cloreto contidos na amostra. Esta corrente foi aplicada de 5 em 5 segundos e interrompida para estabilização e leitura do potencial mediante multímetro. Após total consumo de íons cloreto e precipitação de AgCl, a sequência de aplicação de corrente resultou em íons Ag⁺ livres na solução, sendo detectados pela parte potenciométrica do sistema, consistindo na região de viragem. Gráficos de “carga” vs “tempo” foram obtidos e a concentração de cloreto foi calculada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A descrição e discussão dos resultados deste trabalho estão subdivididas em três partes principais.

Na primeira parte é abordada a eletropolimerização do pirrol, cujos parâmetros de formação foram avaliados, como o método de deposição e a densidade de carga aplicada para o método utilizado. Nesta parte também constam as caracterizações dos filmes formados por MEV, AFM, KFM e FTIR.

Em uma segunda parte é apresentada a determinação de lactato por medida potenciométrica, em que foram investigados diferentes eletrólitos, o efeito da variação do pH do eletrólito, estudos de repetibilidade e reprodutibilidade, estudo da seletividade do sensor otimizado e aplicação em amostras biológicas (lágrima e suor humanos e sangue de ratos).

A terceira parte refere-se ao desenvolvimento de um sensor potenciométrico de cloreto que, igualmente ao sensor de lactato, foi otimizado de acordo com o tipo e o pH do eletrólito, estudos de repetibilidade e reprodutibilidade e avaliação de potenciais interferentes. A aplicação do sensor foi principalmente voltada como um método alternativo para o diagnóstico de Fibrose Cística, em que foram testadas amostras biológicas (lágrima e saliva) de voluntários não-fibrocísticos e fibrocísticos.

4.1 FORMAÇÃO DOS FILMES DE POLIPIRROL

O estudo da obtenção dos parâmetros de eletropolimerização dos filmes de polipirrol foi realizado nesta etapa do trabalho utilizando o cloreto como contra-íon incorporado à matriz polimérica.

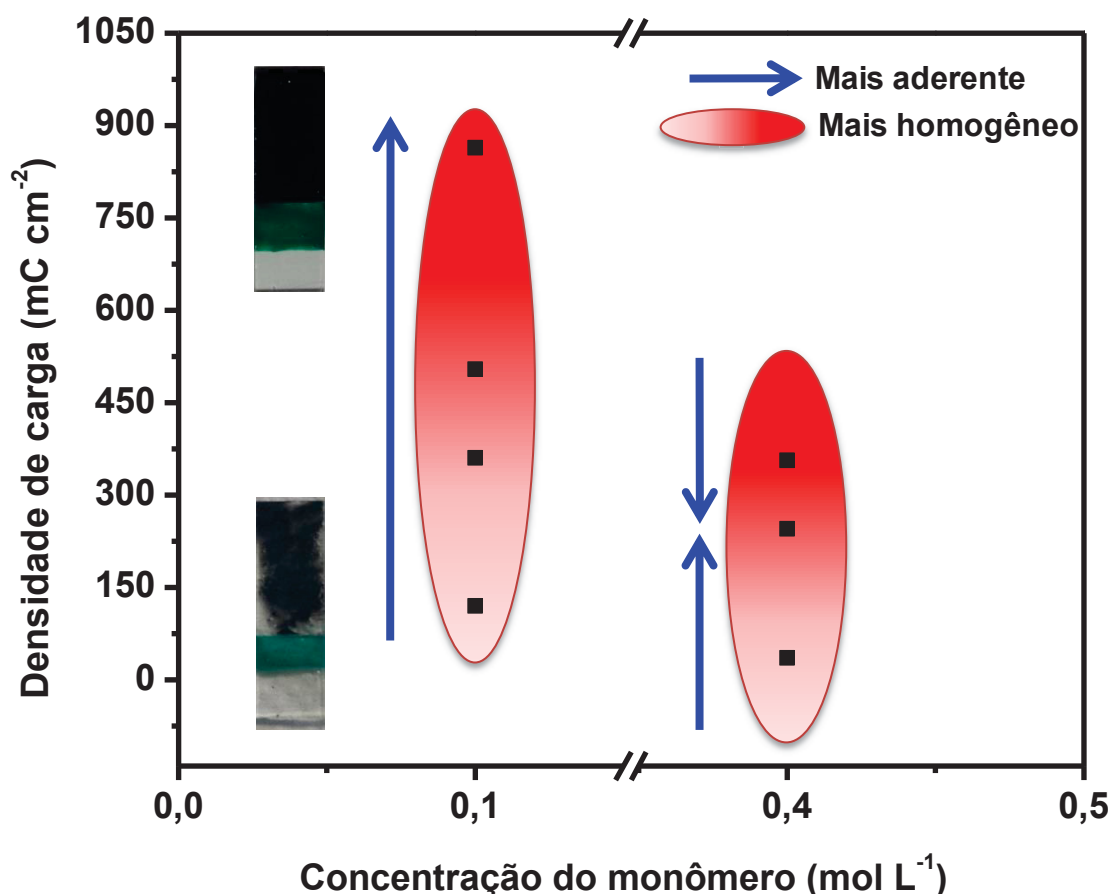
O método de deposição dos filmes foi o galvanostático, amplamente utilizado na construção de sensores eletroquímicos e estrategicamente viável para a finalidade deste trabalho. [22, 42, 60-64, 123] Na formação do filme pelo método galvanostático, uma corrente fixa foi aplicada, resultado na variação do potencial em relação ao tempo. A corrente anódica favorece a inicialização da polimerização, e unidades monoméricas de pirrol são oxidadas formando cátions-radicais, os quais formam dímeros cátion-radicais, mais estáveis em relação aos monômeros e dão sequência ao crescimento da cadeia polimérica pelo acoplamento entre eles e também com os monômeros ainda presentes em solução. Paralelamente, ânions

cloreto são incorporados à matriz polimérica para manter a eletroneutralidade do sistema. [22]

Os parâmetros de otimização para a formação dos filmes de PPI:Cl foram baseados principalmente em relação à aderência do filme ao substrato e à homogeneidade após formação. Ressalta-se que o termo “homogeneidade” está relacionado neste trabalho ao recobrimento uniforme aparente do filme.

Na FIGURA 11 é apresentada uma representação do resumo das condições de formação estudadas.

FIGURA 11 – GRÁFICO DA DENSIDADE DE CARGA VS CONCENTRAÇÃO DO MONÔMERO COMO REPRESENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA FORMAÇÃO DOS FILMES DE PPI:Cl PELO MÉTODO GALVANOSTÁTICO. OS SÍMBOLOS “■” CORRESPONDEM ÀS MEDIDAS REALIZADAS



FONTE: O autor.

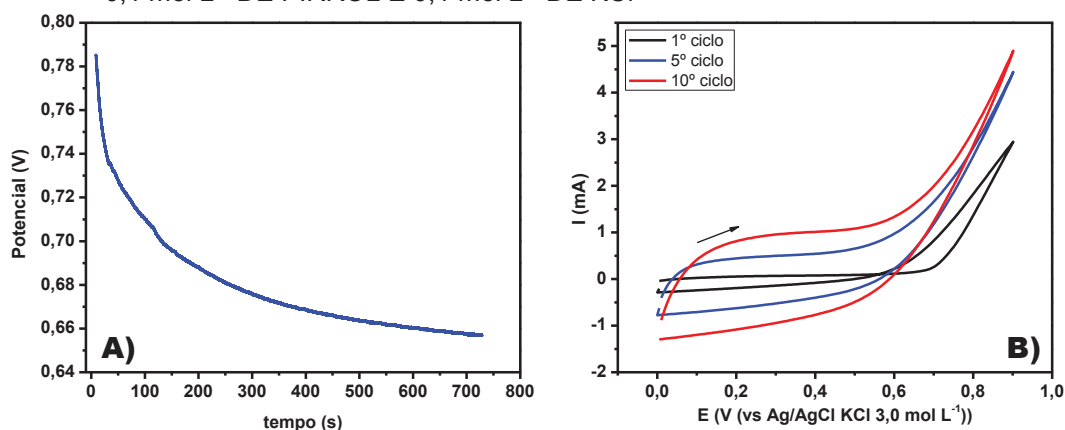
A escolha dos parâmetros iniciais de deposição foi embasada na literatura, em que se utilizou uma concentração de pirrol de 0,4 mol L⁻¹, controle galvanostático de 1,0 mA cm⁻² e 400 mC de carga, correspondendo a um tempo de deposição de 356 segundos. [61] Paralelamente a este experimento foi variada a densidade de

carga, mantendo a concentração do monômero. Foi observado que, para esta concentração, a homogeneidade de deposição do filme aumentou com o aumento da densidade de carga. No entanto, os filmes formados apresentaram baixa aderência para maiores valores de corrente aplicados, possivelmente atribuído ao aumento da espessura e conseqüente rachadura em regiões do filme pelo emprego de solução com alta concentração de monômero.

É relatada também na literatura a formação de filmes de polipirrol utilizando-se uma concentração mais baixa do monômero, de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. [124-125] Os testes subseqüentes foram realizados com esta concentração de pirrol. Verificou-se que o recobrimento na região do eletrodo, bem como a aderência do filme aumentaram com o aumento da corrente aplicada, cuja densidade de carga correspondente a 864 mC cm^{-2} ($i = 1,2 \text{ mA cm}^{-2}$, $t = 720 \text{ s}$) resultou em filmes mais aderentes e mais homogêneos. De acordo com a literatura, uma concentração de pirrol entre $0,1$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ é sustentável para a obtenção de filmes com aplicação para o desenvolvimento de sensores potenciométricos. Os autores reportam também que quando a concentração do monômero for baixa ($< 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), o filme de polipirrol formado é fino, e a resposta em potencial pode não ser linear em função do logaritmo da concentração da espécie analisada. [126]

O comportamento eletroquímico da formação do filme de PPI:Cl pelo método galvanostático está apresentado na FIGURA 12-A. Adicionalmente o filme foi crescido pelo método potenciodinâmico (FIGURA 12-B).

FIGURA 12 – PERFIL ELETROQUÍMICO DURANTE CRESCIMENTO DO FILME DE PPI:Cl PELO MÉTODO GALVANOSTÁTICO E POTENCIODINÂMICO A PARTIR DE SOLUÇÕES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DE PIRROL E $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DE KCl



FONTE: O autor.

LEGENDA: (a) Crescimento galvanostático, $i = 1,2 \text{ mA cm}^{-2}$, 720 s .

(b) Crescimento potenciodinâmico, $E_{\lambda-} = 0 \text{ V}$; $E_{\lambda+} = 0,9 \text{ V}$. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

No regime galvanostático de crescimento (FIGURA 12-A), o valor do potencial varia no decorrer do tempo para a manutenção da corrente constante. De acordo com Shan e colaboradores (1997), o elevado valor de potencial no início do processo está atribuído à nucleação dos oligômeros depositados sobre o substrato. [37, 123] A seqüente queda acentuada do potencial corresponde ao crescimento bidimensional (em largura e comprimento) dos ramos do filme de polipirrol, até se obter um padrão de comprimento dos demais ramos e, após este processo, há uma desaceleração no seu desenvolvimento, até completa formação do filme. O crescimento potenciodinâmico do filme de PPI:Cl (FIGURA 12-B) apresentou voltamogramas característicos, em que a oxidação do pirrol resultando na formação do polipirrol ocorre com incremento de corrente a partir de 0,6 V, e o aumento na área do voltamograma nos ciclos subseqüentes está relacionado ao crescimento camada por camada do filme em cada ciclo. Como resultado, geralmente são obtidos filmes mais compactos e de superfície com menor rugosidade comparada à obtida pelos métodos galvanostático e potencioestático. [42, 125] Além disso, há maior controle das espécies incorporadas à matriz polimérica utilizando estes dois métodos de crescimento em relação ao potenciodinâmico, uma vez que neste último há crescimento camada por camada, o que pode acarretar em diferentes formas oxidativas dos filmes formados de PPI, bem como as espécies incorporadas durante a oxidação podem não ser totalmente reduzidas após a inversão de potencial.

Ressalta-se que o método potencioestático de crescimento também foi testado. No entanto, apresentou aderência muito baixa, em que o filme era removido durante a lavagem do eletrodo pós-formação.

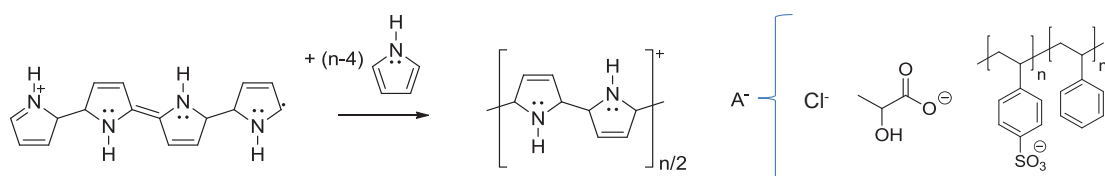
Considerando as características observadas experimentalmente e a finalidade de aplicação (sensores que apresentem robustez e eficiência para detecção das espécies de interesse), optou-se pelo método galvanostático de crescimento para formação dos filmes de polipirrol e incorporação dos contra-íons.

4.1.1 Caracterização dos Filmes de Polipirrol por Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Força Atômica

A caracterização dos filmes de polipirrol foi abordada baseando-se na incorporação de diferentes contra-íons à matriz polimérica (cloreto – PPI:Cl, lactato –

PPI:LAC e poliestireno sulfonato – PPI:PSS), selecionados para comparação de acordo com o tamanho do contra-íon (PSS>LAC>Cl) e o interesse analítico (lactato e cloreto para estudos posteriores), conforme consta na FIGURA 13.

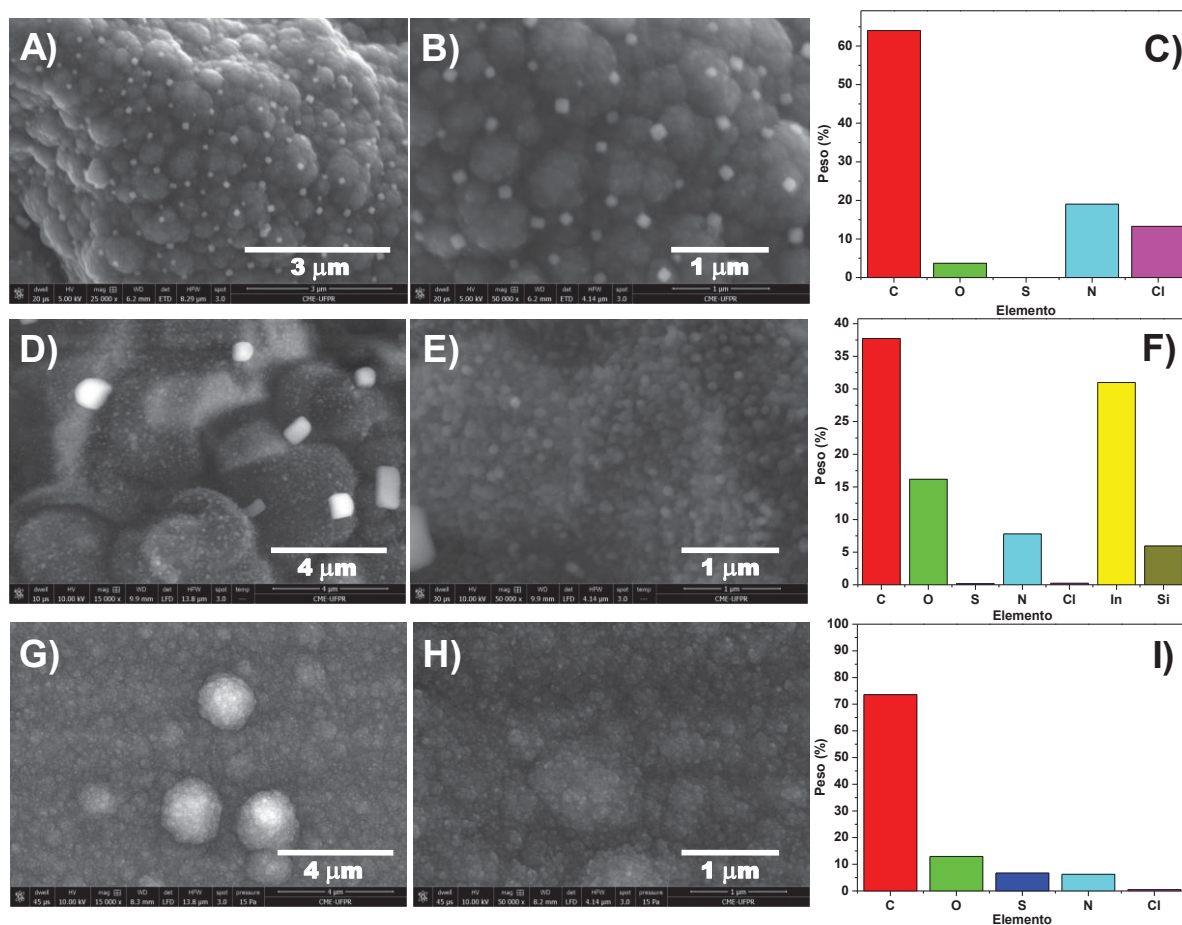
FIGURA 13 – ESTRUTURA DO PPI E CONTRA-ÍONS UTILIZADOS DURANTE A ELETROPOLIMERIZAÇÃO



FONTE: O autor.

Na FIGURA 14 constam os resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e a análise elemental (EDS) de cada filme formado.

FIGURA 14 – IMAGENS DE SEM APÓS CRESCIMENTO GALVANOSTÁTICO DOS FILMES DE POLIPIRROL INCORPORADOS COM DIFERENTES CONTRA-ÍONS.



FONTE: O autor.

LEGENDA: (A, B) PPI:Cl; (D, E) PPI:LAC; (G, H) PPI:PSS. Análise elemental por EDS: (C) PPI:Cl; (F) PPI:LAC; (I) PPI:PSS. Ampliação: (A) 25 kx; (D, G) 15 kx; (B, E, H) 50 kx.

Ressalta-se que a análise elementar (EDS) das estruturas de cor branca em formato semelhante a cubos verificadas na superfície das FIGURAS 14 “A”, “B” e “D” corresponde a íons cloreto e consta no ANEXO 1 (referente ao EDS pontual do filme de PPI:LAC). Para o caso do filme de PPI:LAC, possivelmente as amostras tenham sido contaminadas com cloreto.

De acordo com a FIGURA 14 (“A” e “B”), foi observada a morfologia de um filme denso e globular, em formato de “couve-flor” característico de polímeros condutores. [42, 127-129] Esta estrutura é resultante dos dois mecanismos de crescimento do polipirrol: bidimensional, que ocorre a partir de núcleos oxidados na superfície do eletrodo, e outro crescimento tridimensional, crescidos na direção da solução. [123]

A análise elementar realizada (FIGURA 14-C) indicou os elementos constituintes do polipirrol, bem como do cloreto incorporado.

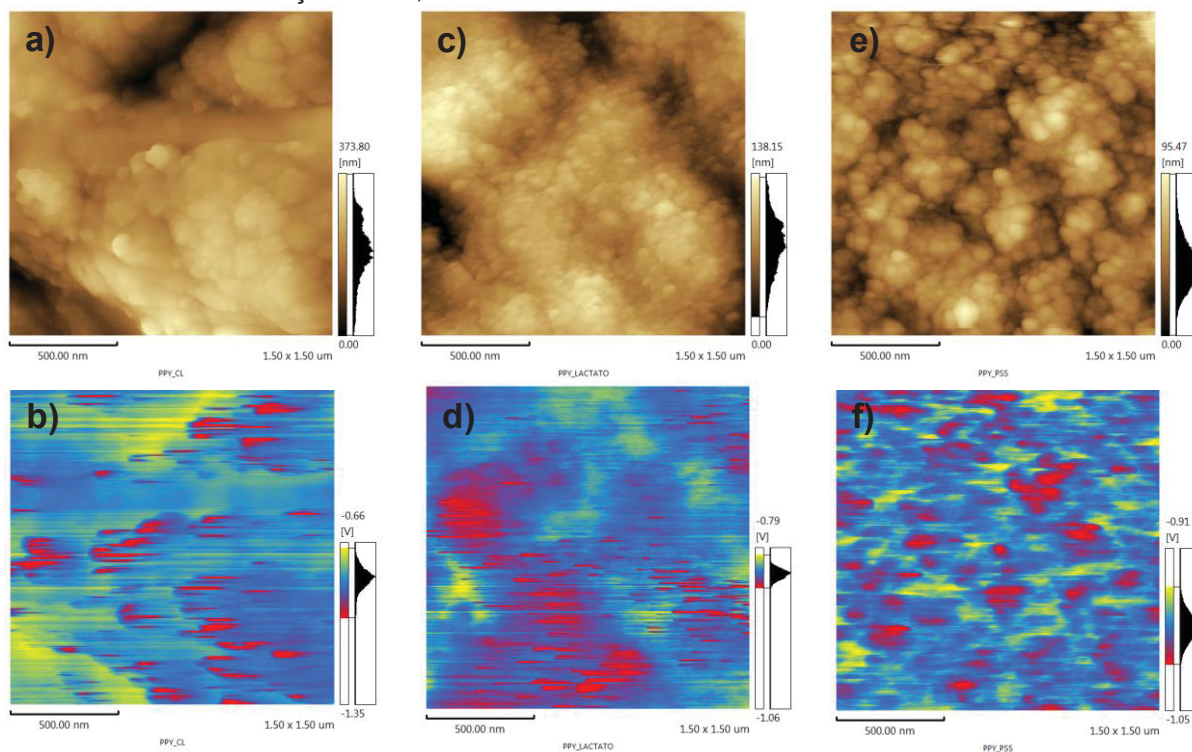
As imagens de microscopia referentes ao filme de PPI:LAC (FIGURA 14-D, E) e PPI:PSS (FIGURA 14-G, H) apresentaram glóbulos de menor magnitude em relação aos do filme de PPI:Cl (os do filme de PPI:PSS menores que os do PPI:LAC), em que não foram visualizados em estrutura com aspecto de “couve-flor” [127-129], indicando que a incorporação de diferentes contra-íons pode alterar a morfologia dos filmes.

Ainda, a análise elementar referente ao filme de PPI:LAC (FIGURA 14-F) indica a incorporação deste ânion na matriz polimérica pela presença em maior quantidade de oxigênio. Verificou-se também presença significativa de índio e silício, elementos presentes no ITO, o que pode estar relacionado à não homogeneidade do filme, podendo conter rachaduras na sua extensão, ou à formação de poros.

Quanto à FIGURA 14-I, o elemento enxofre, presente na estrutura molecular do ânion poliestireno sulfonato, indica também sua incorporação ao polipirrol.

Na FIGURA 15 estão representadas as imagens topográficas (AFM) e das cargas distribuídas (KFM) dos filmes formados com os diferentes íons pelo método galvanostático de crescimento.

FIGURA 15 – IMAGENS DE AFM E KFM DOS FILMES DE POLIPIRROL FORMADOS PELO MÉTODO GALVANOSTÁTICO, DENSIDADE DE CORRENTE DE $0,7 \text{ mA cm}^{-2}$, 720 s, EM SOLUÇÃO DE $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DE PIRROL COM DIFERENTES ELETRÓLITOS



FONTE: O autor.

LEGENDA: (A, C, E) AFM; (B, D, F) KFM; Eletrólitos: (A, B) KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (C, D) Ácido láctico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (E, F) Poliestireno sulfonato de sódio $0,001 \text{ mol L}^{-1}$.

