***FABRICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICRODISPOSITIVOS PARA
ELETROFORESE COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA***

WENDELL KARLOS TOMAZELLI COLTRO

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2004

*“...cada um de nós compõe a sua história e cada
ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz...”*

(Almir Sater e Renato Teixeira)

Dedico este trabalho

*“Aos meus pais, **Antonio Carlos Coltro** e **Lucimar Tomazelli Coltro**, por trazerem-me ao mundo, ensinarem-me os caminhos corretos, dignos, por todo apoio e amor incondicional sempre demonstrados”.*

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC), pelo apoio institucional e as facilidades oferecidas.

Ao prof. Dr. Fernando M. Lanças pela oportunidade de trabalhar nesse excelente grupo.

Ao amigo, mestre e orientador prof. Dr. Emanuel Carrilho pela admirável maneira de orientar, pela confiança, liberdade e pelas várias oportunidades oferecidas.

Aos meus pais, irmãos, vó Luiza, vó Lurdes, vô Careca, vô Lúcio, tia Valdirene e demais familiares que apoiaram e torceram pelo meu êxito no mestrado.

Aos amigos “cromáfilos”: Ana Valéria, Álvaro, Carlos Eduardo (Jean Todd), Célia (Celita), Claudete, Christian, Esmeraldo, Evandro, Fernanda, Guilherme (Caetano), Igor, Inês, Marcelo, Maribel, Maurício, Nilson, Patrícia, Priscila, Regiane, Rodrigo (Catatau), Rodrigo Leite, Rogério, Sandro, Sheila, Sílvia Brondi, Sílvia Freitas, Vítor e Zé Carlos, pelo excelente ambiente de trabalho que proporcionaram e também pelas infinitas horas de descontração.

Aos técnicos e funcionários do Croma que sempre foram prestativos além de companheiros: Odete (pela incansável ajuda), Elaine, Roma, Alcimar, Robson, Luis e Marcos (Marcão).

Aos amigos e colaboradores do grupo LAIA: Heron, Eduardo, Alberto, prof. Claudimir e prof. Lúcio pela experiência transmitida, pelo admirável dinamismo, pela amizade, pelas frutíferas discussões e colaborações.

Aos colegas do grupo GMEME, em especial ao prof. Dr. Luiz H. Mazo não somente pela colaboração, mas pelo apoio e toda contribuição que deram a este trabalho e à minha formação.

Ao prof. Dr. Xinghua Xia, não pelas derrotas nas partidas de tênis de mesa, mas sim pela excelente colaboração construída, mesmo estando do outro lado do mundo.

Ao grupo de pesquisa da profa. Dra. Susan Lunte, em especial a profa. Sue e ao Dr. Walter Vanderveer IV pela receptividade na Universidade do Kansas, pela amizade e pela perspectiva de trabalho em um futuro não muito distante.

Aos amigos Juliano, Tiago e Ildemar, pela hospedagem nos períodos de trabalho na capital paulista e ao prof. Dr. Henrique Toma (IQ/USP) pela colaboração com as análises de reflectância difusa.

Ao grupo de semicondutores do IFSC pela disponibilidade dos equipamentos.

Aos técnicos do LNLS: Vinícius (AFM), Ângelo Gobbi (LMF), Maria Helena (LMF) e Grazielle (LMF) pelo suporte técnico fornecido, além de um excelente convívio nos dias de trabalho.

Aos amigos Fábio (Mineiro), Flávio (Fiotão) e Robson (Robinho) pela ajuda nos momentos difíceis, pela alegria sempre demonstrada e pelas idéias “elaboradas” nos churrascos.

A todos os amigos do IQSC, em particular ao Marcelo Callegaro pela amizade e apoio técnico sempre disponível.

À galera do futebol, pela amizade e pelos campeonatos conquistados.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, limpeza, audiovisual, informática, biblioteca e portaria, por todos os serviços prestados e pela ajuda dispensada.

Aos meus ex-professores e amigos da Universidade Estadual de Maringá: Aloísio, Edmar, Expedito, Florângela, Hioka, Makoto e Ourides que deram os primeiros ensinamentos científicos e mostraram os caminhos a serem seguidos.

Aos funcionários e amigos das Oficinas do IQSC: Alex (gênio), Milton, Ednelson e Élvio e também ao amigo Bento (CAQI) pela paciência, disponibilidade e competência que muito ajudaram-me nestes dois anos.

Aos amigos sempre presentes: Caetano, Cappelaro, Marcelo, Sandro e Valéria que contribuíram muito com companheirismo, sugestões, conselhos e ensinamentos, além dos descontraídos momentos diários durante os *coffee-breaks*, sempre na presença do ilustre *Frajola*. Devo muito a estas pessoas.

Aos amigos que estão distantes, mas que de alguma maneira contribuíram: Adonis, Celso, Maria Rita e Rogério.

A CAPES, pela bolsa de mestrado concedida e ao CNPq pelo auxílio à pesquisa.

Enfim, ao nosso todo poderoso Deus, por estar sempre a meu lado, guiando os meus passos e me auxiliando em todos os momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Miniaturização.....	1
1.2. Miniaturização de Sistemas Analíticos.....	3
1.3. Eletroforese Capilar (CE).....	5
1.4. Eletroforese em microescala.....	11
1.5. Métodos de Introdução da Amostra.....	14
1.6. Métodos de Detecção.....	18
1.6.1. Detecção Eletroquímica.....	19
1.6.2. Configuração do Detector.....	20
1.6.2.1. Detecção na saída do canal de separação.....	21
1.6.2.2. Materiais dos eletrodos.....	22
1.7. Tecnologias de microfabricação.....	25
1.7.1. Processo Fotolitográfico.....	26
1.7.2. Processos alternativos.....	28
1.7.2.1. Tecnologia LIGA.....	28
1.7.2.2. Processo de Impressão Direta.....	30
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivos Gerais.....	32

2.2. Objetivos Secundários.....	32
2.2.1. Processo de impressão direta.....	32
2.2.2. Processo fotolitográfico.....	32
2.3. Detecção Eletroquímica.....	33
2.3.1. Detecção Oscilométrica.....	33
2.3.2. Detecção Amperométrica.....	33
3. EXPERIMENTAL.....	34
3.1. Processo de Impressão Direta.....	34
3.2. Processo Fotolitográfico.....	37
3.2.1. Limpeza dos substratos.....	37
3.2.2. <i>Spinning</i>	37
3.2.3. Fotogravação.....	38
3.2.4. Revelação.....	39
3.2.5. Preparo das máscaras.....	40
3.3. Técnicas de Caracterização.....	41
3.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia Dispersiva de Raios-X (EDX)	41
3.3.2. Microscopia de Força Atômica (AFM)	41
3.3.3. Espectroscopia por Reflectância Difusa.....	41
3.3.4. Análise Elementar.....	42
3.4. Técnicas de Análise.....	42
3.4.1. Eletroforese.....	42
3.4.2. Detecção Eletroquímica.....	42
3.5. Reagentes	43
3.5.1. Preparo das Soluções.....	44

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE I:	
Microestruturas confeccionadas em poliéster-toner	45
4.1. Caracterização do Toner e do poliéster	45
4.2. Avaliação das dimensões	47
4.2.1. Largura	47
4.2.2. Espessura	49
4.3. Aplicação de um efeito de cinza nos microcanais	51
4.4. Preparação de máscaras em transparência	53
4.5. Preparação de máscaras em fotolito	55
4.6. Microdispositivos para eletroforese com detecção eletroquímica	57
4.6.1. Detecção condutométrica sem contato	57
4.6.2. Detecção Amperométrica na saída do canal de separação	62
4.6.2.1. Fabricação dos eletrodos	65
4.6.2.2. Detecção com dois eletrodos e sistema de injeção em duplo-T	67
4.6.2.3. Determinação do Tempo de Injeção da Amostra	68
4.6.2.4. Determinação do Potencial de Detecção	70
4.6.2.5. Separação Eletroforética	71
4.6.2.6. Efeito do Potencial de Separação	72
4.6.2.7. Eficiência e Resolução	75
4.6.2.8. Curva Analítica, Limites de Detecção e Repetibilidade	76
4.6.3. Fluxo Eletroosmótico (EOF)	79
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE II:	
Microdispositivos fabricados através de processos fotolitográficos	83
5.1. Processo Fotolitográfico	83
5.2. Fotorresistes	85
5.3. Avaliação de diferentes substratos	87
5.3.1. Alumina, Silício e Vidro	87

