**Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos**

Thiago Pinotti Segato

**Avanços no processo de fabricação de microdispositivos
analíticos e em seu acoplamento com a detecção
condutométrica sem contato**

**São Carlos
2011**

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

São Carlos, 12 de julho de 2011

Thiago Pinotti Segato

Thiago Pinotti Segato

**Avanços no processo de fabricação de microdispositivos
analíticos e em seu acoplamento com a detecção
condutométrica sem contato**

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de doutor em ciências.

Área de Concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo.

Dedico esta tese às pessoas mais importantes de
minha vida: Deus, meus pais Milton e Teresa e
minha irmã Milena.

Agradecimentos

- ✧ Ao Prof. Luiz Henrique Mazo pela oportunidade e os ensinamentos, pelo exemplo de orientação e pela amizade, confiança e liberdade que me ajudaram muito neste meu processo de amadurecimento profissional e pessoal;
- ✧ Ao Prof. Emanuel Carrilho pelos conhecimentos transmitidos, pelo espaço para trabalho em seu grupo de pesquisa, pela cultura adquirida, e pela companhia agradável;
- ✧ Ao Prof. Wendell K. T. Coltro por ter me ajudado no início do meu doutorado, atuando praticamente como um orientador;
- ✧ Ao Prof. Fernando M. Lanças pelo espaço fornecido em seu laboratório para desenvolvimento do meu projeto;
- ✧ Ao colega e amigo, Renato S. Lima, que foi fonte de idéias e ajudou muito a direcionar nossa pesquisa;
- ✧ Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, mais especificamente, ao pessoal do Lab. de Microfabricação: Angelo Gobbi, Maria Helena, e André, que me ajudaram muito na fabricação dos microchips;
- ✧ A todos integrantes do grupo BioMicS;
- ✧ Ao Prof. Alberto Fracassi da Silva e seu aluno Nathan pela colaboração em projetos;
- ✧ À empresa NANOX[®] por ter cedido amostras de TiO₂;
- ✧ À CAPES pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro;
- ✧ A todos os demais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho;

Lista de Figuras

Figura 1.1 – (a) Imagem de eletrodos de filmes finos de Pt/Ti danificados após tratamento térmico para selagem de canais de vidro, reproduzida da referência [16]; (b) Dispositivo danificado durante processo de selagem térmica.	19
Figura 1.2 – (A) Dimensões dos canais microfluídicos, e (B) detalhe da interseção dos canais em formato de duplo-T ($gap = 200\ \mu m$).....	24
Figura 1.3 – Etapas do processo de microfabricação: I, fotogração; II, corrosão química em via úmida; III, deposição do filme de PDMS por <i>spin-coating</i> ; IV, oxidação do filme de PDMS em plasma de oxigênio; V, dispositivo final após etapa de selagem.....	25
Figura 1.4 – Etapas do processo de fabricação dos eletrodos.	27
Figura 1.5 – Imagem do microdispositivo obtido com eletrodos de ouro integrados.	28
Figura 1.6 – Procedimento para introdução da amostra pelo modo <i>unpinched</i> : (a) injeção da amostra, e (b) início da separação.....	30
Figura 1.7 – Imagem de MEV mostrando a secção transversal do canal selado.....	32
Figura 1.8 – Comportamento da espessura da membrana de PDMS com a velocidade de rotação durante 10 s de operação do <i>spinner</i>	33
Figura 1.9 – Comportamento da pressão no interior do dispositivo mediante variação da vazão.	34
Figura 1.10 – Comportamento do EOF durante 30 dias de utilização de um único chip (A); e variação do EOF com o pH (B) para um dispositivo novo (■) e após 30 dias de uso (▲). ..	36
Figura 1.11 – Valores da magnitude do EOF registrados em uma sequência de dez análises em um mesmo dispositivo.	37

Figura 1.12 – Repetibilidade na separação de FL (50 μ M) e ITCF (150 μ M). Condições: tampão ácido bórico/borato de sódio 25 mM pH 9, injeção por 10 s a 1 kV e separação a 2 kV. $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm.	38
Figura 1.13 – Eletroferogramas mostrando três separações consecutivas dos cátions Li^+ , Na^+ e K^+ (100 μ M cada). Tampão: MES/His 20 mM, pH 6,1; Injeção: 10 s a 1 kV e separação a 1 kV. Detecção a 120 kHz, 2 V_{pp}	41
Figura 1.14 – Eletroferogramas registrados durante reação de decomposição da ureia (concentração de 20 mM) pela enzima urease. Tampão: CHES/Arg 20 mM, pH 9,0; Injeção: 10 s a 1 kV e separação a 1 kV. Detecção a 120 kHz, 2 V_{pp}	42
Figura 1.15 – (A) Curva de Calibração e (B) gráfico de comportamento cinético para produção de íons NH_4^+ a partir de concentrações diferentes de ureia.	43
Figura 1.16 – Ajuste dos dados ao modelo cinético de Michaelis-Menten.	45
Figura 2.1. Modelo elétrico do detector C^4D em microchip. S, sinal alternado; D, detector; R, resistência da solução; C_1 e C_2 , capacitâncias dos sistemas eletrodo/dielétrico/solução e C_o , capacitância de fuga.	55
Figura 2.2. Diagramas esquemáticos com os elementos de um circuito elétrico contendo capacitor e bateria (A) e o fenômeno de polarização dos centros de carga (+/-) do dielétrico em capacitores (B). $\vec{E}_B$, $\vec{E}$ e $\vec{E}_R$, campos elétricos da bateria, inicial e resultante do capacitor, respectivamente.	58
Figura 3.1. Modelo elétrico representativo da cela de detecção do sistema C^4D (A), diagrama esquemático com os elementos de um circuito elétrico com capacitores e bateria (B), e representação da polarização dos centros de carga de um dielétrico em um capacitor (C). Sendo: S, sinal alternado; D, detector; $\vec{E}_B$, $\vec{E}$, e $\vec{E}_R$, campo elétrico da bateria, campo elétrico final e campo elétrico resultante do capacitor, respectivamente.	72
Figura 3.2. Instrumentação utilizada nos experimentos de análise em fluxo: gerador de funções (G); bombas seringa (B); gaiola de Faraday para acomodação do microchip e circuito eletrônico do detector (C); circuito de amplificação do sinal do detector (A); fonte de alimentação do sistema (F).	76

Figura 3.3. Camadas constituintes (A) e imagem do dispositivo (B) contendo a membrana de PDMS_d dopada com 1% de TiO₂ (esta porcentagem foi escolhida apenas para fins ilustrativos pois permite visualizar com mais clareza os eletrodos). Sendo: e_{exc}, eletrodo de excitação; e_{r1} e e_{r2}, eletrodos receptores; e i, interface vidro/PDMS.....78

Figura 3.4. Imagens de AFM registradas para as membranas de PDMS contendo: 0 (A), 10 (B), 25 (C), e 50% (D) de TiO₂.80

Figura 3.5. Sinais obtidos para padrões de NH₄Cl em dispositivos com as seguintes porcentagens de dopagem da membrana de PDMS: 0 (A), 10 (B), 25 (C), e 50% (D).82

Figura 3.6. Efeito da dopagem nos limites de detectabilidade em C⁴D (A) e variação do sinal obtido para solução de 2 mmol.L⁻¹ de NH₄Cl em função de κ para dispositivos contendo membranas de PDMS dopadas com 0, 10, 25, e 50% de TiO₂ (B). Os valores de LD e κ estão discriminados nos gráficos A e B respectivamente.....83

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Comparação de parâmetros eletroforéticos* obtidos para 3 chips diferentes.....	39
Tabela 1.2 Velocidades iniciais de formação de NH_4^+ para as concentrações diferentes de ureia.	44
Tabela 3.1. Valores de RMS, S_{ar} , e S_{ds} calculados para as membranas de PDMS.	80

Lista de abreviaturas

μ TAS – Microsistema para Análises Totais

AFM – Microscopia de Força Atômica

C – Capacitância

C_0 – Capacitância de fuga ou residual

C^4D – Detecção Condutométrica Acoplada Capacitivamente

CHES – ácido 2-(ciclohexilamino) etanosulfônico

$\vec{E}$ – Campo Elétrico

$\vec{E}_b$ – Campo Elétrico da Bateria

$\vec{E}_d$ – Campo Elétrico do Dielétrico

e_{exc} – eletrodo de excitação

EOF – Fluxo eletrosmótico

$\vec{E}_r$ – Campo Elétrico Resultante

e_r – eletrodo receptor

FL – Fluoresceína de Sódio

His – L-histidina

ITCF – Isotiocianato de Fluoresceína

L – Condutância

LD – Limite de Detecção

LIF – Fluorescência Induzida por *Laser*

LQ – Limite de Quantificação

MES – ácido 2-(N-morpholino) etanosulfônico

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

PDMS – Polidimetilsiloxano

PDMS_d – Polímero (PDMS) dopado

RSD – Desvio Padrão Relativo

Y – Admitância

ϵ_0 – Constante de Permissividade Elétrica

κ – Constante Dielétrica

Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidas tecnologias e novos processos de fabricação de microdispositivos analíticos visando o acoplamento desta plataforma microfluídica com a detecção condutométrica sem contato (C^4D). Uma segunda etapa do trabalho concentrou esforços em melhorar os níveis de detectabilidade da C^4D . Para tanto foi proposto um processo rápido e robusto para selagem de canais de vidro para produção de microdispositivos analíticos para eletroforese. Os canais de vidro foram fabricados por processo fotolitográfico e corrosão química em via úmida. Os microcanais obtidos foram selados contra outra lâmina de vidro previamente recoberta por uma membrana polimérica (PDMS) de 50 μm de espessura. Esta mesma membrana, além de promover a junção das placas de vidro, promoveu também o isolamento elétrico entre a solução no interior do canal microfluídico (de uma lâmina de vidro) e os eletrodos metálicos presentes no substrato de vidro oposto. Assim, foi possível acoplar a detecção condutométrica sem contato (C^4D) com a plataforma eletroforética proposta. O desempenho analítico desta foi avaliado usando detecção por fluorescência induzida a *laser* (LIF) e C^4D . Eficiência de aproximadamente 47000 pratos/m foi alcançada com boa repetibilidade chip-a-chip. Fluxo eletrosmótico (EOF) estável foi observado apesar da presença do material polimérico compondo parte da parede interna do canal. Com a metodologia proposta, um chip pode ser fabricado em menos de 120 min, já incluindo as etapas de gravação por fotolitografia, corrosão e selagem. Quando comparada à selagem térmica, além do ganho de tempo e facilidade no manuseio dos substratos, o método proposto não necessita de altas temperaturas e os dispositivos obtidos apresentam repetibilidade satisfatória para análises em diferentes dias e em diferentes microchips. A plataforma analítica desenvolvida foi utilizada em um estudo cinético no qual foi possível determinar os parâmetros cinéticos ($V_{\text{max}} = 12,64 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e $K_M = 23,8 \text{ mmol L}^{-1}$) da reação de decomposição de ureia catalisada pela enzima urease. Na segunda etapa do trabalho, foi proposta a alteração de um parâmetro físico, a constante dielétrica, da membrana de PDMS usada como isolante de modo a obter um acoplamento capacitivo mais eficiente e como consequência uma melhor resposta no detector. Uma discussão teórica fez-se necessária a respeito do princípio de funcionamento da C^4D . Os resultados obtidos com experimentos, nos quais a membrana de PDMS foi dopada com dióxido de titânio (TiO_2), mostraram que a discussão sobre o funcionamento deste detector está de acordo com as considerações teóricas apresentadas neste trabalho, onde o sinal analítico é proporcional à capacitância e esta é proporcional à constante dielétrica na cela de detecção. Com esta alternativa foi possível reduzir os limites de detecção em experimentos de análise em fluxo de 385,5 para 14,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após adição de 50% em massa de TiO_2 na membrana de PDMS.

Abstract

In this thesis were presented technologies developed aiming new manufacturing processes for analytical microdevices by coupling of this microfluidic platform with capacitively coupled contactless conductivity detection (C^4D). In a second stage of the work, we focused on improving the levels of detectability of C^4D . We proposed a fast and robust process for sealing glass channels to produce analytical microdevices for electrophoresis. The glass channels were fabricated by photolithographic process and chemical wet etching. The obtained microchannels were sealed against another glass plate, which was previously coated with a 50- μm -thick membrane of poly(dimethylsiloxane) (PDMS). The purpose of this membrane, besides promoting the bonding of the two glass plates, was to act as an electrical insulator between the solution within the microfluidic channel on the top glass plate and the metal electrode present on the bottom glass chip. Thus it was possible to couple the contactless conductivity detection (C^4D) with the electrophoretic platform proposed. The analytical performance was evaluated using both laser induced fluorescence (LIF) detection and C^4D . Efficiency of about 47,000 plates/m was achieved with good chip-to-chip repeatability. Electroosmotic flow (EOF) was observed and stable despite the presence of polymer composing part of the inner wall of the channel. With the proposed methodology, a chip can be manufactured at less than 120 min, including the patterning step by photolithography, chemical etching, and sealing (bonding) step. When compared to the heat sealing procedure, in addition to time savings, and ease of handling of the substrates, the method does not require high temperatures, and the devices obtained show satisfactory repeatability analysis on different days and different microchips. The proposed analytical platform was used in a kinetic study in which it was possible to determine the kinetic parameters ($V_{\text{max}} = 12.64 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and $K_M = 23.8 \text{ mmol L}^{-1}$) for the decomposition of urea catalyzed by the enzyme urease. In the second part of this thesis, it was proposed to change a physical parameter, the dielectric constant of the PDMS membrane used as an insulator, to achieve a more efficient capacitive coupling and consequently a better response in the detector. A theoretical discussion was required regarding the operating principle of C^4D . The results obtained from experiments in which the PDMS membrane was doped with titanium dioxide (TiO_2) showed that the discussion on the functioning of this detector is in agreement with the theoretical considerations presented in this work. The analytical signal was proportional to the capacitance and this was proportional to the dielectric constant in the detection cell. With this alternative we could reduce the detection limits in flow analysis system experiments from 385.5 to 14.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ after addition of 50% wt of TiO_2 in the PDMS membrane.