Por meio das imagens topográficas de AFM (FIGURA 15 “a”, “c” e “e”) observou-se a estrutura globular do filme de PPI:Cl (FIGURA 15-a). Para os filmes contendo os ânions lactato (FIGURA 15-c) e poliestireno sulfonato (FIGURA 15-e), verificou-se, em concordância com as imagens de SEM, que há desconformação da estrutura característica dos filmes de polipirrol com o aumento do contra-íon incorporado na matriz polimérica. Este indicativo também é sustentado pela estimativa da rugosidade média (*Roughness average* – R_a) para cada filme, de $64,7 \text{ nm}$ para o PPI:Cl, $20,5 \text{ nm}$ para o PPI:LAC e $10,9 \text{ nm}$ para o PPI:PSS. Silk e colaboradores (1998), em um estudo realizado por AFM do efeito da natureza do contra-íon na formação dos filmes de polipirrol, apontaram que, para casos de contra-íons mais volumosos, a espessura do filme formado pode alterar a estrutura de formato “couve-flor” do polipirrol, uma vez que a altura média dos glóbulos é bastante sensível à espessura. [130]

No processo de eletropolimerização dos filmes de polipirrol, os ânions são incorporados durante a oxidação para garantir a neutralidade do filme polimérico. No

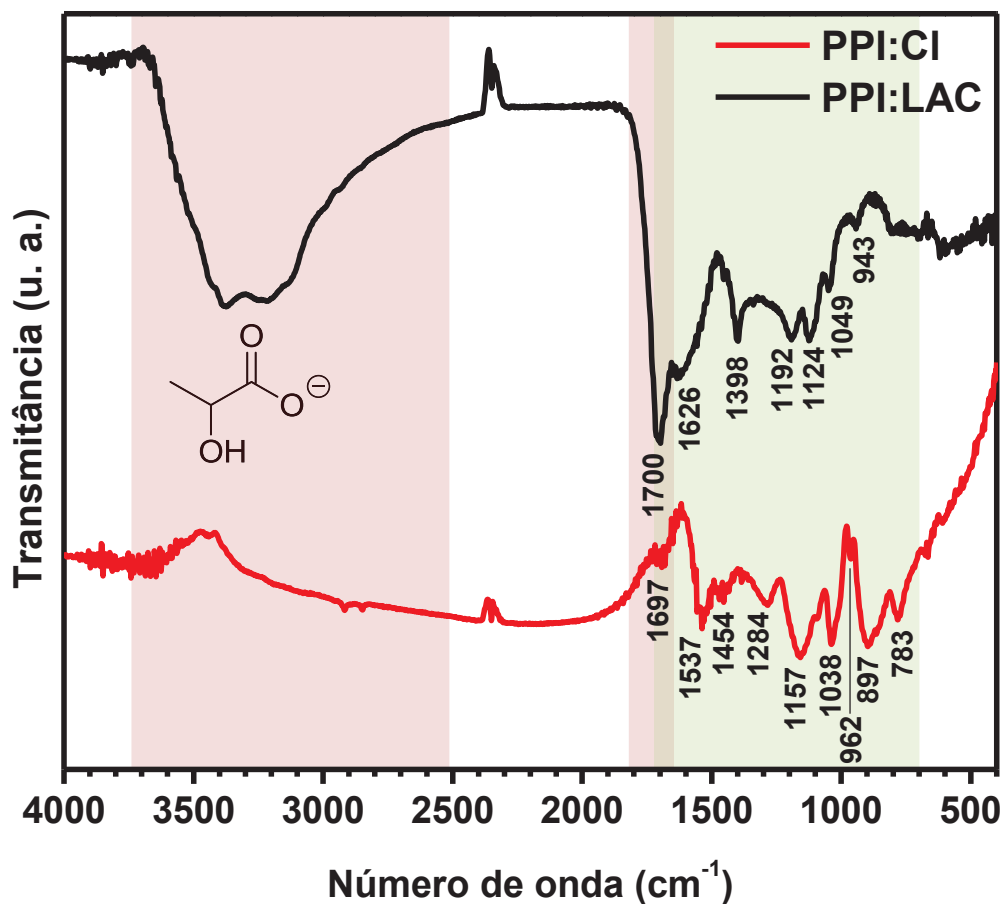
entanto, as cargas positivas e negativas estão distribuídas na matriz polimérica. Pela técnica de KFM, é possível visualizar e avaliar a distribuição das cargas na superfície de materiais e também no interior das moléculas. ^[131] Nesta técnica são medidas forças eletrostáticas atuando sobre o cantilever. A sonda do microscópio atua como um eletrodo de referência, e forma um capacitor com a amostra. Ao varrer a superfície, a aplicação de uma corrente AC (alternada) faz a sonda oscilar, enquanto uma corrente DC (contínua) é aplicada em cada pixel para zerar a defasagem na frequência AC provocada pelo potencial gerado por cargas fixas na amostra. A tensão DC aplicada à sonda iguala o potencial da superfície no ponto adjacente a ela. A imagem é então formada construindo um gráfico de potencial DC aplicado à sonda, e é convertido em um código de cores predefinido para a construção do mapa de potencial elétrico da amostra, com uma resolução espacial de até 10 nm. ^[132]

As imagens de KFM (FIGURA 15 “b”, “d” e “f”) correspondem às mesmas regiões das obtidas pelas imagens topográficas (FIGURA 15 “a”, “c” e “e”). Observou-se que as regiões mais elevadas, ou de pico (cor vermelha), apresentaram as cargas de valor mais negativo, enquanto que as regiões de vale (cor amarela) corresponderam às cargas menos negativas, comportamento observado para os três contra-íons, de diferentes natureza e tamanho. Os resultados obtidos sinalizam que as espécies de interesse – lactato e cloreto para este trabalho – estão dispostas nas regiões mais superficiais da matriz polimérica, indicando um arranjo estrutural favorável para a aplicação como sensor seletivo a íons. ^[131-132]

4.1.2 Caracterização dos Filmes de Polipirrol por Espectroscopia na Região do Infravermelho

Os filmes de PPI:LAC e PPI:Cl, utilizados para determinação das espécies de interesse, foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e os espectros são apresentados na FIGURA 16. As atribuições das regiões específicas constam na TABELA 2.

FIGURA 16 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DE AMOSTRAS DE PPI:LAC E PPI:Cl



FONTE: O autor.

TABELA 2 – ATRIBUIÇÕES DOS GRUPOS FUNCIONAIS REFERENTES ÀS REGIÕES DO ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)
O-H (lactato)	3700-2500
C=O (lactato)	1700
C=C (pirrol)	1697,1626,1537
C-N (pirrol)	1470-1260
C-H	1398, 1124, 943
-C=C	1157
C-CH ₃	1049
C-C fora do plano	962
C-H fora do plano	897, 783

FONTE: O autor.

NOTA: Em rosa constam as regiões referentes à estrutura do lactato e em verde as regiões referentes à estrutura do pirrol.

De acordo com a FIGURA 16, algumas regiões características foram observadas em relação à estrutura do lactato (destacado em rosa) e à estrutura do anel de pirrol (destacado em verde). O espectro de FTIR apresentou uma banda larga referente ao estiramento simétrico da ligação O-H ($3700-2500\text{ cm}^{-1}$). A banda de estiramento C=O foi observada próxima à região de 1700 cm^{-1} . A banda localizada em 1626 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento C=C do anel do pirrol. As bandas próximas a 1398 , 1124 e 943 cm^{-1} são atribuídas às deformações simétricas e às vibrações (*rocking*) da ligação C-H. A banda em 1192 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramento C-N. A banda localizada em 1049 cm^{-1} é identificada como a vibração de estiramento da ligação C-CH₃. [133-135]

Ainda em relação à FIGURA 16, para a amostra de PPI:Cl, o espectro de FTIR apresentou bandas características do anel de pirrol, em que a região de 1537 cm^{-1} corresponde a vibrações de estiramento C=C. A região de 1470 a 1260 cm^{-1} é atribuída à vibração de alongamento C-N no anel. O estiramento da ligação -C=C no anel do pirrol foi identificado na região em torno de 1157 cm^{-1} . As bandas correspondentes à vibração de deformação no plano N-H e C-H estão localizadas em 1038 cm^{-1} . Outras bandas características atribuídas à vibração de deformação do anel fora do plano C-C (962 cm^{-1}) e a vibração de deformação fora do plano C-H (783 e 897 cm^{-1}) foram identificadas. [133]

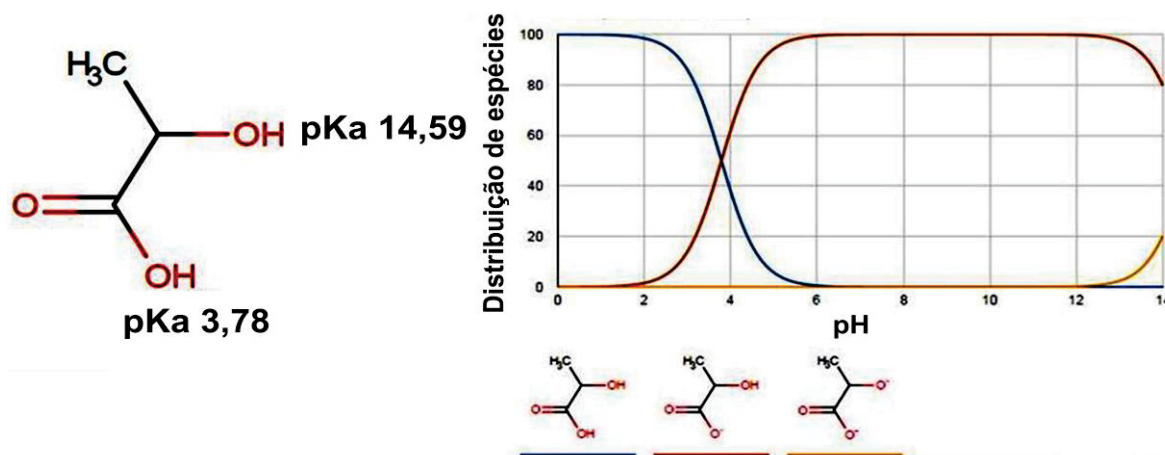
4.2 SENSOR POTENCIOMÉTRICO DE LACTATO

Na determinação potenciométrica de lactato, o eletrodo contendo a espécie de interesse incorporada à matriz polimérica do polipirrol (PPI:LAC), quando em contato com alíquotas de padrão lactato adicionadas em diferentes concentrações, apresenta resposta analítica em um sinal da variação de potencial em relação à concentração de lactato, representada em escala logarítmica.

Para assegurar a desprotonação do ácido láctico, o pH da solução de formação do filme (e posteriormente o da solução padrão para as adições na determinação potenciométrica) foi ajustado em 7,4, que também corresponde ao pH fisiológico. O valor do pKa para a desprotonação do grupo carboxílico do ácido láctico é de 3,78 e, de acordo com o diagrama de espécies (FIGURA 17), a partir do pH 6,0 todas as espécies referentes a este grupo estão desprotonadas. [136] Além do grupo carboxílico, o ácido láctico apresenta uma hidroxila do grupo álcool na cadeia

carbônica. No entanto, o valor do pKa para a desprotonação neste grupo é de 14,59, o que seria inviável para a formação dos íons lactato, pois necessitaria utilizar solução de valores muito elevados de pH.

FIGURA 17 – DIAGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES PARA O SISTEMA ÁCIDO LÁTICO/LACTATO



FONTE: Adaptado de CROUCH *et al.* (2006).

A variação do potencial em função da concentração, no entanto, nem sempre corresponde a valores que abrangem a faixa de concentração utilizada, além de também poder ser pouco reprodutível e de baixa magnitude. Dessa forma, buscou-se estudar diferentes eletrólitos, testes em diferentes substratos e o efeito do pH na resposta potenciométrica.

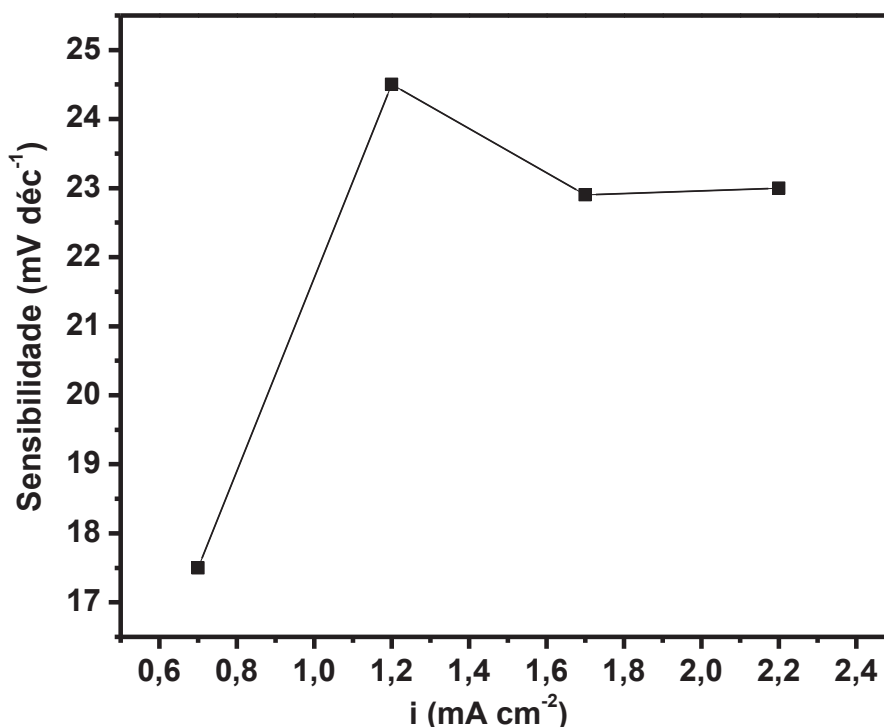
4.2.1 Substrato e Estudo do Eletrólito

O conjunto de experimentos para a otimização dos parâmetros de formação dos filmes de polipirrol foi realizado sobre eletrodo de ITO. Este substrato é frequentemente utilizado para estudo e caracterização dos filmes. Apresenta, no entanto, algumas limitações quanto à aplicabilidade para o desenvolvimento de dispositivos (principalmente em relação à simplicidade e ao custo-efetividade). Para esta finalidade, trabalhos prévios desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do LabSense indicaram os eletrodos de grafite como potencial alternativa na construção de sensores eletroquímicos. Estes eletrodos, de grafite tipo escolar produzidos comercialmente, são de simples manuseio, preparo e adequação aos

sistemas de trabalho e de baixo custo, podendo constituir materiais de uso único. [60-64]

Para confirmação dos parâmetros otimizados da formação dos filmes de PPI:Cl em ITO ao novo sistema proposto (filmes de PPI:LAC em eletrodo de grafite), o efeito da densidade de corrente de formação dos filmes foi avaliado entre 0,7 e 2,2 mA cm⁻². A partir da curva de calibração obtida após adições de solução padrão de lactato em diferentes concentrações foi obtido o valor da sensibilidade (inclinação da reta) para cada filme formado (FIGURA 18).

FIGURA 18 – VARIÇÃO DA SENSIBILIDADE EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DE CORRENTE APLICADA PARA A FORMAÇÃO DO FILME DE PPI:LAC EM ELETRODO DE GRAFITE



FONTE: O autor.

Conforme observado na FIGURA 18, a sensibilidade do eletrodo aumentou com o aumento da densidade de corrente de 0,7 a 1,2 mA cm⁻², seguida de uma ligeira queda após este valor. Este comportamento pode estar atribuído à estrutura do filme de polipirrol formado de forma irregular para altas densidades de corrente, promovendo uma resposta potenciométrica limitada. [137-138] Para valores inferiores a 1,2 mA cm⁻² foi observado que não houve formação do filme na totalidade da área do eletrodo.

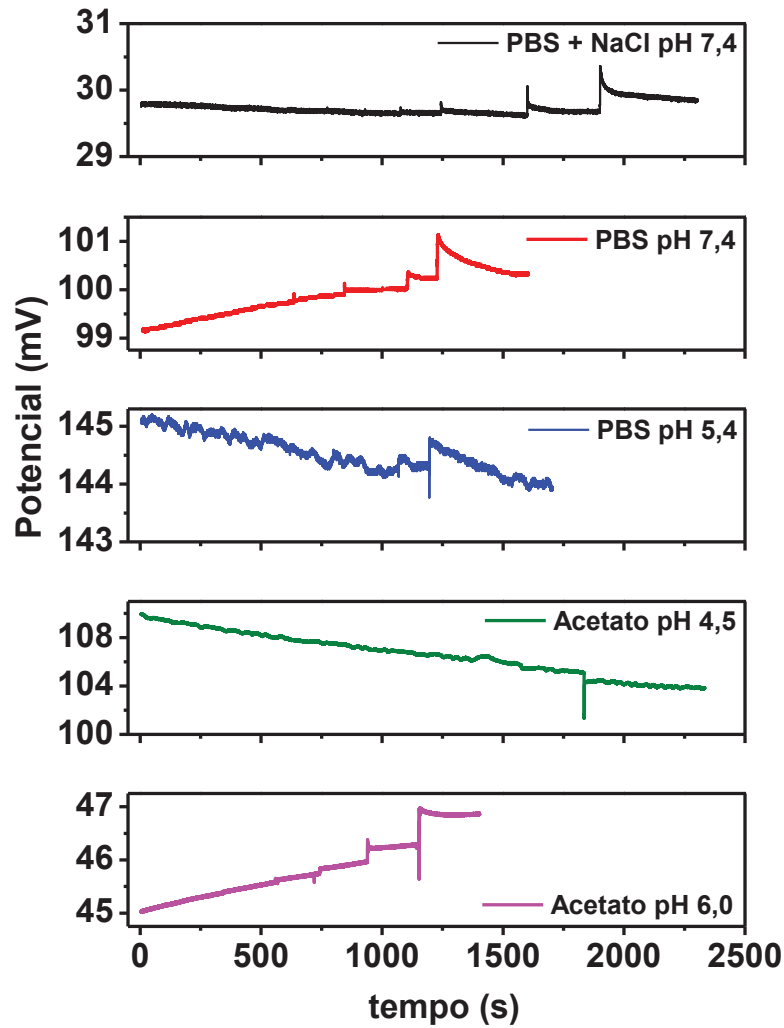
Dessa forma, a maior sensibilidade obtida foi para o filme de PPI:LAC formado com uma densidade de corrente igual a $1,2 \text{ mA cm}^{-2}$, corroborando com os resultados obtidos na etapa de otimização das condições de formação. Este valor foi utilizado para a formação dos filmes no estudo do eletrólito, descrito na sequência, bem como para os demais estudos.

Em potenciometria, o eletrólito está presente em um solvente para promover a condutividade elétrica e assegurar principalmente estabilidade química e eletroquímica no sistema empregado, ou seja, que o eletrólito não reaja com outras espécies presentes em solução. Sais inorgânicos e sistemas tamponantes são amplamente utilizados como eletrólito em solventes aquosos. ^[65] Especialmente para medidas potenciométricas, a escolha do eletrólito foi baseada para respostas analíticas mais pronunciadas e reproduzíveis de lactato após um conjunto de adições de padrão deste analito à solução contendo cada eletrólito.

O estudo foi realizado em solução aquosa. Utilizou-se inicialmente tampão fosfato salino (PBS + NaCl) pH 7,4, solução comumente aplicada para simular meios biológicos. Foram também feitos testes com tampão fosfato (PBS), pH 5,4 e 7,4. Ainda testou-se como eletrólito tampão acetato, pH 4,5 e pH 6,0. Por fim, foram testadas solução tampão de sulfato de amônio pH 5,0 e solução de nitrato de potássio, faixa de pH entre 2,0 e 7,0. Estes eletrólitos são reportados na literatura e a escolha dos valores de pH foi baseada na capacidade característica de tamponamento, para o caso das soluções tampão, e também baseada na região de variação das espécies resultante da primeira desprotonação para o sistema ácido láctico/lactato do diagrama (apresentado anteriormente na FIGURA 17). ^[64-65, 139-140]

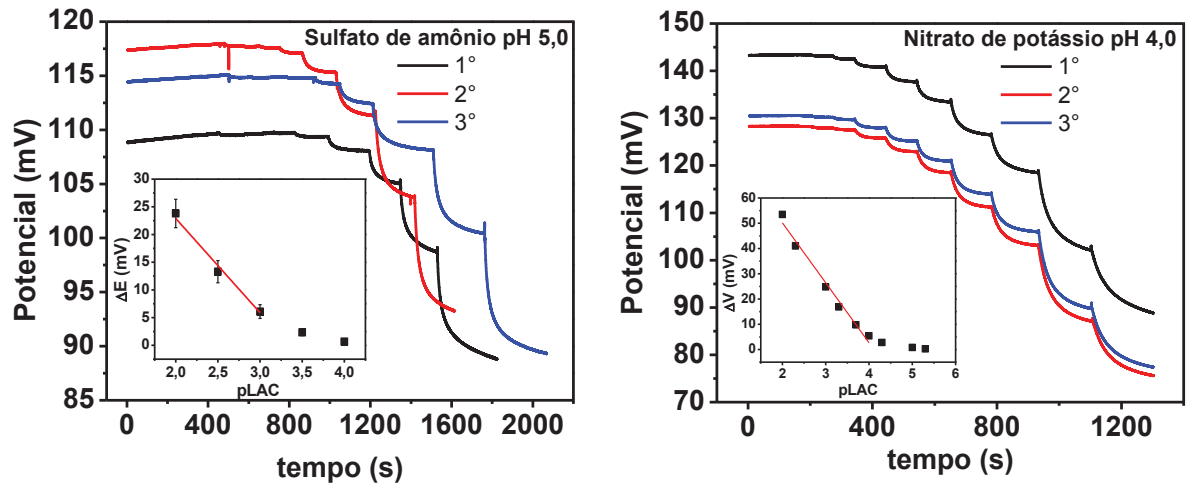
Na FIGURA 19 constam os resultados obtidos da resposta potenciométrica de lactato utilizando diferentes eletrólitos, que apresentaram baixo sinal em resposta de potencial. Os eletrólitos que apresentaram saltos potenciométricos para diferentes concentrações constam na FIGURA 20. Para o eletrólito nitrato de potássio está apresentado o gráfico do pH já otimizado, o que será discutido no item 4.2.2.

FIGURA 19 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA OBTIDA UTILIZANDO SENSOR DE PPI:LAC FORMADO EM DIFERENTES ELETRÓLITOS



FONTE: O autor.

FIGURA 20 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA OBTIDA UTILIZANDO SENSOR DE PPI:LAC FORMADO EM SULFATO DE AMÔNIO E EM NITRATO DE POTÁSSIO



FONTE: O autor.

De acordo com a FIGURA 19, observou-se que para os eletrólitos PBS + NaCl, PBS e acetato houve variação de potencial pouco significativa durante as adições (menor que 2,0 mV). Além disso, foi somente observado sinal para concentrações elevadas adicionadas de padrão lactato, e após grande parte das adições o valor do potencial retornou aos valores da linha base. Foram realizadas triplicatas das medidas apresentadas. No entanto, não houve reprodutibilidade. Por essa razão, constam na FIGURA 19 somente os experimentos em que foram obtidos sinais durante as adições, ou em parte delas.

Em relação ao eletrólito sulfato de amônio (FIGURA 20) foram observados saltos de potencial em uma faixa linear de concentração entre $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Diferente dos demais eletrólitos estudados, a resposta potenciométrica foi significativa. Este comportamento foi também observado no estudo do eletrólito nitrato de potássio. Para além dos resultados obtidos com sulfato de amônio, o sinal das adições em nitrato de potássio apresentou maior magnitude, faixa linear ampla de trabalho ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e maior reprodutibilidade. Dessa forma, utilizou-se este eletrólito para a sequência do estudo do desempenho analítico para o sensor em desenvolvimento.

4.2.2 Efeito da variação do pH do eletrólito

Foram realizadas medidas para determinação de lactato utilizando nitrato de potássio como eletrólito. Nesta configuração, o sensor PPI:LAC apresentou melhor desempenho na resposta potenciométrica, comparado aos demais eletrólitos testados. Por esta razão foi feito estudo do efeito da variação do pH de KNO_3 para cada conjunto de adições de lactato. As medidas foram realizadas em triplicata, em diferentes eletrodos. Na FIGURA 21 está apresentado um resumo dos resultados obtidos.

FIGURA 21 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA E CURVA DE CALIBRAÇÃO APÓS UM CONJUNTO DE ADIÇÕES DE PADRÃO LACTATO UTILIZANDO O SENSOR DE PPI:LAC EM NITRATO DE POTÁSSIO 0,1 mol L⁻¹ EM DIFERENTES VALORES DE pH

continua

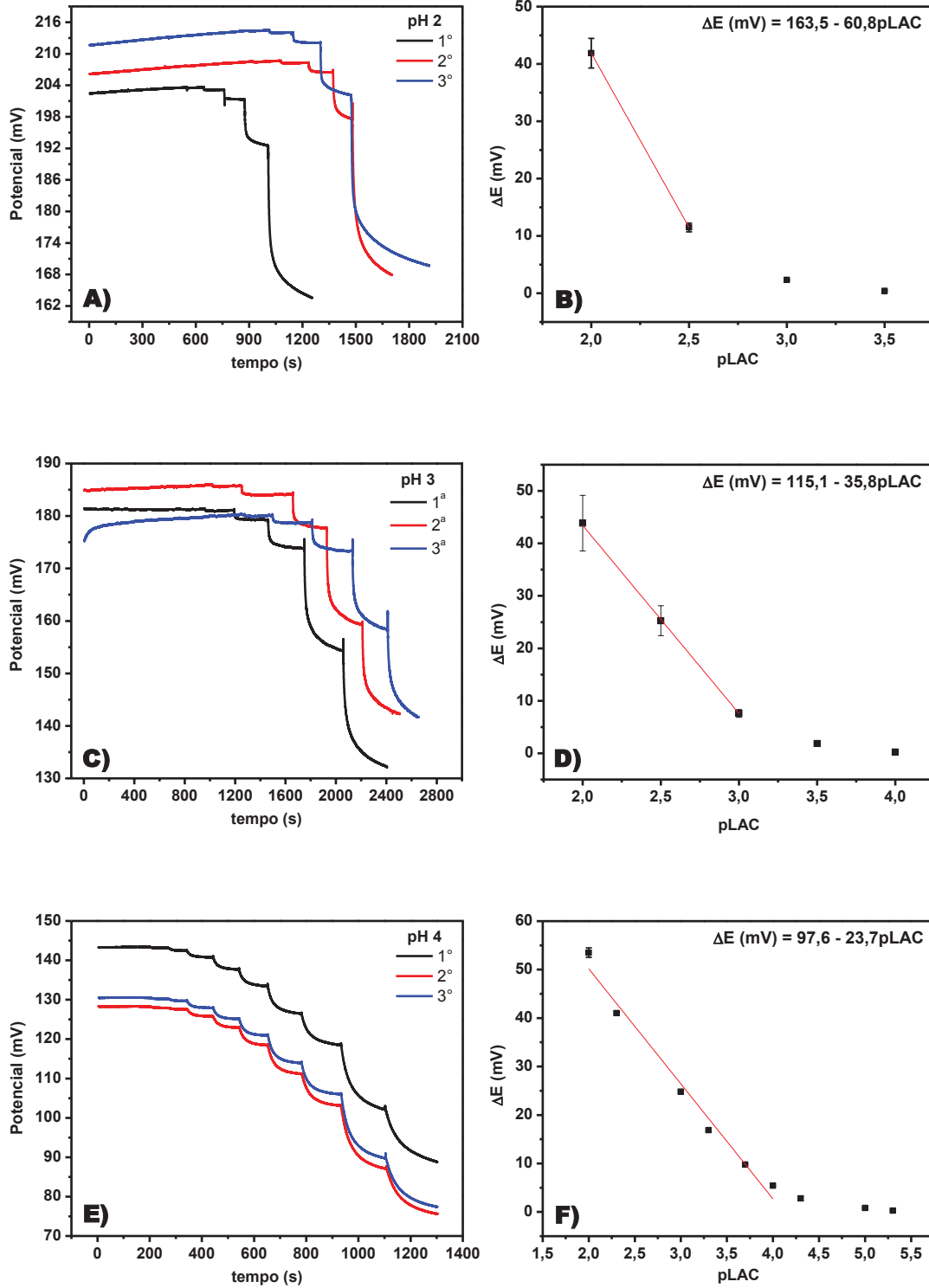
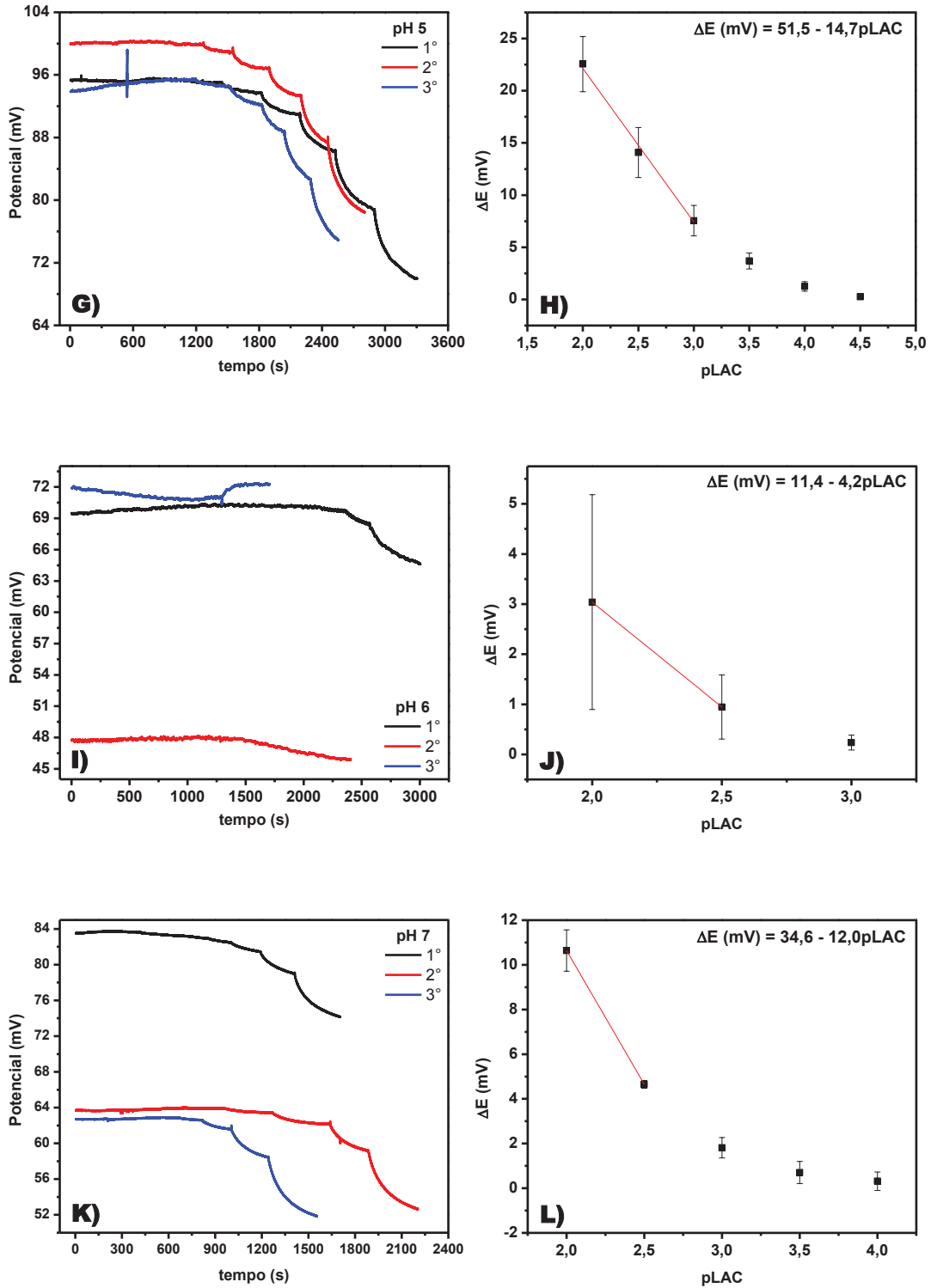


FIGURA 21 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA E CURVA DE CALIBRAÇÃO APÓS UM CONJUNTO DE ADIÇÕES DE PADRÃO LACTATO UTILIZANDO O SENSOR DE PPI:LAC EM NITRATO DE POTÁSSIO 0,1 mol L⁻¹ EM DIFERENTES VALORES DE pH

conclusão



FONTE: O autor.