5.3.2. Poliuretana.....	94
5.4. Produção de Moldes para Prototipagem Rápida.....	98
5.5. Microdispositivos poliméricos.....	102
5.6. Fabricação de microeletrodos em substratos planares.....	106
5.6.1. Fabricação de Eletrodos de Ouro.....	108
5.6.2. Fabricação de Eletrodos de Ti/Pt.....	111
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
APÊNDICE A.....	A1
APÊNDICE B.....	B1
APÊNDICE C.....	C1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da instrumentação necessária de um sistema de CE.....	6
Figura 2. Representação da geração do fluxo eletroosmótico.....	8
Figura 3. Esquematização da inversão do fluxo eletroosmótico sob ação de uma amina quaternária.....	11
Figura 4. Evolução do número de publicações envolvendo sistemas eletroforéticos miniaturizados desde 1990 até abril de 2004.....	12
Figura 5. Desenho do primeiro sistema de eletroforese miniaturizado. Os números 1, 2 e 3 indicam os reservatório do tampão, amostra e descarte, respectivamente. Os pontos I, II, III representam os canais do tampão, injeção e separação, respectivamente. O ponto IV é a intersecção dos canais e V representa o ponto de detecção.....	13
Figura 6. Configuração do dispositivo na forma de cruz. I, II e III representam os canais de injeção, separação e o ponto de detecção, respectivamente. Os reservatórios da amostra, do tampão, do descarte da amostra e de detecção são representados por 1, 2, 3 e 4, respectivamente.....	14
Figura 7. Representação do arranjo dos reservatórios (A), etapa de preenchimento do canal de injeção (B), injeção de um <i>plug</i> de amostra (C) e separação dos analitos (D). Os reservatórios da amostra, do tampão, de descarte da amostra, e de detecção estão representados em (A) por 1, 2, 3 e 4, respectivamente. AT representa o reservatório em que a alta tensão foi aplicada.....	15
Figura 8. Imagens obtidas de um material fluorescente em um microscópio acoplado com uma câmera CCD (dispositivo de carga acoplado) representando a etapa de confinamento da amostra (A) e a etapa de injeção do <i>plug</i> formado (B). Os pontos 1, 2, 3 e 4 representam os reservatórios da amostra, tampão, descarte da amostra e de detecção, respectivamente.....	16
Figura 9. Ilustração das etapas de injeção baseado no modo <i>gated</i> . As imagens representam: (a), a direção do fluxo no sentido do reservatório de descarte; (b), difusão da amostra na intersecção dos microcanais e; (c), introdução de um <i>plug</i> de amostra bem definido no canal de separação.....	17

Figura 10. Imagens obtidas, em um microscópio com câmera CCD, com material fluorescente para representar as etapas da injeção no do modo <i>gated</i> , nas quais pode-se observar o efeito da difusão a 0 (a), 0,75 (b), 3 (c) e 3,25 s (d).....	18
Figura 11. Etapas do processo de microfabricação baseado na impressão direta: (I) filme de poliéster; (II) filme de poliéster com uma camada de toner (a) depositada; (III) alinhamento entre o esquema do dispositivo impresso no filme de poliéster e sua imagem especular com acesso aos reservatórios; (IV) etapa de laminação e; (V) microdispositivo finalizado com reservatórios colados (tubos de PVC ou a base de ponteiros de pipetadores de 100 µL).....	34
Figura 12. Esquema dos microdispositivos utilizados nos experimentos eletroforéticos com detecção oscilométrica (A) e detecção amperométrica (B). Os reservatórios para amostra, tampão e descarte da amostra estão representados em ambas as figuras pelos números 1, 2 e 3, respectivamente. Em A, e1 e e2 representam o posicionamento externo dos eletrodos de cobre, espaçados por 1 mm e o reservatório 4 representa o reservatório de descarte do tampão, o qual foi cortado em B, de modo a facilitar o alinhamento com o eletrodo de trabalho.....	36
Figura 13. Resultados das análises de espectrometria dispersiva de energia de raios-X para o toner.....	46
Figura 14. Microscopias obtidas para microcanais obtidos a partir do processo de impressão direta. Microcanais com largura de 70 µm (A) e 150 µm (B).....	48
Figura 15. Micrografias evidenciando as dimensões de uma partícula de toner (A) e a intersecção dos microcanais de injeção e de separação (B). Na imagem A a partícula apresenta dimensões de aproximadamente 6 × 8 µm e na imagem B é possível observar a elevada irregularidade da superfície de toner.....	49
Figura 16. Perfil da superfície da camada de toner numa área de 19,9 × 1,6 µm. Os símbolos presentes na Figura indicam a presença de vales na superfície da camada de toner.....	50
Figura 17. Perfil em 3D da superfície da camada de toner numa área de 20 × 20 µm.....	50

Figura 18. Micrografias indicando o efeito do gradiente de cinza em um canal com largura de 150 μm com conseqüente aumento da quantidade de partículas de toner.....	52
Figura 19. Imagens apresentando diferentes gradientes de cinza aplicados em um canal com 500 μm de largura. (A) 80%; (B) 85%; (C) 90%; (D) 95%.....	53
Figura 20. Esquema do padrão impresso em transparência.....	54
Figura 21. Imagens obtidas dos microcanais fotogravados utilizando máscara preparada através da impressão em impressora laser com 600 <i>dpi</i> de resolução. (A) intersecção dos microcanais de 150 μm de largura; (B) canal; (C) superfície do fotorresiste protegido da radiação UV pelo toner.....	54
Figura 22. Fotografias obtidas em um microscópio óptico, com aumento de 1000 X, de um padrão de imagem impresso em fotolito: (A) intersecção dos microcanais de 50 μm ; (B) canal transversal próximo ao reservatório; (C) extremidade do canal com reservatório mostrando um grande número de partículas de toner dentro do reservatório.....	56
Figura 23. Representação do (a) posicionamento dos eletrodos e (b) dos possíveis caminhos para propagação do sinal na cela oscilométrica que podem ocorrer através da: (1) transmissão direta entre os eletrodos, (2) pela camada de poliimida que recobre o capilar, (3) pela parede do tubo capilar, e (4) pela solução que preenche o interior do capilar.....	58
Figura 24. Eletroferograma obtido para a detecção de uma solução 2 mmol L ⁻¹ de glutamato. Condições: injeção eletrocínica, 1,0 kV/10 s; potencial de separação: 1500 V; tampão de corrida: Tris-HCl 10 mmol L ⁻¹ , pH 9,5, com a adição de 0,2 mmol L ⁻¹ de CTAH.....	61
Figura 25. Efeito do potencial de separação no tempo de migração do analito....	61
Figura 26. Suporte desenvolvido para trabalhar com detecção amperométrica na saída do canal de separação dos microdispositivos. (A) Vista geral dos dispositivo construído em acrílico: a, manta de silicone; b, microestrutura; c, reservatório de detecção (5 mL); d, guia para controlar a distância entre o eletrodo de trabalho e a saída do canal de separação; e, bloco de acrílico para fixar o eletrodo de trabalho; f, eletrodo de trabalho; g, eletrodo de referência; h, eletrodo auxiliar e; i, eletrodo terra da eletroforese. (B) Vista detalhada da configuração dos eletrodos no reservatório de detecção. (C) Vista com dimensões do dispositivo, em mm.....	64