SUMÁRIO

PREFÁCIO	16
Capítulo 1	17
<i>Processo alternativo para selagem de microssistemas em vidro contendo eletrodos para detecção condutométrica sem contato</i>	<i>17</i>
1.1 Introdução	18
1.2 Experimental	22
1.2.1 Materiais e reagentes	22
1.2.2 Fabricação do dispositivo	24
1.2.2.1 Fabricação dos eletrodos para C^4D	26
1.2.3 Procedimentos eletroforéticos	28
1.2.3.1 Pré-condicionamento dos microcanais	28
1.2.3.2 Medidas do fluxo eletrosmótico	29
1.2.3.3 Controle eletrocinético	29
1.2.4 Detecção por LIF e C^4D	30
1.3 Resultados e discussões	31
1.3.1 Caracterização do microdispositivo	31
1.3.2 Desempenho analítico	37
1.3.3 Estudo cinético de reação <i>on-chip</i>	41
1.4 Conclusões	46
Referências	48
Capítulo 2	51
<i>Considerações teóricas sobre Condutometria sem Contato Acoplada Capacitivamente (C^4D)</i>	<i>51</i>
2.1. Introdução	52
2.2. Conceito	54
2.3. Uma visão atômica sobre a variação da resposta em C^4D	56
2.4. Efeito dos parâmetros da cela de detecção sobre a resposta em C^4D	59

2.5. Efeito da distância entre os eletrodos sobre a condutância	62
2.6. Capacitância e reatância capacitiva.....	63
2.7. Condutância e concentração do analito.....	63
2.8. Conclusões	65
Referências.....	66
Capítulo 3	68
<i>Dopagem da camada dielétrica: uma alternativa para aumento de sensibilidade da detecção condutométrica sem contato em microchip</i>	<i>68</i>
3.1 Introdução	69
3.1.1 Base teórica da metodologia proposta.....	70
3.2 Parte Experimental.....	75
3.3 Resultados e Discussão	79
3.4 Conclusões	84
Referências.....	85

PREFÁCIO

Esta tese está dividida em capítulos de acordo com a ordem cronológica em que resultados eram obtidos e mudanças, devido ao surgimento de novas ideias, direcionavam o rumo deste trabalho. Desta forma iniciaram-se estudos para propor uma alternativa para fabricação de microdispositivos de vidro para eletroforese. A necessidade surgiu de relatos de um colega de grupo, Wendell Coltro, que na época acabara de voltar de um estágio no exterior e trouxe consigo vasta experiência em processos de fabricação de microchips. O problema relatado foi a dificuldade de se realizar a selagem térmica de chips de vidro, processo que apresenta reprodutibilidade muito baixa. Daí iniciaram-se os experimentos que resultaram no trabalho apresentado no **Capítulo 1**.

Durante o desenvolvimento desta primeira etapa do trabalho percebeu-se que uma das técnicas de detecção utilizada, no caso a C^4D , apresentava limites de detectabilidade pouco satisfatórios. Neste momento surgiu uma nova ideia para a continuação do trabalho: tentar aumentar a sensibilidade da C^4D quando acoplada a microchips. Um estudo teórico iniciou-se, em parceria com o colega Renato S. Lima, para compreender os princípios que regem a C^4D . Este levantamento teórico está apresentado nesta tese no **Capítulo 2**.

Com o conhecimento teórico necessário foi possível escolher uma alternativa simples para tentar solucionar o problema de baixa sensibilidade da C^4D em microchips: aumentar a constante dielétrica do material isolante dos eletrodos, no caso o dielétrico. Os esforços concentrados nesta última parte do trabalho estão apresentados no **Capítulo 3**.

Capítulo 1

Processo alternativo para selagem de microssistemas em vidro contendo eletrodos para detecção condutométrica sem contato

1.1 Introdução

Dispositivos miniaturizados para eletroforese tem se tornado uma ferramenta poderosa na química analítica moderna [1-4]. Na eletroforese em microchip, as reduzidas dimensões e energia para alimentar estes sistemas acabam por aumentar a portabilidade e o nível de automação destes sistemas, com baixo custo por dispositivo [5]. Além disso, estes dispositivos miniaturizados oferecem vantagens quando comparados aos atuais instrumentos utilizados, incluindo menor consumo de amostra e reagentes e tempo de análise [6, 7].

Microdispositivos para eletroforese tem sido fabricados em uma ampla variedade de materiais como substrato utilizando-se métodos fotolitográficos ou tecnologias alternativas de microfabricação [8, 9]. Nos últimos 10 anos o interesse por materiais poliméricos cresceu significativamente devido ao seu baixo custo e facilidade de manuseio [9]. Entretanto, desde os primeiros relatos na literatura [10-12] o vidro ainda é o material mais popular e amplamente utilizado devido à sua similaridade com os capilares de sílica fundida [11-13]. Quando comparado aos materiais poliméricos, canais fabricados em vidro possibilitam separações analíticas mais eficientes [9], menor interação de analitos com a parede interna do microcanal [9] e fluxo eletrosmótico (EOF) com maior magnitude [9, 14]. Além disso, substratos de vidro também oferecem ótimas propriedades mecânicas e óticas, eficiente isolamento elétrico, baixa reatividade química e melhor dissipação de calor [6, 15], características desejáveis para uma plataforma eletroforética.

Microdispositivos de vidro ainda são fabricados usando processos fotolitográficos combinados com corrosão química em via úmida [7]. Processos de confecção de dispositivos analíticos usando substrato de vidro são complexos e requerem o uso de salas limpas e instrumentação de alto custo. No entanto, o ponto crítico na fabricação destes dispositivos de vidro ainda é o processo de selagem dos canais, no qual o substrato contendo os canais é

unido a outro substrato plano promovendo a selagem dos canais e permitindo a fluidez de líquidos no interior dos canais. O método mais utilizado para selar canais de vidro é a selagem térmica, a qual é processada a aproximadamente 600° C. Entretanto, este procedimento não é tão robusto como descrito na literatura. A selagem térmica de canais em vidro requer uma etapa rigorosa de limpeza dos substratos com soluções ácidas (exemplo, solução piranha), pois a presença de material particulado, como poeira, impede o contato entre as placas atrapalhando o processo de selagem. Além da etapa de limpeza, a selagem térmica também é delicada e demorada, e normalmente as elevadas temperaturas requeridas podem danificar outras ferramentas analíticas que venham a ser incorporadas ao dispositivo, como eletrodos ou biomoléculas imobilizadas [16, 17]. A Figura 1.1 mostra duas imagens com exemplos destes problemas encontrados durante o processo de selagem térmica.

Figura 1.1 – (a) Imagem de eletrodos de filmes finos de Pt/Ti danificados após tratamento térmico para selagem de canais de vidro, reproduzida da referência [16]; (b) Dispositivo danificado durante processo de selagem térmica.

Além dos pontos críticos citados, a selagem térmica também é irreprodutível, e os dispositivos produzidos são muito caros para serem utilizados como dispositivos descartáveis [15]. Outro processo que é usado para fundir canais de vidro é a selagem anódica que é obtida sob temperaturas da ordem de 300-450° C e potenciais de 400-1200 V. Porém, este método

requer que um dos substratos contenha uma camada de material condutor como metal ou silício [5].

Estas desvantagens tem direcionado os pesquisadores a investigar processos de selagem alternativos. Huang e colaboradores [18] reportaram um método atrativo de selar canais de vidro usando uma cola de baixa viscosidade com cura sob irradiação UV à temperatura ambiente. Allen e Chiu [19] descreveram um processo de selagem baseado no uso de íons Ca^{2+} que é conduzido a 115°C durante 1-2 horas. Outros processos empregando ácido fluorídrico [20, 21], silicato de sódio [22], fotorresiste SU-8 [23], ou camadas intermediárias de material adesivo [6, 7, 24, 25] são encontrados na literatura. Diferentes grupos de pesquisa tem divulgado a selagem de microdispositivos de vidro à temperatura ambiente sem necessidade de utilizar salas limpas [15, 26-30]. Porém em nenhuma destas alternativas (à temperatura ambiente) encontrou-se um processo de fabricação que permitisse a integração de eletrodos externos ao canal microfluídico, ou seja, isolados da solução no interior do canal, o que é necessário quando se pretende utilizar a detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C^4D).

A C^4D é uma técnica de detecção que foi recentemente introduzida na química analítica, mais especificamente acoplada a eletroforese capilar [31] e sua utilização tem crescido muito na última década [32]. Seu princípio de funcionamento está baseado na medida de admitância entre um eletrodo de excitação (e_{exc}) e um eletrodo receptor (e_r). Estes dois eletrodos em conjunto com a região do canal microfluídico entre eles formam a cela de detecção. O fenômeno de indução de cargas nesta cela sofre influência da condutividade da solução no interior do canal, logo é possível relacionar o sinal registrado com a condutividade da solução. Em linhas gerais, a C^4D consiste na aplicação de um sinal alternado de alta frequência ao eletrodo de excitação na cela de detecção. Uma corrente alternada é, então, acoplada capacitivamente no eletrólito e, em seguida, registrada pelo segundo eletrodo

(eletrodo receptor) [33]. Tal corrente está relacionada ao acoplamento capacitivo entre a dupla camada elétrica da solução eletrolítica e a superfície do e_{exc} , fenômeno que depende fortemente da constante dielétrica da camada isolante dos eletrodos. Esse parâmetro está relacionado à capacidade de polarização dos centros de carga do material sob a aplicação de um campo elétrico externo, sendo a resistência imposta à indução de momentos de dipolo responsável pela menor sensibilidade de detectores condutométricos sem contato ante aos métodos com contato. A resistência dielétrica provém do efeito de assimetria de carga, o qual é gerado à medida que os momentos de dipolo elétrico do material se alinham em acordo com o campo elétrico.

Esta primeira etapa do trabalho teve como objetivo a viabilização de um método alternativo para selagem de microssistemas fabricados em vidro. Esta selagem foi promovida pelo uso de uma membrana de PDMS a qual, além de proporcionar a vedação, também foi responsável por isolar fisicamente eletrodos planares (fabricados em vidro) dos microcanais de modo a realizar a detecção condutométrica no modo “sem contato”. Nos estudos realizados até o momento, os dispositivos obtidos foram submetidos a testes visando caracterizar a nova plataforma microfluídica em termos de estabilidade de EOF, bem como avaliar seu desempenho em aplicações analíticas e também em uma aplicação mais complexa como monitorar um ensaio enzimático *on-line*. Os testes analíticos foram realizados usando-se um detector condutométrico e um detector de fluorescência. Através da plataforma idealizada, testes enzimáticos entre urease e o substrato ureia foram realizados de modo a avaliar a aplicabilidade dos dispositivos produzidos em estudos de cinética de reação.

1.2 Experimental

1.2.1 Materiais e reagentes

Para produção dos microdispositivos foram utilizados os seguintes materiais e reagentes:

- Lâmina de vidro para microscópio ($26 \times 76 \times 1$ mm) fornecido por Glass Técnica, São Paulo-SP;
- Kit de elastômero Sylgard 184 fornecido por Dow Corning, Midland-MI, EUA;
- Fotorresiste AZ4330 fornecido por Clariant Corporation, Sommerville-NJ, EUA;
- Revelador AZ400K fornecido por Clariant Corporation, Sommerville-NJ, EUA;
- Ácido clorídrico fornecido por Synth, Diadema-SP;
- Ácido fluorídrico fornecido por Synth, Diadema-SP;
- Ácido sulfúrico fornecido por Synth, Diadema-SP
- Peróxido de hidrogênio fornecido por Vetec, Duque de Caxias-RJ;

Para os experimentos de eletroforese, os seguintes reagentes foram utilizados:

- Hidróxido de sódio fornecido por Sigma Co., St. Louis-MO, EUA;
- Ácido bórico fornecido por Sigma Co., St. Louis-MO, EUA;
- Tetraborato de sódio fornecido por Sigma Co., St. Louis-MO, EUA;
- Fosfato de potássio mono- e di-básico fornecidos por Mallinckrodt, Xalostoc, Mexico
- MES [ácido 2-(N-morpholino) etanosulfônico] fornecido por Sigma Co., St. Louis-MO, EUA;

- CHES [ácido 2-(ciclohexilamino) etanosulfônico] fornecido por Sigma Co., St. Louis-MO, EUA;
- L-arginina e L-histidina fornecidos por Synth, Diadema-SP;
- Cloretos de sódio, potássio e lítio fornecidos por Sigma Co., St. Louis-MO, EUA;
- Fluoresceína de sódio e isotiocianato de fluoresceína fornecidos por Sigma-Aldrich, St. Louis-MO, EUA;
- Ureia fornecida por J. T. Baker, Xalostoc-Tlaxcala, México;
- Urease (U1500 – 100000 unidades de atividade/g) fornecida por Sigma-Aldrich, St. Louis-MO, EUA;

As soluções tampão foram preparadas semanalmente utilizando água ultrapura (resistividade 18,3 M Ω cm). Para os experimentos usando detecção LIF e C⁴D, utilizou-se tampão ácido bórico/borato de sódio, 20 mM, pH 9,0, e tampão MES/His, 20 mM, pH 6,1, respectivamente. Soluções estoque de cada analito (10 mM) foram preparadas diariamente em água, exceto isotiocianato de fluoresceína (ITCF) que foi preparada em acetona. Para os experimentos com detecção por LIF, padrões de fluoresceína de sódio (FL) e ITCF foram diluídos no próprio tampão de corrida. Para as medidas de EOF, tampão fosfato, nas concentrações 15 e 20 mM, foi preparado a diferentes valores de pH usando fosfato de potássio mono- e di-básico. Para o ensaio enzimático soluções estoque de ureia e da enzima urease foram preparadas diariamente nas concentrações de 100 mM e 15 mg/mL, respectivamente.