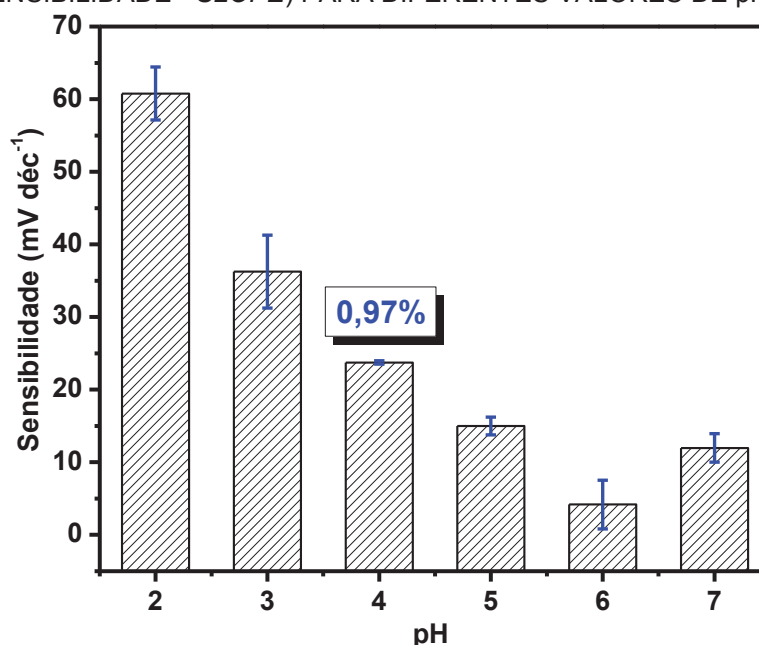
LEGENDA: (A, B) pH 2,0; (C, D) pH 3,0; (E, F) pH 4,0; (G, H) pH 5,0; (I, J) pH 6,0; (K, L) pH 7,0.

Na faixa de pH estudada utilizando o KNO_3 como eletrólito pode-se verificar resposta potenciométrica após as adições de concentrações de lactato na solução. No entanto, conforme observado na FIGURA 21, algumas características são ressaltadas na escolha do valor que apresentou melhor desempenho para o desenvolvimento de um sensor.

Uma delas está relacionada ao sinal de detecção, tendo-se por base o valor de variação de potencial ($\Delta E / \text{mV}$) após a adição de maior concentração ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, ou pLAC igual a 2,0). Verificou-se que, a partir do pH 5,0, a variação de potencial diminuiu para valores até a metade ou menores quando comparados aos valores entre pH 2,0 a 4,0. Sinais de maior magnitude contribuem para uma resposta mais pronunciada. Outra característica refere-se à reprodutibilidade das medidas. Observou-se que, para o pH 6,0, não houve uma tendência no comportamento da resposta potenciométrica após as adições (FIGURA 21-I), além de o desvio padrão dos sinais detectados apresentar valor de até 70,4% (FIGURA 21-J).

A resposta potenciométrica pode também ser avaliada pela obtenção do valor da sensibilidade (inclinação) após a construção da curva analítica, por meio de regressão linear. Na FIGURA 22 constam os valores de sensibilidade obtidos por regressão da região linear para cada triplicata de adições na faixa de pH entre 2,0 e 7,0 .

FIGURA 22 – COMPORTAMENTO DO SENSOR PPI:LAC EM NITRATO DE POTÁSSIO (SENSIBILIDADE - SLOPE) PARA DIFERENTES VALORES DE pH

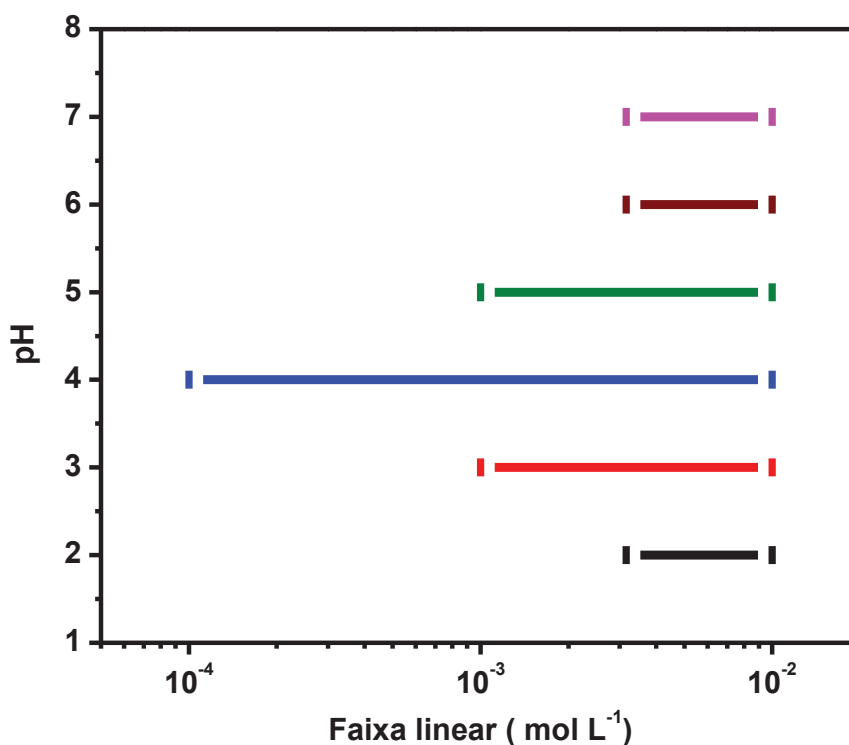


FONTE: O autor.

De acordo com a FIGURA 22, observou-se um declínio dos valores de sensibilidade até o pH 6,0 seguido de um aumento para o pH 7,0. Entretanto, quando comparado aos demais valores obtidos para diferentes faixas de pH, apresentou um desvio padrão relativo menor, de 0,97%. Esta característica é essencial para um sensor eletroquímico e configura a confiabilidade do eletrodo desenvolvido.

Adicionalmente, um importante aspecto para avaliar o desempenho do sensor proposto é a faixa linear de concentração da resposta potenciométrica, pois corresponde à região que pode abranger a concentração do analito em amostras reais. A partir dos resultados obtidos na FIGURA 22 construiu-se um gráfico de pH em função da faixa linear de concentração em escala logarítmica (FIGURA 23).

FIGURA 23 – COMPORTAMENTO DO SENSOR PPI:LAC EM NITRATO DE POTÁSSIO (FAIXA LINEAR ABRANGENTE) PARA DIFERENTES VALORES DE pH



FONTE: O autor.

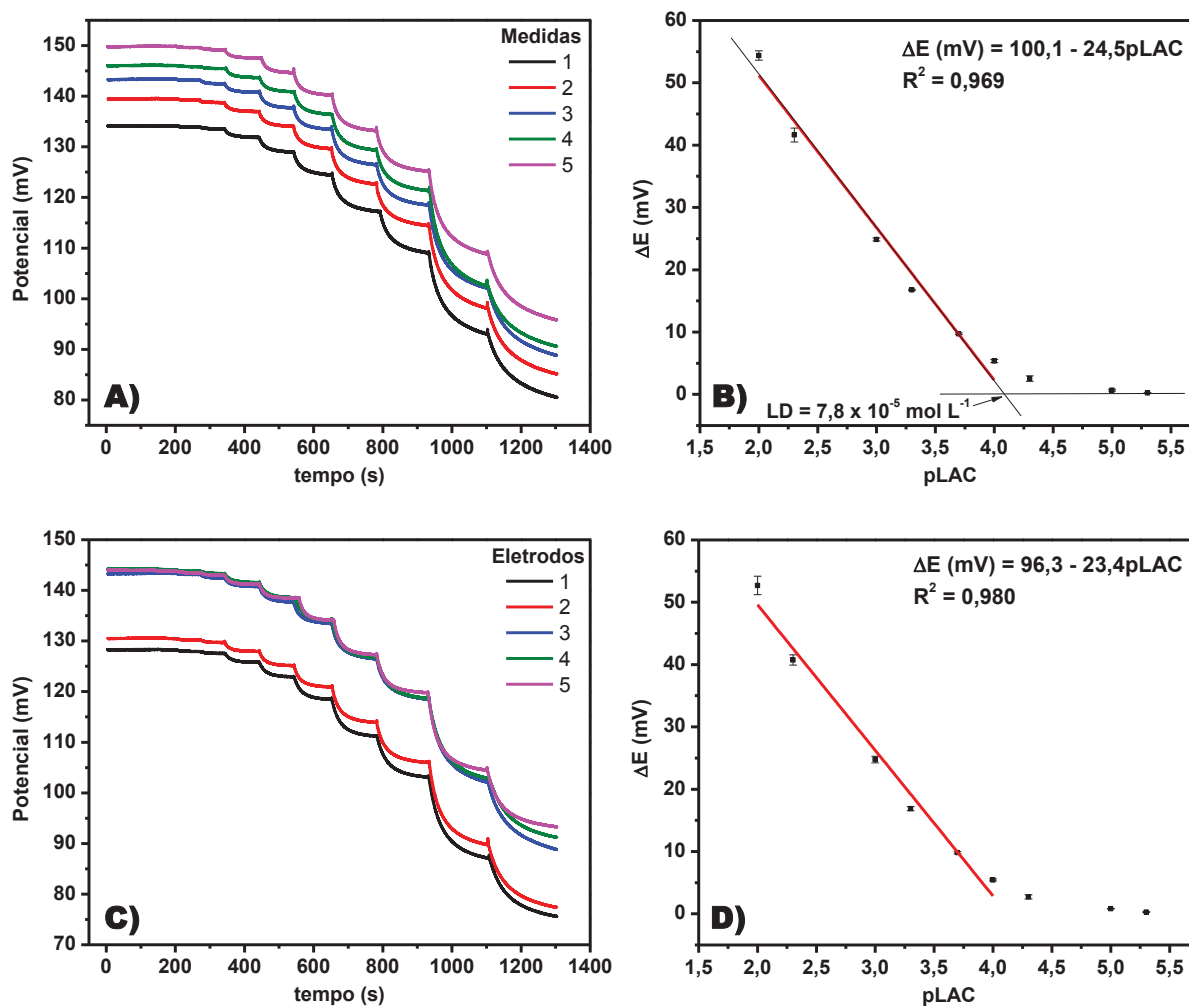
Foi possível verificar que a maior faixa linear de trabalho correspondeu ao eletrólito KNO₃ com valor de pH 4,0, de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ a 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹, expressivamente maior em relação aos demais valores de pH, em especial para baixas concentrações. Este resultado indica que a faixa de concentração pode ser utilizada com um seguro intervalo em amostras de fluidos corporais, uma vez que as

concentrações de lactato em amostras de sangue, lágrima e suor são obtidas na ordem de milimol por litro. [78, 86, 90] Assim, soluções de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ajustadas em pH 4,0 foram utilizadas para a determinação de lactato por meio do sensor de PPI:LAC.

4.2.3 Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade

Para avaliar a repetibilidade da superfície do sensor proposto, um mesmo eletrodo foi utilizado para a obtenção de diferentes curvas analíticas ($n = 5$). Para os testes de reprodutibilidade foram utilizados diferentes eletrodos ($n = 5$) e a partir da resposta potenciométrica foram construídas curvas de calibração. Os resultados estão apresentados na FIGURA 24.

FIGURA 24 – REPETIBILIDADE REPRODUTIBILIDADE DO SENSOR DE PPI:LAC



FONTE: O autor.

LEGENDA: A,C) Resposta potenciométrica; B,D) Curva de calibração.

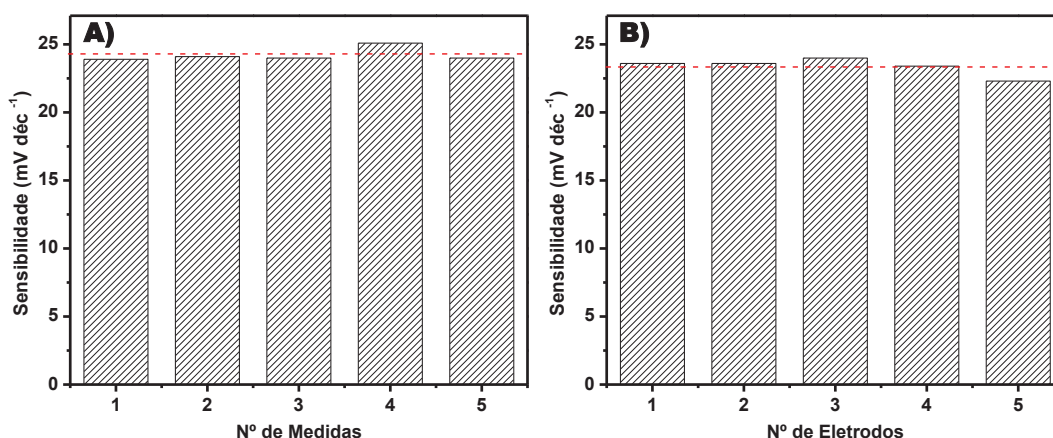
Após otimização das condições operacionais foi obtida uma curva analítica com os resultados da repetibilidade que constam na FIGURA 24-B. A resposta potenciométrica para o eletrodo de PPI:LAC pode ser representada pela Equação 9, que será utilizada posteriormente no estudo em amostras biológicas.

$$\Delta E(\text{mV}) = 100,1 - 24,5p\text{LAC} \quad (9)$$

Conforme Scholz *et al.* (2009), bem como recomendações da IUPAC (1994), o limite de detecção (LD) foi obtido pela extrapolação e intersecção das duas retas apresentadas na FIGURA 24-B, cujo valor foi de $7,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. [71, 141] O sensor apresentou baixo valor de LD, quando comparado aos sensores enzimáticos para determinação de lactato. Um biossensor potenciométrico desenvolvido pela imobilização da enzima lactato oxidase em nanobastões de ZnO (em combinação com glutaraldeído como agente de ligação cruzada para a enzima lactato oxidase) apresentou LD de $1,0 \text{ a } 10,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. [142] O LD obtido para um biossensor amperométrico baseado em copolímero condutor acoplado à enzima lactato oxidase foi de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. [143] Outro biossensor amperométrico construído pela imobilização das enzimas lactato oxidase e lactato desidrogenase em filmes de polianilina apresentou LD de $0,5 \text{ a } 10,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. [144]

A repetibilidade e a reprodutibilidade do sensor foram avaliadas pela obtenção da sensibilidade (inclinação) para cada medida, conforme apresentado na FIGURA 25.

FIGURA 25 – GRÁFICO DE BARRAS OBTIDOS A PARTIR DA SENSIBILIDADE EM FUNÇÃO DA REPETIBILIDADE E DA REPRODUTIBILIDADE



FONTE: O autor.

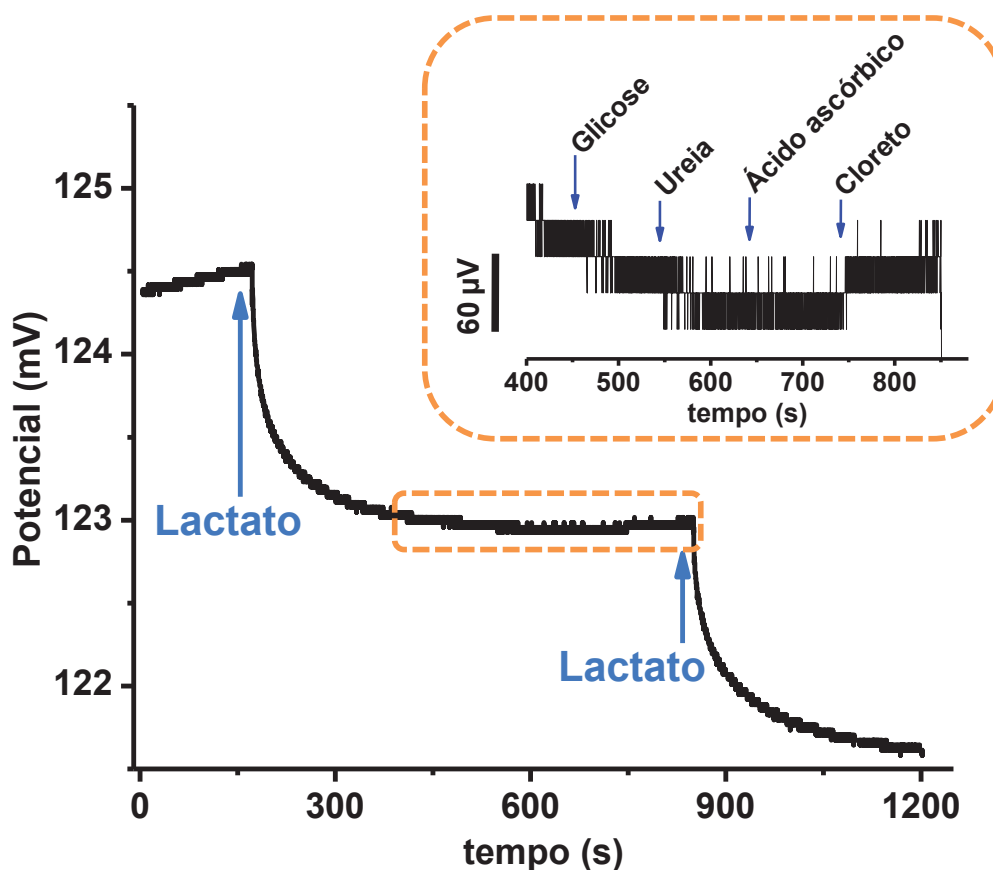
LEGENDA: A) número de medidas (repetibilidade). B) diferentes eletrodos (reprodutibilidade).

Os resultados obtidos em relação à repetibilidade (FIGURA 25-A) apresentaram valor médio da resposta da sensibilidade de $24,2 \pm 0,5 \text{ mV déc}^{-1}$ com desvio padrão relativo de 2,1%. Para os estudos de reprodutibilidade (FIGURA 25-B) os valores foram de $23,4 \pm 0,6 \text{ mV déc}^{-1}$, e desvio padrão relativo de 2,7%, indicando variação pouco significativa na resposta potenciométrica e sinalizando a potencialidade do sensor proposto para a determinação de lactato em amostras biológicas.

4.2.4 Seletividade do sensor proposto

Para que haja uma determinação precisa dos níveis de lactato em fluidos biológicos é necessário que outras espécies presentes não interfiram na resposta. Assim, o sensor otimizado de PPI:LAC foi submetido a testes para avaliar a influência de alguns potenciais interferentes, como glicose, ácido ascórbico, ureia e cloreto, que estão presentes em lágrima, sangue e suor humanos. A faixa normal de concentração de lactato corresponde a 1,0 a 5,0 mmol L^{-1} na lágrima, 0,5 a 2,5 mmol L^{-1} no sangue e um valor médio de 20 mmol L^{-1} no suor, e a proporção dos interferentes em relação ao lactato é similar nos três fluidos. [78, 87, 90-92] Para ajustar ao valor de lactato em relação à curva analítica e em relação aos estudos em lágrima (posteriormente apresentados) partiu-se de uma concentração de lactato de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Assim, a seletividade do sensor de PPI:LAC foi avaliada conforme apresentado na FIGURA 26.

FIGURA 26 – ESTUDO DE POTENCIAIS INTERFERENTES UTILIZANDO ADIÇÃO DE LACTATO $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ INTERCALADO PELA ADIÇÃO DE GLICOSE $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, UREIA $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ÁCIDO ASCÓRBICO $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ E CLORETO $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$



FONTE: O autor.

De acordo com a FIGURA 26, nenhuma alteração significativa foi observada durante a adição dos interferentes, bem como a adição de cada espécie não influenciou na adição subsequente de lactato.

Vale ressaltar que as medidas foram também realizadas adicionando-se lactato em uma concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (maior valor de lactato adicionado na região linear de trabalho) seguida por uma adição de glicose $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O teste não apresentou variação durante a adição de glicose, assegurando não haver interferência mesmo para maiores concentrações.

Este estudo foi repetido duas vezes, nas quais também não se observou alterações durante as adições dos interferentes, indicando que o sensor proposto de PPI:LAC apresenta seletividade analítica.

4.2.5 Análise em amostras biológicas

A versatilidade do modo operacional de um sensor potenciométrico associada à ampla faixa linear de trabalho, confiabilidade entre as medidas, precisão e seletividade constatados durante o processo de otimização do sensor proposto demonstraram a potencialidade de sua aplicação para o desenvolvimento de um dispositivo. Como alternativa aos dispositivos comerciais usualmente utilizados para a determinação dos níveis de lactato, a proposta deste trabalho foi direcionada para o emprego do sensor em dispositivos semelhantes aos do tipo *on-off*, nos quais são produzidos sinais de saída binários, de um sinal lógico “1” (*on*) ou um sinal lógico “0” (*off*). Nesta direção, buscou-se avaliar o desempenho do sensor em diferentes amostras biológicas com o propósito de detectar a variação dos níveis de lactato entre a região basal (anterior ao início do acúmulo de lactato no fluido) e a região de intensidade máxima de esforço (máxima concentração de lactato) a partir da variação do sinal potenciométrico obtido.

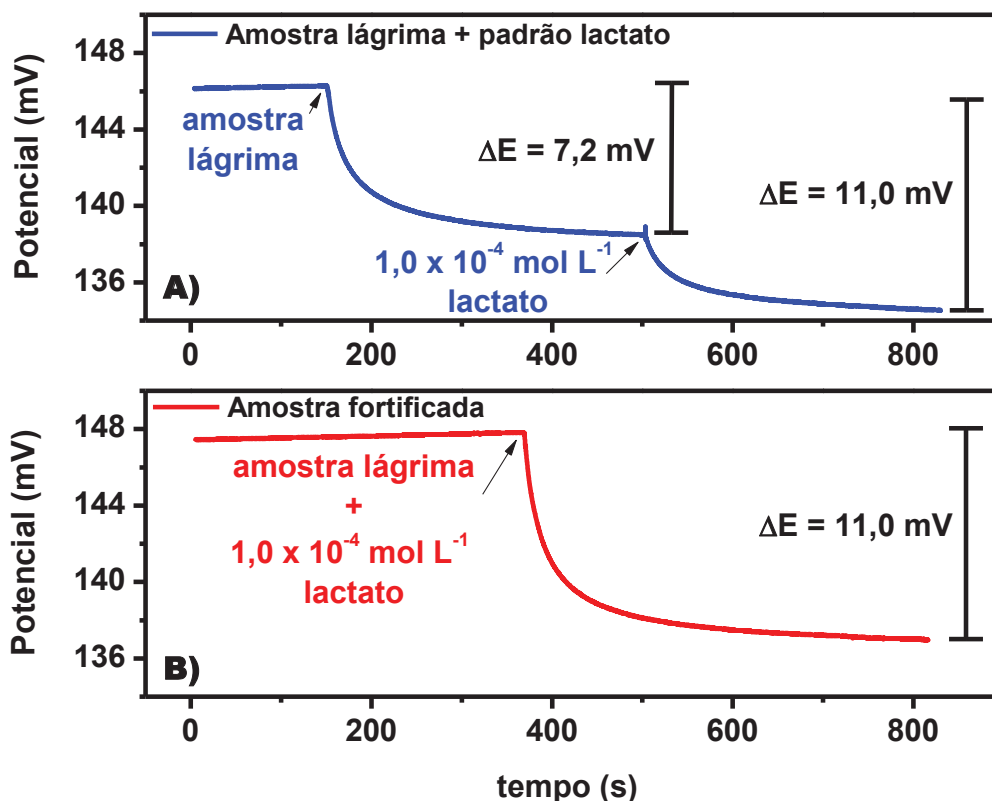
4.2.5.1 Amostras de lágrima humana

O primeiro fluido biológico a ser analisado foi de lágrima humana. Por razão de maior acessibilidade de coleta destas amostras em relação às demais estudadas foi possível analisar com maior detalhamento o desempenho do sensor de PPI:LAC para determinação de níveis de lactato em lágrima na região basal. Os testes para avaliar a variação do sinal potenciométrico em relação à variação dos níveis de lactato entre a região basal e após intensidade máxima de esforço foram realizados utilizando amostras de sangue de ratos e de suor humano, descritos posteriormente.