Figura 27. Composição dos <i>compact-discs</i> (CD): (a) base de policarbonato; (b) camada foto-degradável; (c) camada de ouro e; (d) uma ou duas camadas poliméricas.....	66
Figura 28. Representação das etapas de fabricação dos eletrodos. (a) impressão de uma máscara com a configuração desejada; (b) transferência térmica da máscara sobre uma peça de CD cortado; (c) remoção da camada de Au com solução de iodo/iodeto; (d) remoção do toner com acetonitrila e; (e) imagem amplificada dos eletrodos obtidos.....	66
Figura 29. Eletroferograma obtido com dois eletrodos de Au. Condições: injeção: 1,0 kV/30 s; potencial de separação: 1,5 kV; potencial de detecção: 0,900 V nos dois eletrodos; tampão de corrida: borato 10 mmol L ⁻¹ , pH 9,2, na presença de 0,2 mmol L ⁻¹ de CTAH.....	67
Figura 30. Efeito do tempo de injeção da amostra versus a altura do pico.....	69
Figura 31. Efeito do tempo de injeção da amostra versus a largura do pico.....	69
Figura 32. Voltamogramas hidrodinâmicos (HDVs) para o iodeto (10 µmol L ⁻¹) e para o ascorbato (40 µmol L ⁻¹). Potencial de injeção: 1,0 kV/10 s, potencial de separação: 3,0 kV. Tampão: borato de sódio, 10 mmol L ⁻¹ com CTAH 0,2 mmol L ⁻¹ , pH 9,2.....	71
Figura 33 Eletroferograma mostrando a separação de (a) iodeto (10 µmol L ⁻¹) e (b) ascorbato (40 µmol L ⁻¹). Injeção eletrocínica: 1000 V/10 s, potencial de separação: 4,0 kV. Tampão: borato de sódio 10 mmolL ⁻¹ com 0,2 mmol L ⁻¹ de CTAH, pH 9,2. Potencial de detecção: 0,900 V (vs Ag/AgCl).....	72
Figura 34. Efeito do potencial de separação no tempo de migração dos analitos.	73
Figura 35. Efeito do potencial de separação na velocidade eletroforética dos analitos.....	73
Figura 36. Efeito do potencial de separação na largura do pico.....	74
Figura 37. Nível de ruído detectado sob diferentes potenciais de separação.....	75
Figura 38. Curva de calibração para o iodeto.....	77
Figura 39. Curva de calibração para o ascorbato.....	77

Figura 40. Sequência de dez eletroferogramas obtidos para a separação de (a) iodeto ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (b) ascorbato ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$) a partir do uso de um dispositivo eletrônico para controlar alternadamente a aplicação do potencial nas etapas de injeção e de separação. Potencial de injeção: 3,0 kV/5 s, potencial de separação: 3,0 kV, tampão de corrida: borato de sódio 10 mmol L^{-1} , pH 9,2, com $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAH. O ponto c no detalhe representa o tempo de injeção.....	78
Figura 41. Efeito do pH na mobilidade do catecol.....	80
Figura 42. Relação entre o EOF e o pH. Condições: tampão fosfato 10 mmol L^{-1} ; potencial aplicado: 1,0 kV.....	81
Figura 43. Esquema com as principais etapas do processo fotolitográfico: (I) substrato; (II) revestimento com fotorresiste e etapa de <i>pré-bake</i> ; (III) posicionamento da máscara e exposição à radiação UV; (IV) revelação dos microcanais fotogravados e etapa de <i>pós - bake</i> ; (V) etapa de corrosão e; (VI) etapa de vedação dos microcanais.....	84
Figura 44. Curva da espessura do filme SU8-100 em função da velocidade de rotação do <i>Spinner</i>	85
Figura 45. Diferenciação do uso de fotorresistes positivos (A) e negativos (B)...	86
Figura 46. Imagem digitalizada do primeiro dispositivo desenvolvido.....	87
Figura 47. Perfil dos microcanais fotogravados em SU-8 usando o silício (A) e o vidro (B) como substratos.....	88
Figura 48. Imagens dos microdispositivos em três diferentes substratos: (A) alumina, (B) silício e, (C) vidro. Mag. 24 X.....	88
Figura 49. Imagens dos reservatórios interligados pelos microcanais de injeção e separação. (A) alumina, (B) silício e, (C) vidro. Mag. 50 X.....	89
Figura 50. Imagens das intersecções dos microcanais de injeção e separação. (A) alumina, (B) silício e, (C) vidro. Mag. 1500 X.....	89
Figura 51. Imagens obtidas da secção transversal dos dispositivos fabricados com a alumina: (A) detalhe evidenciando o perfil curvado do fotorresiste na extremidade do reservatório; (B) detalhe comprovando que os canais não foram completamente formados.....	90

Figura 52. Espectros de reflectância difusa na região do UV/Vis realizado para a alumina, o silício e para o vidro.....	91
Figura 53. Perfil do SU-8 polimerizado inadequadamente sobre substrato de alumina.....	93
Figura 54. Imagem em 3D da superfície do SU-8 dentro do canal de separação..	93
Figura 55. Fotografia da superfície da poliuretana após espalhamento do fotorresiste. Imagem obtida em microscópio óptico com aumento de 1000 X.	95
Figura 56. Fotografias apresentando a formação dos micro-canais em substrato de poliuretana recoberto com níquel: (A) geometria do injetor na forma de duplo-T e (B) canal de separação com canal adicional para posicionamento do eletrodo de trabalho.....	96
Figura 57. Etapas necessárias na tecnologia LIGA-UV. I, substrato; II, recobrimento com metal (geralmente Au); III, espalhamento do fotorresiste, posicionamento da máscara e exposição à radiação UV; IV, formação dos microcanais após etapa de revelação da imagem; V, crescimento de Ni a partir de processo eletrolítico; VI, remoção do fotorresiste com solvente orgânico; VII, moldagem com material polimérico (PDMS ou silicone-polisiloxano); VIII, desmoldagem; IX obtenção de microestruturas poliméricas e, X, vedação (com vidro, PDMS ou silicone).....	99
Figura 58. Esquema dos moldes metálicos fabricados. O molde A apresenta quatro estruturas em dimensões de 3×3 cm, com um canal de injeção (I), canal de separação (II) e um canal para posicionamento de um eletrodo de trabalho para detecção eletroquímica. O molde B apresenta uma estrutura com geometria complexa.....	100
Figura 59. Imagens obtidas a partir dos moldes preparados.....	101
Figura 60. Curvas de Ohm para dispositivos de PDMS usando tampão fosfato 20 mmol L^{-1} , pH 8,0 (A) e tampão acetato 20 mmol L^{-1} , pH 5,0 (B).....	103
Figura 61. Esquema do dispositivo utilizado para avaliar a geometria complexa como um sistema de injeção.....	104
Figura 62. Imagens de CCD obtidas com a nova geometria proposta.....	104
Figura 63. Configuração do dispositivo para simulação numérica.....	105