1.2.2 Fabricação do dispositivo

O desenho do dispositivo foi feito usando o programa CorelDraw versão 11.0 (Corel Corporation) e impresso em transparências com alta resolução (3000 dpi) em uma gráfica local (Jornal Primeira Página, São Carlos-SP). Estas transparências foram usadas como máscaras no processo fotolitográfico. O desenho dos canais microfluídicos é composto de dois canais em conformação de duplo-T com um *gap* de 200 μm , como mostrado na Figura 1.2. Os canais de injeção e separação apresentam 15 e 60 mm de comprimento, respectivamente. Os canais foram fabricados com máscaras de 35 μm de largura dos canais.

Figura 1.2 – (A) Dimensões dos canais microfluídicos, e (B) detalhe da interseção dos canais em formato de duplo-T ($gap = 200 \mu\text{m}$).

O procedimento para obtenção dos canais em vidro para eletroforese está mostrado na Figura 1.3. O fotolito foi colocado sobre uma lâmina de vidro já previamente coberta com uma camada de 5 μm de fotorresiste AZ4330. Em seguida, o substrato foi exposto à radiação

UV por 15 s e revelado com solução de revelador AZ400K por 2 min (Figura 1.3 I). Os canais foram corridos em solução de ácido fluorídrico (HF) a 20% por 4 min sob agitação contínua (Figura 1.3 II). A taxa de corrosão desta solução é de $8 \pm 1 \mu\text{m}$ por min. Seguindo a etapa de corrosão, os substratos foram lavados vigorosamente com água deionizada e o fotorresiste foi removido com acetona. Para acesso aos canais microfluídicos, foram feitos furos de 1 mm de diâmetro nas extremidades dos canais usando uma ponta diamantada adaptada a uma minirretífica (Dremel).

Figura 1.3 – Etapas do processo de microfabricação: I, fotogração; II, corrosão química em via úmida; III, deposição do filme de PDMS por *spin-coating*; IV, oxidação do filme de PDMS em plasma de oxigênio; V, dispositivo final após etapa de selagem.

Para a etapa de selagem, outra lâmina de vidro foi recoberta com uma camada de PDMS usando um *spinner* a 3000 RPM durante 10 s (Figura 1.3 III). O PDMS foi preparado misturando-se os componentes do kit Sylgard 184 na proporção de 10 partes de monômero

para 1 parte do agente de cura, conforme indicado pelo fabricante. A espessura do filme de PDMS obtida foi de 50 μm . Antes da selagem, o filme de PDMS foi curado a 100° C por 5 min sobre placa aquecedora. O substrato contendo os canais e o substrato contendo a camada de PDMS foram colocados em uma câmara de plasma de oxigênio (Plasma Technology PLAB SE80) e oxidados por 1 min (Figura 1.3 IV). Os dois substratos foram colocados em contato entre eles imediatamente após remoção da câmara de plasma, obtendo assim uma selagem irreversível (Figura 1.3 V). Como descrito neste subtópico, o dispositivo pode ser obtido em menos de 120 min.

Os canais obtidos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando um equipamento LEO 440 (Zeiss-Leica) aplicando voltagem de aceleração de 18 kV. Substratos obtidos através de cortes transversais aos canais microfluídicos foram recobertos com uma camada de 90 Å de espessura antes das análises por MEV.

Com a finalidade de avaliar a força da ligação entre as placas de vidro, o dispositivo foi submetido a valores diferentes de pressão usando uma bomba de cromatógrafo a líquido (Shimadzu, modelo LC-20AT). Para este teste, conectores de aço inox foram colados aos reservatórios usando resina epoxy e conectados à bomba de cromatógrafo. Este teste foi conduzido variando a vazão da bomba na faixa de 10 a 500 $\mu\text{L}/\text{min}$.

1.2.2.1 Fabricação dos eletrodos para C^4D

Eletrodos planares para C^4D foram fabricados sobre a superfície de vidro e integrados ao dispositivo microfluídico usando uma membrana de PDMS para promover o isolamento elétrico entre os eletrodos e o canal. O substrato de vidro foi submetido a processo fotolitográfico para definição da geometria dos eletrodos.

Os materiais para composição dos eletrodos, compostos por uma camada de 20 nm de titânio seguida pela deposição de 150 nm de ouro, foram depositados por *sputterig*. A camada de titânio foi necessária para aumentar a adesão do ouro à superfície do vidro. Uma placa contendo filmes finos de Ti/Au (Figura 1.4 I) foi recoberta com uma camada (aproximadamente 5 μm de espessura) de fotorresiste AZ4330 utilizando *spinner* a 3000 RPM durante 30 s. Depois de uma etapa de *prebake* (90° C por 5 min) o fotolito com o desenho dos eletrodos foi posicionado sobre este substrato para gravação. O tempo de exposição à radiação UV foi de 15 s sob uma potência de 10 mW/cm². Em seguida o fotorresiste, já gravado, foi revelado com o revelador AZ400K, lavado com água deionizada e seco com N₂ (Figura 1.4 II). O desenho dos eletrodos foi obtido expondo o substrato em soluções corrosivas de Au e Ti subsequentemente (Figura 1.4 III). O material de composição dos eletrodos permaneceu ligado à placa de vidro apenas na região protegida pelo fotorresiste. Este fotorresiste restante foi removido com acetona e a placa de vidro lavada com água deionizada e seca com N₂ (Figura 1.4 IV). Após terminado o processo de fabricação dos eletrodos, uma fina camada de 50 μm de PDMS foi depositada sobre a placa de vidro para promover o isolamento elétrico dos eletrodos e também permitir a selagem contra os canais microfluídicos, conforme descrito anteriormente. A Figura 1.5 mostra uma imagem do microdispositivo obtido com os eletrodos de ouro integrados.

Figura 1.4 – Etapas do processo de fabricação dos eletrodos.

Figura 1.5 – Imagem do microdispositivo obtido com eletrodos de ouro integrados.

1.2.3 Procedimentos eletroforéticos

1.2.3.1 Pré-condicionamento dos microcanais

Diariamente, antes de iniciar os experimentos, os microdispositivos foram tratados com solução de NaOH a 0,1 M, com água ultrapura e com tampão de corrida, por 30 min cada, nesta sequência. Estas etapas foram feitas aplicando vácuo no reservatório de descarte do tampão. Após o pré-condicionamento dos canais, o tampão de corrida do reservatório da amostra foi substituído pela amostra. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente (25° C) e todos os reservatórios foram preenchidos com o mesmo volume de solução (50 µL) para evitar fluxo hidrodinâmico indesejável.

1.2.3.2 Medidas do fluxo eletrosmótico

As medidas do EOF foram feitas seguindo o método do monitoramento da corrente [34] realizando corridas alternadas com duas soluções tampão de concentrações diferentes (15 e 20 mM) sob um campo elétrico de 125 V/cm. Os valores de EOF foram monitorados em valores de pH diferentes (de 2 a 12). Um experimento de 30 dias de duração foi realizado em um único dispositivo para avaliar o comportamento e estabilidade do EOF. A magnitude do EOF dentro de uma faixa ampla de pH foi comparada com valores medidos antes e após 30 dias de utilização do dispositivo. Medidas foram realizadas em 3 dispositivos diferentes para avaliar a repetibilidade analítica de diferentes chips.

1.2.3.3 Controle eletrocinético

O controle eletrocinético do fluxo dentro dos canais microfluídicos foi feito através de uma fonte de alta voltagem monocanal (modelo CZE 1000R, fabricado por Spellman, Hauppauge-Nova Iorque, EUA) controlado por um microcomputador equipado com uma interface USB-6009 (National Instruments, Austin, Texas, EUA). Injeções eletrocinéticas foram conduzidas após estabilização da linha de base através do procedimento conhecido como *unpinched*. As injeções foram realizadas aplicando o potencial desejado (+ 1 kV) durante 10 s ao reservatório da amostra com aterramento posicionado no reservatório de descarte da amostra, conforme Figura 1.6a. Separações foram conduzidas chaveando a aplicação da alta voltagem para o reservatório do tampão de corrida com aterramento no reservatório de descarte após o ponto de detecção (Figura 1.6b).

Figura 1.6 – Procedimento para introdução da amostra pelo modo *unpinched*: (a) injeção da amostra, e (b) início da separação.

1.2.4 Detecção por LIF e C⁴D

A detecção por LIF foi realizada usando um equipamento feito sob encomenda (produzido por IS BIOTECH, Porto Alegre-RS) equipado com uma fonte de *laser* de argônio com comprimento de onda de 488 nm (com potência de 1 a 50 mW) (fabricado por LaserPhysics, Salt Lake City-UT, EUA) [8]. O sinal de fluorescência captado por uma fotomultiplicadora e enviado a interface de aquisição foi monitorado em tempo real usando um *software* desenhado em ambiente *LabVIEW*[®].

Os experimentos que usaram C⁴D foram realizados usando um sistema construído em laboratório já descrito na literatura [35]. Um gerador de funções (CFG-250, Tektronix) foi usado para geração do sinal de excitação para um dos eletrodos de detecção. A aquisição de dados também foi realizada pelo mesmo *software* que faz o controle do sistema. Através deste

software foi possível controlar os potenciais e tempos para as etapas de injeção e separação. Os eletroferogramas foram registrados com resolução temporal de 50 ms sem qualquer manipulação prévia dos dados. Para reduzir a captura de ruídos elétricos, todas as medidas foram realizadas usando uma gaiola de Faraday.

1.3 Resultados e discussões

1.3.1 Caracterização do microdispositivo

O dispositivo proposto foi caracterizado por imagens de MEV, medidas de perfilometria dos canais corroídos, resistência do dispositivo a fluxo forçado, e acompanhando a magnitude e estabilidade do EOF no interior dos canais. A Figura 1.7 mostra uma imagem de MEV de um corte transversal de um canal selado. É possível notar o perfil parabólico do canal característico do processo isotópico de corrosão química em via úmida. O canal resultante exibiu baixa rugosidade (em torno de 5 nm de acordo com medidas perfilométricas) e as seguintes dimensões: 135, 85 e 35 μm de largura na base, largura no topo e profundidade, respectivamente. A profundidade do canal foi controlada através do tempo de banho na solução de HF.

Figura 1.7 – Imagem de MEV mostrando a secção transversal do canal selado.

Os canais de vidro foram selados contra outra placa de vidro previamente recoberta com uma membrana de PDMS depositada com uso de um *spinner*. Usando um tempo fixo de operação do *spinner*, 10 s, a espessura foi avaliada em função da velocidade de rotação. A espessura da membrana foi acompanhada através de medidas de perfilometria e os resultados são apresentados na Figura 1.8. Como pode ser observado, quanto maior a velocidade de rotação, menor é a espessura da membrana obtida. Com o objetivo de obter uma selagem robusta e reprodutível, variou-se a espessura da membrana de 20 a 120 μm .

Para camadas com espessura inferior a 40 μm , observou-se problemas relacionados com a uniformidade da superfície da membrana e geração de bolhas de ar entre as placas de vidro, impedindo uma selagem eficiente dos canais de vidro. Por outro lado, para os filmes de PDMS mais espessos (acima de 60 μm), observou-se o surgimento de uma deformação (formação de uma barreira em alto-relevo de PDMS) nas bordas da placa de vidro. Este fenômeno pode ser atribuído a viscosidade elevada e impediu o contato por completo entre as placas. Além disso, o uso de camadas mais espessas de PDMS ocasionava obstrução do canal

microfluídico no momento da selagem devido à própria característica elastomérica do polímero usado. Devido a estes problemas, optou-se pela espessura de 50 μm . Com este valor de espessura foi possível obter aproveitamento de 100% no processo de produção dos dispositivos.

Figura 1.8 – Comportamento da espessura da membrana de PDMS com a velocidade de rotação durante 10 s de operação do *spinner*.

A força de adesão entre as placas foi avaliada usando uma bomba de HPLC variando a vazão de 0,01 a 0,50 mL/min. A pressão gerada dentro do microcanal foi registrada pela própria bomba e os valores ficaram dentro da faixa de 1-45 kgf/cm^2 , conforme mostrado na Figura 1.9. Dentro desta faixa de pressão não observou-se vazamento no dispositivo. A partir de 0,55 mL/min observou-se uma queda na pressão do sistema devido a um vazamento surgido na conexão de entrada no canal, porém nenhuma alteração visível ocorreu no interior do dispositivo.

Figura 1.9 – Comportamento da pressão no interior do dispositivo mediante variação da vazão.

O EOF é um dos mais importantes parâmetros para se avaliar durante o desenvolvimento de novas plataformas analíticas para eletroforese. O EOF está diretamente relacionado com a composição das paredes do canal microfluídico e é sensivelmente afetado pela temperatura, pH e concentração do tampão [36]. O valor do EOF e seu comportamento fornecem informação a respeito das condições da superfície do canal e influenciam parâmetros analíticos, como por exemplo: eficiência de separação. A geração de EOF com direção catódica, ou seja, EOF que se move do ânodo para o cátodo, é um indicativo de uma superfície do canal carregada com excesso de cargas negativas, e a magnitude do EOF é determinada pela quantidade destas cargas na superfície [36]. Como o EOF é um dos parâmetros mais importantes para as separações eletroforéticas, sua determinação e otimização devem ser conduzidas de modo a ter um conhecimento completo da química de superfície envolvida [37, 38].