Após a coleta, uma alíquota da amostra de lágrima foi adicionada ao sistema eletroquímico contendo o sensor de PPI:LAC e o eletrólito KNO_3 pH 4,0. Testes prévios indicaram que a amostra pode ser adicionada diretamente ao eletrólito, sem necessidade de diluição ou outra preparação específica.

Na FIGURA 27 está apresentada a resposta potenciométrica obtida para a adição da amostra de lágrima seguida da adição de uma concentração de solução padrão de lactato e também para a adição da amostra fortificada (amostra de lágrima contendo a concentração da solução padrão de lactato).

FIGURA 27 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA A PARTIR DE AMOSTRA DE LÁGRIMA HUMANA (AMOSTRA SEGUIDA DE ADIÇÃO DE PADRÃO LACTATO E AMOSTRA FORTIFICADA)



FONTE: O autor.

LEGENDA: A) Adição de 100 μL de lágrima diluída em 10 vezes seguida de adição de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (10 μL) de padrão lactato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

B) Adição simultânea de 100 μL de lágrima diluída 10 vezes e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (10 μL) de padrão lactato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Na FIGURA 27-A, a adição de uma alíquota de lágrima resultou em um sinal de potencial de 7,2 mV. Após estabilização do sinal da alíquota de lágrima adicionada anteriormente foi feita uma adição de padrão lactato, e apresentou um sinal com variação de 3,8 mV entre a adição anterior e a estabilização do sinal, resultando em uma variação total de 11,0 mV. Na FIGURA 27-B, as mesmas concentrações de lágrima e padrão lactato foram adicionadas, no entanto em uma única adição, cuja variação resultou em 11,0 mV.

Conforme observado na FIGURA 27 verificou-se que a variação de potencial apresentou o mesmo valor (11,0 mV) para a adição sucessiva (FIGURA 27-A) e simultânea (FIGURA 27-B) de lágrima e padrão lactato. Isto sinalizou que a amostra não apresenta interferências significativas em relação à matriz para a resposta potenciométrica de lactato. Dessa forma, os valores de concentração de lactato na amostra puderam ser obtidos por interpolação da variação de potencial na curva

analítica, sem necessidade de realizar uma curva de adição de padrão para minimizar os efeitos de matriz.

A partir da equação da reta construída pela curva analítica dos testes de repetibilidade (Equação 9) os valores de concentração de lactato foram obtidos para a amostra de lágrima e amostra fortificada:

$$\Delta E(\text{mV})_{\text{amostra}} = 100,1 - 24,5\text{pLAC}_{\text{amostra}}$$

$$7,2 = 100,1 - 24,5 \text{ pLAC}$$

$$\text{pLAC} = 3,79$$

$$C_{\text{lac(amostra)}} = 1,61 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

$$\Delta E(\text{mV})_{\text{fortificada}} = 100,1 - 24,5\text{pLAC}_{\text{fortificada}}$$

$$11,0 = 100,1 - 24,5 \text{ pLAC}$$

$$\text{pLAC} = 3,64$$

$$C_{\text{lac(fortificada)}} = 2,31 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

As medidas foram realizadas utilizando outras três amostras de lágrima e, a partir dos valores de concentração de lactato para a amostra e amostra fortificada, foi calculada a taxa de recuperação de lactato na amostra para avaliar a exatidão do método, que pode ser calculada por:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Camostra fortificada} - \text{Camostra não fortificada}}{\text{Cadicionada}} \times 100 \quad (10)$$

Os valores calculados constam na TABELA 3:

TABELA 3 – TAXA DE RECUPERAÇÃO DE LACTATO EM AMOSTRAS DE LÁGRIMA POR INTERPOLAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

Amostra	ΔE amostra (mV)	Concentração amostra (mmol L ⁻¹)	ΔE fortificada (mV)	Concentração fortificada (mmol L ⁻¹)	Recuperação (%)
1	7,2	161	11,0	231	70
2	8,0	174	12,1	256	82
3	7,2	161	10,7	224	63
4	12,8	273	15,3	346	73

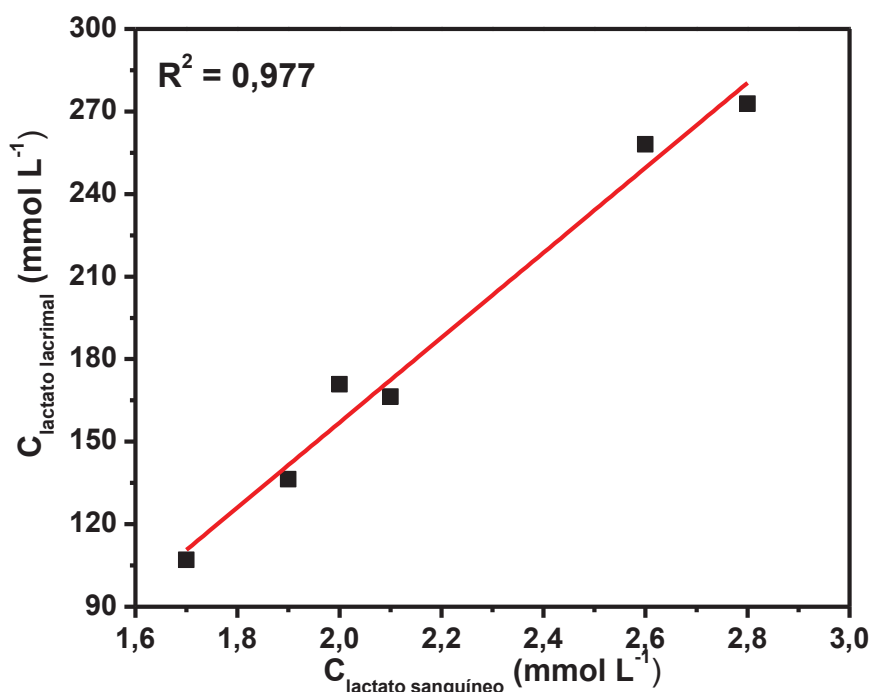
FONTE: O autor.

De acordo com a TABELA 3, o sensor proposto apresentou uma taxa média de recuperação da amostra de 73%. O valor médio da concentração de lactato na região basal foi de $1,92 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Considerando a diluição da amostra ao ser adicionada no eletrólito (10,0 mL), a concentração média de lactato correspondeu a $192,0 \text{ mmol L}^{-1}$, cerca de 100 vezes maior quando comparada à da literatura, que apresenta uma faixa normal de concentração de lactato entre $1,0$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em lágrima humana. [90]

Em medidas potenciométricas, o sinal de resposta em potencial está em função do pLAC, ou seja, em escala logarítmica, e pode causar alguns problemas de precisão. Incertezas muito pequenas medidas no potencial da cela podem resultar em erros de maior amplitude. [65] Algumas incertezas são relatadas por Lewenstam e colaboradores (1991) na aplicação de eletrodos seletivos a íons em amostras biológicas, como as atribuídas ao sinal de resposta em função do logaritmo da atividade do analito (e não da concentração). Ao sinal resultante podem ser somados valores da atividade de outras espécies eletroativas presentes, que podem interferir na resposta. Uma vez que a composição de amostras biológicas é complexa e desconhecida exatamente, os coeficientes de atividade de íons individuais não são conhecidos com precisão suficiente. Outras incertezas são apontadas, como alterações no potencial de junção líquida do eletrodo de referência causadas por adsorção de espécies contidas na amostra durante a adição. [145]

A fim de determinar um fator de correção para as concentrações de lactato em lágrima obtidas pelo método proposto, foi realizada uma correlação com o lactato sanguíneo dos participantes utilizando um medidor portátil de lactato (método comparativo) (FIGURA 28). Este experimento foi realizado a partir da coleta de lágrima e sangue de 6 voluntários.

FIGURA 28 – GRÁFICO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE LACTATO EM AMOSTRAS DE LÁGRIMA E DE SANGUE HUMANO



FONTE: O autor.

Conforme observado na FIGURA 28, foi obtida uma boa relação linear seguindo a equação

$$C_{\text{lactato lacrimal}} (\text{mmol L}^{-1}) = -151,8 + 154,4 C_{\text{lactato sanguíneo}} (\text{mmol L}^{-1}) \quad (11)$$

com um valor de R^2 de 0,977. Considerando que os valores médios da concentração normal de lactato na lágrima e no sangue são $3,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ respectivamente ($C_{\text{lactato sanguíneo}} = 2,5 \times C_{\text{lactato lacrimal}}$), assume-se que a equação pode ser ajustada para $C_{\text{lactato lacrimal medido}} (\text{mmol L}^{-1}) = -151,8 + (154,4 / 2,5) C_{\text{lactato lacrimal real}} (\text{mmol L}^{-1})$.^[87, 90] Portanto, o valor ajustado da concentração de lactato para a amostra de lágrimas apresentados na FIGURA 27 foi de $6,99 \text{ mmol L}^{-1}$.

Entende-se que, mesmo havendo eventuais erros presentes na resposta de lactato obtida na região basal, estes possivelmente estarão também acrescentados à resposta de lactato após intensidade máxima de esforço, mantendo a proporcionalidade entre os sinais, o que confere o propósito deste trabalho.

Nesta direção, buscou-se estudar a variação de lactato para duas situações: em amostras de sangue de ratos submetidos a treinamentos intervalados em tanques de água e em amostras de suor de atletas durante atividade intervalada realizada em esteira ergométrica.

4.2.5.2 Amostras de sangue animal e de suor humano

Para avaliar o desempenho do sensor de PPI:LAC na determinação dos níveis de lactato entre a região basal e após intensidade máxima de esforço foram realizados testes iniciais em ratos, os quais foram submetidos a protocolos de treinamento, e a coleta de sangue foi feita anterior ao início do protocolo (região basal) e após atividade máxima de esforço.

Foram realizados testes prévios em amostras de plasma sanguíneo e em sangue não fracionado. Como a variação de potencial foi igual para as duas amostras, indicando que ambas apresentam a mesma concentração de lactato, optou-se por trabalhar com sangue não fracionado, uma vez que uma pequena quantidade de amostra é coletada pela cauda, sem necessidade de sacrifício do animal. Utilizou-se heparina sódica como anticoagulante adicionado ao sangue, a

qual, de acordo com a literatura em comparação a outras composições, é adequada por não interferir na resposta de concentração de lactato no sangue. [146]

Vale ressaltar que as coletas foram realizadas na última semana de treinamento pois, de acordo com a literatura, a concentração de lactato no sangue aumenta exponencialmente com a intensidade do exercício e também com o condicionamento. Exercícios periódicos e que apresentam um incremento de carga progressivo em relação ao peso corporal resultam em maior indução de hiperlactemia. [147]

Na FIGURA 29 estão apresentados os resultados obtidos da resposta potenciométrica da variação de lactato sanguíneo em ratos entre a região basal e após atividade máxima.

FIGURA 29 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA A PARTIR DE AMOSTRA DE SANGUE DE RATOS NA REGIÃO BASAL E APÓS TREINAMENTO

continua

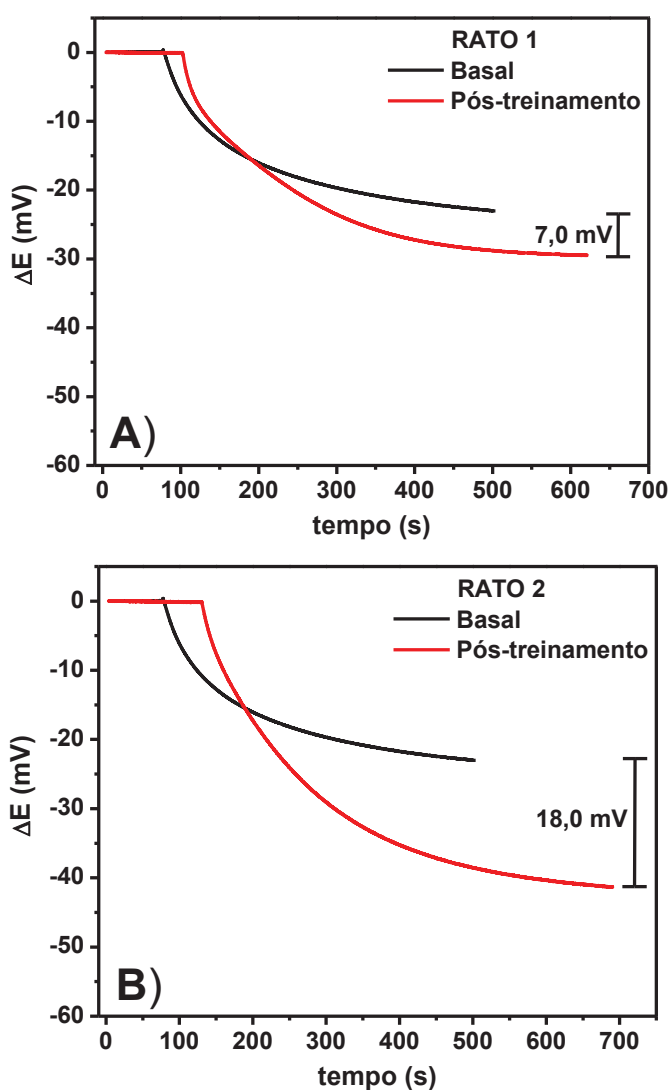
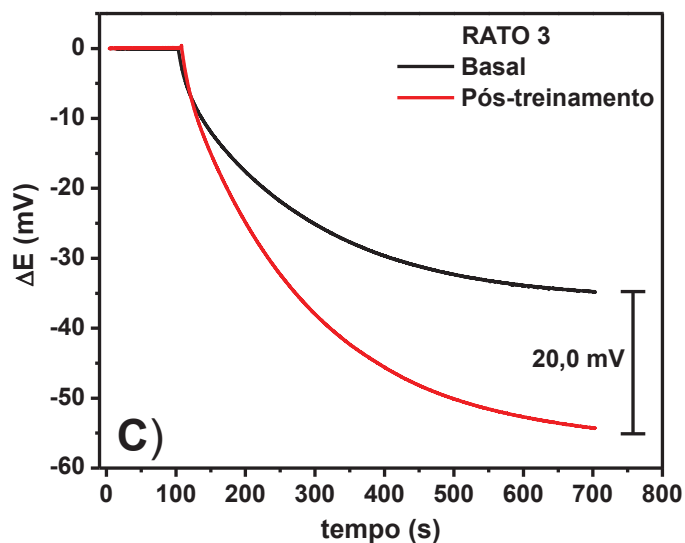


FIGURA 29 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA A PARTIR DE AMOSTRA DE SANGUE DE RATOS NA REGIÃO BASAL E APÓS TREINAMENTO

conclusão

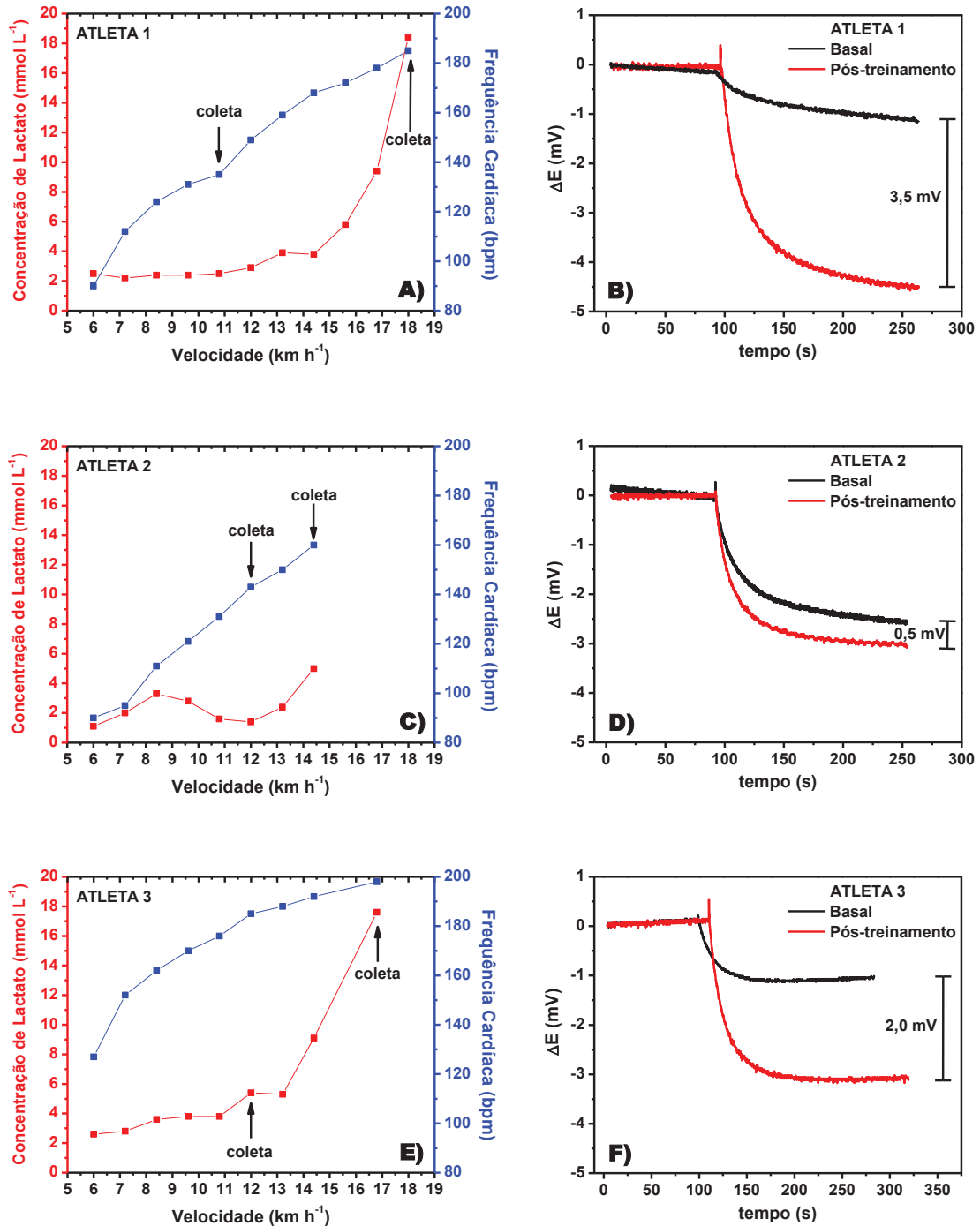


FONTE: O autor.

Conforme observado, houve um incremento de potencial significativo para os três ratos estudados, da região basal para a de pós-treino. Observou-se também que este incremento foi menor para o “rato 1” (FIGURA 29-A) comparado aos demais. O sistema fisiológico, bem como as respostas ao exercício de animais em programas de treinamento são semelhantes aos encontrados em seres humanos. Da mesma forma que para humanos, a resposta ao estímulo não é igual para todos os ratos. A adaptação ocorre de acordo com a particularidade fisiológica de cada animal. Possivelmente o “rato 1” produziu menor quantidade de lactato por ter obtido maior condicionamento físico em relação aos demais, realizando menos esforço para obter o mesmo resultado no final do treinamento. [148-149]

Este comportamento foi também observado após avaliação em suor e sangue de humanos, submetidos a treinamento intervalado em esteira ergométrica. Na FIGURA 30 estão apresentados os resultados obtidos da resposta potenciométrica de lactato em amostras de suor utilizando o sensor desenvolvido de PPI:LAC. Constam também os valores de lactato obtidos de sangue por medidor portátil e a frequência cardíaca registrada em cada intervalo de exercício dos atletas.

FIGURA 30 – GRÁFICO DE CONCENTRAÇÃO DE LACTATO E FREQUÊNCIA CARDÍACA vs VELOCIDADE DA ESTEIRA CONTENDO A REGIÃO DE COLETA (A, B, C). RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA A PARTIR DE AMOSTRA DE SUOR HUMANO NA REGIÃO BASAL E APÓS TREINAMENTO (D, E, F)



FONTE: O autor.

De acordo com a FIGURA 30 (D, E, F) verificou-se um incremento de potencial para os três atletas, da região basal para a de pós-treinamento. Observou-se, no entanto, incremento de menor magnitude comparado aos valores obtidos a

partir de sangue animal. Experimentalmente a coleta de suor durante atividade em esteira apresenta uma limitação. As alíquotas coletadas no término continham resíduos de suor eliminados ao longo do treinamento, o que pode ter interferido na resposta máxima de lactato.

Ainda em relação à FIGURA 30 (A, B, C), observou-se um aumento nas concentrações de lactato para os três atletas a partir da avaliação sanguínea com o incremento de velocidade na esteira. Acompanhado à produção de lactato ocorreu o aumento da frequência cardíaca (e aumento da atividade respiratória), que é resultante da necessidade de condução do oxigênio aos músculos em atividade e remoção de gás carbônico para manter a homeostase do pH sanguíneo. Os músculos, quando contraem com maior intensidade, comprimem as veias do corpo provocando o aumento da velocidade de chegada do sangue ao coração, sendo este bombeado mais vigorosamente, aumentando a frequência cardíaca. [85]

Igualmente para o caso de estudo em animais, o incremento de potencial em suor humano variou para os três atletas, na ordem: atleta 1 > atleta 3 > atleta 2. Em confirmação, esta ordem foi também verificada para os valores máximos de lactato sanguíneo: $18,4 \text{ mmol L}^{-1}$ (atleta 1) > $17,6 \text{ mmol L}^{-1}$ (atleta 3) > $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (atleta 2).

O atleta 2 apresentou menor variação e menor índice de lactato. O término do treinamento ocorre quando o atleta informa que atingiu sua capacidade máxima de esforço. Isto se dá por meio de uma escala de 1 a 10 (Escala de Borg), em que 10 equivale ao esforço máximo. [150] Esta escala é subjetiva, e o atleta 2 possivelmente não produziu a quantidade máxima de lactato.

A curva de lactato durante o exercício está intimamente relacionada com o condicionamento físico do atleta. Quanto melhor o condicionamento, mais deslocada para a direita é a curva. Os resultados em lactato sanguíneo sugerem que o atleta 1 apresenta melhor desempenho físico, seguido dos atletas 3 e 2. Os resultados obtidos utilizando o sensor desenvolvido de PPI:LAC em suor pelo incremento de potencial confirmaram essa tendência, indicando um método alternativo e potencial para o desenvolvimento de dispositivos.

4.3 SENSOR POTENCIOMÉTRICO DE CLORETO

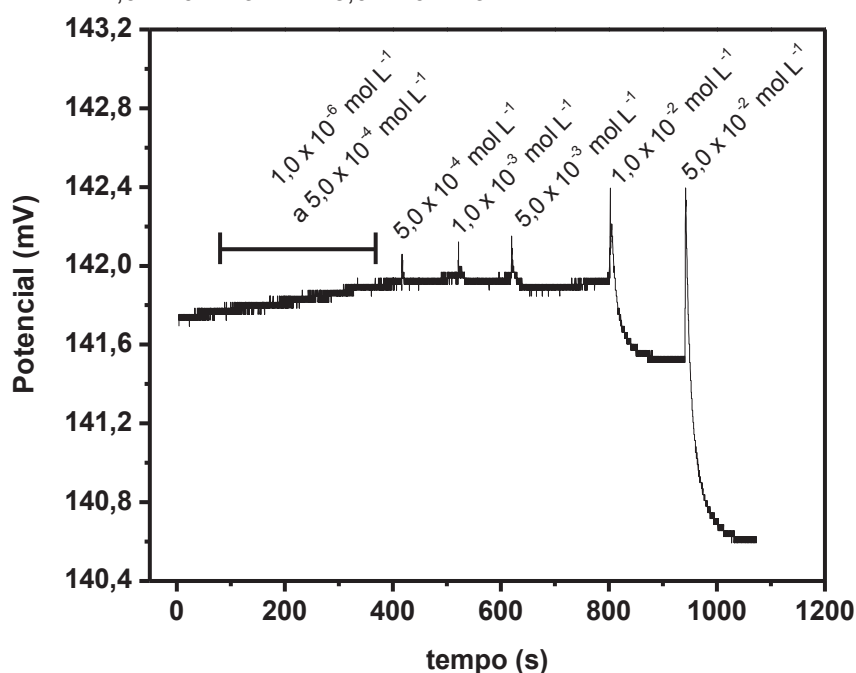
Verificada a potencialidade de aplicação do sensor potenciométrico de PPI:LAC após otimização, estudos foram realizados utilizando cloreto na incorporação ao filme de polipirrol para a determinação deste íon em amostras biológicas. Eletrodos de grafite como substrato e o método galvanostático de crescimento foram igualmente utilizados. Este método, bem como a densidade de carga aplicada para a formação dos filmes de PPI:Cl foram otimizados e constam no item 4.1 deste trabalho.

Para intensificação do sinal analítico de resposta do sensor proposto, alguns parâmetros foram avaliados, conforme descrito na sequência.

4.3.1 Estudo da natureza e do pH do eletrólito

Os testes do tipo de eletrólito para a resposta do sensor de PPI:Cl foram realizados utilizando o eletrólito KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e eletrólito $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, que apresentaram sinal mais pronunciado para o sensor PPI:LAC. Na FIGURA 31 consta o sinal obtido para o eletrólito KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0.

FIGURA 31 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA DO SENSOR PPI:Cl EM ELETRÓLITO DE KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 APÓS ADIÇÕES DE PADRÃO CLORETO EM CONCENTRAÇÕES ENTRE $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ E $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$



FONTE: O autor.