Figura 64. Resultados da simulação numérica, sugerindo uma modificação na geometria apresentada na Figura 58B.....	106
Figura 65. Esquematização da técnica <i>lift-off</i> para obtenção de eletrodos microfabricados (A) e a integração destes eletrodos com microcanais eletroforéticos (B).....	107
Figura 66. Máscaras utilizadas no processo de integração de diferentes configurações de eletrodos (a e b) com microcanais eletroforéticos (c).....	110
Figura 67. Configuração com dois (A) e quatro (B) eletrodos de Au posicionados na saída do canal de separação.....	110
Figura 68. Máscaras utilizadas para a fabricação dos eletrodos de Ti/Pt (A) e conseqüente integração com os microcanais eletroforéticos (B). Imagem do dispositivo integrado (C) com seu respectivo detalhamento da geometria dos eletrodos de detecção: WE, eletrodo de trabalho; RE, eletrodo de referência; AE, eletrodo auxiliar (D).....	112
Figura 69. Medida da corrente eletroforética no s microdispositivos integrados sob aplicação de diferentes potenciais.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Características dos microdispositivos em quatro diferentes valores de l	2
Tabela II. Resultados da Análise Elementar CHN-O para o toner e para o poliéster.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Eletrodo auxiliar
AFM	Microscopia de força atômica
CA	Catecol
CCD	<i>Coupled charge device</i>
CD-R	<i>Compact discs recordable</i>
CE	Eletroforese capilar
CTAB	Brometo de cetil(tri)metilamônio
CTAC	Cloreto de cetil(tri)metilamônio
CTAH	Hidróxido de cetil(tri)metil amônio
DA	Detecção amperométrica
DCT	Dupla camada de toner
DE	Detecção eletroquímica
DETA	Dietileno(tri)amina
DO	Detecção oscilométrica
<i>Dpi</i>	<i>Dots per inch</i> (pontos por polegada)
EDX	Espectroscopia dispersiva de raios-X
EOF	Fluxo eletroosmótico
GC	Cromatografia em fase gasosa
GMEME	Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos
HDMS	Hexadimetilsiloxano
HDV	Voltametria hidrodinâmica
HP	<i>Hewlett packard</i>
HPLC	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
LAIA	Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica

LD	Limite de detecção
LIF	Fluorescência induzida a laser
LIGA	<i>Lithography, Galvo und Abformung</i> (Litografia, eletroformação e moldagem)
LMF	Laboratório de microfabricação
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LOC	<i>Lab-on-a-chip</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS	Espectrometria de massas
μTAS	Micro-Sistemas para análises totais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDMS	Poli(di)metilsiloxano
PET	Poli(etileno tereftalato)
PMMA	Poli(metilmetacrilato)
PS	Poliestireno
PU	Poliuretana
RE	Eletrodo de referência
RX	Raios-X
SCT	Simples camada de toner
TTAB	Brometo de tetradecil(tri)metilamônio
UV	Ultravioleta
WE	Eletrodo de trabalho

LISTA DE SÍMBOLOS

B	Susceptância
E	Campo elétrico aplicado
ε	Constante dielétrica do tampão
F	Constante de faraday
G	Condutância
i_t	Corrente gerada na superfície do eletrodo
l	Comprimento efetivo
μ_{EOF}	Mobilidade eletroosmótica
μ_{EP}	Mobilidade eletroforética de uma espécie
N	Número de mols do analito oxidado, ou reduzido
N_{exp}	Eficiência experimental
N_T	Eficiência teórica total
n	Número de mols de elétrons transferidos por mol de analito
η	Viscosidade do meio
Q	Carga na superfície do eletrodo
q	Carga do íon
R_s	Resistência da solução
r	Raio do íon solvatado
t	Tempo
t_{mig}	Tempo de migração
v_{EOF}	Velocidade do fluxo eletroosmótico (eof)
X_w	Reatância capacitiva da parede do capilar
X_o	Reatância capacitiva intereletrodos
Y	Admitância complexa
ζ	Potencial zeta

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de microchips para eletroforese a partir dos processos de impressão direta e fotolitográfico. A estrutura dos microcanais fabricados pelo processo de impressão direta são definidos por filmes de poliéster (base e tampa) e por uma camada de toner (paredes). A caracterização da superfície e da composição do toner foram necessárias para um melhor entendimento da composição química da estrutura dos microcanais e para este propósito foram utilizadas diferentes técnicas como análise elementar de CHN-O, AFM, EDX e MEV. Além da química do toner as dimensões limites para os canais, como largura e altura, também foram estudadas. A aplicação de um efeito de cinza nos microcanais foi avaliado de modo a desenvolver um dispositivo de pré-concentração usando as partículas de toner como obstáculos para o fluxo. Os microdispositivos fabricados em poliéster-toner foram integrados com detecção amperométrica no final do canal de separação usando eletrodos produzidos a partir da combinação das tecnologias da produção de máscaras de toner e CDs, como fonte de ouro. O desempenho destes microchips foi avaliado com detecção amperométrica da separação eletroforética de iodeto e ascorbato. Os limites de detecção obtidos foram de 500 nmol L^{-1} (135 amol) e $1,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (486 amol) para o iodeto e ascorbato, respectivamente.

Além do processo de impressão direta, o processo fotolitográfico também foi utilizado para a mesma finalidade. Neste processo foi utilizado o fotorresiste negativo SU-8 e microdispositivos com área de 1 cm^2 foram fabricados usando diferentes substratos como vidro, silício e alumina. A alumina apresentou muitas irregularidades para os microdispositivos fabricados. Problemas com a absorção e dispersão da radiação ultravioleta foram observados. No entanto, a alumina foi um excelente material para as etapas de produção de dois moldes metálicos para a rápida produção de dispositivos poliméricos. Um molde com uma geometria complexa foi obtido para estudar um novo sistema de injeção e um segundo molde foi preparado para avaliar o uso de uma borracha de silicone como material moldante. Além disso, este trabalho também apresenta o desenvolvimento de um dispositivo microfabricado com eletrodos completamente integrados para separação e detecção eletroquímica. Eletrodos de ouro ou de titânio/platina foram obtidos através da técnica *lift-off*. As máscaras para a fabricação de moldes metálicos e dos dispositivos integrados foram preparadas em fotolito de alta resolução.

ABSTRACT

This work describes the development of electrophoresis microchip fabricated by direct-printing and photolithographic processes. The channel structures of the devices fabricated by direct-printing process are defined by polyester films (base and cover) and by a toner layer (walls). The characterization of toner surface and composition were necessary for a better understanding of the chemistry composition and for this purpose we have used different techniques such as CHN-O elemental analysis, AFM, EDX and SEM. Besides the chemistry of toner, the possible dimensions for the channels as the depth and the width were also studied. The application of a gray-scale effect in the channels was evaluated in order to create a preconcentration device using the toner particles as obstacles for the flow. The polyester-toner microdevices were coupled with end-channel amperometric detection using electrodes produced by combination of the toner masks laser-printing and compact discs as a gold source. The performance of this electrophoresis microchip was evaluated by amperometric detection of iodide and ascorbate. The detection limits found were 500 nmol L^{-1} (135 amol) and $1.2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (486 amol) for iodide and ascorbate, respectively.

Besides the direct-printing process, the photolithographic process was also used for this purpose. In this process it was used the SU-8 negative photoresist and microdevices with 1-cm^2 area were fabricated using different substrates such as glass, silicon and alumina. The alumina presented several irregularities for the microdevices fabricated. Problems with the absorption and dispersion of ultraviolet radiation were observed. However, the alumina was an excellent material for the steps in the production of two metallic molds for fast production of PDMS devices. One mold with complex geometry was obtained in order to study a new injection system and a second mold was prepared to evaluate the use of silicon rubber as molding material. Furthermore, in this work it was also reported the development of a microfabricated device with fully integrated electrodes for separation and electrochemical detection. The gold or titanium/platinum electrodes were obtained by lift-off technique. The masks for fabrication of the metallic molds and of the integrated microdevices were prepared in transparency films with high resolution.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Miniaturização

A miniaturização de dispositivos eletrônicos, a partir da década de 1960, provocou uma verdadeira revolução na eletrônica e na informática. O rápido desenvolvimento de sistemas miniaturizados, nos mais diferentes campos de pesquisas, tem dominado o progresso da tecnologia moderna. Nos dias atuais, a miniaturização do rádio, da televisão, dos gravadores, dos telefones, dos discos rígidos e dos microcomputadores é algo comum, presente no dia-a-dia do ser humano. Com todo este avanço, indústrias ligadas a setores como automobilística, informática, entretenimento, telecomunicações, medicina, têm faturado milhões de dólares com a comercialização de seus produtos [1, 2].

O desenvolvimento de um sistema miniaturizado não é simplesmente a transferência de um ensaio realizado na escala macro para a escala micro. Com a redução das dimensões geométricas, vários aspectos devem ser considerados para se obter uma boa performance. Se todas as dimensões do sistema forem reduzidas uniformemente as mudanças em comprimento, área e volume alteram a influência de vários efeitos físicos [1].