Os valores de EOF foram medidos em uma ampla faixa de pH de 2 a 12. Como esperado, EOF catódico foi observado para todos os valores de pH. A magnitude do EOF para um único chip foi avaliada durante 30 dias consecutivos de utilização deste dispositivo, dados apresentados na Figura 1.10(A). A Figura 1.10(B) apresenta os valores de EOF para cada valor de pH obtidos para medidas realizadas no primeiro e no trigésimo dia de utilização do mesmo microchip. É importante ressaltar que o canal microfluídico é composto, aproximadamente, por uma parte de PDMS e três partes de vidro como observado na Figura 1.7. Como a intensidade do EOF não alterou significativamente durante os 30 dias de utilização do dispositivo, pode-se deduzir que a eletrosmose é governada predominantemente pela superfície do vidro, a qual é mais estável que o PDMS. Para dispositivos de PDMS (nativo ou oxidado em plasma de O_2), o EOF altera-se rapidamente (em questão de minutos) afetando assim a repetibilidade das análises [37, 39].

Figura 1.10 – Comportamento do EOF durante 30 dias de utilização de um único chip (A); e variação do EOF com o pH (B) para um dispositivo novo (■) e após 30 dias de uso (▲).

A Figura 1.11 mostra os valores de EOF para dez medidas consecutivas em um mesmo dispositivo. O valor de EOF, medido em pH 7, durante 10 experimentos seguidos foi de $3,6 \pm 0,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$. Conforme visualizado na Figura 1.11, a sequência de experimentos apresentou uma estabilidade satisfatória (com RSD de 5,5 %). A intensidade e

estabilidade do EOF gerado no dispositivo fabricado mostraram-se estar coerentes com os valores encontrados na literatura para dispositivos de vidro e quartzo [37, 40-43].

Figura 1.11 – Valores da magnitude do EOF registrados em uma sequência de dez análises em um mesmo dispositivo.

1.3.2 Desempenho analítico

O desempenho analítico da plataforma eletroforética proposta foi avaliado usando como detectores tanto LIF quanto C^{40}D . Para os experimentos conduzidos com estes sistemas de detecção manteve-se constante o volume de injeção de amostra de 200 pL, que foi definido pela geometria dos microcanais (ver Figura 1.2).

A Figura 1.12 mostra 3 injeções de uma mistura contendo FL e ITCF (50 e 150 μM respectivamente). Para os eletroferogramas da Figura 1.12, os tempos de migração para ITCF e FL foram de $78,5 \pm 0,3$ e $93,4 \pm 0,3$ s, respectivamente, com desvio padrão relativo em torno de 0,4 %. A eficiência de separação obtida para ambos analitos com o dispositivo

proposto foi de aproximadamente 28000 pratos/m. É importante ressaltar que não foi observado surgimento de caldas nos picos destes analitos o que é frequente quando se utiliza plataformas poliméricas para realização de experimentos similares. Estes resultados reforçam a afirmação da predominância do vidro a frente do PDMS na caracterização desta nova plataforma microfluídica, gerando EOF estável e reprodutível.

Figura 1.12 – Repetibilidade na separação de FL (50 μ M) e ITCF (150 μ M). Condições: tampão ácido bórico/borato de sódio 25 mM pH 9, injeção por 10 s a 1 kV e separação a 2 kV. $\lambda_{ex} = 488$ nm.

Ainda usando detecção por LIF, 3 chips diferentes foram usados em um estudo comparativo para avaliar a reprodutibilidade do processo de fabricação. Os resultados obtidos a respeito da corrente eletroforética, intensidade do EOF, tempo de migração, eficiência e área do pico para injeção de FL estão apresentados na Tabela 1.1. Observando estes resultados pode-se concluir que o processo de selagem de canais em vidro proposto apresenta boa reprodutibilidade. Para uma comparação intra-chip foram calculados os valores de desvio padrão relativo (RSD) para os parâmetros listados na Tabela 1, e estes valores, de forma geral,

ficaram abaixo de 6,5 %. Os valores de RSD para área de pico (9,2 %) e eficiência (13,6 %) podem ser atribuídos a diferenças na intensidade do EOF e/ou as dimensões do canal (largura e altura). Na verdade, acredita-se que estas variações não são representativas para análises químicas usando microchips. Os resultados apresentados na Tabela 1.1 confirmam que o método de selagem dos canais proposto é confiável, reproduzível, rápido e, o mais importante, não requer altas temperaturas para promover a selagem.

Tabela 1.1. Comparação de parâmetros eletroforéticos* obtidos para 3 chips diferentes.

Chip #	Corrente no canal (μA)	EOF ($10^4 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Tempo de migração (s)	Área do pico (u.a.)	Eficiência ** (pratos m^{-1})
1	$3,35 \pm 0,02$	$3,30 \pm 0,26$	$74,4 \pm 0,7$	$6,05 \pm 0,42$	21400 ± 100
2	$3,54 \pm 0,02$	$3,00 \pm 0,08$	$76,6 \pm 1,1$	$6,52 \pm 1,25$	27900 ± 800
3	$3,24 \pm 0,01$	$3,41 \pm 0,16$	$73,4 \pm 0,5$	$5,42 \pm 0,33$	26700 ± 300
RSD (%)					
chip-a-chip	4,5	6,6	2,2	9,2	13,7

* Valores de corrente e EOF estão relacionados ao canal enquanto tempo de migração, área do pico, e eficiência estão relacionadas à injeção do analito FL. Cada valor é uma média de 5 medidas +/- o desvio padrão entre estas.

** Calculada utilizando-se a fórmula: $N = 5,54 \times (t_m/w_{1/2})^2$, onde t_m e $w_{1/2}$ são tempo de migração e largura do pico a meia altura, respectivamente.

Para a detecção C^{4}D , eletrodos planares foram integrados à superfície do vidro e isolados fisicamente dos canais de vidro usando uma camada de PDMS, como discutido anteriormente. A Figura 1.13 apresenta os eletroferogramas obtidos para 3 injeções consecutivas de uma mistura de cátions contendo Li^+ , Na^+ e K^+ (100 μM cada). A detecção

foi conduzida aplicando-se um sinal senoidal com frequência de 120 kHz e amplitude de 2

$V_{\text{pico a pico}}$

A eficiência de separação foi calculada baseando-se no tempo de migração dos cátions (t_m) e na largura do pico à meia altura ($w_{1/2}$) conforme a equação abaixo:

$$N = 5,54 \times (t_m/w_{1/2})^2$$

A eficiência de separação alcançada para os cátions ficou em torno de 27000 a 47000 pratos/m. Estes valores obtidos com o dispositivo avaliado são maiores que os obtidos com um dispositivo feito com um material polimérico, usando o mesmo sistema de detecção [9]. O limite de detecção encontrado para estes experimentos foi igual a 25 μM para K^+ e Na^+ , e 50 μM para Li^+ . Como pode ser observado na Figura 1.13, resolução de linha de base foi obtida para todos os picos em todas as corridas.

Figura 1.13 – Eletroferogramas mostrando três separações consecutivas dos cátions Li^+ , Na^+ e K^+ ($100\ \mu\text{M}$ cada). Tampão: MES/His $20\ \text{mM}$, $\text{pH}\ 6,1$; Injeção: $10\ \text{s}$ a $1\ \text{kV}$ e separação a $1\ \text{kV}$. Detecção a $120\ \text{kHz}$, $2\ \text{V}_{\text{pp}}$.

1.3.3 Estudo cinético de reação *on-chip*

Para avaliar a aplicabilidade da plataforma analítica proposta em estudos cinéticos, um ensaio enzimático foi escolhido para ser monitorado em tempo real no próprio dispositivo. A reação estudada foi a decomposição de ureia catalisada pela enzima urease conforme a reação abaixo.

O principal produto desta reação é o íon amônio, NH_4^+ , o qual possui alta mobilidade e consequentemente alta condutividade [44], o que facilita a detecção via C^4D .

Estes experimentos foram conduzidos preenchendo o reservatório da amostra com solução de ureia nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 mM preparadas a partir da dissolução da ureia no próprio tampão de corrida (CHES/Arg 20 mM, pH 9,0). Uma alíquota da solução estoque da enzima urease foi adicionada ao reservatório da amostra e simultaneamente deu-se início a uma série de corridas eletroforéticas consecutivas. Para todas as concentrações de substrato (ureia) manteve-se constante a concentração de enzima adicionada (0,15 mg/mL)

A Figura 1.14 mostra os eletroferogramas registrados no decorrer da reação ureia/urease para a concentração de 20 mM de substrato. O sinal observado em 20 s de corrida corresponde à formação de NH_4^+ . Este sinal foi utilizado para os cálculos de velocidades de formação para este produto e subsequente estudo da cinética da reação de decomposição de ureia catalisada pela enzima urease.

Figura 1.14 – Eletroferogramas registrados durante reação de decomposição da ureia (concentração de 20 mM) pela enzima urease. Tampão: CHES/Arg 20 mM, pH 9,0; Injeção: 10 s a 1 kV e separação a 1 kV. Detecção a 120 kHz, 2 V_{pp}.

Correlacionando as intensidades dos sinais referentes ao NH_4^+ com os valores obtidos para injeções de padrões de NH_4Cl (Figura 1.15A) foi possível construir as curvas cinéticas para as concentrações de substrato testadas (ureia: 5-25 mM) mantendo fixa a concentração de enzima, conforme mostrado na Figura 1.15B.

Figura 1.15 – (A) Curva de Calibração e (B) gráfico de comportamento cinético para produção de íons NH_4^+ a partir de concentrações diferentes de ureia.

Pela inclinação das retas traçadas sobre a fase inicial da reação (1-4,5 min) foi possível calcular as velocidades iniciais (V_0) de formação de amônio para cada concentração de substrato. Estes valores estão listados na tabela abaixo.

Tabela 1.2 – Velocidades iniciais de formação de NH_4^+ para as concentrações diferentes de ureia.

[substrato]	V_0 (mM min^{-1})
5 mM	2,26
10 mM	3,43
15 mM	4,20
20 mM	6,62
25 mM	7,56

Com os valores da Tabela 1.2 fez-se o ajuste destes dados ao modelo de Michaelis-Menten conforme mostrado na Figura 1.16. Assim foram obtidos graficamente os valores de V_{max} e K_M como sendo $12,64 \text{ mM min}^{-1}$ e $23,8 \text{ mM}$, respectivamente.

Figura 1.16 – Ajuste dos dados ao modelo cinético de Michaelis-Menten.

Os valores de K_M podem variar de 0,1 a 100,0 mM dependendo da fonte da qual a enzima é extraída [45]. A enzima utilizada neste experimento é extraída de feijão da espécie *Canavlia ensiformis*. Foram encontrados na literatura valores de K_M variando de 2,9 a 16 mM utilizando enzimas desta mesma fonte [45].

1.4 Conclusões

Foi proposto um método rápido e confiável para selar canais de vidro baseado no uso de uma membrana de material polimérico (PDMS). Este processo de selagem permitiu obter desempenhos analíticos muito próximos (com baixo desvio padrão relativo) entre os dispositivos fabricados, o que é muito raro de se obter com a técnica de selagem térmica. Como relatado por grupos de pesquisa distintos [9, 43, 46], de forma geral, o vidro ainda é o melhor material para fabricação de plataformas microfluídicas. No entanto, o alto custo e baixa reprodutibilidade do processo de selagem térmica conduziram alguns pesquisadores à utilização de novos materiais [9, 47] e processos de selagem alternativos. Especificamente neste trabalho, com a metodologia de fabricação proposta foi possível obter microdispositivos de vidro com alta reprodutibilidade do processo e em tempo relativamente curto (aproximadamente 120 min). Estes resultados tem estimulado outros avanços na instrumentação como integração de controle fluídico através da manipulação pneumática da membrana de PDMS. O uso desta membrana de PDMS também mostrou-se muito versátil ao permitir a integração dos eletrodos para detecção C^4D . Estas vantagens podem ajudar a resolver alguns problemas relacionados à selagem de canais de vidro sem comprometer o desempenho das análises devido à adsorção de analitos a parede do canal, o que comumente ocorre quando se utiliza dispositivos 100% poliméricos [9].

Além disso, o dispositivo microfabricado mostrou-se compatível com aplicações envolvendo ensaios enzimáticos. Métodos convencionais que utilizam espectrofotometria requerem que substrato e produto tenham espectros de absorção distintos para serem realizados sem necessidade de separação. Por outro lado, técnicas de separação, como cromatografia líquida, não apresentam agilidade suficiente para realizar corridas sucessivas com intervalos inferiores a 1 min, o que é facilmente alcançado em eletroforese em

microchip. Esta plataforma microfluídica abre várias possibilidades para estudos cinéticos porque agrega o poder de separação da eletroforese com uma detecção universal provida pelo sistema C⁴D.

Etapas futuras no desenvolvimento deste trabalho incluem um experimento para padronização da atividade enzimática da urease e comparação do desempenho da plataforma microfluídica com um método espectrofotométrico convencionalmente utilizado para tal aplicação.