Verificou-se que para este eletrólito o sinal obtido apresentou baixa magnitude em adições de maior concentração ($\Delta E = 1,3$ para a adição de $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de cloreto). Além disso, concentrações de cloreto menores que $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ não apresentaram variação de potencial. Os testes subsequentes foram realizados em eletrólito (NH₄)₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, o qual apresentou sinais mais pronunciados, conforme descrito na sequência. Estes resultados estão em conformidade com os obtidos por Dong e colaboradores (1988), que estudaram o efeito de interferência de dez ânions utilizados em eletrólitos para resposta potenciométrica utilizando um sensor de polipirrol com cloreto incorporado à matriz. ^[151] Os coeficientes de seletividade calculados ($K_{i,j}^{pot}$) para ânions nitrato e sulfato foram >1 para o primeiro ânion e $3,16 \times 10^{-3}$ para o segundo, o que significa interferência significativa dos íons nitrato.

Para o eletrólito (NH₄)₂SO₄ foram realizados testes do efeito da variação do pH na resposta potenciométrica de cloreto. Cada conjunto de adições foi realizado em triplicata, em diferentes eletrodos. Na FIGURA 32 está apresentado um resumo das respostas potenciométricas (E vs t) e das curvas de calibração obtidas para cada pH estudado obtidos da variação do potencial em função do pCl para diferentes valores de pH.

FIGURA 32 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA E CURVA DE CALIBRAÇÃO APÓS UM CONJUNTO DE ADIÇÕES DE PADRÃO CLORETO UTILIZANDO O SENSOR DE PPI:Cl EM SULFATO DE AMÔNIO 0,1 mol L⁻¹ PARA DIFERENTES VALORES DE pH
continua

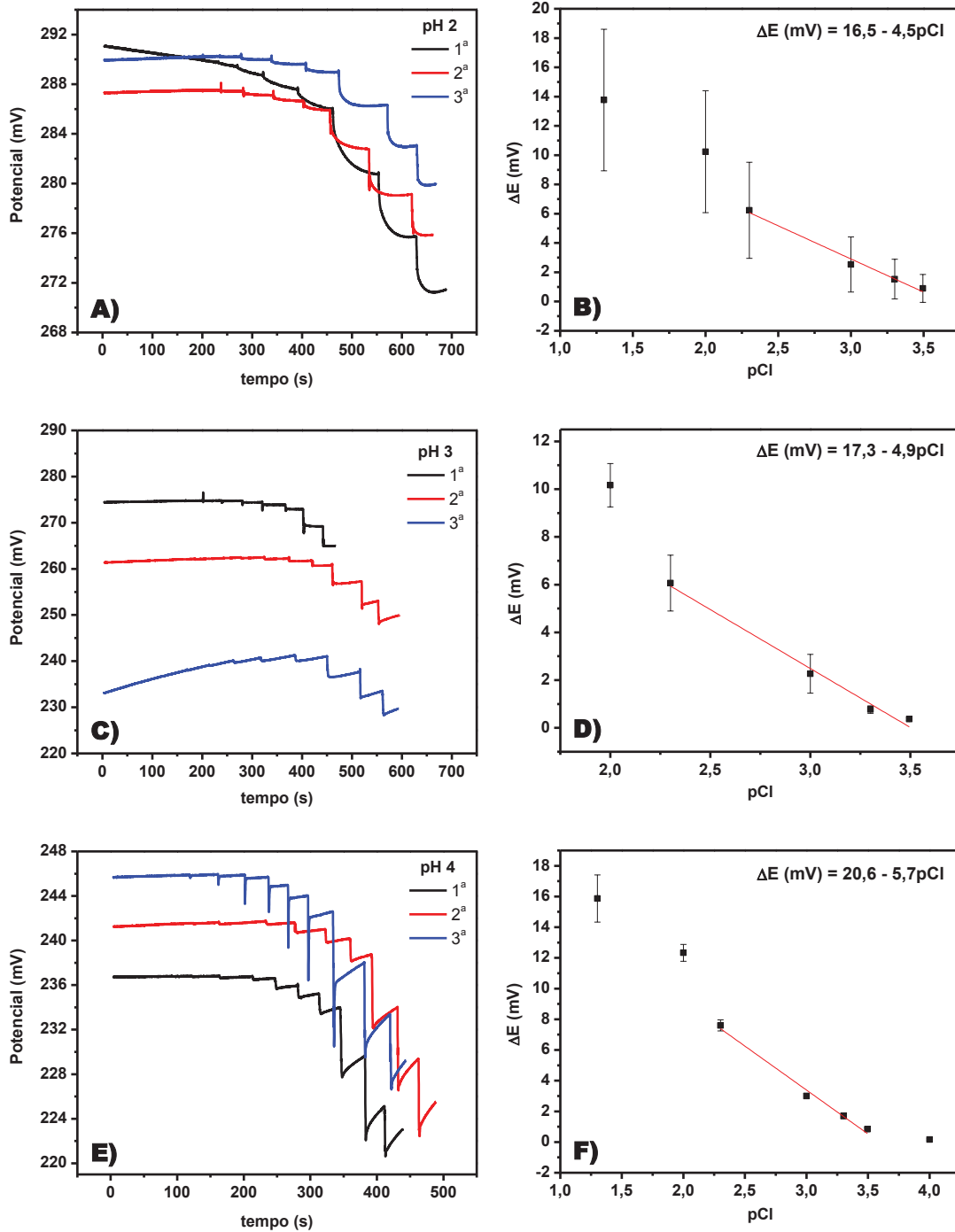
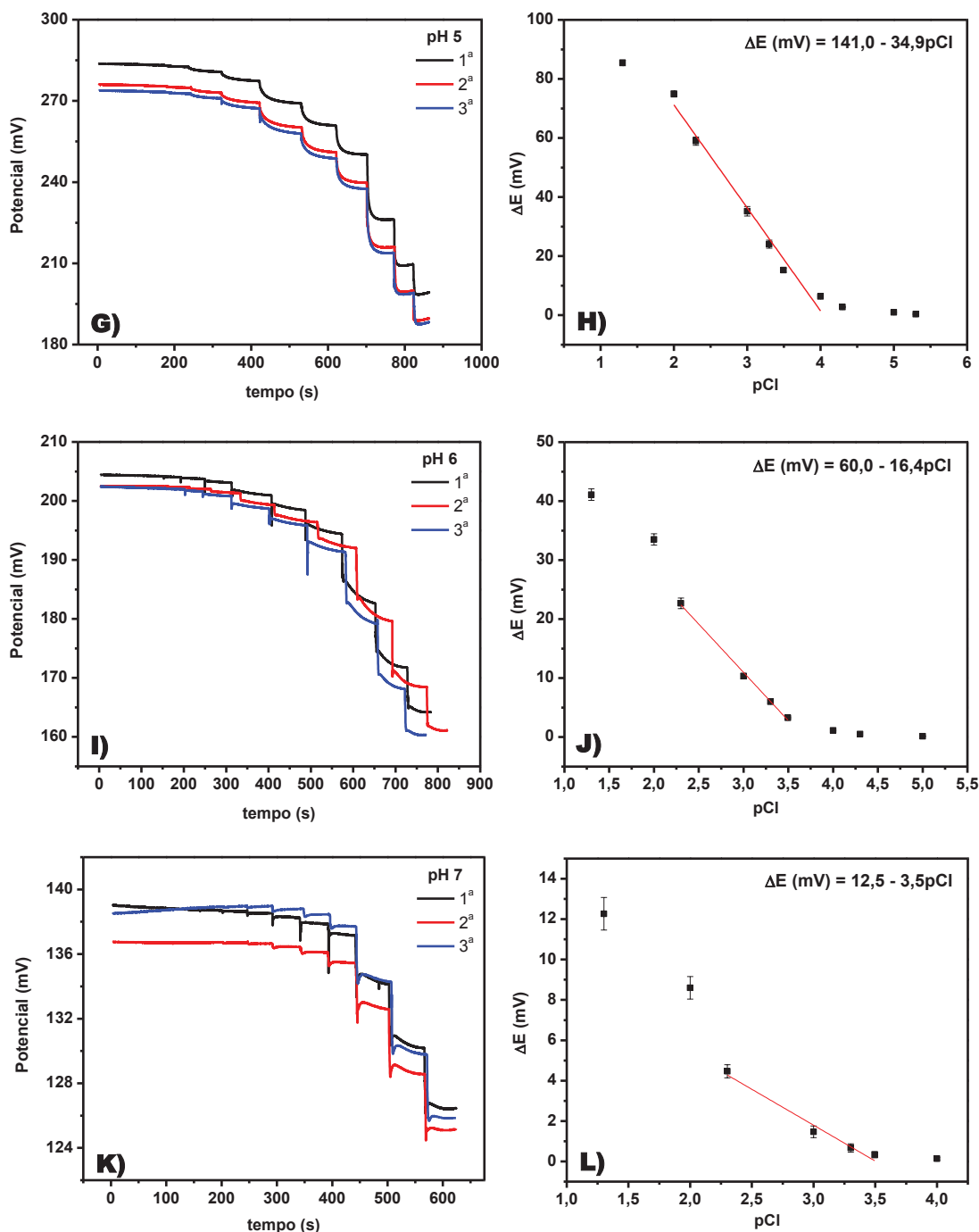


FIGURA 32 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA E CURVA DE CALIBRAÇÃO APÓS UM CONJUNTO DE ADIÇÕES DE PADRÃO CLORETO UTILIZANDO O SENSOR DE PPI:Cl EM SULFATO DE AMÔNIO 0,1 mol L⁻¹ PARA DIFERENTES VALORES DE pH
conclusão



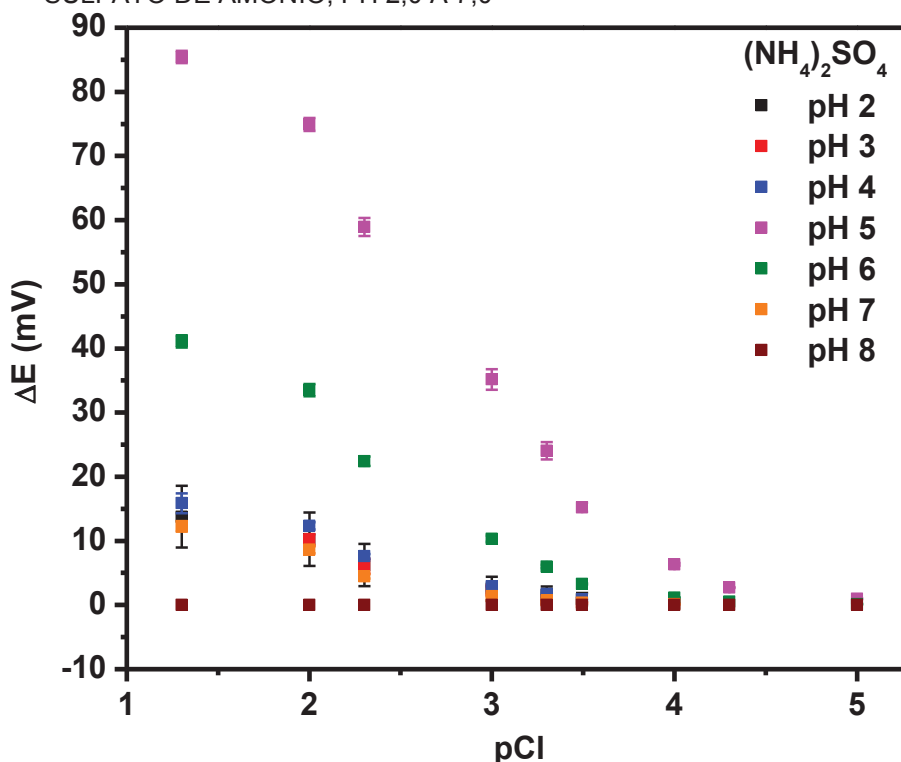
FONTE: O autor.

LEGENDA: (A, B) pH 2,0; (C, D) pH 3,0; (E, F) pH 4,0; (G, H) pH 5,0; (I, J) pH 6,0; (K, L) pH 7,0.

Para melhor entendimento dos resultados obtidos na FIGURA 32, foram construídos gráficos que constam nas FIGURAS 33, 34 e 35 e, a partir destes, algumas características são ressaltadas para escolha do valor de pH que apresentou melhor desempenho do sensor de PPI:Cl na resposta potenciométrica. Na FIGURA

33 está apresentado um gráfico da variação de potencial em função do pCl ($-\log C_{Cl}$) após um conjunto de adições para valores de pH entre 2,0 e 8,0 utilizando $(NH_4)_2SO_4$ como eletrólito.

FIGURA 33 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA OBTIDA UTILIZANDO O SENSOR DE PPI:Cl EM SULFATO DE AMÔNIO, PH 2,0 A 7,0

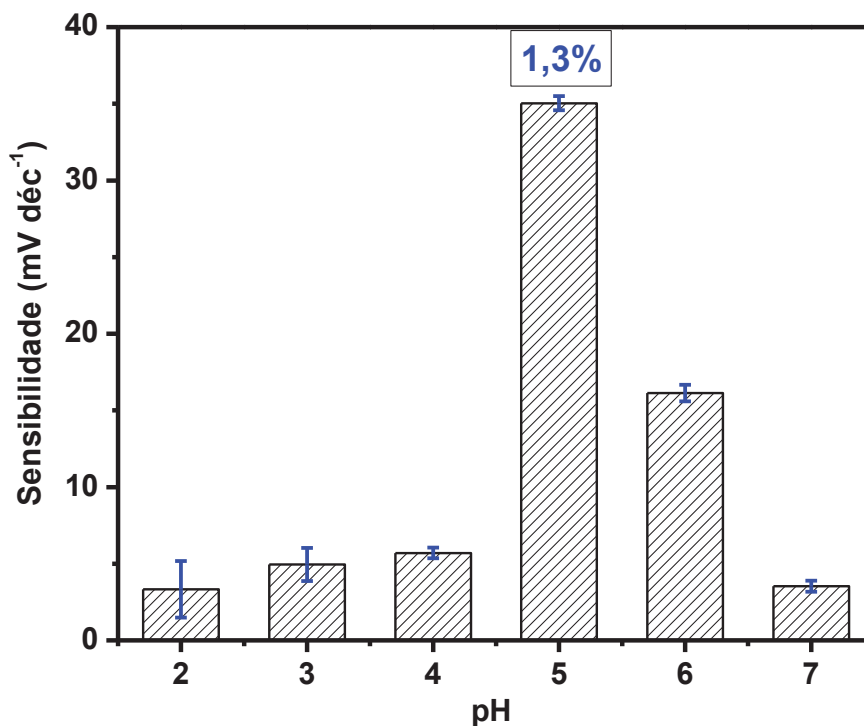


FONTE: O autor.

Destaca-se que os resultados relacionados ao pH 8,0 estão apresentados somente na FIGURA 33, e não nas demais, pois não foi observada variação de potencial após o conjunto de adições, e o valor de potencial após cada adição mantinha-se à linha base. De acordo com a FIGURA 33, verificou-se que a variação de potencial para adições de concentrações superiores a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($pCl < 4$) foi crescente do pH 2,0 ao pH 5,0 e decrescente deste valor até o pH 8,0, indicando que os sinais para o pH 5,0 apresentam resposta mais pronunciada (85 mV para a adição de $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, correspondendo a mais que o dobro da resposta para o pH 6,0, de 41 mV).

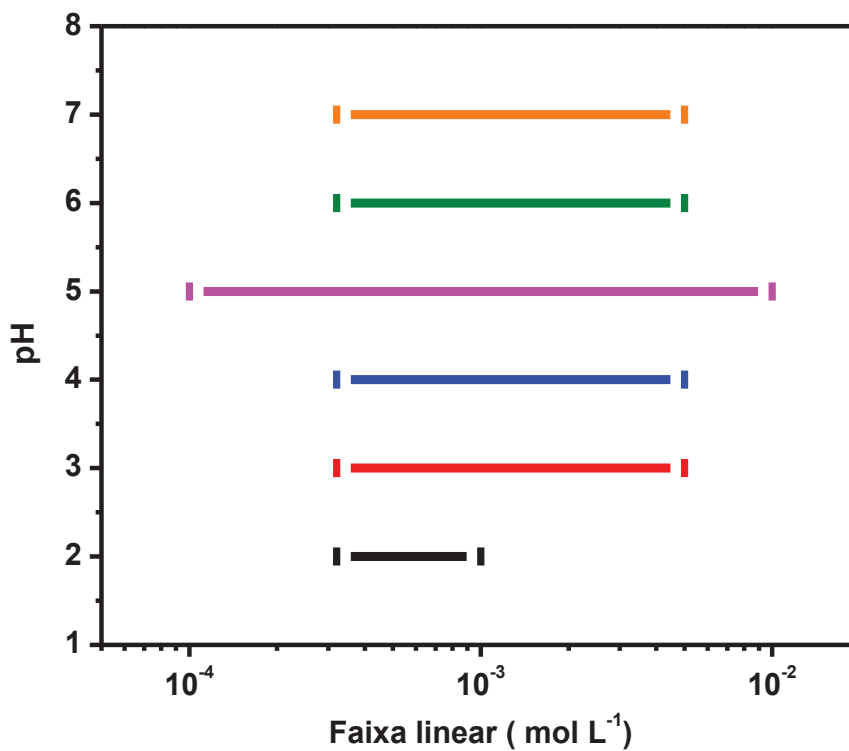
Outra característica importante está na obtenção da inclinação da reta, que fornece informações sobre a sensibilidade (FIGURA 34) e a região linear de trabalho do sensor proposto (FIGURA 35).

FIGURA 34 – COMPORTAMENTO DO SENSOR DE PPI:CI (SENSIBILIDADE – SLOPE) OBTIDO EM DIFERENTES VALORES DE pH PARA O ELETRÓLITO SULFATO DE AMÔNIO



FONTE: O autor.

FIGURA 35 – COMPORTAMENTO DO SENSOR DE PPI:CI (FAIXA LINEAR DE TRABALHO) OBTIDO EM DIFERENTES VALORES DE pH PARA O ELETRÓLITO SULFATO DE AMÔNIO



FONTE: O autor.

Verificou-se para o pH 5,0 (FIGURA 34) uma sensibilidade (*slope*) média maior em relação aos outros valores de pH, de 35,0 mV por década. Este valor se aproxima aos da literatura, em que são reportados sensores de polipirrol incorporados com cloreto com valores de inclinação entre 26,7 e 62,6 mV déc^{-1} . [58] Além disso, neste valor de pH, o sensor apresentou baixo desvio padrão relativo (1,3%), o que confere a confiabilidade das respostas do sensor proposto.

Por fim, na FIGURA 35 foi observada uma faixa ampla de concentração para o eletrólito $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 5,0 ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). Esta característica é importante para a aplicação de um sensor, pois a faixa de trabalho abrange a região de detecção do analito em uma amostra. Para a aplicação abordada posteriormente, esta faixa abrange a determinação de cloreto, que será na ordem milimolar.

A partir das considerações descritas, a condição otimizada para o sensor de PPI:Cl foi a detecção em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 5,0. Dessa forma, a FIGURA 32-H representa a curva analítica indicada na Equação 12

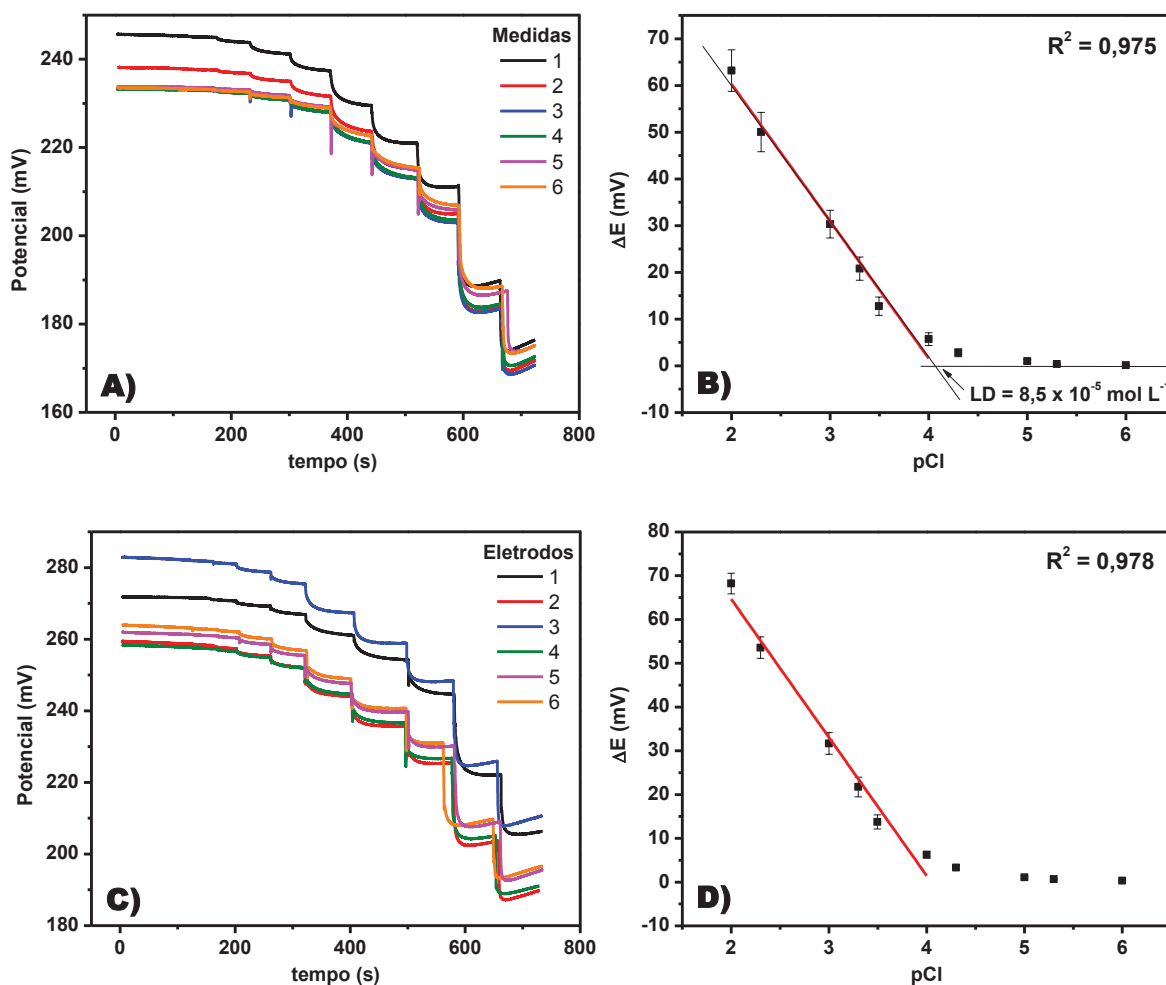
$$\Delta E(\text{mV}) = 141,0 - 34,9\text{pCl} \quad (12)$$

a qual apresentou $R^2 = 0,979$ e RSD de 1,3% e será utilizada posteriormente no estudo em amostras biológicas.

4.3.2 Estudo da repetibilidade e reprodutibilidade

Para avaliar a repetibilidade das respostas potenciométricas obtidas a partir do sensor proposto, um mesmo eletrodo foi utilizado para a obtenção de diferentes curvas de calibração ($n = 6$). Para os testes de reprodutibilidade foram utilizados diferentes eletrodos ($n = 6$). Os resultados estão apresentados na FIGURA 36.

FIGURA 36 – REPETIBILIDADE REPRODUTIBILIDADE DO SENSOR DE PPI:Cl



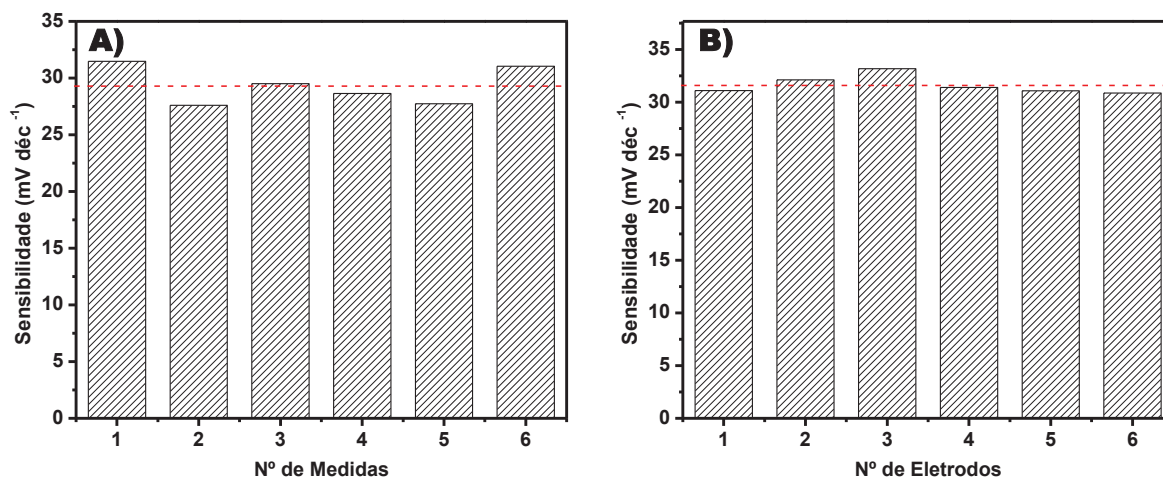
FONTE: O autor.

LEGENDA: A,C) Resposta potenciométrica; B,D) Curva de calibração.

O limite de detecção foi obtido pela extrapolação e intersecção das duas retas apresentadas na FIGURA 36-B, cujo valor foi de $8,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.^[71] O valor obtido apresentou-se abaixo de outros reportados pela literatura, como, por exemplo, ao de um sensor portátil para determinação voltamétrica de íons cloreto ($20,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).^[98]

A repetibilidade e a reprodutibilidade do sensor de PPI:Cl foram avaliadas pela obtenção da inclinação da reta da região linear (*slope*), conforme apresentado na FIGURA 37.

FIGURA 37 – GRÁFICO DE BARRAS OBTIDOS PARA O SENSOR DE PPI:Cl A PARTIR DA SENSIBILIDADE EM FUNÇÃO DA REPETIBILIDADE E DA REPRODUTIBILIDADE



FONTE: O autor.