Os efeitos da miniaturização podem ser demonstrados através do uso da análise dimensional combinada com fórmulas simples [3]. Algumas características dos dispositivos em função de um típico comprimento, l , estão apresentados na Tabela I. Um critério importante é o número máximo de dispositivos que podem ser arranjados em uma superfície com área igual a 1 cm^2 . Este número aumenta inversamente proporcional ao quadrado do comprimento l , ou seja, $1/l^2$. Como pode ser observado na Tabela I, para um comprimento de $1 \text{ }\mu\text{m}$, $2,5 \times 10^7$ dispositivos

podem ser construídos por cm^2 , os quais poderiam ser utilizados para aplicações discretas, mas também para processamento em paralelo [1, 3].

A redução do tamanho dos dispositivos também afeta processos químicos, relacionados à mistura de soluções, separação analítica e detecção. Em química convencional, a mistura de soluções é usualmente realizada por convecção. No entanto, este mesmo mecanismo não pode ser realizado em microestruturas uma vez que o número de Reynolds é muito baixo, insuficiente para gerar turbulência nos microcanais. Por outro lado, a mistura por difusão é obtida com sucesso nos microdispositivos. Isso ocorre pelo fato que o tempo que uma molécula necessita para percorrer uma distância l diminui com $1/l^2$ (proporcionalmente ao quadrado da dimensão l). Este efeito está ilustrado na Tabela I, na qual é possível observar que uma molécula com coeficiente de difusão de $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ necessita de 500 s para percorrer uma distância de 1 mm, mas somente 5 s para percorrer 100 μm , 50 ms para 10 μm e 0,5 ms para 1 μm . Conseqüentemente, misturas eficientes podem ser obtidas em dispositivos fabricados em microescala [3].

Tabela I. Características dos microdispositivos em quatro diferentes valores de l

Dimensão (l)	1 mm	100 μm	10 μm	1 μm
Volume	1 μL	1 nL	1 pL	1 fL
Tempo de Difusão¹	500 s	5 s	50 ms	0,5 ms
Nº de moléculas²	6×10^{11}	6×10^8	6×10^5	600
Nº de dispositivos (volumes/cm^2)	25	2500	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^7$

¹Coeficiente de Difusão: $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

²Número de moléculas calculado considerando uma concentração de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Além dos parâmetros citados, outros fenômenos variam com maior dependência da dimensão linear l como, gravidade (l^3), inércia (l^3), magnetismo (l^2 , l^3 ou l^4 , dependendo da exata configuração), fluxo (l^4) e emissão térmica (l^2 a l^4). Outros fatores também exercem seus efeitos, como eletrostática (l^2), fricção (l^2), tensão superficial (l), difusão ($l^{1/2}$) e interações de van der Waals ($l^{1/4}$) [1]. As propriedades físicas citadas são alguns dos parâmetros que exercem algumas regras básicas para a miniaturização [1, 3].

1.2. Miniaturização de Sistemas Analíticos

Da mesma forma que os microchips eletrônicos revolucionaram os universos dos computadores e da eletrônica, os microchips analíticos têm revolucionado a química analítica na última década [4]. Inicialmente, a principal razão para a miniaturização era aumentar a performance analítica mais do que reduzir seu tamanho. No entanto, com a mudança da escala macro para a escala micro outras vantagens foram obtidas como redução do volume de reagentes e amostras (da ordem de pL-nL), baixo custo de fabricação e análise em tempo reduzido.

O primeiro dispositivo analítico miniaturizado foi um cromatógrafo gasoso, apresentado na década de 70 [5]. O micro-cromatógrafo foi construído em um substrato circular de silício com diâmetro igual a 5 cm. Neste substrato foi construída uma válvula de injeção e uma coluna de separação de 1,5 m de comprimento. Um detector de condutividade térmica foi fabricado em um outro substrato, sendo posteriormente prensado mecanicamente para integrá-lo ao substrato contendo a coluna de separação.

Apesar da capacidade de realizar rápidas separações, o primeiro micro-dispositivo não foi bem aceito pela comunidade científica devido à falta de

experiência tecnológica (dos cientistas em métodos de separação). Com isso, pesquisas relacionadas à miniaturização ficaram direcionadas nos anos seguintes ao desenvolvimento de micro-bombas, micro-válvulas e sensores químicos [5].

O renascimento dos microdispositivos analíticos ocorreu no início dos anos 90 com a apresentação de um cromatógrafo líquido miniaturizado [6]. Este cromatógrafo foi fabricado em um substrato de silício com dimensões de 5×5 mm contendo uma coluna tubular aberta, um detector condutométrico e conexões externas para uma bomba de cromatografia líquida e válvulas para aplicação de pressão.

Simultaneamente à apresentação deste microdispositivo, Manz e colaboradores propuseram a introdução do conceito de micro-sistemas para análises totais, ou simplesmente μ TAS [7]. Com o desenvolvimento dos μ TAS, tornou-se possível a integração de várias etapas de processamento analítico como, introdução da amostra, pré-tratamento da amostra, reações químicas, separação química e detecção em um único dispositivo [4, 5, 7]. Os μ TAS transformam informações químicas em sinais elétricos ou óticos, possibilitando uma fácil automação. Todos estes fatores, aliados à portabilidade, impulsionaram o desenvolvimento explosivo e maciço dos sistemas analíticos em micro-escala nos últimos anos [5]. Estes aspectos se tornaram relevantes para o campo clínico e ambiental em que o termo *point-of-care* vem sendo utilizado [8, 9]. Devido à idéia de inserir várias etapas normalmente desenvolvidas em um laboratório em um chip, os μ TAS são também denominados *lab-on-a-chip* (LOC) [9].

Os μ TAS vêm sendo utilizados para solucionar uma ampla diversidade de problemas bio-analíticos. Microdispositivos para cultura de células bacterianas [10, 11], diagnósticos clínicos [12, 13], interesses ambientais [14, 15],

imunoensaios [16, 17], análise de proteínas [18, 19], análise e separação de DNA [20, 21], reação em cadeia da polimerase (PCR) [22] e também para sequenciamento de DNA [23, 24, 25] são alguns exemplos que demonstram a potencialidade dos *microchips* químicos. Diversas técnicas analíticas podem ser desenvolvidas em micro-escala, destacando-se a cromatografia em fase gasosa (GC), a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC) e principalmente a eletroforese capilar (CE) [26].

A CE é a principal técnica desenvolvida em micro-escala devido à simplicidade de sua instrumentação e também devido às vantagens com relação ao transporte do fluido, que não requer componentes adicionais além de eletrodos para aplicação de campo elétrico eliminando assim, a necessidade de acoplar micro-bombas e micro-válvulas [27]. O controle eletrocinético pode ser usado para transportar a amostra para um determinado ponto em que ela possa ser quimicamente modificada, diluída ou misturada com outra substância, detectada e talvez usada para promover análises pelo acoplamento com outras técnicas analíticas, como a espectrometria de massas [28].

1.3. Eletroforese Capilar (CE)

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos sob a influência de um campo elétrico [29]. Em CE, a separação é conduzida em tubos capilares com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno e 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com solução tipicamente eletrolítica e submetidos à ação de um campo elétrico.

Devido à elevada área superficial interna em relação ao volume, o uso do capilar possibilita a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V cm^{-1}), resultando em separações com alta eficiência (em casos favoráveis, aproximadamente 1 milhão de pratos podem ser obtidos), resolução inigualável e tempos de análise relativamente curtos.

Outro aspecto atrativo à CE é a simplicidade da instrumentação [29, 30]. O equipamento consiste de uma fonte de alta tensão, coluna capilar comumente de sílica fundida, eletrodos de platina e um detector apropriado. A fonte é conectada, por meio de eletrodos de platina, a dois reservatórios contendo uma solução de um eletrólito apropriado (tampão). O capilar é então preenchido com a solução, servindo como *canal* de migração iônica. As extremidades do capilar são imersas nos reservatórios das soluções tampão para completar o circuito elétrico. A Figura 1 representa um esquema da instrumentação necessária para CE.