Referências

- [1] West, J.; Becker, M.; Tombrink, S.; Manz, A.; *Anal. Chem.* **2008**, 80, 4403-4419
- [2] Dittrich, P. S.; Tachikawa, K.; Manz, A.; *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3887-3908
- [3] Vilkner, T.; Janasek, D.; Manz, A.; *Anal. Chem.* **2004**, 76, 3373-3385
- [4] Reyes, D. R.; Iossifidis, D.; Auroux, P. A.; Manz, A.; *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2623-2636
- [5] Berthold, A.; Laugere, F.; Schellevis, H.; de Boer, C. R.; Laros, M.; Guijt, R. M.; Sarro, P. M.; Vellekoop, M.J.; *Electrophoresis* **2002**, 23, 3511-3519
- [6] Chen, Q.; Li, G.; Jin, Q. H.; Zhao, J. L.; Ren, Q. S.; Xu, Y. S.; *J. Microelectromech. S.* **2007**, 16, 1193-1200
- [7] Pan, Y. J.; Yang, R. J.; *J. Micromech. Microeng.* **2006**, 16, 2666-2672
- [8] Coltro, W. K. T.; Piccin, E.; da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L.; Carrilho, E.; *Lab Chip* **2007**, 7, 731-734
- [9] Coltro, W. K. T.; Lunte, S. M.; Carrilho, E.; *Electrophoresis* **2008**, 29, 4928-4937
- [10] Harrison, D. J.; Manz, A.; Fan, Z. H.; Ludi, H.; Widmer, H. M.; *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1926-1932
- [11] Seiler, K.; Harrison, D. J.; Manz, A.; *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1481-1488
- [12] Effenhauser, C. S.; Manz, A.; Widmer, H. M.; *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2637-2642
- [13] Effenhauser, C. S.; Manz, A.; Widmer, H. M.; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2284-2287
- [14] Zhuang, G.; Jin, Q.; Liu, J.; Cong, H.; Liu, K.; Zhao, J.; Yang, M.; Wang, H.; *Biomed. Microdevices* **2006**, 8, 255-261
- [15] Castano-Alvarez, M.; Pozo Ayuso, D. F.; Garcia Granda, M.; Fernandez-Abedul, M. T.; Rodriguez Garcia, J.; Costa-Garcia, A.; *Sens. Actuators, B* **2008**, 130, 436-448
- [16] Wang, H. Y.; Foote, R. S.; Jacobson, S. C.; Schneibel, J. H.; Ramsey, J. M.; *Sens. Actuators, B* **1997**, 45, 199-207
- [17] Akiyama, Y.; Morishima, K.; Kogi, A.; Kikutani, Y.; Tokeshi, M.; Kitamori, T.; *Electrophoresis* **2007**, 28, 994-1001
- [18] Huang, Z.; Sanders, J. C.; Dunsmore, C.; Ahmadzadeh, H.; Landers, J. P.; *Electrophoresis* **2001**, 22, 3924-3929
- [19] Allen, P. B.; Chiu, D. T.; *Anal. Chem.* **2008**, 80, 7153-7157

- [20] Chen, L.; Luo, G.; Liu, K.; Ma, J.; Yao, B.; Yan, Y.; Wang, Y.; *Sens. Actuators, B* **2006**, 119, 335-344
- [21] Iles, A.; Oki, A.; Pamme, N.; *Microfluid Nanofluid* **2007**, 3, 119-122
- [22] Satoh, A.; *Sens. Actuators, A* **1999**, 72, 160-168
- [23] Jackman, R. J.; Floyd, T. M.; Ghodssi, R.; Schmidt, M. A.; Jensen, K. F.; *J. Micromech. Microeng.* **2001**, 11, 263-269
- [24] Carroll, S.; Crain, M. M.; Naber, J. F.; Keynton, R. S.; Walsh, K. M.; Baldwin, R. P.; *Lab Chip* **2008**, 8, 1564-1569
- [25] Oh, K. W.; Han, A.; Bhansali, S.; Ahn, C. H.; *J. Micromech. Microeng.* **2002**, 12, 187-191
- [26] Zhi-Jian Jia, Qun Fang, Zhao-Lun Fang,; *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5597-5602
- [27] Sayah, A.; Solignac, D.; Cueni, T.; Gijs, M. A. M.; *Sens. Actuators, A* **2000**, 84, 103-108
- [28] Szekely, L.; Freitag, R.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, 512, 39-47
- [29] Chiem, N.; Lockyear-Shultz, L.; Andersson, P.; Skinner, C.; Harrison, D. J.; *Sens. Actuators, B* **2000**, 63, 147-152
- [30] Howlader, M. M. R.; Suehara, S.; Suga, T.; *Sens. Actuators, A* **2006**, 127, 31-36
- [31] da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L.; *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4339-4343
- [32] Kubáň, P.; Hauser, P. C.; *Electrophoresis* **2009**, 30, 176-188
- [33] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. Ed. John Wiley & Sons, 2nd ed., New York, 2001
- [34] Wang, W.; Zhou, F.; Zhao, L.; Zhang, J. R.; Zhu, J. J.; *J. Chromatogr. A* **2007**, 1170, 1-8
- [35] Coltro, W. K. T.; Da Silva, J. A. F.; Carrilho, E.; *Electrophoresis* **2008**, 29, 2555-2560
- [36] Baker, D. R. **Capillary Electrophoresis**. Ed. John Wiley & Sons, New York, 1995
- [37] Mourzina, Y.; Steffen, A.; Kalyagin, D.; Carius, R.; Offenhausser, A.; *Electrophoresis* **2005**, 26, 1849-1860
- [38] Pittman, J. L.; Gessner, H. J.; Frederick, K. A.; Raby, E. M.; Blatts, J. B.; *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3531-3538
- [39] Vickers, J.A.; Caulum, M. M.; Henry, C. S.; *Anal. Chem.* **2006**, 78, 7446-7452
- [40] Kim, M.-S., Cho, S., Lee, K.-N., Kim, Y.-K.; *Sens. Actuators, B* **2005**, 107, 818-824

- [41] Mourzina, Y.; Kalyagin, D.; Steffen, A.; Offenhäusser, A.; *Talanta* **2006**, 70, 489-498
- [42] Ren, X.; Bachman, M.; Sims, C.; Li, G. P.; Allbritton, N.; *J. Chromatogr. B* **2001**, 762, 117-125
- [43] Lacher, N. A.; Rooji, N. F.; Verpoorte, E.; Lunte, S. M.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 1004, 225-235
- [44] da Silva, J. A. F.; Tese de doutorado: Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocinética. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2001
- [45] Schuchert-Shia, A.; Hauser, P. C.; *Anal. Biochem.* **2008**, 376, 262-267
- [46] Roman, G. T.; McDaniel, K.; Culbertson, C. T.; *The Analyst* **2006**, 131, 194-201
- [47] Piccin, E.; Coltro, W. K. T.; Da Silva, J. A. F.; Claro-Neto, S.; Mazo, L. H.; Carrilho, E.; *J. Chromatogr. A* **2007**, 1173, 151-158

Capítulo 2

Considerações teóricas sobre Condutometria sem Contato Acoplada Capacitivamente (C⁴D)

Os trabalhos relatados na literatura envolvendo detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C^4D) são, em sua maior parte, experimentais; ainda se faz necessária uma análise detalhada a respeito dos fenômenos e princípios físicos que governam a resposta desses detectores. Neste capítulo, são abordados de forma inédita aspectos teóricos sobre o princípio de funcionamento de detectores C^4D em *microchip* e a modificação de sua resposta analítica frente a parâmetros geométricos da cela de detecção.

2.1. Introdução

Pesquisas e o desenvolvimento de métodos envolvendo plataformas analíticas miniaturizadas alcançaram progresso notório desde a última década. A miniaturização de componentes (válvulas, bombas, misturadores, reguladores de pH, reatores etc.), o desenvolvimento de métodos ultrasensíveis e a integração de detectores, técnicas de separação e sensores diversos, dentre outros, são citados como aspectos positivos obtidos até o momento[1, 2]. Por outro lado, maiores esforços devem ser feitos visando à construção de microssistemas para análises totais (μ TAS) [3]. Esses dispositivos, os quais foram conceitualmente concebidos por Manz, Graber e Widmer em 1990 [4], implicam na integração de componentes que os permitam realizarem todas as etapas de um procedimento analítico (amostragem, pré-tratamento da amostra, separação do analito, reações químicas, detecção e análise dos dados). Essa característica é relevante em muitos casos, particularmente nos campos de diagnósticos clínicos e assistência médica.

Idealmente, um μ TAS deve apresentar os seguintes requisitos: sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade elevadas, tempo de resposta rápido, baixo custo e simplicidade operacional. Neste contexto, os detectores eletroquímicos representam

uma alternativa potencial uma vez que, em geral, agregam todos estes requisitos e possuem alta capacidade de miniaturização destacando a facilidade de deposição de metais finos sobre vidro e outros materiais. Adicionalmente, essas técnicas podem promover a integração de todos os componentes básicos de um μ TAS; bombas, válvulas, sistemas de separação e sensores podem operar com base em princípios eletroquímicos [3].

Em microfluídica, a detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C^4D) tem sido amplamente utilizada na determinação de compostos em matrizes como: i) explosivos [5-7], ii) alimentos [8], iii) bebidas [8-10], iv) medicamentos [11], v) fluidos biológicos [12], e vi) agentes químicos [13]. Recentemente, a C^4D foi também empregada na caracterização de fases estacionárias monolíticas e empacotadas mediante a avaliação da homogeneidade estrutural e densidade das partículas [14]. Como vantagem em relação aos métodos eletroquímicos faradaicos, o isolamento elétrico dos eletrodos com relação aos fluidos eletrolíticos em C^4D evita uma série de problemas comumente presentes no modo com contacto, incluindo a passivação e a contaminação dos eletrodos [15]. Em termos de suas desvantagens, os altos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) figuram como fator limitante principal da C^4D . Alternativas objetivando melhorias na sensibilidade dessa técnica têm sido recentemente reportadas na literatura, a saber: i) sinais de alta tensão (centenas de volts), ii) plano-terra [16], iii) eletrodos semicirculares [9, 17], eletrodos duplos *top-bottom* [10], e iv) detecção condutométrica híbrida, na qual o eletrodo de excitação é mantido em contato com o eletrólito [7]. Além disso, desde que a resposta em C^4D está intimamente relacionada a parâmetros associados às celas de detecção (como posicionamento e área dos eletrodos, espessura do dielétrico e distância entre os eletrodos), estudos analíticos visando um aumento na sensibilidade do método têm sido realizados a partir da variação desses parâmetros [18, 19]. Neste contexto, tais estudos são em sua maior parte experimentais; ainda se faz necessária uma análise detalhada a respeito dos fenômenos e princípios físicos que

levam à modificação da resposta desses detectores em função dos parâmetros mencionados, dentre outros. Por outro lado, a instrumentação, os modelos elétricos, a forma do sinal em eletroforese capilar e os efeitos da capacitância de fuga em C^4D figuram como questões já abordadas com maiores detalhes na literatura [20-23]. Neste capítulo, são abordados de forma inédita aspectos teóricos no que diz respeito ao princípio de funcionamento de detectores C^4D em *microchip* e a modificação de sua resposta analítica frente a parâmetros geométricos da cela de detecção, quais sejam: área dos eletrodos, espessura do material isolante (dielétrico) e distância entre os eletrodos. Por fim, é importante destacar que a teoria apresentada é aplicável também a detectores C^4D acoplados a eletroforese capilar convencional. Nesse caso, dada a simetria cilíndrica entre eletrodo e solução, a capacitância é calculada segundo uma relação matemática distinta à equação (3) [22]. Contudo, seu valor continua a variar com os mesmos parâmetros.

2.2. Conceito

Em C^4D há a ausência de corrente faradaica de modo que os eletrodos, os quais são isolados por um dielétrico, formam essencialmente capacitores com o eletrólito. Em *microchips*, o sistema eletrodo/dielétrico/solução apresenta comportamento similar ao de um capacitor elétrico de placas paralelas, com capacitância dependente da frequência do sinal aplicado. Na Figura 2.1 é ilustrado um modelo elétrico que representa o sistema de detecção, no qual estão presentes os seguintes elementos: i) resistência da solução amostrada (R), ii) capacitâncias intrínsecas aos sistemas eletrodo/dielétrico/solução (C_1 e C_2), as quais estão diretamente associadas com o sinal analítico em C^4D , e iii) uma terceira capacitância consequente do acoplamento capacitivo direto entre os eletrodos, denominada capacitância de

fuga (C_0). Em linhas gerais, a C^4D consiste na aplicação de um sinal alternado (combinando frequências e amplitudes variadas) a um dos eletrodos na cela de detecção (eletrodo de excitação, e_{exc}), o qual gera a polarização dos centros de carga do dielétrico. Este fenômeno induz uma carga na solução eletrolítica mediante a formação de uma diferença de potencial interfacial. Na região do segundo eletrodo (eletrodo receptor, e_r), ocorre processo análogo ao descrito anteriormente com indução de corrente elétrica em e_r [20, 21].

Figura 2.1. Modelo elétrico do detector C^4D em microchip. S, sinal alternado; D, detector; R, resistência da solução; C_1 e C_2 , capacitâncias dos sistemas eletrodo/dielétrico/solução e C_0 , capacitância de fuga.

A corrente medida pelo circuito eletrônico do detector C^4D reflete a admitância (inverso da impedância) total do sistema (Y), a qual é dada pela combinação das admitâncias da parede do dielétrico, intereletrodos e da solução. O módulo de Y varia diretamente com a condutância do eletrólito (L) e com as capacitâncias dos sistemas eletrodo/dielétrico/solução (C_1 e C_2) segundo a equação abaixo [20]:

$$|Y| = 1/[(A^2/d^2L)^2 + 1/4\pi^2f^2C_{eq}]^{1/2} \quad (1)$$

sendo A a área dos eletrodos, d a distância entre os eletrodos, f a frequência em Hz do sinal aplicado a e_{exc} e C_{eq} a capacitância equivalente dos sistemas eletrodo/dielétrico/solução $[C_1C_2/(C_1+C_2)]$.

Conforme pode ser observado na Equação (1), mantendo constantes a frequência de operação e a geometria da cela condutométrica, as variações na admitância ocorrerão em função da condutividade do eletrólito. Desse modo, o sinal obtido em C^4D estará intimamente relacionado com a concentração, carga e mobilidade dos íons presentes em solução (ver Equação 4) [24]. Estudos mostram que há uma relação linear entre os sinais em C^4D (obtidos em V) e L de 0,2 a 1,5 mS.cm⁻¹ de condutividade específica. As soluções empregadas em determinações condutométricas diretas, com e sem contato, usualmente apresentam condutividades dentro dessa faixa [22].