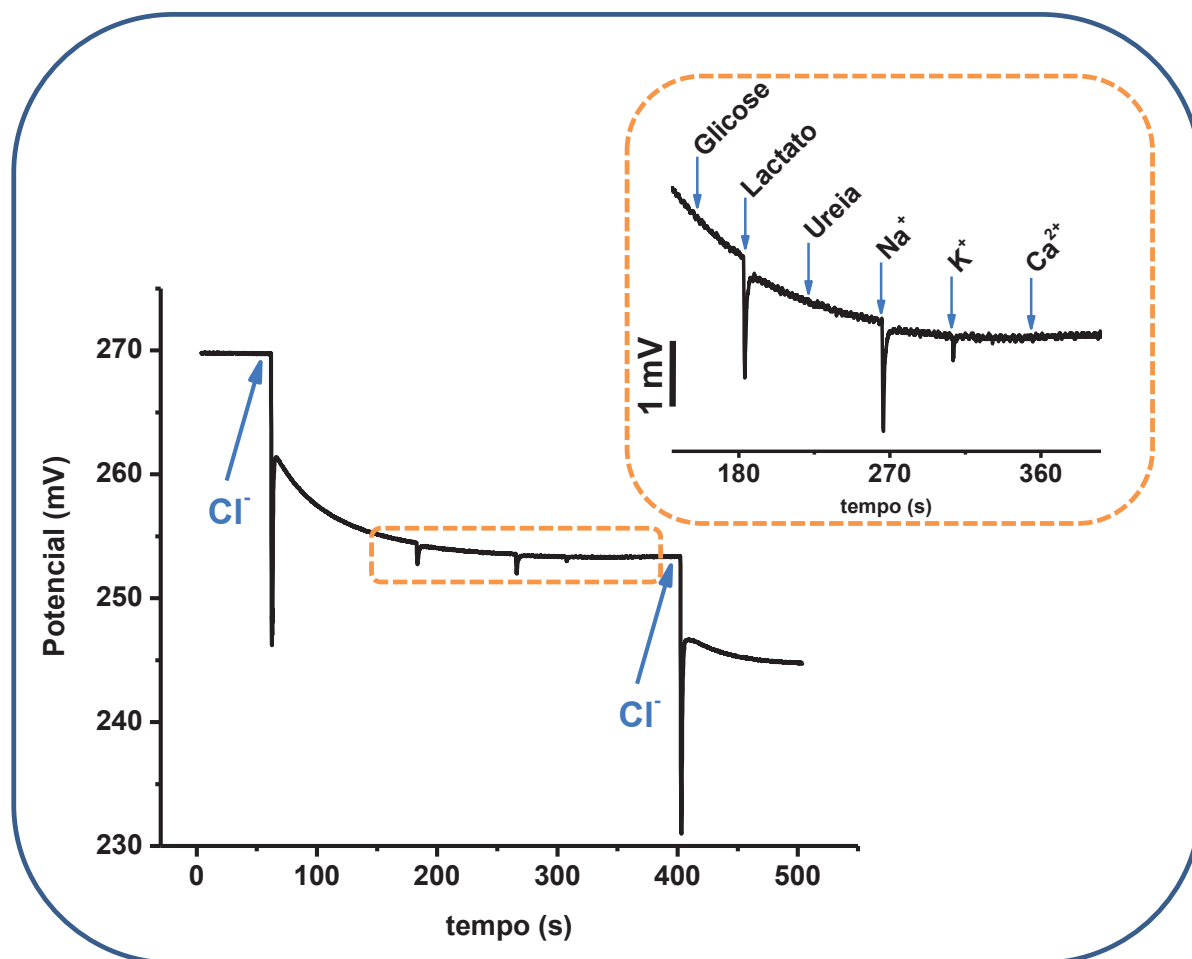
LEGENDA: A) número de medidas (repetibilidade); B) medidas em diferentes eletrodos (reprodutibilidade)

Os resultados obtidos em relação à repetibilidade (FIGURA 37-A) apresentaram valor médio da resposta da sensibilidade de $29,3 \pm 1,6$ mV dec⁻¹ com desvio padrão relativo de 5,5%. Para os estudos de reprodutibilidade (FIGURA 37-B) os valores foram de $31,6 \pm 0,8$ mV dec⁻¹, e desvio padrão relativo de 2,5%. Este valor, quando comparado, por exemplo, ao de outro sensor potenciométrico de cloreto reportado pela literatura (RSD = 8%) sinaliza a potencialidade do sensor proposto para a determinação de cloreto em amostras biológicas. ^[114]

4.3.3 Avaliação da seletividade do sensor

Para o estudo da seletividade do sensor de PPI:Cl foram considerados alguns possíveis interferentes presentes na lágrima e saliva humanas, fluidos que serão avaliados posteriormente. A proporção das espécies testadas foi baseada na literatura e feita em relação à adição de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de íons cloreto. ^[152-154] Na FIGURA 38 constam os resultados obtidos.

FIGURA 38 – ESTUDO DE POTENCIAIS INTERFERENTES UTILIZANDO ADIÇÃO DE CLORETO $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ INTERCALADO PELA ADIÇÃO DE GLICOSE $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, LACTATO $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, UREIA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ÍONS SÓDIO $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ÍONS POTÁSSIO $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ E ÍONS CÁLCIO $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$



FONTE: O autor.

De acordo com a FIGURA 38, nenhuma alteração significativa foi observada durante a adição dos interferentes, bem como a adição de cada espécie não influenciou na adição subsequente de cloreto. Este estudo foi realizado em triplicata, em que também não se observaram alterações, indicando que o sensor proposto de PPI:Cl apresenta seletividade analítica. Esta característica é significativa e indica uma potencial alternativa de aplicação, uma vez que a literatura reporta limitações quanto à seletividade no desenvolvimento de outros dispositivos. ^[115]

4.3.4 Análise em amostras biológicas de voluntários não-fibrocísticos e fibrocísticos

A aplicação do sensor de PPI:Cl neste trabalho está voltada para o desenvolvimento de um método alternativo para o diagnóstico de Fibrose Cística. Considerando o levantamento bibliográfico, verificou-se que há ainda limitações nesta direção em relação às metodologias usuais. Isto se confirmou conforme relatos de pacientes fibrocísticos durante o período de coleta. Embora a coleta tenha sido realizada em um número limitado de pacientes (cinco voluntários), dois deles relataram que o teste do suor pelo método padrão ouro (o qual foi realizado duas vezes) não foi confirmatório para o diagnóstico. Este somente ocorreu após o teste genético pelo mapeamento do gene da proteína CFTR, cuja avaliação também possui limitações dadas as consecutivas mutações deste gene.

Nesta direção, buscou-se aplicar o sensor de PPI:Cl em amostras de dois fluidos corporais – lágrima e saliva – de pacientes já diagnosticados com FC e também de voluntários não-fibrocísticos, avaliando a potencialidade do sensor.

4.3.4.1 Avaliação do sensor de PPI:Cl em amostras de lágrima

A lágrima humana possui uma grande quantidade de informações moleculares úteis e potenciais para o diagnóstico e tratamento de doenças. Este fluido contém cerca de 80 proteínas, além de outros componentes. ^[155-156] A literatura sinaliza que diferentes tecidos oculares, bem como as glândulas lacrimais, podem ser afetados pela FC direta ou indiretamente. ^[157-158] A determinação de íons cloreto utilizando este fluido para diagnóstico de FC não foi reportada, no entanto também não foi excluída para esta finalidade. Por esta razão, testes em lágrimas foram realizados e estão apresentados neste item.

Os testes iniciais foram realizados em amostras de voluntários não-fibrocísticos. Ressalta-se que tratamentos prévios da amostra, como a avaliação de diluição e quantidade de amostra adicionada, foram realizados nesta etapa, resultando em adição de 10 μ L de lágrima sem necessidade de diluição.

Na TABELA 4 estão apresentados os resultados do teste de adição e recuperação de cloreto na amostra, obtidos por interpolação da curva analítica.

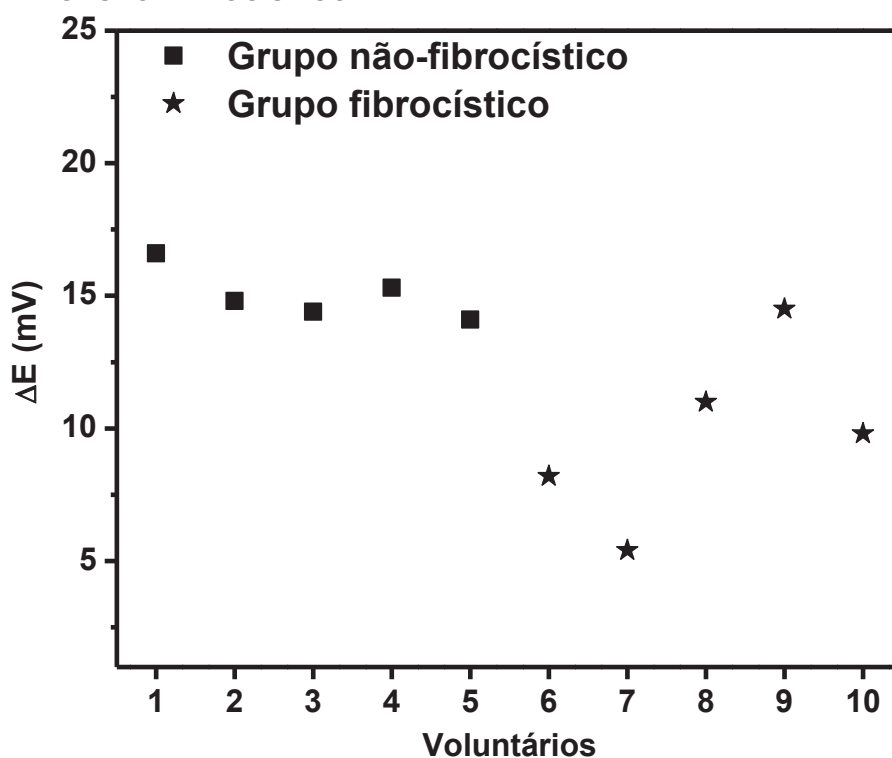
TABELA 4 – TAXA DE RECUPERAÇÃO DE CLORETO EM AMOSTRAS DE LÁGRIMA DE VOLUNTÁRIOS NÃO-FIBROCÍSTICOS POR INTERPOLAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

Amostra	ΔE amostra (mV)	Concentração amostra (mmol L ⁻¹)	ΔE fortificada (mV)	Concentração fortificada (mmol L ⁻¹)	Recuperação (%)
1	16,6	272,6	20,9	362,0	44,7
2	14,8	242,1	19,6	332,3	45,1
3	14,4	235,8	18,4	307,0	35,6
4	15,3	250,2	19,8	336,7	43,2
5	14,1	231,1	19,0	319,4	44,1

FONTE: O autor.

Os resultados obtidos indicaram uma baixa taxa de recuperação pelo método de interpolação da curva analítica para determinação das concentrações de cloreto, sugerindo que pode haver interferência da matriz na resposta. Por este motivo, os testes subsequentes foram realizados utilizando o método de adição de padrão para quantificação de cloreto em grupos de voluntários não-fibrocísticos (NF) e fibrocísticos (F). Na FIGURA 39 constam os resultados da variação de potencial obtida para cada amostra, e na TABELA 5 estão apresentadas as concentrações de cloreto calculadas pelo método de adição de padrão.

FIGURA 39 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA (VARIAÇÃO DE POTENCIAL) OBTIDA A PARTIR DE AMOSTRAS DE LÁGRIMA HUMANA DE GRUPO NÃO-FIBROCÍSTICO E DE GRUPO FIBROCÍSTICO



FONTE: O autor.

TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DE CLORETO OBTIDA EM AMOSTRAS DE LÁGRIMA DE VOLUNTÁRIOS NÃO-FIBROCÍSTICOS E FIBROCÍSTICOS POR ADIÇÃO DE PADRÃO

Amostra	Grupo não fibrocístico					Grupo fibrocístico				
	NF1	NF2	NF3	NF4	NF5	F6	F7	F8	F9	F10
Concentração (mmol L ⁻¹)	139	169	152	185	161	N/A	70,0	122	175	78,6

FONTE: O autor.

NOTA: N/A: Não apresentou resposta após as adições de padrão de cloreto.

De acordo com a literatura, a concentração média de cloreto em fluidos lacrimais é cerca de 106 a 135 mmol L⁻¹. [158] Os resultados obtidos apresentaram uma faixa entre 70,0 e 195 mmol L⁻¹. Verificou-se também proximidade entre os sinais de resposta, o que inviabiliza propor uma faixa de corte para diagnóstico de FC neste fluido. Haveria necessidade de coleta em grupos maiores de voluntários, especialmente de fibrocísticos, cujos sinais apresentaram desvio relativo maior das amostras 6 a 10 (RSD = 34,5%) quando comparado ao de não-fibrocísticos (RSD = 6,5%, amostras 1 a 5). Ainda, não foi possível realizar os testes em triplicata pela quantidade restrita de material coletado.

Os resultados realizados para estes grupos de voluntários indicaram que a lágrima não confere um fluido de confiabilidade para diagnóstico de FC. No entanto, o sensor de PPI:Cl apresentou potencialidade para determinação de cloreto neste fluido.

4.3.4.2 Avaliação do sensor de PPI:Cl em amostras de saliva

Diferentemente da lágrima, estudos em saliva para o diagnóstico de FC vêm sendo reportados recentemente, conforme apresentado na revisão bibliográfica. Propõe-se nesta etapa avaliar o sensor potenciométrico de PPI:Cl como uma nova metodologia para diagnosticar a doença.

Os testes iniciais foram realizados em voluntários não-fibrocísticos para avaliar o efeito de matriz da amostra na resposta potenciométrica de cloreto pelo método de interpolação da curva analítica. De forma igual à lágrima, testes prévios de preparo das amostras foram realizados, resultando em uma adição de 200 µL de amostra diluída 1:1 em (NH₄)₂SO₄ pH 5,0. Os resultados estão apresentados na TABELA 6.

TABELA 6 – TAXA DE RECUPERAÇÃO DE CLORETO EM AMOSTRAS DE SALIVA DE VOLUNTÁRIOS NÃO-FIBROCÍSTICOS POR INTERPOLAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

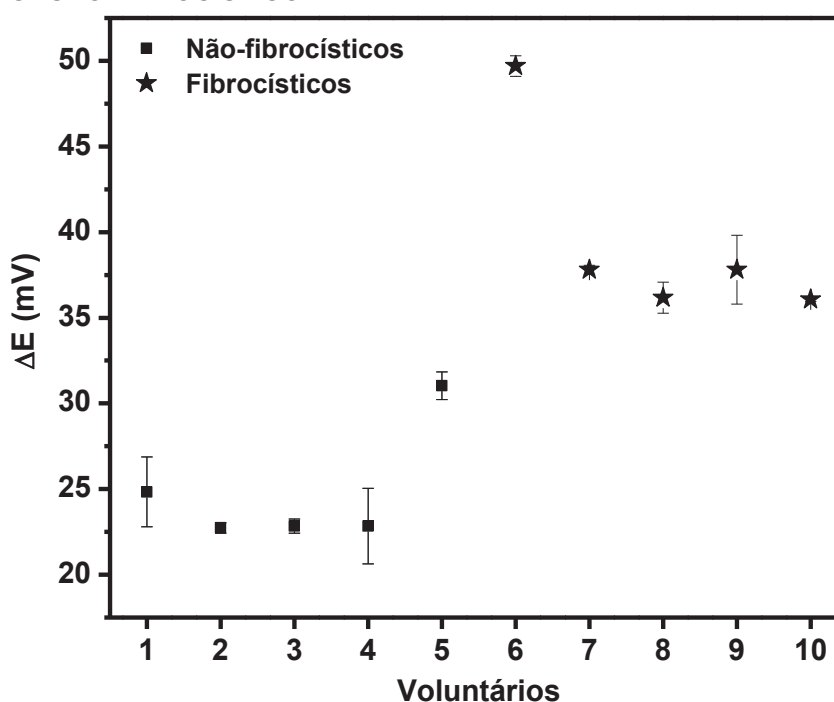
Amostra	ΔE amostra (mV)	Concentração amostra (mmol L ⁻¹)	ΔE fortificada (mV)	Concentração fortificada (mmol L ⁻¹)	Recuperação (%)
1	24,5	45,9	40	127,7	83
2	30,3	67,3	41,5	140,9	74
3	24,0	44,4	38,4	114,9	71
4	30,4	67,8	43,1	156,6	90
5	22,1	39,2	38	111,9	73

FONTE: O autor.

Conforme apresentado na TABELA 6, os resultados obtidos indicaram uma taxa satisfatória de recuperação de cloreto em saliva pelo método de interpolação da curva analítica (taxa média de 78,2%).

Testes subsequentes foram realizados em triplicata em amostra de saliva de grupo não-fibrocístico e grupo fibrocístico. Na FIGURA 40 constam os resultados da variação de potencial obtida para cada amostra (valor médio e desvio padrão) e na TABELA 7 estão apresentadas as concentrações de cloreto calculadas pelo método de interpolação da curva analítica (valor médio e desvio padrão).

FIGURA 40 – RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA (VARIAÇÃO DE POTENCIAL) OBTIDA A PARTIR DE AMOSTRAS DE LÁGRIMA HUMANA DE GRUPO NÃO-FIBROCÍSTICO E DE GRUPO FIBROCÍSTICO



FONTE: O autor.

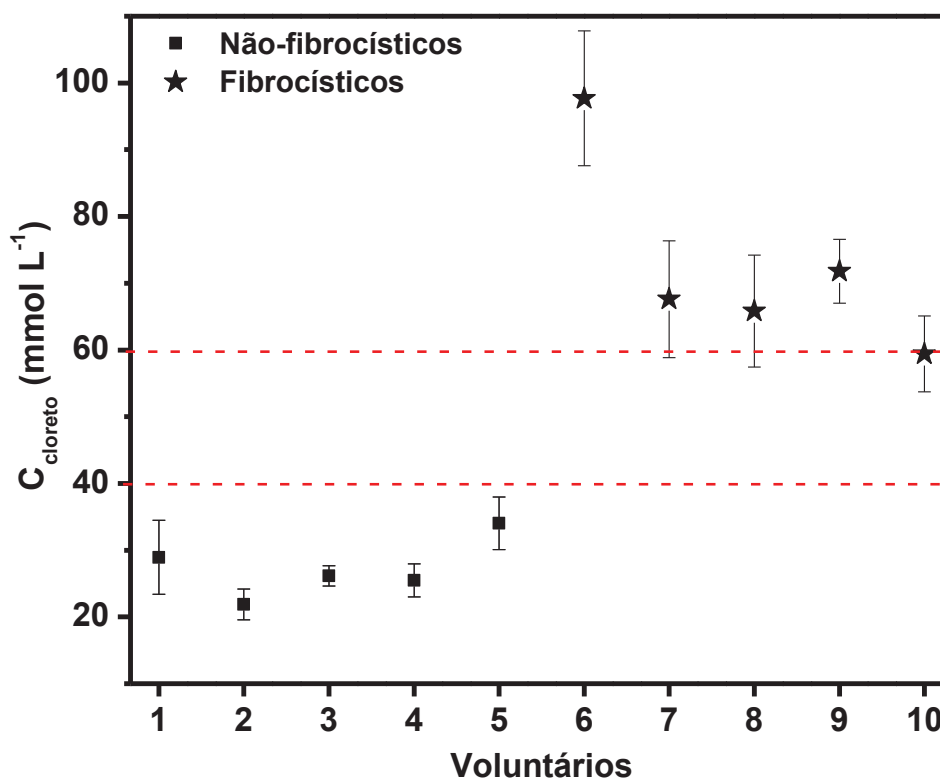
TABELA 7 – CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE CLORETO OBTIDA EM AMOSTRAS DE SALIVA DE VOLUNTÁRIOS NÃO-FIBROCÍSTICOS E FIBROCÍSTICOS POR INTERPOLAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

Grupo	Amostra	C _{Cl} (mmol L ⁻¹)
Não-fibrocístico	NF1	47,2 ± 6,2
	NF2	40,8 ± 0,8
	NF3	41,1 ± 1,1
	NF4	41,4 ± 5,8
	NF5	70,7 ± 3,8
Fibrocístico	F6	242,2 ± 9,6
	F7	101,7 ± 17,0
	F8	99,2 ± 6,0
	F9	111,0 ± 14,1
	F10	98,5 ± 0,8

FONTE: O autor.

Na FIGURA 40 foi observada maior variação de potencial para o grupo fibrocístico, bem como concentrações mais elevadas de cloreto (TABELA 7). Os resultados obtidos por interpolação apresentaram valores médios ligeiramente superiores aos reportados, embora apresentem também desvios padrões significativos. ^[121] Adicionalmente, a saliva é considerada uma matriz complexa e susceptível a vários agentes de interferência. ^[118] Diante destas duas considerações optou-se por avaliar e quantificar a concentração de cloreto neste fluido por adição de padrão cloreto, a qual foi realizada sequencialmente à adição das amostras da FIGURA 40. Os resultados dos valores médios de cloreto com desvio padrão estão apresentados na FIGURA 41.

FIGURA 41 – CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE CLORETO OBTIDAS PELO MÉTODO POTENCIOMÉTRICO VIA ADIÇÃO DE PADRÃO DE CLORETO A PARTIR DE AMOSTRAS DE SALIVA HUMANA DE GRUPO NÃO-FIBROCÍSTICO E DE GRUPO FIBROCÍSTICO



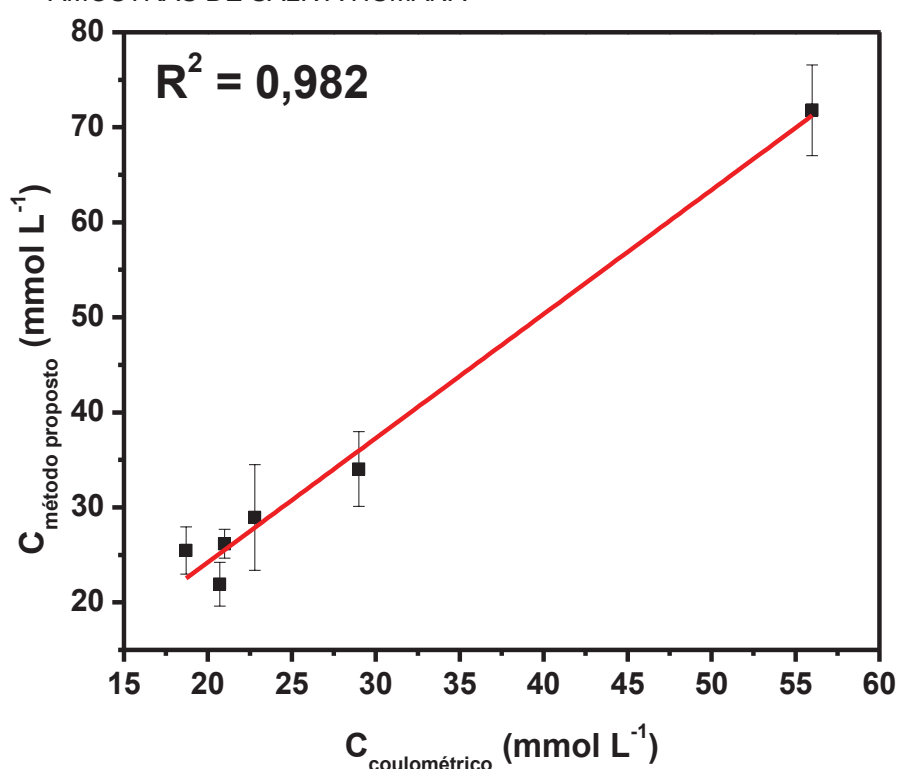
FONTE: O autor.

Os valores apresentados na FIGURA 41 indicaram concentrações de menor magnitude para os dois grupos de voluntários, quando comparadas aos valores da TABELA 6. Considerando que a concentração de íons cloreto na saliva e no suor são similares, conforme reportado, os valores de referência para diagnósticos podem também ser aplicados. [106, 121, 159] Concentrações de cloreto iguais ou superiores a 60 mmol L⁻¹ são consistentes com o diagnóstico de FC, enquanto que valores abaixo de 40 mmol L⁻¹ excluem a doença. Concentrações entre 40 e 60 mmol L⁻¹ são consideradas limítrofes e recomenda-se repetição do teste. As indicações tracejadas no gráfico da FIGURA 41 indicam a faixa de incerteza para diagnóstico. As concentrações médias de cloreto para os voluntários 1 a 5 indicaram valores abaixo de 40 mmol L⁻¹. Para os cinco voluntários já diagnosticados com a doença, quatro deles apresentaram valores médios acima de 60 mmol L⁻¹, sendo que para dois deles o desvio padrão estava contido na região limítrofe, e para o voluntário “10” o valor médio obtido estava incluso nesta região. De acordo com os valores limítrofes,

os resultados apresentaram concordância para o diagnóstico de FC utilizando a saliva como fluido biológico de detecção de cloreto.

Para avaliar a confiabilidade do método proposto, um estudo comparativo entre o método potenciométrico utilizando o sensor proposto e o método coulométrico foi realizado a partir de 6 das 10 amostras de saliva e está apresentado na FIGURA 42.

FIGURA 42 – CORRELAÇÃO ENTRE O MÉTODO PROPOSTO UTILIZANDO O SENSOR DE PPI:CI E O MÉTODO COULOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CLORETO EM AMOSTRAS DE SALIVA HUMANA



FONTE: O autor.

Embora tenha sido observado que as concentrações obtidas pelo método coulométrico apresentaram valores ligeiramente inferiores aos do sensor potenciométrico proposto, por meio de regressão linear uma correlação entre os métodos foi obtida, seguindo a relação

$$C_{\text{Cl},\text{sensor PPI:CI}} \text{ (mmol L}^{-1}\text{)} = -1,9 + 1,3C_{\text{Cl},\text{coulométrico}} \text{ (mmol L}^{-1}\text{)} \quad (13)$$

a qual apresentou $R^2 = 0,982$, indicando uma significativa correlação entre os métodos. A correlação entre diferentes métodos utilizando saliva como fluido ainda

não foi reportada pela literatura. No entanto, este valor é classificado como uma alta correlação, conforme a obtida em teste comparativo entre um dispositivo colorimétrico em papel para triagem de FC e o método padrão ouro de determinação coulométrica de íons cloreto em suor ($R^2 = 0,98$). ^[115] Sinalizou-se assim, a potencialidade de aplicação do sensor proposto para detecção de íons cloreto em uma matriz alternativa, não-invasiva e que indicou consistência e viabilidade na particularidade para o diagnóstico de Fibrose Cística.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na primeira parte deste trabalho indicaram os parâmetros otimizados de deposição dos filmes de PPI:LAC e PPI:Cl pelo método galvanostático (para $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $1,2 \text{ mA cm}^{-2}$ de densidade de corrente, em 720 segundos de deposição, resultando em uma densidade de carga de 864 mC cm^{-2}), os quais apresentaram filmes mais aderentes e homogêneos.