Figura 1. Representação da instrumentação necessária para um sistema de CE.

Em CE a separação ocorre como resultado de duas estratégias: maximizar as diferenças entre as mobilidades eletroforéticas efetivas dos analitos e minimizar as causas de alargamento das zonas. A mobilidade eletroforética prediz que, sob a influência de um campo elétrico, uma espécie eletricamente carregada irá migrar através do capilar em direção ao pólo de carga oposta. A velocidade da migração eletroforética (v_{EP}) é determinada pela seguinte equação:

$$v_{EP} = \mu_{EP} E = \frac{q}{6\pi\eta r} E \quad \text{Equação 1}$$

sendo que:

μ_{EP} é a mobilidade eletroforética da espécie

E é o campo elétrico aplicado

q é a carga do íon

η é a viscosidade do meio

r é o raio do íon solvatado

Em CE, além dos solutos, a solução tampão também move-se através do capilar sob a influência do campo elétrico gerando o fluxo eletroosmótico (EOF). Este fluxo origina-se da ionização dos grupos silanóis (Figura 2) da superfície interna do capilar de sílica fundida (ácidos fracos: $pK_a \approx 3$) e tem direção catódica [30]. O EOF é caracterizado por um perfil planar de velocidade, não contribuindo, portanto, para o alargamento das bandas. Este aspecto distingue CE dos métodos cromatográficos em fase líquida, que apresentam perfil parabólico de velocidade dentro da coluna, característico do fluxo induzido por pressão [30].

Com a presença do EOF torna-se possível analisar cátions e ânions em uma mesma corrida e permite que a análise de espécies com pequena razão q/r ocorra em

tempos substancialmente menores, uma vez que ele é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, na direção do detector [30].

Figura 2. Representação da geração do fluxo eletroosmótico

A velocidade do EOF, v_{EOF} , pode ser determinada pela equação 2.

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E \quad \text{Equação 2}$$

A mobilidade eletroosmótica, μ_{EOF} , por sua vez pode ser calculada a partir da equação 3:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad \text{Equação 3}$$

sendo que:

ε é a constante dielétrica do tampão e;

ζ é o potencial zeta

É possível observar na equação 3 que a mobilidade eletroosmótica é dependente da superfície do capilar (potencial zeta), das características do tampão

como a constante dielétrica, a viscosidade, o pH e a concentração e é independente do campo elétrico aplicado.

O EOF é diferente para cada tipo de capilar ou de canal utilizado. A magnitude do EOF pode ser determinada pela injeção e detecção de um composto neutro, adicionado à amostra ou injetado individualmente [30]. Com a medida do tempo de migração (t_{mig}) e, conhecendo o comprimento efetivo (l) (comprimento do capilar até o ponto de detecção) pode-se calcular a velocidade eletroosmótica, v_{EOF} , em cm s^{-1} como representado na equação 4:

$$v_{EOF} = \frac{l}{t_{mig}} \quad \text{Equação 4}$$

Combinando as equações 2 e 4, a mobilidade eletroosmótica, μ_{EOF} , dada em $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, pode ser calculada pela divisão da velocidade eletroosmótica, em cm s^{-1} , pelo campo elétrico, E , em V cm^{-1} .

Quando os parâmetros do EOF são medidos usando um marcador neutro, é importante que o marcador seja escolhido de modo a se mover ao longo do capilar sob a ação exclusiva do EOF. O principal critério na escolha de um marcador neutro é que ele seja neutro no pH do tampão, detectável no detector utilizado, puro e que não tenha interação com a parede do capilar ou do canal, e também deve ser solúvel no tampão [30].

Outro método utilizado para medir a magnitude do EOF foi proposto por Huang e colaboradores [31]. Neste método, é realizado o monitoramento da corrente eletroforética usando uma solução tampão preparada em duas concentrações diferentes, cuja diferença não precisa ser maior do que 5%. Inicialmente o capilar, ou

o canal, é preenchido com uma das soluções. Ao introduzir a segunda solução, haverá uma diferença na corrente eletroforética. Ao dividir o comprimento do capilar pelo intervalo de tempo observado para ocorrer a variação da corrente, a velocidade eletroosmótica pode ser calculada e ao dividi-la pelo campo elétrico, a magnitude do EOF pode ser encontrada.

Além da magnitude do EOF poder ser modificada através das propriedades citadas, sua direção também pode ser alterada. No modo normal de operação, o reservatório mais próximo ao detector, o cátodo, tem uma carga negativa e atrai os cátions através da dupla camada difusa. Como resultado, o EOF é direcionado do ânodo para o cátodo, detectando primeiramente os cátions, seguidos pelos neutros e pelos ânions. A direção do EOF pode ser invertida de modo a se detectar os ânions primeiramente, seguidos pelos neutros e pelos cátions, respectivamente.

Quando se analisam ânions, é desejável que eles apresentem um menor tempo de migração, diminuindo o tempo de separação. Isto pode ser feito pela inversão da direção do EOF, obtendo um fluxo do cátodo para o ânodo. Além de inverter a polaridade, a direção do fluxo pode ser alterada pela adição de uma amina quaternária, como um sal de alquil amônio, ao tampão a ser utilizado. O sal da amina quaternária é também denominado de modificador, ou inversor, de fluxo. Como visualizado na Figura 3 as extremidades hidrofílicas positivamente carregadas da amina quaternária atacam a parede do capilar através de interações iônicas com os grupos silanoatos do capilar. As extremidades hidrofóbicas, das aminas quaternárias ligadas aos grupos silanoatos, associam-se com as extremidade das aminas quaternárias em solução através de interações hidrofóbicas [30].

As extremidades hidrofílicas das aminas quaternárias, carregadas positivamente, atraem os ânions do tampão. Estes ânions são atraídos para o eletrodo

positivo, e seu movimento na direção do ânodo resulta em uma inversão da direção do EOF.

Uma variedade de compostos pode ser utilizada como modificador de fluxo, incluindo o brometo de cetil(tri)metilamônio (CTAB), cloreto de cetil (tri)metilamônio (CTAC), brometo de tetradecil(tri)metilamônio (TTAB), dietilenotriamina (DETA) e brometo de 1,6 -bis(tri)metilamônio hexano.

Figura 3. Esquematização da inversão do fluxo eletroosmótico sob ação de uma amina quaternária.

1.4. Eletroforese em microescala

As teorias mencionadas para CE são válidas também para eletroforese em microescala. Porém, enquanto em CE a separação ocorre em um capilar, no formato *micro*, a separação ocorre em microcanais os quais podem ser fabricados nos mais diferentes tipos de materiais. Os materiais utilizados para fabricar os microdispositivos eletroforéticos devem apresentar alta eficiência na dissipação de calor, provocado pelo efeito Joule. Por apresentar alta transparência ótica e possuir propriedade eletroosmótica similar à sílica fundida, o vidro tem sido o principal substrato explorado na fabricação destes microdispositivos [5]. No entanto, outros

materiais como plásticos, cerâmicas e polímeros podem ser utilizados para o mesmo propósito [32].

Os trabalhos de Manz e Harrison [33-39], no início dos anos 90, abriram as portas da miniaturização para técnicas eletroforéticas de análise. Após os trabalhos pioneiros, os quais foram muito bem aceitos pela comunidade científica, esta linha de pesquisa começou a se difundir em todo o mundo. Na Figura 4 está apresentado um gráfico estatístico com a evolução das publicações desde 1990 até abril de 2004. Como pode ser observado, houve uma grande explosão no número de publicações ao longo destes anos. A pesquisa bibliográfica foi efetuada usando palavras-chave como *miniaturized capillary electrophoresis system*, *micromachined electrophoresis system*, *microfabricated electrophoresis system*, *microchip electrophoresis*, *electrophoresis microchip*, *lab-on-a-chip* e *micro-total analysis system*.