2.3. Uma visão atômica sobre a variação da resposta em C^4D

O efeito de parâmetros da cela de detecção (área dos eletrodos, espessura e constante dielétrica do material isolante dos eletrodos) sobre a resposta em C^4D ocorre mediante a variação de C e L. Para um melhor entendimento do fenômeno responsável por essas variações, consideremos um capacitor sem dielétrico conectado a uma bateria. Na Figura 2.2(A) é apresentado um diagrama esquemático com os elementos desse circuito. Uma vez efetuada a conexão do capacitor, inicialmente descarregado, com a bateria, elétrons (portadores de carga) fluem através dos fios condutores segundo um sentido determinado pelo

campo elétrico da bateria ($\vec{E}_B$). À medida que ocorre o processo de carregamento das placas (eletrodo e solução em C^4D) do capacitor, é formado um campo elétrico $\vec{E}$ contrário a $\vec{E}_B$ e cuja magnitude é dada pela equação:

$$\vec{E} = q/\epsilon_0 A \quad (2)$$

sendo q a carga sobre qualquer uma das placas do capacitor (iguais em módulo) e ϵ_0 a constante de permissividade ($8,85 \text{ pF/m}$). A Equação (2) é obtida pela lei de Gauss desprezando-se o efeito de borda do campo elétrico; logo, $\vec{E}$ é constante por toda a região entre as placas do capacitor. Essa aproximação é válida quando as placas estão muito próximas uma da outra. A partir do momento que os campos elétricos da bateria e do capacitor se igualam, anula-se o campo (e por consequência a corrente) entre esses componentes. Diz-se então que o capacitor está completamente carregado e sua capacitância, que mede a densidade de carga a um dado potencial, alcança seu valor máximo (capacitância de equilíbrio) [25,26].

Na presença de um dielétrico entre as placas do capacitor, C aumenta segundo um fator numérico κ , denominado constante dielétrica (ver Equação 3). Em termos atômicos e moleculares, quais as causas que levam a esse aumento? A constante dielétrica de um material isolante expressa a capacidade de polarização de seus centros de carga sob a presença de um campo elétrico. Independentemente de terem ou não momentos de dipolo elétrico permanentes (dipolos polares ou apolares), as moléculas que constituem o dielétrico adquirem esses momentos por indução dos seus centros de carga positiva e negativa quando submetidas a um campo elétrico externo. A polarização do dielétrico, mostrada na Figura 2.2(B), gera um campo elétrico $\vec{E}_D$ de menor intensidade e contrário ao campo do capacitor $\vec{E}$. Como consequência, esse último é enfraquecido e, logo, desde que $\vec{E}$ se opõe ao campo da bateria, o

processo de carregamento do capacitor tem sua eficiência aumentada com um acréscimo na capacitância de equilíbrio [26].

Figura 2.2. Diagramas esquemáticos com os elementos de um circuito elétrico contendo capacitor e bateria (A) e o fenômeno de polarização dos centros de carga (+/-) do dielétrico em capacitores (B). $\vec{E}_B$, $\vec{E}$ e $\vec{E}_R$, campos elétricos da bateria, inicial e resultante do capacitor, respectivamente.

No âmbito matemático, o efeito do fenômeno de polarização do dielétrico (cuja intensidade é expressa por κ) sobre C é ilustrado pela equação (3), a qual é calculada utilizando-se a lei de Gauss assumindo a ausência do efeito de borda do campo elétrico [26].

$$C = \kappa \epsilon_0 A/d \quad (3)$$

Da mesma forma que ocorre com os capacitores elétricos, em C^4D as modificações nos valores de capacitância se devem, primeiramente, a alterações no seu campo elétrico as quais decorrem de uma polarização mais ou menos efetiva das moléculas que constituem o dielétrico. Por fim, em adição ao aumento em C , um processo de polarização do dielétrico com maior intensidade conduz a um aumento na concentração de portadores de carga (c_i) na camada dupla de capacitância para transdução condutométrica, elevando-se assim a condutância conforme mostra a equação abaixo [24]:

$$L = F.(A/d).\sum c_i |z_i| u_i \quad (4)$$

em que F é a constante de Faraday, z_i é a carga e u_i a mobilidade iônica efetiva dos íons presentes na solução amostrada.

2.4. Efeito dos parâmetros da cela de detecção sobre a resposta em C^4D

Em microdispositivos acoplados à C^4D , a espessura do dielétrico (usualmente menor que 150 μm) é pequena o suficiente a ponto de podermos negligenciar os efeitos de borda do campo elétrico. Por conseguinte, conforme discutido anteriormente, esse campo será

constante por todo o volume de detecção. Nessas circunstâncias, aplicando-se a lei de Gauss, obtemos a Equação (3) a partir da qual observa-se que C aumenta com κ e A e diminui com a espessura do dielétrico d [26].

Área dos eletrodos

O aumento da capacitância com a área dos eletrodos (volume de detecção) pode ser explicado com base em dois fenômenos: i) intensificação do processo de polarização das moléculas do dielétrico, com consequente redução de $\bar{E}$ [25], e ii) aumento adicional na concentração de portadores de carga no eletrólito. Este último, conforme dito anteriormente, promove uma elevação na condutância do eletrólito a qual é dada pela combinação linear de contribuições de todos os íons presentes na solução amostrada. Essas contribuições levam em conta a concentração de equilíbrio (c_i) e a natureza (z_i e u_i) dessas espécies como mostrado na Equação (4) [24].

O efeito da área dos eletrodos sobre a resposta analítica em C^4D foi demonstrada por Lee e colaboradores [9]. Sinais eletroforéticos a amostras de Rodamina B foram obtidos utilizando-se microdispositivos contendo eletrodos planares e semicirculares, com os quais foram medidas intensidades de capacitância mais de quatro vezes maiores para os eletrodos semicirculares que comparados aos planares. Também é importante destacar que o simples aumento da área de eletrodos planares pela sua largura não implica necessariamente em acréscimo da resposta analítica em C^4D . Dados revelam que larguras maiores que 2 mm, embora acarretem em aumento do valor de capacitância, resultam em uma redução do sinal devido ao aumento paralelo da capacitância de fuga [18]. Esse parâmetro não tem efeito sobre a sensibilidade do método em termos de altura de pico. Contudo, sua presença eleva o sinal de fundo como mostra a Equação (5), conduzindo a uma deterioração da relação sinal/ruído[22, 23].

$$V_{out} = - V_{in} / \{ (1 + 2\pi j f R C_o) / [2\pi j f (C + C_o) [1 + (2\pi j f R C C_o / C + C_o)]] \} R_f \quad (5)$$

em que V_{out} e V_{in} são, respectivamente, as voltagens em volts de saída e entrada do detector, j é uma unidade imaginária, R_f é a resistência de retorno sobre a amplificação do sinal de e_r em Ω , R é a resistência da cela de detecção em Ω , C é a capacitância da cela em F e C_o é a capacitância de fuga em F.

Espessura do material isolante dos eletrodos

A redução da capacitância com a espessura do dielétrico, por outro lado, ocorre graças ao aumento no número de interações/colisões entre as moléculas do dielétrico durante o seu processo de polarização [25]. Esse fenômeno tende a reduzir o campo elétrico estabelecido pelo material isolante, aumentando-se, assim, o campo do capacitor. Segundo dados na literatura [18], há uma perda de aproximadamente 75% do sinal analítico quando d é aumentado de 125 para 425 μm .

Constante dielétrica do material isolante dos eletrodos

O efeito da constante dielétrica do material isolante dos eletrodos sobre a capacitância foi discutido no item anterior. Uma vez que expressa a capacidade de polarização de seus centros de carga, dielétricos com maior valor de κ resultam em uma redução mais pronunciada de $\bar{E}$ [26]. Dados experimentais sobre a influência de κ sobre a resposta analítica em C^4D não existem na literatura.

2.5. Efeito da distância entre os eletrodos sobre a condutância

Uma menor intensidade de sinal é observada em C^4D para maiores distâncias entre os eletrodos. Respostas obtidas para sais de lítio demonstraram uma redução de aproximadamente 60% do sinal quando essa distância aumentou de 0,5 para 3,0 mm [18]. Esses resultados se devem a uma queda na condutância do eletrólito, que pode ser explicada com base em dois fenômenos de retardamento dos íons segundo a teoria da atração interiônica de Debye-Hückel-Onsager: i) efeito eletroforético e ii) efeito assimétrico. O primeiro tem sua origem na fricção entre íons hidratados de carga oposta, os quais migram em sentidos opostos. O efeito assimétrico, por sua vez, é consequência da distribuição assimétrica de íons à medida que ocorre o processo de polarização dessas espécies sob o campo aplicado pelos eletrodos [27]. Ambos efeitos contribuem para um retardamento do fluxo de migração dos íons presentes no eletrólito, reduzindo, desse modo, a condutância/conductividade da solução amostrada [28]. Matematicamente, a redução da condutividade com os efeitos eletroforético e assimétrico é expressa pela equação [27].

$$\Lambda_c = \Lambda_o - (A + B\Lambda_o)(c)^{1/2} \quad (6)$$

na qual Λ_c e Λ_o são, respectivamente, as condutividades molares a uma concentração de íons c e à diluição infinita. A e B , por outro lado, são constantes (para um íon particular em um solvente específico a uma dada temperatura) que correspondem aos efeitos assimétrico e eletroforético, respectivamente. Os valores de condutividade calculados pela Equação (6) concordam com aqueles determinados experimentalmente, de modo especial para soluções diluídas.

2.6. Capacitância e reatância capacitiva

Os capacitores formados pelos sistemas eletrodo/dielétrico/solução em C⁴D são caracterizados por uma impedância, denominada reatância capacitiva em condutometria (X_C), a qual é inversamente dependente de C conforme mostra Equação (7) [29]

$$X_C = 1/2\pi fC \quad (7)$$

Substituindo (3) em (7), temos:

$$X_C = d/2\pi f\kappa\epsilon_0 A \quad (8)$$

A Equação (8) mostra claramente que, visando diminuir a impedância imposta ao acoplamento capacitivo eletrodo/solução, sinais com maiores frequências devem ser utilizados para celas C⁴D incorporando dielétricos espessos e de baixa constante dielétrica e eletrodos com área reduzida.

2.7. Condutância e concentração do analito

Para que ocorra uma variação linear da condutância em função da concentração de uma espécie iônica i , é necessário que parâmetros como a constante de cela (A/d) e a viscosidade da solução (η) mantenham-se constante durante as medidas. Matematicamente, isso pode ser ilustrado considerando-se, a princípio, a fórmula para a mobilidade iônica efetiva [24].

$$u_i = |z_i|e/6\pi\eta r_i \quad (9)$$

cujas constantes envolvidas representam a carga elementar (e) e o raio iônico da partícula considerada (r_i). Substituindo (9) em (3), temos:

$$L = F(A/d)z_i^2 e/6\pi\eta dr_i \cdot c_i \quad (10)$$

Considerando-se um dado analito i e desde que A, d, e η mantenham-se constantes, conclui-se então que L irá variar linearmente em função de c_i como se segue:

$$L = k' \cdot c_i \quad (11)$$

com

$$k' = F(A/d)z_i^2 e/6\pi\eta r_i \quad (12)$$

2.8. Conclusões

Uma visão físico-química foi abordada neste capítulo buscando uma análise detalhada sobre os fenômenos e princípios que governam a resposta analítica em detectores condutométricos sem contato acoplados capacitivamente em microchips. Embora a análise tenha contemplado detectores C^4D em microchips, é importante ressaltar que a teoria apresentada é aplicável, em sua maior parte, a detectores C^4D acoplados a sistemas microfluídicos em geral englobando a eletroforese capilar convencional conforme dito no item 2.1. Por fim, acredita-se que o entendimento teórico do método é sumamente relevante no que diz respeito ao desenvolvimento de técnicas e protocolos que venham a resultar em uma performance analítica mais eficiente. Com base em toda a teoria abordada neste capítulo, o planejamento de experimentos e desenvolvimento de novos meios de integrar eletrodos metálicos para C^4D em microchips, foram realizados para ilustrar o efeito da constante dielétrica do material isolante dos eletrodos sobre a resposta em C^4D .

Referências

- [1] Arora, A.; Simone, G.; Salieb-Beugelaar, G. B.; Kim, J. T.; Manz, A.; *Anal. Chem.* **2010**, 82, 4830.
- [2] Sassa, F.; Morimoto, K.; Satoh, W.; Suzuki, H.; *Electrophoresis* **2008**, 29, 1787.
- [3] Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H.M.; *Sensors and Actuators B* **1990**, 1, 244.
- [4] Wang, J.; Pumera, M.; *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5919.
- [5] Wang, J.; Chen, G.; Muck Jr, A.; Collins, G. E.; *Electrophoresis* **2003**, 24, 3728.
- [6] Wang, J.; Chen, G.; Muck, A.; *Talanta* **2009**, 78, 207.
- [7] Kubáň, P.; Hauser, P. C.; *Electrophoresis* **2005**, 26, 3169.
- [8] Lee, C. Y.; Chen, C. M.; Chang, G. L.; Lin, C. H.; Fu, L. M.; *Electrophoresis* **2006**, 27, 5043.
- [9] Mahabadi, K. A.; Rodriguez, I.; Lim, C. Y.; Maurya, D. K.; Hauser, P. C.; Rooij, N. F.; *Electrophoresis* **2010**, 31, 1063.
- [10] Li, O. L.; Tong, Y. L.; Chen, Z. G.; Liu, C.; Zhao, S.; Mo, J. Y.; *Chromatographia* **2008**, 68, 1039.
- [11] Kubáň, P.; Hauser, P. C.; *LOC* **2008**, 8, 1829.
- [12] Wang, J.; Pumera, M.; Collins, G. E.; Mulchandani, A.; *Anal. Chem.* **2002**, 74, 6121.
- [13] Walsh, Z.; Vásquez, M.; Benito-Lopez, F.; Paull, B.; Macka, M.; Svec, F.; Diamond, D.; *LOC* **2010**, 10, 1777.
- [14] Kubaň, P.; Hauser, P. C.; *Anal. Chim. Acta* **2008**, 607, 15.
- [15] Tanyanyiwa, J.; Hauser, P. C.; *Anal. Chem.* **2002**, 74, 6378.
- [16] Xu, Y.; Liang, J.; Liu, H.; Hu, X.; Wen, Z.; Wu, Y.; Cao, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 397, 1583.
- [17] Kubaň, P.; Hauser, P. C. *LOC* **2005**, 5, 407.
- [18] Kubaň, P.; Hauser, P. C. *LOC* **2008**, 8, 1829.
- [19] Brito-Neto, J. G. A.; Da Silva, J. A. F.; Blanes, L.; Do Lago, C. L.; *Electroanalysis* **2005**, 17, 1198.
- [20] Brito-Neto, J. G. A.; Da Silva, J. A. F.; Blanes, L.; Do Lago, C. L. *Electroanalysis* **2005**, 17, 1207.
- [21] Kubaň, P.; Hauser, P. C. *Electrophoresis* **2004**, 25, 3387.
- [22] Kubaň, P.; Hauser, P. C. *Electrophoresis* **2004**, 25, 3398.