Sobre o estudo do método de deposição, o regime galvanostático de crescimento foi escolhido considerando as características observadas experimentalmente e a finalidade de aplicação. As caracterizações por SEM pelo método galvanostático de crescimento e utilizando diferentes contra-íons indicaram que a incorporação de diferentes espécies aniônicas pode alterar a morfologia dos filmes de polipirrol, e esta modificação é mais pronunciada para ânions de maior tamanho (PPI:PSS).

As medidas de AFM apresentaram concordância com as realizadas por SEM, em que se observou nos filmes de PPI:Cl a formação de glóbulos, em formato de “couve-flor”, característicos de polímeros condutores. Foi feita estimativa da rugosidade média para cada filme, de $64,7 \text{ nm}$ para o PPI:Cl, $20,5 \text{ nm}$ para o PPI:LAC e $10,9 \text{ nm}$ para o PPI:PSS. A técnica de KFM possibilitou identificar regiões de maior concentração das espécies mais negativas indicando que as cargas dos ânions (espécies de interesse) coincidiam com as regiões mais elevadas (de pico) da superfície dos filmes.

Após otimização dos parâmetros de formação e caracterização dos filmes de polipirrol, na segunda parte do trabalho as condições de formação foram adequadas para eletrodos de grafite tipo escolar, que se apresentaram uma ferramenta eletroanalítica viável e econômica. A determinação de lactato e de cloreto foi realizada via potenciometria.

Para o lactato, foram investigados o efeito de diferentes eletrólitos e o efeito do pH no sinal resultante. Dentre os testados, a solução de nitrato de potássio, pH 4,0, apresentou melhor desempenho em relação à resposta. Os sinais de potencial foram obtidos em uma ampla faixa linear de concentração, de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, e resposta potenciométrica para o sensor de PPI:LAC pode ser representada pela equação: $\Delta E(\text{mV}) = 100,1 - 24,5\text{pLAC}$.

Testes de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizados, cujo desvio padrão relativo para cada teste (2,1% e 2,7% respectivamente) sinalizou a potencialidade do sensor proposto para a determinação de lactato em amostras biológicas. Ainda, o estudo de potenciais interferentes indicou que o sensor proposto apresenta seletividade analítica.

A aplicação do sensor em amostras de lágrima humana foi feita para avaliar a resposta potenciométrica dos níveis de concentração normal de lactato (região basal). Por interpolação dos saltos potenciométricos na curva analítica, os valores de concentração de lactato foram obtidos para a amostra de lágrima e amostra fortificada e apresentaram uma taxa média de recuperação da amostra de 73%. Por meio de correlação com as concentrações de lactato no sangue, os valores de concentração na lágrima foram ajustados.

O estudo da variação de lactato em amostras de sangue de ratos e em amostras de suor de atletas utilizando o sensor de PPI:LAC indicou que houve um incremento de potencial da região basal para a de pós-treinamento. Este incremento foi mais pronunciado para amostras de sangue animal. Em suor humano, a partir dos resultados potenciométricos foi relacionado o desempenho de cada atleta pelos saltos da variação de lactato e foram confirmados pelos obtidos em lactato sanguíneo por detecção enzimática, indicando que o método proposto é uma alternativa viável e potencial para aplicação em dispositivos, especialmente do tipo *on-off*.

Verificada a potencialidade do sensor de PPI:LAC após otimização e aplicação, um sensor de cloreto foi desenvolvido e avaliado para diagnóstico de Fibrose Cística. Igualmente ao sensor de PPI:LAC, os parâmetros de detecção para o sensor de PPI:Cl foram otimizados. Respostas potenciométricas em eletrólito de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 5,0 apresentaram valores mais pronunciados. Nestas condições, uma inclinação de $35,0 \text{ mV dec}^{-1}$ com baixo desvio padrão relativo (1,3%) e uma ampla faixa de trabalho ($1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) foram obtidas.

O sensor de PPI:Cl apresentou-se repetitivo (RSD = 5,5%) e reprodutível (RSD = 2,5%). Testes realizados para avaliar possíveis interferentes, especialmente os contidos em lágrima e saliva, indicaram seletividade do sensor para íons cloreto.

Amostras de lágrima e saliva de voluntários não-fibrocísticos e fibrocísticos foram avaliadas. A quantificação de íons cloreto por interpolação da curva analítica e por adição de padrão apontaram que a lágrima não corresponde um fluido para o

diagnóstico de FC, cujo resultado entre os dois grupos não apresentou variação entre os valores.

Os resultados foram promissores para a quantificação em saliva. Testes de adição e recuperação sinalizaram uma taxa de recuperação de cloreto satisfatória. Após a determinação de cloreto em fibrocísticos e não-fibrocísticos os resultados puderam ser comparados aos valores de referência para diagnóstico de FC. Um estudo comparativo entre o método proposto e o método coulométrico indicou significativa correlação, apresentando um R^2 de 0,982%. Assim, o sensor de PPI:Cl apresentou-se como uma alternativa potencial e viável para o diagnóstico de FC. Adicionalmente este trabalho apresentou também um fluido diferente do utilizado para os testes usuais de quantificação de cloreto.

A particularidade de polímeros condutores como o polipirrol em incorporar espécies presentes em solução de forma simples e rápida associada ao método potenciométrico de detecção de espécies de interesse utilizando um eletrodo de grafite como substrato indicaram a potencialidade no desenvolvimento de sensores com característica seletiva, reprodutível e de alta robustez.

REFERÊNCIAS

- (1) JUSTINO, C. I. L., DUARTE, A. C., ROCHA-SANTOS, T. A. P., Critical overview on the application of sensors and biosensors for clinical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p.36-60, 2016.
- (2) KASSAL, P., STEINBERG, M. D., STEINBERG, I. M., Wireless chemical sensors and biosensors: A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 266, p.228-245, 2018.
- (3) KIM, J., KIM, M., LEE, M.-S., KIM, K., JI, S., KIM, Y.-T., PARK, J., NA, K., BAE, K.-H., KYUN KIM, H., BIEN, F., YOUNG LEE, C., PARK, J.-U., Wearable smart sensor systems integrated on soft contact lenses for wireless ocular diagnostics. **Nature Communications**, v. 8, p.14997, 2017.
- (4) SHARMA, N., BARSTIS, T., GIRI, B., Advances in paper-analytical methods for pharmaceutical analysis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p.46-56, 2018.
- (5) MOHAMED, H. M., Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p.1-11, 2016.
- (6) BAKIRHAN, N. K., USLU, B., OZKAN, S. A. The Detection of Pesticide in Foods Using Electrochemical Sensors. In: GRUMEZESCU, A. M. & HOLBAN, A. M. (Ed.). **Food Safety and Preservation**. Academic Press, 2018, p. 91-141.
- (7) MADURAVEERAN, G., SASIDHARAN, M., GANESAN, V., Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, p.113-129, 2018.
- (8) JAIN, R., JADON, N., PAWAIYA, A., Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p.363-373, 2017.
- (9) PRON, A., RANNOU, P., Processible conjugated polymers: from organic semiconductors to organic metals and superconductors. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p.135-190, 2002.
- (10) STRUMPLER, R., GLATZ-REICHENBACH, J., FEATURE ARTICLE Conducting Polymer Composites. **Journal of Electroceramics**, v. 3, p.329-346, 1999.
- (11) HOLZE, R., G. Inzelt: Conducting Polymers. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 39, p.953-954, 2009.
- (12) JANG, J. **Conducting Polymer Nanomaterials and Their Applications**. In: Emissive Materials Nanomaterials. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 189-260.

- (13) NAVEEN, M. H., GURUDATT, N. G., SHIM, Y.-B., Applications of conducting polymer composites to electrochemical sensors: A review. **Applied Materials Today**, v. 9, p.419-433, 2017.
- (14) DE PAOLI, M.-A., ZANELLI, A., MASTRAGOSTINO, M., ROCCO, A. M., An electrochromic device combining polypyrrole and WO₃ II: solid-state device with polymeric electrolyte. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 435, p.217-224, 1997.
- (15) SONG, H. K., PALMORE, G. T. R., Redox-Active Polypyrrole: Toward Polymer-Based Batteries. **Advanced Materials**, v. 18, p.1764-1768, 2006.
- (16) KIM, J.-H., SHARMA, A. K., LEE, Y.-S., Synthesis of polypyrrole and carbon nano-fiber composite for the electrode of electrochemical capacitors. **Materials Letters**, v. 60, p.1697-1701, 2006.
- (17) DIAZ, A. F., KANAZAWA, K. K., GARDINI, G. P., Electrochemical polymerization of pyrrole. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v., p.635-636, 1979.
- (18) ANSARI, R., Polypyrrole Conducting Electroactive Polymers: Synthesis and Stability Studies. **E-Journal of Chemistry**, v. 3, p.186-201, 2006.
- (19) SADKI, S., SCHOTTLAND, P., BRODIE, N., SABOURAUD, G., The mechanisms of pyrrole electropolymerization. **Chemical Society Reviews**, v. 29, p.283-293, 2000.
- (20) DELLA PINA, C., FALLETTA, E., ROSSI, M., Conductive materials by metal catalyzed polymerization. **Catalysis Today**, v. 160, p.11-27, 2011.
- (21) SKOTHEIM, T. A., **Handbook of Conducting Polymers**. Second Edition. New York: Taylor & Francis, 1997.
- (22) ATEH, D. D., NAVSARIA, H. A., VADGAMA, P., Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 3, p.741-752, 2006.
- (23) SCHAB-BALCERZAK, E. **Electropolymerization**. Rijeka: InTech, 2011.
- (24) COSNIER, S., KARYAKIN, A., **Electropolymerization: Concepts, Materials and Applications**. Weinheim: Wiley, 2011.
- (25) LATONEN, R.-M., AKIEH, M. N., VAVRA, K., BOBACKA, J., IVASKA, A., Ion Exchange Behavior of Polypyrrole Doped with Large Anions in Electrolytes Containing Mono- and Divalent Metal Ions. **Electroanalysis**, v. 25, p.991-1004, 2013.
- (26) W. LEWIS, T., G. WALLACE, G., R. SMYTH, M., Electrofunctional polymers: their role in the development of new analytical systems. **Analyst**, v. 124, p.213-219, 1999.

- (27) TALAIE, A., WALLACE, G. G., The effect of the counterion on the electrochemical properties of conducting polymers — a study using resistometry. **Synthetic Metals**, v. 63, p.83-88, 1994.
- (28) OTERO, T. F., PADILLA, J., Anodic shrinking and compaction of polypyrrole blend: electrochemical reduction under conformational relaxation kinetic control. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 561, p.167-171, 2004.
- (29) SHIMIDZU, T., OHTANI, A., IYODA, T., HONDA, K., Effective adsorption-desorption of cations on a polypyrrole-polymer anion composite electrode. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v., p.1415-1417, 1986.
- (30) BLAZ, T., MIGDALSKI, J., LEWENSTAM, A., Polypyrrole–calcium film as a membrane and solid-contact in an indicator electrode for potentiometric titrations. **Talanta**, v. 52, p.319-328, 2000.
- (31) WALLACE, G. G., MAXWELL, K. E., LEWIS, T. W., HODGSON, A. J., SPENCER, M. J., New Conducting Polymer Affinity Chromatography Stationary Phases. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p.3091-3110, 1990.
- (32) RATHEE, K., DHULL, V., DHULL, R., SINGH, S., Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 5, p.35-54, 2016.
- (33) BARISCI, J. N., INNIS, P. C., KANE-MAGUIRE, L. A. P., NORRIS, I. D., WALLACE, G. G., Preparation of chiral conducting polymer colloids. **Synthetic Metals**, v. 84, p.181-182, 1997.
- (34) ASAVAPIRIYANONT, S., CHANDLER, G. K., GUNAWARDENA, G. A., PLETCHER, D., The electrodeposition of polypyrrole films from aqueous solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 177, p.229-244, 1984.
- (35) SHARIFI-VIAND, A., MAHJANI, M. G., JAFARIAN, M., Determination of fractal rough surface of polypyrrole film: AFM and electrochemical analysis. **Synthetic Metals**, v. 191, p.104-112, 2014.
- (36) HEINZE, J., RASCHE, A., PAGELS, M., GESCHKE, B., On the Origin of the So-Called Nucleation Loop during Electropolymerization of Conducting Polymers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, p.989-997, 2007.
- (37) SHAN, J., YUAN, C., ZHANG, H., Morphology and microstructure of polypyrrole formed by electrochemical polymerization. **Thin Solid Films**, v. 301, p.23-27, 1997.
- (38) KIANI, M. S., MITCHELL, G. R., The role of the counter-ion in the preparation of polypyrrole films with enhanced properties using a pulsed electrochemical potential. **Synthetic Metals**, v. 48, p.203-218, 1992.
- (39) ZHOU, M., HEINZE, J., Electropolymerization of pyrrole and electrochemical study of polypyrrole: 1. Evidence for structural diversity of polypyrrole. **Electrochimica Acta**, v. 44, p.1733-1748, 1999.

- (40) DUBAL, D. P., LEE, S. H., KIM, J. G., KIM, W. B., LOKHANDE, C. D., Porous polypyrrole clusters prepared by electropolymerization for a high performance supercapacitor. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p.3044-3052, 2012.
- (41) CHEN, G., TALLMAN, D. E., BIERWAGEN, G. P., Unusual microstructures formed during the mediated electrodeposition of polypyrrole on Al 2024-T3 at low current densities. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 8, p.505-510, 2004.
- (42) PATRA, S., BARAI, K., MUNICHANDRAIAH, N., Scanning electron microscopy studies of PEDOT prepared by various electrochemical routes. **Synthetic Metals**, v. 158, p.430-435, 2008.
- (43) KAUR, A., DHILLON, A., AVASTHI, D. K., Effect of 100 MeV swift heavy ions [silver (Ag^{8+})] on morphological and electrical properties of polypyrrole. **Journal of Applied Physics**, v. 106, p.73715, 2009.
- (44) DA CRUZ, A. G. B., WARDELL, J. L., RANGEL, M. V. D., SIMÃO, R. A., ROCCO, A. M., Preparation and characterization of a polypyrrole hybrid film with $[\text{Ni}(\text{dmit})_2]^{2-}$, bis(1,3-dithiole-2-thione-4,5-dithiolate)nickellate(II). **Synthetic Metals**, v. 157, p.80-90, 2007.
- (45) DA CRUZ, A. G. B., WARDELL, J. L., ROCCO, A. M., A novel material obtained by electropolymerization of polypyrrole doped with $[\text{Sn}(\text{dmit})_3]^{2-}$, [tris(1,3-dithiole-2-thione-4,5-dithiolato)-stannate] $^{2-}$. **Synthetic Metals**, v. 156, p.396-404, 2006.
- (46) PASSOS, M. S., QUEIROS, M. A., LE GALL, T., IBRAHIM, S. K., PICKETT, C. J., Solid-phase chemistry of electropolymers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 435, p.189-203, 1997.
- (47) LI, X., WANG, Y., YANG, X., CHEN, J., FU, H., CHENG, T., Conducting polymers in environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 39, p.163-179, 2012.
- (48) VAN DE VELDE, L., D'ANGREMONT, E., OLTHUIS, W., Solid contact potassium selective electrodes for biomedical applications – a review. **Talanta**, v. 160, p.56-65, 2016.
- (49) CHAUBEY, A., GERARD, M., SINGHAL, R., SINGH, V. S., MALHOTRA, B. D., Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole–polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 46, p.723-729, 2001.
- (50) MISHRA, A., GREAVES, R., MASSIE, J., The Limitations of Sweat Electrolyte Reference Intervals for the Diagnosis of Cystic Fibrosis: A Systematic Review. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 28, p.60-76, 2007.
- (51) HU, J., STEIN, A., BÜHLMANN, P., Rational design of all-solid-state ion-selective electrodes and reference electrodes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p.102-114, 2016.
- (52) BOBACKA, J., Conducting Polymer-Based Solid-State Ion-Selective Electrodes. **Electroanalysis**, v. 18, p.7-18, 2006.

- (53) BAKKER, E., PRETSCH, E., BÜHLMANN, P., Selectivity of Potentiometric Ion Sensors. **Analytical Chemistry**, v. 72, p.1127-1133, 2000.
- (54) LINDNER, E., PENDLEY, B. D., A tutorial on the application of ion-selective electrode potentiometry: An analytical method with unique qualities, unexplored opportunities and potential pitfalls; Tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 762, p.1-13, 2013.
- (55) FERNANDES, J. C. B., KUBOTA, L. T., OLIVEIRA NETO, G. D., Eletrodos íon-seletivos: histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão dos conceitos. **Química Nova**, v. 24, p.120-130, 2001.
- (56) LINDNER, E., TÓTH, K., To the Memory of Ernő Pungor: A Subjective View on the History of Ion-Selective Electrodes. **Electroanalysis**, v. 21, p.1887-1894, 2009.
- (57) MOODY, G. J., OKE, R. B., THOMAS, J. D. R., A calcium-sensitive electrode based on a liquid ion exchanger in a poly(vinyl chloride) matrix. **Analyst**, v. 95, p.910-918, 1970.
- (58) MICHALSKA, A., Optimizing the analytical performance and construction of ion-selective electrodes with conducting polymer-based ion-to-electron transducers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p.391-406, 2006.
- (59) BENDIKOV, T. A., HARMON, T. C., A Sensitive Nitrate Ion-Selective Electrode from a Pencil Lead. An Analytical Laboratory Experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 82, p.439, 2005.
- (60) NORONHA, B. V., BINDEWALD, E. H., DE OLIVEIRA, M. C., PAPI, M. A. P., BERGAMINI, M. F., MARCOLINO-JR, L. H., Potentiometric determination of pantoprazole using an ion-selective sensor based on polypyrrole doped films. **Materials Science and Engineering: C**, v. 43, p.517-520, 2014.
- (61) BINDEWALD, E. H., BERGAMINI, M. F., MARCOLINO-JR, L. H., Disposable Solid-State Sensor Based on Polypyrrole Films Doped for Potentiometric Determination of Dipyrone in Human Urine and Pharmaceuticals Products. **Electroanalysis**, v. 25, p.1535-1540, 2013.
- (62) LAMY-MENDES, A. C., BINDEWALD, E. H., PAPI, M. A. P., MARCOLINO-JR, L. H., BERGAMINI, M. F., Filmes de polipirrol aplicados no desenvolvimento de eletrodos descartáveis seletivos a íons fluoreto. **Polímeros**, v. 24, p.508-513, 2014.
- (63) OLIVEIRA, M. C., BINDEWALD, E. H., MARCOLINO, L. H., BERGAMINI, M. F., Potentiometric determination of Diclofenac using an ion-selective electrode prepared from polypyrrole films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 732, p.11-16, 2014.
- (64) OCHIAI, L. M., BINDEWALD, E. H., MENGARDA, P., MARCOLINO-JUNIOR, L. H., BERGAMINI, M. F., Disposable potentiometric citrate sensor based on polypyrrole-doped films for indirect determination of sildenafil in pharmaceuticals formulations. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, p.43762, 2016.
- (65) WANG, J., **Analytical Electrochemistry**. Weinheim: Wiley, 2004.

- (66) BOBACKA, J., IVASKA, A., LEWENSTAM, A., Potentiometric Ion Sensors. **Chemical Reviews**, v. 108, p.329-351, 2008.
- (67) BAKKER, E., PRETSCH, E., Modern Potentiometry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, p.5660-5668, 2007.
- (68) GUGGENHEIM, E. A., The Conceptions of Electrical Potential Difference between Two Phases and the Individual Activities of Ions. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 33, p.842-849, 1928.
- (69) SCHWABE, K., SUSCHKE, H. D., Theories of the Glass Electrode. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 3, p.36-46, 1964.
- (70) EISENMAN, G. Theory of membrane electrode potentials: an examination of parameters determining the selectivity of solid and liquid ion exchangers and of neutral ion-sequestering molecules. In: DURST, R. A. (Ed.). **Ion-selective Electrodes: Proceedings**. U.S. National Bureau of Standards, Washington DC, 1969. p. 1-56.
- (71) BUCK, R. P., LINDNER, E.. Recommendations for nomenclature of ion selective electrodes (IUPAC Recommendations 1994). **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 2527-2536, 1994.
- (72) SOKALSKI, T., LINGENFELTER, P., LEWENSTAM, A., Numerical Solution of the Coupled Nernst–Planck and Poisson Equations for Liquid Junction and Ion Selective Membrane Potentials. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, p.2443-2452, 2003.
- (73) JASIELEC, J. J., SOKALSKI, T., FILIPEK, R., LEWENSTAM, A., Neutral-Carrier Ion-Selective Electrodes Assessed by the Nernst–Planck–Poisson Model. **Analytical Chemistry**, v. 87, p.8665-8672, 2015.
- (74) LU, B., HOLST, M. J., ANDREW MCCAMMON, J., ZHOU, Y. C., Poisson–Nernst–Planck equations for simulating biomolecular diffusion–reaction processes I: Finite element solutions. **Journal of Computational Physics**, v. 229, p.6979-6994, 2010.
- (75) BOLINTINEANU, D. S., SAYYED-AHMAD, A., DAVIS, H. T., KAZNESSIS, Y. N., Poisson-Nernst-Planck Models of Nonequilibrium Ion Electrodifusion through a Protegrin Transmembrane Pore. **PLOS Computational Biology**, v. 5, p.e1000277, 2009.
- (76) BANDODKAR, A. J., JEERAPAN, I., WANG, J., Wearable Chemical Sensors: Present Challenges and Future Prospects. **ACS Sensors**, v. 1, p.464-482, 2016.
- (77) LIU, W., LIN, J.-M., Online Monitoring of Lactate Efflux by Multi-Channel Microfluidic Chip-Mass Spectrometry for Rapid Drug Evaluation. **ACS Sensors**, v. 1, p.344-347, 2016.
- (78) TUR-GARCÍA, E. L., DAVIS, F., COLLYER, S. D., HOLMES, J. L., BARR, H., HIGSON, S. P. J., Novel flexible enzyme laminate-based sensor for analysis of lactate in sweat. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 242, p.502-510, 2017.

- (79) MAUGHAN, R., GLEESON, M., GREENHAFF, P. L., **Bioquímica do exercício e do treinamento**. São Paulo: Manole, 2000.
- (80) SOLA-PENNA, M., DA SILVA, D., COELHO, W. S., MARINHO-CARVALHO, M. M., ZANCAN, P., Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism. **IUBMB Life**, v. 62, p.791-796, 2010.
- (81) YANG, H., WU, J., GUO, R., PENG, Y., ZHENG, W., LIU, D., SONG, Z., Glycolysis in energy metabolism during seizures. **Neural Regeneration Research**, v. 8, p.1316-1326, 2013.
- (82) FERRARO, E., GIAMMARIOLI, A. M., CHIANDOTTO, S., SPOLETINI, I., ROSANO, G., Exercise-Induced Skeletal Muscle Remodeling and Metabolic Adaptation: Redox Signaling and Role of Autophagy. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, p.154-176, 2014.
- (83) ROSE, A. J., RICHTER, E. A., Skeletal Muscle Glucose Uptake During Exercise: How is it Regulated? **Physiology**, v. 20, p.260-270, 2005.
- (84) O'CONNELL, J. M., WEIR, J. M., MACINTOSH, B. R., Blood lactate accumulation decreases during the slow component of oxygen uptake without a decrease in muscular efficiency. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 469, p.1257-1265, 2017.
- (85) BENEKE, R., LEITHÄUSER, R. M., OCHENTEL, O., Blood Lactate Diagnostics in Exercise Testing and Training. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 6, p.8-24, 2011.
- (86) SARDESAI, N. P., GANESANA, M., KARIMI, A., LEITER, J. C., ANDREESCU, S., Platinum-Doped Ceria Based Biosensor for in Vitro and in Vivo Monitoring of Lactate during Hypoxia. **Analytical Chemistry**, v. 87, p.2996-3003, 2015.
- (87) PUNDIR, C. S., NARWAL, V., BATRA, B., Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p.777-790, 2016.
- (88) ALI ALMARWAEY, O., MARK JONES, A., TOLFREY, K., Physiological Correlates with Endurance Running Performance in Trained Adolescents. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 35, p.480-487, 2003.
- (89) MARTÍ, R., VARELA, E., SEGURA, R. M., ALEGRE, J., SURIÑACH, J. M., PASCUAL, C., Determination of d-lactate by enzymatic methods in biological fluids: study of interferences. **Clinical Chemistry**, v. 43, p.1010-1015, 1997.
- (90) THOMAS, N., LÄHDESMÄKI, I., PARVIZ, B. A., A contact lens with an integrated lactate sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 162, p.128-134, 2012.
- (91) YAO, H., SHUM, A. J., COWAN, M., LÄHDESMÄKI, I., PARVIZ, B. A., A contact lens with embedded sensor for monitoring tear glucose level. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p.3290-3296, 2011.