Figura 4. Evolução do número de publicações envolvendo sistemas eletroforéticos miniaturizados desde 1990 até abril de 2004.

O primeiro sistema de eletroforese capilar em microchip foi apresentado em 1992 [33, 34] e o desenho deste microdispositivo está apresentado na Figura 5. Este chip foi construído em um substrato de vidro planar com dimensões de $14,8 \times 3,9 \times 0,1$ cm.

Figura 5. Desenho do primeiro sistema de eletroforese miniaturizado. Os números 1, 2 e 3 indicam os reservatório do tampão, amostra e descarte, respectivamente. Os pontos I, II, III representam os canais do tampão, injeção e separação, respectivamente. O ponto IV é a intersecção dos canais e V representa o ponto de detecção.

Neste primeiro dispositivo, a amostra era introduzida no canal de separação através de uma geometria na forma de T, indicada na Figura 5 pelo ponto IV. Devido à dificuldade no controle do *plug* de amostra, a geometria proposta inicialmente foi substituída por um sistema na forma de cruz, conforme apresentado na Figura 6. Esta nova configuração é representada por dois canais contendo em suas extremidades reservatórios para líquidos. O canal I representa o canal de injeção contendo um reservatório para amostra (1) e um reservatório para descarte da amostra (3). O canal II representa o canal de separação delimitado pelos reservatórios da solução tampão (2) e de descarte da solução (4). Este último reservatório pode ser denominado, também, de reservatório de detecção. O ponto III indica a posição em que normalmente é realizada a detecção nos microdispositivos.

Figura 6. Configuração do dispositivo na forma de cruz. I, II e III representam os canais de injeção, separação e o ponto de detecção, respectivamente. Os reservatórios da amostra, do tampão, do descarte da amostra e de detecção são representados por 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

1.5. Métodos de Introdução da Amostra

Embora em CE convencional as injeções da amostra sejam realizadas através de métodos eletrocinéticos e hidrodinâmicos, em sistemas miniaturizados a injeção se faz principalmente por processos eletrocinéticos [40-42], embora já existam alguns trabalhos com injeção hidrodinâmica [43, 44]. O sistema de introdução da amostra é uma das principais etapas do processamento analítico desenvolvido em dispositivos microfluídicos. Tal importância se deve ao fato de que as características do *plug* de amostra, formado pela intersecção dos canais, determinarão a qualidade da separação analítica.

A respeito do modo de injeção eletrocinética, há basicamente três metodologias constantemente utilizadas em microdispositivos. Estas metodologias baseiam-se no modo *unpinched* [45], *pinched* [46] e *gated* [47].

No modo de injeção mais simples, modo *unpinched*, o *plug* da amostra é determinado basicamente pela geometria dos microcanais que pode ser na forma de cruz, na forma de um duplo-T, ou ainda na forma de um triplo-T. Para realizar a injeção uma diferença de potencial é aplicada no canal de injeção durante 1-10 s,

através de eletrodos posicionados nos reservatórios da amostra e de descarte da amostra. Após completar a injeção, a etapa de separação é iniciada pela aplicação de uma diferença de potencial no canal de separação através de eletrodos posicionados nos reservatórios do tampão e de detecção. Deste modo, o *plug* de amostra definida pela intersecção dos canais é transportada na direção do detector e as espécies são separadas de acordo com suas mobilidades eletroforéticas [45]. Esta metodologia é a mais simples de todas e requer apenas uma fonte de alta tensão. Um esquema deste modo de injeção, usado neste trabalho, está apresentado na Figura 7.

Figura 7. Representação do arranjo dos reservatórios (A), etapa de preenchimento do canal de injeção (B), injeção de um *plug* de amostra (C) e separação dos analitos (D). Os reservatórios da amostra, do tampão, de descarte da amostra, e de detecção estão representados em (A) por 1, 2, 3 e 4, respectivamente. AT representa o reservatório em que a alta tensão foi aplicada.

Para realizar as injeções no modo *pinched* [46] há uma necessidade de efetuar um controle do potencial aplicado em cada reservatório, aplicando-se potenciais específicos em cada um deles. O *plug* de amostra, no modo *pinched*, não é definido especificamente pela geometria da intersecção entre os canais, mas sim pelo

confinamento da amostra através do uso de forças eletrocinéticas (E), as quais são geradas devido aos diferentes potenciais aplicados nos reservatórios. A Figura 8 apresenta todas as etapas necessárias para este modo de injeção. As imagens apresentadas foram obtidas em um microscópio acoplado com uma câmera CCD (dispositivo de carga acoplado).

Figura 8. Imagens obtidas de um material fluorescente em um microscópio acoplado com uma câmera CCD (dispositivo de carga acoplado) representando a etapa de confinamento da amostra (A) e a etapa de injeção do *plug* formado (B). Os pontos 1, 2, 3 e 4 representam os reservatórios da amostra, tampão, descarte da amostra e de detecção, respectivamente [46].

Para realizar a etapa de injeção, inicialmente é aplicado um potencial específico nos reservatórios da amostra (1), do tampão (2) e de detecção (4), mantendo o reservatório de descarte da amostra (3) aterrado. Os valores de potencial a serem aplicados dependem da geometria dos canais e também da resistência das soluções. O confinamento (Fig. 8a) resulta da aplicação de forças eletrocinéticas

diferentes. Para obter um confinamento simétrico na intersecção dos canais, a força eletrocinética gerada pela aplicação de potenciais nos reservatórios do tampão, E_2 , e de detecção, E_4 , devem ser iguais. Após obter um confinamento estável, uma diferença de potencial é aplicada no canal de separação e conseqüentemente, um *plug* é injetado (Fig. 8b) e a etapa de separação é iniciada. Nesta etapa uma fração do potencial de separação é aplicada aos reservatórios da amostra e descarte da amostra, de modo a evitar a difusão da amostra no canal de separação.

A terceira metodologia, baseada no modo *gated* [19, 47], requer uma configuração ligeiramente diferente das demais (Figura 9). Inicialmente é aplicado um potencial no reservatório da amostra, mantendo o reservatório de descarte aterrado. Simultaneamente, um valor de potencial, normalmente idêntico, é aplicado ao reservatório do tampão mantendo o reservatório de detecção aterrado (Fig. 9a). Devido ao baixo valor do número de Reynolds obtido em microcanais a mistura dos dois fluxos não ocorre. Ao desligar os potenciais aplicados (Fig. 9b), por um pequeno intervalo de tempo, um *plug* de amostra é formado devido à difusão das espécies, o qual é injetado (Fig. 9c), tendo as espécies separadas e detectadas quando os potenciais são religados. A Figura 10 apresenta algumas imagens relacionadas às etapas descritas.

Figura 9. Ilustração das etapas de injeção baseado no modo *gated*. As imagens representam: (a), a direção do fluxo no sentido do reservatório de descarte; (b), difusão da amostra na intersecção dos microcanais e; (c), introdução de um *plug* de amostra bem definido no canal de separação.

Figura 10. Imagens obtidas, em um microscópio com câmera CCD, com material fluorescente para representar as etapas da injeção no do modo *gated*, nas quais pode-se observar o efeito da difusão a 0 (a), 0,75 (b), 3 (c) e 3,25 s (d) [19].

1.6. Métodos de Detecção

Embora a miniaturização de dispositivos de separação venha se desenvolvendo rapidamente nos últimos 15 anos, o desenvolvimento de sistemas de detecção efetivos encontra-se em um estágio atrasado [48, 49]. Desde que o conceito de μ TAS foi proposto, no início dos anos 90, o método de detecção mais utilizado, principalmente na primeira década, foi a fluorescência induzida a laser (LIF) [50]. Este modo de detecção é perfeitamente adequado para ser empregado em aplicações bioanalíticas. Outro método de detecção que, recentemente, vem recebendo considerável atenção em conexão (primariamente) com a análise proteômica é a espectrometria de massas (MS) [51, 52]. Embora ofereçam alta sensibilidade e um alto grau de informação, LIF e MS requerem um completo controle da instrumentação *off-chip* e apresentam alto custo instrumental, aspectos que comprometem os benefícios da miniaturização e portabilidade.