- [23] Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, John Wiley & Sons: New York, 2001.
- [24] Gründler, P.; **Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers**. Springer: Berlin, 2007.
- [25] Halliday, D.; Resnick, R.; Walker, J.; **Fundamentals of Physics**, John Wiley & Sons: New York, 2001.
- [26] Vogel, A. I.; **Química Analítica Qualitativa**, Mestre Jou: São Paulo, 1981.
- [27] Damaskin, B.; Petri, O.; **Fundamentos da electroquímica teorica**. MIR: Moscow, 1985.
- [28] Lichtenberg, J.; Rooij, N. F.; Verpoorte, E.; *Electrophoresis* **2002**, 23, 3769

Capítulo 3

Dopagem da camada dielétrica: uma alternativa para aumento de sensibilidade da detecção condutométrica sem contato em microchip

3.1 Introdução

Microchips híbridos de PDMS/vidro representam uma alternativa potencial para a produção de dispositivos analíticos miniaturizados [1,2]. Esse tipo de plataforma microfluídica é vantajosa porque os microcanais poliméricos podem ser facilmente fabricados por litografia suave e selados, reversível ou irreversivelmente, contra uma placa plana de vidro contendo outros elementos analítico integrados como, por exemplo, eletrodos[3]. Além disso, esses microchips exibem boa precisão inter-ensaios decorrente da repetibilidade associada ao seu processo de fabricação [4]. Em microfluídica, a C^4D tem se mostrado uma ferramenta útil para a determinação de uma ampla gama de compostos, incluindo: biomoléculas [5-9], íons orgânicos [10-12], e inorgânicos [13-17]. Este método de detecção tem vantagens consideráveis, tais como a simplicidade da instrumentação, baixo custo e alta compatibilidade com as técnicas de miniaturização.

Para se realizar medidas de C^4D é necessário que os eletrodos estejam separados fisicamente da solução eletrolítica no interior do canal por uma camada isolante, no caso um dielétrico [18]. O fato dos eletrodos não estarem em contato com a solução evita uma série de problemas frequentemente encontrados em outras técnicas, como amperometria e até mesmo na condutometria convencional. Dentre os problemas, pode-se citar a passivação, contaminação e formação de bolhas na superfície dos eletrodos [19, 20]. Provavelmente, o fator limitante principal de sistemas C^4D é a baixa sensibilidade. Algumas alternativas para melhorar o limite de detecção (LD) dessa técnica tem sido publicadas, como: i) a aplicação de sinais de excitação da ordem de centenas de volts, ii) a utilização de um plano terra para reduzir a capacitância de fuga [21], iii) eletrodos semicirculares [14], iv) utilização de eletrodos duplos (em cima e embaixo do canal analítico) denominados *dual top-bottom* [17], v) novos materiais para serem utilizados como dielétrico [22] e vi) a detecção C^4D híbrida (na

qual o eletrodo de excitação é mantido em contato com a solução) [23], bem como a utilização de novas geometria de células de detecção [24].

Considerando as vantagens da C^4D e sua ampla utilização em aplicações analíticas, este capítulo descreve um novo processo para aumentar a sensibilidade normalmente deficiente (expressa em termos de LD) desta detecção acoplada a microdispositivos híbridos PDMS/vidro. Esta abordagem consiste na dopagem da camada isolante (membrana de PDMS, mesma tecnologia apresentada no Capítulo 1) com um material semiconductor (TiO_2), a fim de aumentar a sua constante dielétrica.

3.1.1 Base teórica da metodologia proposta

A metodologia proposta baseia-se no aumento da magnitude da constante dielétrica da membrana de PDMS adicionando-se TiO_2 , em consequência, é elevado o sinal analítico da C^4D como será discutido abaixo. O uso de semicondutores para aumentar a condutividade dos dielétricos já é adotado na fabricação de materiais de alta densidade de armazenamento de energia para composição de capacitores [25-27].

Em C^4D não há corrente faradáica de modo que os eletrodos, que são isolados por um dielétrico, assumem essencialmente comportamento de capacitores com o eletrólito no canal analítico. Em microchips, o sistema eletrodo/dielétrico/solução apresenta comportamento similar ao de um capacitor de placas paralelas. A Figura 3.1(A) ilustra um modelo elétrico do detector, no qual os seguintes elementos estão presentes: resistência da solução da amostra (R), capacitância relativa ao sistema eletrodo/solução (C_1 e C_2) e uma capacitância residual resultante do acoplamento capacitivo direto entre os eletrodos, chamado de capacitância de fuga (C_0) e que afeta negativamente a sensibilidade da técnica. Em geral, a C^4D consiste na

aplicação de um sinal alternado de alta frequência a um dos eletrodos (eletrodo de excitação, e_{exc}), o qual gera a polarização dos centros de carga do dielétrico. Este fenômeno induz uma carga na solução mediante a formação de uma diferença de potencial interfacial. Na região do segundo eletrodo (eletrodo receptor, e_r) ocorre um processo análogo ao anterior, com a indução de corrente elétrica em e_r [18, 28].

Figura 3.1. Modelo elétrico representativo da cela de detecção do sistema C^4D (A), diagrama esquemático com os elementos de um circuito elétrico com capacitores e bateria (B), e representação da polarização dos centros de carga de um dielétrico em um capacitor (C). Sendo: S, sinal alternado; D, detector; $\vec{E}_B$, $\vec{E}$, e $\vec{E}_R$, campo elétrico da bateria, campo elétrico final e campo elétrico resultante do capacitor, respectivamente.

A corrente medida pelo circuito eletrônico do detector C^4D reflete a admitância total do sistema (inverso da impedância) (Y), que é dada pela combinação das admitâncias da parede do dielétrico, inter-eletrodos, e da solução. O módulo de Y varia diretamente com a resistência do eletrólito (L) e as capacitâncias do sistema eletrodo/dielétrico/solução (C_1 e C_2), de acordo com a equação [18]:

$$|Y| = 1/[(A^2/d^2L)^2 + 1/4\pi^2f^2C_{eq}]^{1/2} \quad (1)$$

sendo A a área dos eletrodos, d a espessura da camada dielétrica, f a frequência do sinal aplicado ao e_{exc} em Hz, e C_{eq} a capacitância equivalente do sistema eletrodo/dielétrico/solução $[C_1C_2 / (C_1 + C_2)]$. Como pode ser observado na Equação 1, mantendo constantes a frequência de operação e a geometria da célula de detecção, as variações na admitância estarão diretamente relacionadas à condutância (ou condutividade) do eletrólito. Desta forma, o sinal analítico em C^4D está intimamente relacionado com a concentração, carga, e mobilidade dos íons em solução (ver equação 4) [29]. Estudos mostram que há uma relação linear entre o sinal em C^4D (obtido em volt) e a resistividade do eletrólito (L) para soluções de condutividade específica dentro do intervalo de 0,2 a 1,5 mS.cm⁻¹. As soluções utilizadas na determinação condutométrica direta, com e sem contacto, geralmente apresentam condutividades dentro deste intervalo [30].

O efeito da constante dielétrica do material isolante dos eletrodos sobre a resposta em C^4D ocorre por meio do aumento de C (C_1 e C_2). Para melhor entendimento sobre o fenômeno responsável por estas variações, vamos considerar um capacitor sem dielétrico conectado a uma bateria. Na Figura 3.1(B), um diagrama esquemático contendo os elementos deste circuito é apresentado. Uma vez efetuada a ligação do capacitor, inicialmente descarregados, com a bateria, elétrons (portadores de carga) fluem através de fios condutores de acordo com a direção determinada pelo campo elétrico da bateria ($\vec{E}_B$). À medida que ocorre o processo de carregamento das placas do capacitor (eletrodo e solução em C^4D), um campo elétrico ($\vec{E}$) contrário a $\vec{E}_B$ é formado cuja magnitude é dada pela equação:

$$\vec{E} = q/\epsilon_0 A \quad (2)$$

sendo q a carga acumulada em qualquer uma das placas do capacitor (iguais em módulo) e ϵ_0 a constante de permissividade elétrica (8,85 pF/m). A Equação (2) é obtida pela lei de Gauss negligenciando o efeito de borda de campo elétrico e, portanto, $\vec{E}$ é constante em toda a região entre as placas do capacitor. Esta aproximação é válida quando as placas estão muito próximas umas das outras. Uma vez que os campos elétricos da bateria e do capacitor se igualam, cancela-se o campo (e consequentemente a corrente) entre esses componentes. Diz-se então que o capacitor está totalmente carregado e sua capacitância, que mede a densidade de carga em um dado potencial, alcança seu valor máximo (capacidade de equilíbrio) [31,32].

Na presença de uma camada dielétrica entre as placas do capacitor, C aumenta segundo um fator numérico κ , chamado constante dielétrica, conforme a equação (3).

$$C = \kappa \epsilon_0 A/d \quad (3)$$

Mas o que faz com que ocorra esse aumento em C ? A constante dielétrica do material isolante expressa a capacidade de polarização de seus centros de carga em um campo elétrico. Independentemente de terem ou não momentos de dipolo elétrico permanente, as moléculas que constituem o dielétrico adquirem esses momentos através do alinhamento dos seus centros de carga positivos e negativos quando expostos a um campo elétrico externo. Esse fenômeno de polarização, mostrado na Figura 3.1(C), gera um campo elétrico $\vec{E}_D$ menos intenso e contrário ao campo do capacitor $\vec{E}$. Como consequência, $\vec{E}$ é enfraquecido e, portanto, uma vez que esse se opõe ao campo da bateria, o processo de carregamento do capacitor se intensifica com um consequente aumento na capacitância de equilíbrio [32].

Assim como ocorre com os capacitores elétricos, em C^4D o incremento nos valores de capacitância do sistema eletrodo/dielétrico/solução decorre, principalmente, de uma redução no seu campo elétrico que surge a partir de uma polarização mais eficaz dipolos do dielétrico.

A eficiência deste processo de polarização é expressa por κ . Finalmente, em adição ao aumento de C , uma polarização do dielétrico mais eficiente resulta em uma maior concentração de portadores de carga (c_i) na camada dupla de capacitância para a transdução condutométrica, elevando, portanto, a condutância, como mostrado na equação:

$$L = F.(A/d).\sum c_i |z_i| u_i \quad (4)$$

onde se tem os seguintes parâmetros: constante de Faraday (F), carga (z_i), e mobilidade efetiva (u_i) das espécies presentes na amostra [29].

3.2 Parte Experimental

O cloreto de amônio (NH_4Cl) foi adquirido da Sigma-Aldrich Chemical Co. Amostras de TiO_2 foram gentilmente cedidas pela Nanox[®] (São Carlos, SP, Brasil). Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada (Milli-Q, Bedford), com resistividade não inferior a 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$. A instrumentação analítica necessária para as medidas de C^4D (Figura 3.2) é composta por três componentes principais: (i) gerador de sinal alternado (Minipa, modelo MFG 4202, São Paulo, SP, Brasil), (ii) detector de condutividade, cujo circuito eletrônico foi projetado de acordo com esquema previamente reportado na literatura [33], e (iii) duas bombas seringa para movimentação microfluídica (New Era Pump Systems Inc., modelo NE-300, Boston, MA, EUA). A aquisição de dados foi realizada a partir de um software escrito em LabVIEW[®]. Micrografias de força atômica (AFM) dos polímeros modificados e não modificados foram obtidas, em modo oscilante, em um equipamento Veeco (modelo MultiModeTM SPM), com 512 x 512 pixels de resolução máxima e detecção

óptica. As imagens de AFM foram registradas à temperatura ambiente, taxa de 1,2 Hz, e varreduras de 5 x 5 μm .

Figura 3.2. Instrumentação utilizada nos experimentos de análise em fluxo: gerador de funções (G); bombas seringa (B); gaiola de Faraday para acomodação do microchip e circuito eletrônico do detector (C); circuito de amplificação do sinal do detector (A); fonte de alimentação do sistema (F).

A fabricação dos dispositivos propostos envolveu cinco etapas principais: (i) deposição dos eletrodos (Ti/Au/Ti) em vidro, (ii) adição de TiO_2 em diferentes porcentagens (0, 10, 25, e 50%, massa de TiO_2 /massa de PDMS) durante a preparação do PDMS usando seu monômero e agente de cura, (iii) isolamento elétrico dos eletrodos por uma membrana PDMS dopada com TiO_2 (PDMS_d) via *spin-coating*, seguido da cura do polímero, (iv) fabricação de microcanais em PDMS por litografia suave, e (v) selagem assistida por plasmas de O_2 do dispositivo: vidro/ PDMS_d /PDMS. Em relação à deposição das membranas de PDMS_d sobre superfície de vidro, foi utilizado um *spinner* a 1000 rpm durante 10 s.