- (92) HARVEY, C. J., LÉBOUF, R. F., STEFANIAK, A. B., Formulation and stability of a novel artificial human sweat under conditions of storage and use. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p.1790-1796, 2010.
- (93) BANDODKAR, A. J., JIA, W., WANG, J., Tattoo-Based Wearable Electrochemical Devices: A Review. **Electroanalysis**, v. 27, p.562-572, 2015.
- (94) PANKRATOV, D., GONZÁLEZ-ARRIBAS, E., BLUM, Z., SHLEEV, S., Tear Based Bioelectronics. **Electroanalysis**, v. 28, p.1250-1266, 2016.
- (95) DE GRAAF, D. B., ABBAS, Y., GERRIT BOMER, J., OLTHUIS, W., VAN DEN BERG, A., Sensor-actuator system for dynamic chloride ion determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 888, p.44-51, 2015.
- (96) JARUJAMRUS, P., MALAHOM, N., PUCHUM, S., MEELAPSOM, R., AMATATONGCHAI, M., SIRIPINYANOND, A., CHAIRAM, S., KULSING, C., Complexometric and argentometric titrations using thread-based analytical devices. **Talanta**, v. 183, p.228-236, 2018.
- (97) YAKOH, A., RATTANARAT, P., SIANGPROH, W., CHAILAPAKUL, O., Simple and selective paper-based colorimetric sensor for determination of chloride ion in environmental samples using label-free silver nanoprisms. **Talanta**, v. 178, p.134-140, 2018.
- (98) BUJES-GARRIDO, J., ARCOS-MARTÍNEZ, M. J., Development of a wearable electrochemical sensor for voltammetric determination of chloride ions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p.224-228, 2017.
- (99) GAO, X., ZHANG, J., YANG, Y., DENG, H., Fabrication and Performance of All-Solid-State Chloride Sensors in Synthetic Concrete Pore Solutions. **Sensors**, v. 10, p.10226, 2010.
- (100) AKINYEMI, J. O., SOULEY, S. O., Monitoring the Quality of Some Sources of Irrigation Water in Different Parts of Ogun State, Nigeria. **IERI Procedia**, v. 9, p.123-128, 2014.
- (101) JIN, M., GAO, S., JIANG, L., CHU, H., LU, M., ZHI, F. F., Degradation of concrete with addition of mineral admixture due to free chloride ion penetration under the effect of carbonation. **Corrosion Science**, v. 138, p.42-53, 2018.
- (102) RIORDAN, J., ROMMENS, J., KEREM, B., ALON, N., ROZMAHEL, R., GRZELCZAK, Z., ZIELENSKI, J., LOK, S., PLAVSIC, N., CHOU, J., AL., E., Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. **Science**, v. 245, p.1066-1073, 1989.
- (103) GENTZSCH, M., MALL, M. A., Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis. **CHEST**, v.154, p.383-393, 2018.
- (104) CALELLA, P., VALERIO, G., BRODLIE, M., DONINI, L. M., SIERVO, M., Cystic fibrosis, body composition, and health outcomes: a systematic review. **Nutrition**, v. 55, p.131-139, 2018.

- (105) RIORDAN, J. R., CFTR Function and Prospects for Therapy. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p.701-726, 2008.
- (106) DALCIN, P. D. T. R., ABREU E SILVA, F. A. D., Fibrose cística no adulto: aspectos diagnósticos e terapêuticos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, p.107-117, 2008.
- (107) SPOONHOWER, K. A., DAVIS, P. B., Epidemiology of Cystic Fibrosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 37, p.1-8, 2016.
- (108) SERVIDONI, M. F., GOMEZ, C. C. S., MARSON, F. A. L., TORO, A. A. D. C., RIBEIRO, M. Â. G. D. O., RIBEIRO, J. D., RIBEIRO, A. F., Sweat test and cystic fibrosis: overview of test performance at public and private centers in the state of São Paulo, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, p.121-128, 2017.
- (109) ATHANAZIO, R. A., SILVA FILHO, L. V. R. F. D., VERGARA, A. A., RIBEIRO, A. F., RIEDI, C. A., PROCIANOY, E. D. F. A., ADDE, F. V., REIS, F. J. C., RIBEIRO, J. D., TORRES, L. A., FUCCIO, M. B. D., EPIFANIO, M., FIRMIDA, M. D. C., DAMACENO, N., LUDWIG-NETO, N., MARÓSTICA, P. J. C., RACHED, S. Z., MELO, S. F. D. O., Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, p.219-245, 2017.
- (110) MINISTÉRIO DA SAÚDE. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) - Relatório nº 42. **Teste do Suor com Dosagem de Cloreto para Diagnóstico da Fibrose Cística**. Disponível em: <<http://conitec.gov.br/relatorios-de-recomendação-da-conitec>> Acesso em: 31 jul. 2018.
- (111) GIBSON, L. E., COOKE, R. E., A TEST FOR CONCENTRATION OF ELECTROLYTES IN SWEAT IN CYSTIC FIBROSIS OF THE PANCREAS UTILIZING PILOCARPINE BY IONTOPHORESIS. **Pediatrics**, v. 23, p.545-549, 1959.
- (112) LEGRYS, V. A., YANKASKAS, J. R., QUITTELL, L. M., MARSHALL, B. C., MOGAYZEL, P. J., JR., Diagnostic Sweat Testing: The Cystic Fibrosis Foundation Guidelines. **The Journal of Pediatrics**, v. 151, p.85-89, 2007.
- (113) MATTAR, A. C. V., GOMES, E. N., ADDE, F. V., LEONE, C., RODRIGUES, J. C., Comparação entre o método clássico de Gibson e Cooke e o teste da condutividade no suor em pacientes com e sem fibrose cística. **Jornal de Pediatria**, v. 86, p.109-114, 2010.
- (114) GONZALO-RUIZ, J., MAS, R., DE HARO, C., CABRUJA, E., CAMERO, R., ALONSO-LOMILLO, M. A., MUÑOZ, F. J., Early determination of cystic fibrosis by electrochemical chloride quantification in sweat. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p.1788-1791, 2009.
- (115) MU, X., XIN, X., FAN, C., LI, X., TIAN, X., XU, K.-F., ZHENG, Z., A paper-based skin patch for the diagnostic screening of cystic fibrosis. **Chemical Communications**, v. 51, p.6365-6368, 2015.

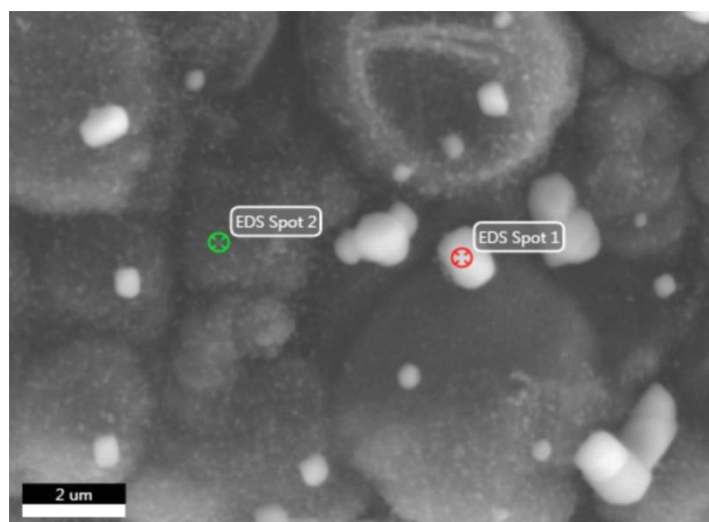
- (116) DE MATTEIS, V., CANNAVALE, A., BLASI, L., QUARTA, A., GIGLI, G., Chromogenic device for cystic fibrosis precocious diagnosis: A “point of care” tool for sweat test. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 225, p.474-480, 2016.
- (117) ESTEVES, C. Z., DE AGUIAR DIAS, L., DE OLIVEIRA LIMA, E., DE OLIVEIRA, D. N., RODRIGUES MELO, C. F. O., DELAFIORI, J., SOUZA GOMEZ, C. C., RIBEIRO, J. D., RIBEIRO, A. F., LEVY, C. E., CATHARINO, R. R., Skin Biomarkers for Cystic Fibrosis: A Potential Non-Invasive Approach for Patient Screening. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, p.1-8, 2018.
- (118) JAVAID, M. A., AHMED, A. S., DURAND, R., TRAN, S. D., Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, p.67-76, 2016.
- (119) CATALÁN, M. A., NAKAMOTO, T., GONZALEZ-BEGNE, M., CAMDEN, J. M., WALL, S. M., CLARKE, L. L., MELVIN, J. E., Cfr and ENaC ion channels mediate NaCl absorption in the mouse submandibular gland. **The Journal of Physiology**, v. 588, p.713-724, 2010.
- (120) NIE, S., ZHANG, H., MAYER, K. M., OPPENHEIM, F. G., LITTLE, F. F., GREENBERG, J., ULUER, A. Z., WALT, D. R., Correlations of Salivary Biomarkers with Clinical Assessments in Patients with Cystic Fibrosis. **PLOS ONE**, v. 10, p.e0135237, 2015.
- (121) GONÇALVES, A. C., MARSON, F. A. L., MENDONÇA, R. M. H., BERTUZZO, C. S., PASCHOAL, I. A., RIBEIRO, J. D., RIBEIRO, A. F., LEVY, C. E., Chloride and sodium ion concentrations in saliva and sweat as a method to diagnose cystic fibrosis. **Jornal de Pediatria**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2018.04.005>.
- (122) MURUBE, J., Basal, Reflex, and Psycho-emotional Tears. **The Ocular Surface**, v. 7, p.60-66, 2009.
- (123) FUJII, M., ARII, K., YOSHINO, K., Branching Patterns of a Conducting Polymer Polymerized Electrochemically with a Constant-Current Source. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 140, p.1838-1842, 1993.
- (124) RAMESH KUMAR, M., RYMAN, S., TAREQ, O., BUCHANAN, D. A., FREUND, M. S., Chemical diversity in electrochemically deposited conducting polymer-based sensor arrays. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p.600-608, 2014.
- (125) BANU, A., MARCU, M., ALEXANDRESCU, E., ANGHEL, E. M., Electrochemical deposition and characterization of polypyrrole coatings doped with nickel cobalt oxide for environmental applications. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 18, p.2661-2671, 2014.
- (126) DONG, S., CHE, G., An electrochemical microsensor for chloride. **Talanta**, v. 38, p.111-114, 1991.
- (127) DARYAKENARI, A. A., APOSTOLUK, A., ARADILLA, D., SADKI, S., DELAUNAY, J.-J., Pulse electropolymerization synthesis of PPy(DBS) nanoparticle layers. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 19, p.655-661, 2014.

- (128) CHEN, G., TALLMAN, D. E., BIERWAGEN, G. P., Unusual microstructures formed during the mediated electrodeposition of polypyrrole on Al 2024-T3 at low current densities. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 8, p.505-510, 2003.
- (129) SEYFODDIN, A., CHAN, A., CHEN, W. T., RUPENTHAL, I. D., WATERHOUSE, G. I. N., SVIRSKIS, D., Electro-responsive macroporous polypyrrole scaffolds for triggered dexamethasone delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p.419-426, 2015.
- (130) SILK, T., HONG, Q., TAMM, J., COMPTON, R. G., AFM studies of polypyrrole film surface morphology I. The influence of film thickness and dopant nature. **Synthetic Metals**, v. 93, p.59-64, 1998.
- (131) SONG, Y., BHUSHAN, B., Atomic force microscopy dynamic modes: modeling and applications. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 20, p.225012, 2008.
- (132) TAKAHASHI, T., ONO, S., Tip-to-sample distance dependence of an electrostatic force in KFM measurements. **Ultramicroscopy**, v. 100, p.287-292, 2004.
- (133) ZHAO, X., ZHAO, Z., YANG, M., XIA, H., YU, T., SHEN, X., Developing Polymer Cathode Material for the Chloride Ion Battery. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, p.2535-2540, 2017.
- (134) FU, Y., SU, Y.-S., MANTHIRAM, A., Sulfur-Polypyrrole Composite Cathodes for Lithium-Sulfur Batteries. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 159, p.A1420-A1424, 2012.
- (135) CASSANAS, G., MORSSLI, M., FABRÈGUE, E., BARDET, L., Vibrational spectra of lactic acid and lactates. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 22, p.409-413, 1991.
- (136) CROUCH, S. R., HOLLER, F. J., **Fundamentos de química analítica**, Pioneira Thomson Learning, 2006.
- (137) DE PAOLI, M.-A., PERES, R. C. D., PANERO, S., SCROSATI, B., Properties of electrochemically synthesized polymer electrodes—X. Study of polypyrrole/dodecylbenzene sulfonate. **Electrochimica Acta**, v. 37, p.1173-1182, 1992.
- (138) LINDFORS, T., BOBACKA, J., IVASKA, A., Electrosynthesis of polypyrrole in iodide solution. Film growth, redox behaviour and potentiometric response. **Analytica Chimica Acta**, v. 355, p.217-225, 1997.
- (139) YUAN, R., TANG, D., CHAI, Y., ZHANG, L., LIU, Y., ZHONG, X., DAI, J., Highly sensitive potentiometric immunosensor for hepatitis B surface antigen diagnosis. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 48, p.49-57, 2005.
- (140) ELNEMMA, E. M., HAMADA, M. A., HASSAN, S. S. M., Liquid and poly (vinyl chloride) matrix membrane electrodes for the selective determination of cocaine in illicit powders. **Talanta**, v. 39, p.1329-1335, 1992.

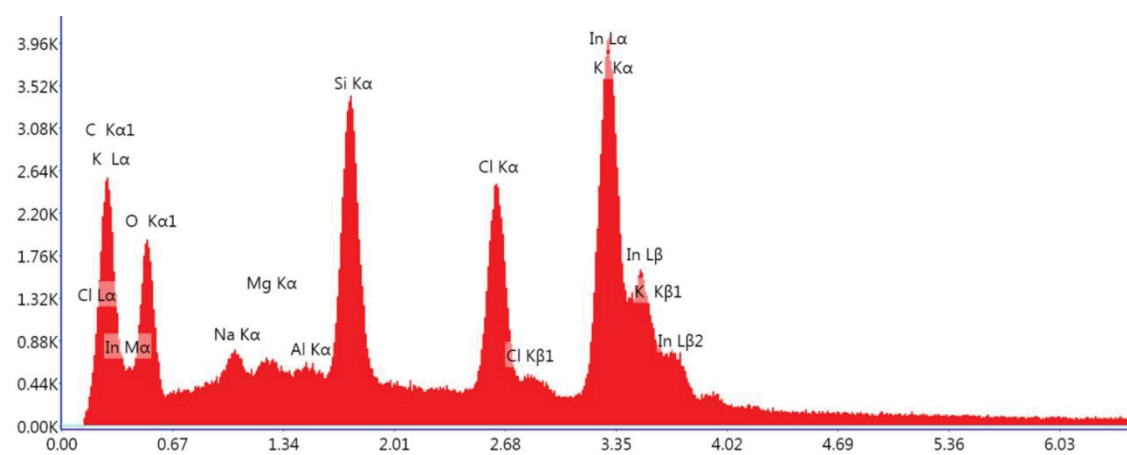
- (141) SCHOLZ, F., **Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications**, Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- (142) IBUPOTO, Z. H., SHAH, S. M. U. A., KHUN, K., WILLANDER, M., Electrochemical L-lactic acid sensor based on immobilized ZnO nanorods with lactate oxidase. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, p.2456-2466, 2012.
- (143) SUMAN, S., SINGHAL, R., SHARMA, A. L., MALTHOTRA, B. D., PUNDIR, C. S., Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 107, p.768-772, 2005.
- (144) CHAUBEY, A., PANDE, K. K., PANDEY, M. K., SINGH, V. S., Signal amplification by substrate recycling on polyaniline/lactate oxidase/lactate dehydrogenase bienzyme electrodes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 96, p.239-248, 2001.
- (145) LEWENSTAM, A., MAJ-ZURAWSKA, M., HULANICKI, A., Application of ion-selective electrodes in clinical analysis. **Electroanalysis**, v. 3, p.727-734, 1991.
- (146) WIESE, J., DIDWANIA, A., KERZNER, R., CHERNOW, B., Use of different anticoagulants in test tubes for analysis of blood lactate concentrations: Part 2. Implications for the proper handling of blood specimens obtained from critically ill patients. **Critical Care Medicine**, v. 25, p.1847-1850, 1997.
- (147) VOLTARELLI, F. A., GOBATTO, C. A., MELLO, M. A. R. D., Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p.1389-1394, 2002.
- (148) DE ARAUJO, G. G., PAPOTI, M., DE BARROS MANCHADO, F., DE MELLO, M. A. R., GOBATTO, C. A., Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, p.888-892, 2007.
- (149) PANVELOSKI-COSTA, A. C., PAPOTI, M., MOREIRA, R. J., SERAPHIM, P. M., Respostas lactacidêmicas de ratos ao treinamento intermitente de alta intensidade. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, p.122-125, 2012.
- (150) RIVAS, E., SMITH, J. D., SHERMAN, N. W., Leg compressions improve ventilatory efficiency while reducing peak and post exercise blood lactate, but does not improve perceived exertion, exercise economy or aerobic exercise capacity in endurance-trained runners. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 237, p.1-6, 2017.
- (151) DONG, S., SUN, Z., LU, Z., Chloride chemical sensor based on an organic conducting polypyrrole polymer. **Analyst**, v. 113, p.1525-1528, 1988.
- (152) DANG, W., MANJAKKAL, L., NAVARAJ, W. T., LORENZELLI, L., VINCIGUERRA, V., DAHIYA, R., Stretchable wireless system for sweat pH monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 107, p.192-202, 2018.

- (153) JOHANSSON, A.-K., NORRING, C., UNELL, L., JOHANSSON, A., Eating disorders and biochemical composition of saliva: a retrospective matched case-control study. **European Journal of Oral Sciences**, v. 123, p.158-164, 2015.
- (154) LIU, J., SUN, S., SHANG, H., LAI, J., ZHANG, L., Electrochemical Biosensor Based on Bienzyme and Carbon Nanotubes Incorporated into an Os-complex Thin Film for Continuous Glucose Detection in Human Saliva. **Electroanalysis**, v. 28, p.2016-2021, 2016.
- (155) SARIRI, R., GHAFOORI, H., Tear proteins in health, disease, and contact lens wear. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, p.381-392, 2008.
- (156) ZHOU, L., BEUERMAN, R. W., Tear analysis in ocular surface diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 31, p.527-550, 2012.
- (157) ALGHADYAN, A., ALJINDAN, M., ALHUMEIDAN, A., KAZI, G., MCMHON, R., Lacrimal glands in cystic fibrosis. **Saudi Journal of Ophthalmology**, v. 27, p.113-116, 2013.
- (158) BERCEZELI, O., VIZVÁRI, E., KATONA, M., TÖRÖK, D., SZALAY, L., RÁROSI, F., NÉMETH, I., RAKONCZAY, Z., HEGYI, P., DING, C., TÓTH-MOLNÁR, E., Novel insight into the role of CFTR in lacrimal gland duct function in mice. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 59, p.54-62, 2018.
- (159) ROSENSTEIN, B. J., WHAT IS A CYSTIC FIBROSIS DIAGNOSIS? **Clinics in Chest Medicine**, v. 19, p.423-441, 1998.

ANEXO 1 – ANÁLISE ELEMENTAR PONTUAL DA REGIÃO “1” OBTIDA A PARTIR DE FILME DE PPI:LAC



EDS Região 1



ic: 30.0 0 Cnts 0.000 keV Det: Apollo XL-SDD Det

APÊNDICE 1 – DIREITOS AUTORAIS DAS IMAGENS UTILIZADAS NA TESE

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS	
Nov 21, 2018	
This Agreement between Priscilla Mengarda ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.	
License Number	4473820846144
License date	Nov 21, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Applied Materials Today
Licensed Content Title	Applications of conducting polymer composites to electrochemical sensors: A review
Licensed Content Author	Malenahalli Halappa Naveen, Nanjanagudu Ganesh Gurudatt, Yoon-Bo Shim
Licensed Content Date	Dec 1, 2017
Licensed Content Volume	9
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	15
Start Page	419
End Page	433
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Original figure numbers	Figure 2
Title of your thesis/dissertation	DESENVOLVIMENTO DE SENSORES POTENCIOMÉTRICOS BASEADOS EM FILMES DE POLIPIRROL PARA DETECÇÃO DE LACTATO E CLORETO EM AMOSTRAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS
Expected completion date	Dec 2018
Estimated size (number of pages)	130
Requestor Location	Priscilla Mengarda Rua Goiânia, 1253 Curiúba, PR 82940150 Brazil Attn: Priscilla Mengarda
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

<https://is100.copyright.com/AppDispatchServlet>

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS	
Nov 21, 2018	
13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.	
14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.	
LIMITED LICENSE	
The following terms and conditions apply only to specific license types:	
15. Translation: This permission is granted for non-exclusive world English rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.	
16. Posting licensed content on any Website: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at http://www.elsevier.com ; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu. Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at http://www.elsevier.com . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.	
Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.	
17. For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above:	
Preprints: A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.). Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).	
If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.	
Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.	

<https://is100.copyright.com/AppDispatchServlet>

INTRODUCTION	
1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at http://myaccount.copyright.com).	
GENERAL TERMS	
2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.	
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows: "Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit: "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."	
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.	
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.	
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.	
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.	
8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.	
9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.	
10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.	
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.	
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).	

<https://is100.copyright.com/AppDispatchServlet>

INTRODUCTION	
Authors can share their accepted author manuscript:	
<ul style="list-style-type: none"> • immediately <ul style="list-style-type: none"> ◦ via their non-commercial person homepage or blog ◦ by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript ◦ via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group ◦ directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use ◦ for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement • After the embargo period <ul style="list-style-type: none"> ◦ via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository ◦ via commercial sites with which Elsevier has an agreement 	
In all cases accepted manuscripts should:	
<ul style="list-style-type: none"> • link to the formal publication via its DOI • bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do • if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way that appear more like, or to substitute for, the published journal article. 	
Published journal article (JPA): A published journal article (JPA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.	
Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:	
Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version. Theses and dissertations which contain embedded JPAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.	
If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.	
Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.	
Please refer to Elsevier's posting policy for further information.	
18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. Posting to a repository: Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.	
19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded JPAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.	

<https://is100.copyright.com/AppDispatchServlet>

21/11/2018

RightsLink Printable License

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.9

Questions? customer-care@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

21/11/2018

RightsLink Printable License

**SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 21, 2018

This Agreement between Priscilla Mengarda ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number 4473830937095
 License date Nov 21, 2018
 Licensed Content Publisher Springer Nature
 Licensed Content Publication Journal of Solid State Electrochemistry
 Licensed Content Title Unusual microstructures formed during the mediated electrodeposition of polypyrrole on Al 2024-T3 at low current densities
 Licensed Content Author Guoliang Chen, Dennis E. Tallman, Gordon P. Bierwagen
 Licensed Content Date Jan 1, 2003
 Licensed Content Volume 8
 Licensed Content Issue 7
 Type of Use Thesis/Dissertation
 Requestor type academic/university or research institute
 Format print and electronic
 Portion figures/tables/illustrations
 Number of figures/tables/illustrations 1
 Will you be translating? yes, without original language
 Number of languages 1
 Circulation/distribution <501
 Author of this Springer Nature content no
 Title DESENVOLVIMENTO DE SENSORES POTENCIOMÉTRICOS BASEADOS EM FILMES DE POLIPIRROL PARA DETECÇÃO DE LACTATO E CLORETO EM AMOSTRAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS
 Institution name Universidade Federal do Paraná
 Expected presentation date Dec 2018
 Portions Fig.5
 Specific Languages Portuguese
 Requestor Location Priscilla Mengarda
 Rua Goiania, 1253
 Curitiba, PR 82940150
 Brazil
 Attn: Priscilla Mengarda
 Billing Type Invoice
 Billing Address Priscilla Mengarda
 Rua Goiania, 1253

https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet

13

21/11/2018

RightsLink Printable License

 Curitiba, Brazil 82940150
 Attn: Priscilla Mengarda

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

- The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).
 If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
- Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic reuse.
- Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
- A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
- Where '**reuse in a dissertation/thesis**' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
- Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
- Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
- The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
- Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
- Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet

23

21/11/2018

RightsLink Printable License

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.1

Questions? customer-care@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet

33

20/01/2019

RightsLink Printable License

**Royal Society of Chemistry LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 20, 2019

This is a License Agreement between Priscilla Mengarda ("You") and Royal Society of Chemistry ("Royal Society of Chemistry") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Royal Society of Chemistry, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	4473860028828
License date	Nov 21, 2018
Licensed content publisher	Royal Society of Chemistry
Licensed content title	Journal of materials chemistry
Licensed content date	Jan 1, 1991
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Academic institution
Format	Print, Electronic
Portion	chart/graph/table/figure
Number of charts/graphs/tables/figures	1
The requesting person/organization is:	Priscilla Mengarda
Title or numeric reference of the portion(s)	Figure 2(a)
Title of the article or chapter the portion is from	Porous polypyrrole clusters prepared by electropolymerization for a high performance supercapacitor
Editor of portion(s)	N/A
Author of portion(s)	N/A
Volume of serial or monograph.	N/A
Page range of the portion	3046
Publication date of portion	2012
Rights for	Main product and any product related to main product
Duration of use	Life of current edition
Creation of copies for the disabled	no
With minor editing privileges	no
For distribution to	Worldwide
In the following language(s)	Original language of publication
With incidental promotional use	no
The lifetime unit quantity of new product	Up to 499
Title	DESENVOLVIMENTO DE SENSORES POTENCIOMÉTRICOS BASEADOS EM FILMES DE POLIPÍRROL PARA DETECÇÃO DE LACTATO E CLORETO EM AMOSTRAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS

<https://i100.copyright.com/CustomerAdminPLF.jsp?ref=30b1c5a-ea8f-4db4-a3d3-392a630963f>

15

20/01/2019

RightsLink Printable License

Institution name	Universidade Federal do Paraná
Expected presentation date	Dec 2018
Billing Type	Invoice
Billing Address	Priscilla Mengarda Rua Goiania, 1253

Curitiba, Brazil 82940150
Attn: Priscilla Mengarda

Total (may include CCC user 0.00 USD fee)

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

The following terms are individual to this publisher:

None

Other Terms and Conditions:

STANDARD TERMS AND CONDITIONS

1. Description of Service. Defined Terms. This Reproduction License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republication", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.

2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.

3. Scope of Licenses; Limitations and Obligations.

3.1 All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.

3.2 General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, 2918 Network Place, Chicago, IL 60673-1291. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.

3.3 Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-

<https://i100.copyright.com/CustomerAdminPLF.jsp?ref=30b1c5a-ea8f-4db4-a3d3-392a630963f>

25

20/01/2019

RightsLink Printable License

exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).

3.4 In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.

3.5 Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright], permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

3.6 User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.

5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.

6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE

<https://i100.copyright.com/CustomerAdminPLF.jsp?ref=30b1c5a-ea8f-4db4-a3d3-392a630963f>

35

20/01/2019

RightsLink Printable License

WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

7. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price; therefore, any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

8. Miscellaneous.

8.1 User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.

8.2 Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here: <http://www.copyright.com/content/cc3/en/tools/footer/privacy-policy.html>.

8.3 The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

8.4 No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.

8.5 The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to info@copyright.com.

v 1.1

Questions? customerare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

<https://i100.copyright.com/CustomerAdminPLF.jsp?ref=30b1c5a-ea8f-4db4-a3d3-392a630963f>

45