Posteriormente, a etapa de cura foi realizada a 90°C durante 5 min, resultando em uma membrana com 50 µm de espessura. A Figura 3.3 mostra as três camadas do dispositivo (Figura 3.3A) e uma fotografia do dispositivo final (Figura 3.2B). O microchip apresenta duas vias de entrada e uma de saída. Medições de condutividade foram realizadas em tempo real, comutando-se água e eletrólito. As respostas analíticas registradas neste estudo foram associadas a diferenças de sinal após a estabilização do sinal da amostra. Nota-se na Figura 3.3 a presença de 2 eletrodos receptores (e_{r1} e e_{r2}) devido ao fato de ter sido utilizada máscara projetada para utilização de sistema duplo de detecção, porém em todos os experimentos realizados nesta tese foi utilizado somente um dos eletrodos receptores.

Figura 3.3. Camadas constituintes (A) e imagem do dispositivo (B) contendo a membrana de PDMS_d dopada com 1% de TiO₂ (esta porcentagem foi escolhida apenas para fins ilustrativos pois permite visualizar com mais clareza os eletrodos). Sendo: e_{exc} , eletrodo de excitação; e_{r1} e e_{r2} , eletrodos receptores; e i , interface vidro/PDMS.

Valores de LD foram determinados usando soluções padrão de NH₄Cl (diluído em água) e calculados com base em uma relação S/R = 3 [34]. Para construção das curvas de calibração, foram realizadas cinco medidas para cada nível de concentração. O método dos

mínimos quadrados foi empregado para obter a regressão linear. Análise de resíduos e testes de linearidade F a 95,0, 99,0 e 99,9% de confiabilidade foram usados para avaliar a adequação do modelo linear às regressões [35].

3.3 Resultados e Discussão

A análise morfológica da superfície dos dielétricos foi realizada por imagens de AFM usando placas de vidro de $1,0 \text{ cm}^2$ de área revestidas com os dielétricos em questão. Parâmetros de rugosidade e gráfico fractal foram obtidos utilizando-se o software Nanoscope 6.11 (programa fornecido pelo fabricante do equipamento). Os parâmetros de rugosidade considerados foram os seguintes: rugosidade média quadrática (RMS, medida estatística da magnitude de uma quantidade variável), área superficial (S_{ar} , incremento da área superficial em relação à área do plano projetada sobre os eixos xy), e densidade de picos (S_{ds}). Imagens de AFM obtidas para as membranas PDMS_d dopadas com 0, 10, 25 e 50% de TiO₂ são mostradas na Figura 3.4. Como verificado na Tabela 3.1, a adição de níveis crescentes de TiO₂ gerou superfícies com maior rugosidade, área e densidade de picos.

Figura 3.4. Imagens de AFM registradas para as membranas de PDMS contendo: 0 (A), 10 (B), 25 (C), e 50% (D) de TiO_2 .

Tabela 3.1. Valores de RMS, S_{ar} , e S_{ds} calculados para as membranas de PDMS.

Percentagem de dopagem (%)	RMS (nm)	S_{ar} (%)	S_{ds} (μm^2)
0	0,51	0,05	693,32
10	2,37	0,12	710,76
25	2,64	0,21	813,32
50	4,60	1,15	869,76

A Figura 3.5 corresponde às respostas analíticas obtidas para as membranas de PDMS_d usando padrões de NH₄Cl. As curvas de calibração são mostradas juntamente com os dados analíticos na Figura 3.5. Adotamos as seguintes condições experimentais: tempo de amostragem de 25 segundos; 1,0 mm de largura e espaçamento entre os eletrodos, canais microfluídicos em forma de Y (ver figura 3.3), apresentando 250 µm de largura e 50 µm de profundidade, 100 µL.min⁻¹ de vazão para amostra e água; 400 kHz de frequência e potencial pico a pico igual a 2,5 V_{p-p}. A análise de resíduos e testes de linearidade validaram os ajustes lineares para todos os modelos de calibração. Valores de LD calculados para cada nível de dopagem estão detalhados na Figura 3.6A. Pode-se observar uma redução significativa nos valores de LD conforme aumentam-se os níveis de TiO₂ adicionados ao PDMS, bem como um aumento na sensibilidade analítica (inclinação das curvas de calibração). Além disso, com base na Figura 3.6A, as variações nos valores de LD tendem a reduzir para níveis de TiO₂ superiores a 50%.

O PDMS utilizado neste estudo tem um valor de κ de 2,65 (25 ° C, 1 kHz) [36], enquanto que o TiO₂ possui as seguintes propriedades: estado cristalino rutilo, resistência elétrica de 12 Ω (a 30°C) [37] e κ igual a 86,00 (25°C, 1 kHz) [38]. Leis de misturas relatadas na literatura permitem correlacionar a constante dielétrica de materiais compostos por mais de um constituinte (como é o caso deste trabalho: PDMS/TiO₂) com as dos seus constituintes individuais [39]. Entre essas leis, a lei generalizada de Looyenga [40] não envolve considerações sobre a forma das partículas, sendo, em princípio, aplicável a qualquer tipo de partícula conforme reportado na literatura [39, 41, 42]. Aplicando-se a lei de Looyenga generalizada, foram obtidos valores de κ para o PDMS_d dopado com 10, 25 e 50% em TiO₂, que são apresentados na Figura 3.6B em função dos sinais de C⁴D para solução de NH₄Cl a 2 mmol.L⁻¹.

Figura 3.5. Sinais obtidos para padrões de NH_4Cl em dispositivos com as seguintes porcentagens de dopagem da membrana de PDMS: 0 (A), 10 (B), 25 (C), e 50% (D).

Figura 3.6. Efeito da dopagem nos limites de detectabilidade em C⁴D (A) e variação do sinal obtido para solução de 2 mmol.L⁻¹ de NH₄Cl em função de κ para dispositivos contendo membranas de PDMS dopadas com 0, 10, 25, e 50% de TiO₂ (B). Os valores de LD e κ estão discriminados nos gráficos A e B respectivamente.

Uma vez que os eletrodos utilizados neste estudo apresentaram as mesmas dimensões e geometria, os microchips diferiam apenas em termos de área superficial do dielétrico (Tabela 3.1) e ϵ (ver Figura 3.6B) entre os fatores que afetam o valor de C (ver equação 2). O aumento da área de superfície das membranas de PDMS para níveis mais elevados de dopagem tende a aumentar o número de portadores de carga que formam a dupla camada de capacitância, gerando uma polarização dos dipolos do dielétrico com maior intensidade, aumentando, por consequência, a condutância do sistema solução/eletrodo em C⁴D. Sinais analíticos e constantes dielétricas, contudo, apresentaram relação linear (ver Figura 3.6B), como confirmado pela análise de resíduos e do teste F de linearidade. Assim, podemos concluir que as variações na área não afetaram as respostas em C⁴D, o que resultaria em um desvio positivo de ϵ em relação aos sinais de C⁴D.

3.4 Conclusões

Uma nova estratégia para aumentar a sensibilidade da C^4D em microchips híbridos de vidro/PDMS foi relatada neste capítulo. Esta estratégia, que consiste basicamente no aumento da constante dielétrica da camada isolante dos eletrodos, envolveu um protocolo experimental que é simples, barato e rápido. Além disso, a adição de níveis crescentes de TiO_2 não afetou a etapa de cura do PDMS e mostrou-se eficaz em relação ao aumento da condutância em C^4D . Em etapas futuras, outros percentuais de dopagem, substâncias dopantes (condutores e semicondutores) para atuarem como dielétricos, e diferentes espessuras do dielétrico podem ser investigados visando um aumento mais significativo na sensibilidade. Esse campo de pesquisa é muito importante quanto ao desenvolvimento de instrumentação para química analítica; pois com a apresentação de LD mais baixos, a C^4D tem grande chance de se tornar uma alternativa em potencial frente aos métodos eletroquímicos faradâicos em que as interações eletrodo/solução geram numerosos inconvenientes. Neste contexto, a detecção condutométrica sem contato representa uma ferramenta atrativa para diversas finalidades e matrizes, podendo ser empregada em procedimentos que envolvam titulações, eletroforese capilar ou sensores químicos. Finalmente, utilizando diferentes dielétricos, dopantes e métodos de dopagem, é importante ressaltar que o método descrito pode ser estendido para outras plataformas microfluídicas, como vidro/PMMA e vidro/vidro, entre outras possibilidades.

Referências

- [1] Li, O. L.; Tong, Y. L.; Chen, Z. G.; Liu, C.; Zhao, S.; Mo, J. Y. *Chromatographia* **2008**, 68, 1039–1044.
- [2] Moreira, N. H.; Almeida, A. L. J.; Piazzeta, M. H. O.; De Jesus, D. P.; Deblire, A.; Gobbi, A. L.; Da Silva, J. A. F. *LOC* **2009**, 9, 115–121.
- [3] Coltro, W. K. T.; Lunte, S. M.; Carrilho, E. *Electrophoresis* **2008**, 24, 4928–4937.
- [4] Becker, H.; Gärtner, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 390, 89–111.
- [5] Gong, X. Y.; Dobrunz, D.; Kümin, M.; Wiesner, M.; Revell, J. D.; Wennemers, H.; Hauser, P. X. *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 565–573.
- [6] Abad-Villar, E. M.; Kubaň, P.; Hauser, P. C. *Electrophoresis* **2005**, 26, 3609–3614.
- [7] Abad-Villar, E. M.; Tanyanyiwa, J.; Fernández-Abedul, M. T.; Costa-García, A.; Hauser, P. C. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1282–1288.
- [8] Tuma, P.; Samcova, E.; Opekar, F.; Jurka, V.; Stulik, K. *Electrophoresis* **2007**, 28, 2174–2180.
- [9] Xu, Y.; Liang, J.; Liu, H.; Hu, X.; Wen, Z.; Wu, Y.; Cao, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 397, 1583–1593.
- [10] Gong, X. Y.; Hauser, P. C. *Electrophoresis* **2006**, 27, 4375–4382.
- [11] Tanyanyiwa, J.; Abad-Villar, E. M.; Hauser, P. C. *Electrophoresis* **2004**, 25, 903–908.
- [12] Wang, J.; Chen, G.; Muck, A.; Chatrathi, M.; Mulchandani, A.; Chen, W. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 505, 183–187.
- [13] Wang, J.; Chen, G.; Muck, A. M.; Collins, G. E. *Electrophoresis* **2003**, 24, 3728–3734.
- [14] Lee, C. Y.; Chen, C. M.; Chang, G. L.; Lin, C. H.; Fu, L. M. *Electrophoresis* **2006**, 27, 5043–5050.
- [15] Kubaň, P.; Hauser, P. C. *LOC* **2008**, 8, 1829–1836.

- [16] Qu, S.; Chen, X.; Chen, D.; Yang, P.; Chen, G. *Electrophoresis* **2006**, 27, 4910–4718.
- [17] Mahabadi, K. A.; Rodriguez, I.; Lim, C. Y.; Maurya, D. K.; Hauser, P. C.; Rooij, N. F.; *Electrophoresis* **2010**, 31, 1063–1070.
- [18] Brito-Neto, J. G. A.; Da Silva, J. A. F.; Blanes, L.; Do Lago, C. L. *Electroanalysis* **2005**, 17, 1198–1206.
- [19] Guijt, R. M.; Evenhuis, C. J.; Macka, M.; Haddad, P. R. *Electrophoresis* **2004**, 25, 4032–4057.
- [20] Kubaň, P.; Hauser, P. C. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 607, 15–29.
- [21] Tanyanyiwa, J.; Hauser, P. C. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 6378–6382.
- [22] Fercher, G.; Smetana, W.; Vellekoop, M. J. *Electrophoresis* **2009**, 30, 2516–2522.
- [23] Wang, J.; Chen, G.; Muck, A. *Talanta* **2009**, 78, 207–211.
- [24] Kubaň, P.; Hauser, P. C. *LOC* **2008**, 8, 1829–1836.
- [25] Bai, Y.; Cheng, Z. Y.; Bharti, V.; Xu, H. S.; Zhang, Q. M. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 76, 3804–3806.
- [26] Yan, Y. Y.; Jin, L.; Feng, L. X.; Cao, G. H. *Mater. Sci. Eng. B* **2006**, 130, 146–150.
- [27] Kulek, J.; Szafraniak-Wisa, I.; Hilczer, B.; Połomska, M. *J. Non-Cryst. Solids* **2007**, 353, 4448–4452.
- [28] Kubaň, P.; Hauser, P. C. *Electrophoresis* **2004**, 25, 3398–3405.
- [29] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, Ed. John Wiley & Sons, New York, 2001.
- [30] Kubaň, P.; Hauser, P. C. *Electrophoresis* **2004**, 25, 3387–3397.
- [31] Gründler, P. **Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers**. Springer: Berlin, 2007.
- [32] Halliday, D.; Resnick, R.; Walker, J. **Fundamentals of Physics**. Ed. John Wiley & Sons, 6th ed., 2001.

- [33] Da Silva, J. A. F.; Do Lago, C. L. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4339–4343.
- [34] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**. Ed. Thomson Brooks/Cole, 5th ed., Belmont, 1998.
- [35] Pimentel, M. F.; Neto, B. B. *Quim. Nova* **1996**, *19*, 268–277.
- [36] <http://www.dowcorning.com/applications/search/default.aspx?r=131en>, accessed in April 2010.
- [37] http://www2.dupont.com/Titanium_Technologies/en_US/products/900/CO_B_H_65962_5_900_Grade_Description.pdf, accessed in April, 2010.
- [38] Frederikse, H. P. R., “Permittivity (dielectric constant) of inorganic solids”, in Lide, D. R., Ed., **CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84nd Ed.**, CRC Press, Boca Raton FL, p. 195, 2003–2004.
- [39] Amaral, F.; Rubinger, C. P. L.; Henry, F.; Costa, L. C.; Valente, M. A.; Barros-Timmons, A. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2008**, *354*, 5321–5322.
- [40] Looyenga, H. *Physica* **1965**, *31*, 401–406.
- [41] Maron, N.; Maron, O. *Mon. Not. R. Astron. Soc.* **2008**, *391*, 738–764.
- [42] Yang, R. B.; Hsu, S. D.; Lin, C. K. *J. Appl. Phys.* **2009**, *105*, 07A527-1–07A527-3.