Se LIF e MS apresentam instrumentação complexa e de alto custo, por outro lado, a eletroquímica tem atraído, nos últimos anos, considerável interesse direcionado para os micro-sistemas [53, 54]. A eletroquímica oferece grande promessa para os micro-sistemas, com aspectos que incluem notável sensibilidade

miniaturização própria do detector e do controle da instrumentação, independência do comprimento do caminho óptico ou turbidez da amostra, baixo custo, simplicidade e alta compatibilidade com técnicas de microfabricação [2].

1.6.1. Detecção Eletroquímica

A detecção eletroquímica (DE) é um modo alternativo e atrativo para eletroforese capilar convencional e também para sistemas de eletroforese miniaturizados. Muitos compostos podem ser detectados sem derivatização e a alta sensibilidade e seletividade são comparáveis com a detecção por LIF [53].

Há três modos gerais de detecção eletroquímica que podem ser utilizados em CE convencional e em micro-sistemas: condutometria [55], potenciometria [56] e amperometria [54]. Dentre estes modos, a detecção amperométrica (DA) é o modo que apresenta melhores limites de detecção (LD) sendo o mais utilizado em sistemas de eletroforese miniaturizados.

O princípio da DA está baseado na aplicação de um potencial constante ao eletrodo de trabalho com subsequente medida da corrente resultante em função do tempo [57]. Na configuração convencional, três eletrodos são utilizados na cela eletroquímica: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar. Em alguns casos, somente o eletrodo de trabalho e um contra-eletrodo são utilizados em uma configuração de dois eletrodos, proposta por Kappes e Hauser [58]. Esta configuração apresenta maior simplicidade, porém, tem a desvantagem de se obter a detecção de níveis de ruído mais elevados.

A resposta em termos de corrente é diretamente proporcional ao número de mols do analito oxidado, ou reduzido, na superfície do eletrodo como descrito pela lei de Faraday:

$$i_t = \frac{dQ}{dt} = nF \frac{dN}{dt} \quad \textbf{Equação 5}$$

sendo que i_t é a corrente gerada na superfície do eletrodo, a um determinado tempo, t , Q é a carga na superfície do eletrodo, n é o número de mols de elétrons transferidos por mol de analito, N é o número de mols do analito oxidado, ou reduzido, e F é a constante de Faraday ($96.485 \text{ C mol}^{-1}$) [57].

1.6.2. Configuração do Detector

A configuração do detector deve garantir um transporte de massa bem definido, mínimo alargamento de banda e isolamento elétrico do alto potencial de separação (tipicamente 1-4 kV). O último fator é atribuído ao fato de que a corrente associada com o potencial de separação ($\sim \mu\text{A}$) é usualmente várias ordens de magnitude maior do que a corrente medida ($\sim \text{nA}$) no detector eletroquímico. Alta sensibilidade, seletividade ajustável (através do potencial aplicado), simples manipulação, estabilidade em longo prazo e rigidez (para resistir a repetitivas separações) são requerimentos adicionais [48].

O primeiro microdispositivo de eletroforese com detecção eletroquímica foi proposto por Woolley e colaboradores [59], em 1998. Desde então, mais de 60 artigos relacionados ao posicionamento do eletrodo de trabalho podem ser encontrados na literatura. O eletrodo pode ser posicionado no canal (*in-channel*) [60], fora do canal (*off-channel*) [61] ou na saída do canal (*end-channel*) [59] de

separação de modo a obter um perfeito isolamento do alto campo elétrico. Devido à simplicidade e à eficiência de isolamento elétrico, a detecção na saída do canal de separação é o modo de detecção mais utilizado (80-90% dos artigos), o qual envolve o posicionamento do eletrodo de trabalho a dezenas de micrometros da saída do canal de separação. Por esta razão, a detecção eletroquímica na saída do canal de separação merece um maior detalhamento.

1.6.2.1. Detecção na saída do canal de separação

No modo de detecção na saída do canal de separação o eletrodo de trabalho é posicionado a dezenas de micrometros da saída do canal de separação, distância em que o potencial de separação é efetivamente isolado do eletrodo de trabalho. No entanto, devido ao fato do potencial de separação estar aterrado no reservatório de detecção, o eletrodo de trabalho é suavemente influenciado pela ação do campo elétrico. O potencial de separação pode causar um pequeno, mas significativo, deslocamento no potencial do eletrodo de trabalho. Conseqüentemente, para determinar o potencial de detecção apropriado para um dado analito, é necessário construir um voltamograma hidrodinâmico para cada composto de interesse sob as exatas condições de separação a serem empregadas. Adicionalmente, a detecção na saída do canal de separação geralmente exibe uma corrente de fundo maior do que a detecção fora do canal e apresenta menor detectabilidade, porém é mais simples e não requer o uso de um desacoplador para isolar o sistema de detecção do campo elétrico gerado [54].

Outra consideração com relação à detecção na saída do canal de separação é que se o eletrodo for posicionado muito perto da saída do canal, pequenas flutuações

no potencial de separação podem produzir ruído no detector, resultando em uma perda de sensibilidade. O LD e a eficiência de separação para a detecção na saída do canal variam na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$ – nmol L^{-1} e 1.000-20.000 pratos m^{-1} , respectivamente.

1.6.2.2. Materiais dos eletrodos

A seletividade nos microdispositivos com detecção amperométrica pode ser obtida através do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho, como descrito previamente. No entanto, a seletividade pode também ser obtida pela escolha pelo tipo de eletrodo de trabalho a ser usado. Diferentes tipos de eletrodos de trabalho vêm sendo utilizados em microdispositivos com DA como, por exemplo, tinta de carbono [62], pasta de carbono [63], nanotubos de carbono [64] ouro [65], platina [66] e cobre [67].

Há muitas vantagens e desvantagens para cada tipo de eletrodo, dependendo de cada aplicação. Eletrodos metálicos são comumente usados para microdispositivos com DA devido à facilidade com que eles podem ser evaporados ou depositados a partir da técnica de *sputtering*. Metais como Au e Pt não apresentam boa aderência com o vidro. Devido a isso, uma camada de Ti e/ou Cr deve ser formada de modo a garantir uma boa aderência com o substrato empregado [53].

Eletrodos de Platina

Em geral os eletrodos de Pt são utilizados para detectar peróxidos, álcoois, aldeídos e hidrazinas. Gavin e Ewing [68] demonstraram um sistema de separação

eletroforética em canal aberto, utilizando um arranjo de 100 microeletrodos fabricados em substrato de vidro a partir de técnicas fotolitográficas. O sistema de separação possibilitou a resolução em duas dimensões do analito transportado por um capilar de amostragem, posicionado na abertura do canal.

No trabalho pioneiro de Woolley e colaboradores [59], os eletrodos de Pt foram microfabricados a partir de técnicas de fotolitografia e *sputtering* sendo posicionados a uma distância de 30 μm da saída do canal de separação. Com este dispositivo, Woolley e colaboradores demonstraram a separação de três neurotransmissores e também a separação de fragmentos de DNA e produtos de PCR.

Eletrodos de Ouro

A utilização de eletrodos de Au para microdispositivos com DA vem sendo apresentada por vários grupos. Wang e colaboradores [69] depositaram por *sputtering* um filme fino de ouro na saída do canal de separação de um microchip fabricado em vidro. Hilmi e Luong [70] fizeram algo bastante semelhante, porém utilizando um processo de deposição química de ouro catalisada na superfície do substrato de vidro.

Martin e colaboradores [45] demonstraram o primeiro exemplo de DA com múltiplos eletrodos em microchips fabricados em poli(di)metilsiloxano (PDMS). Procedimentos fotolitográficos foram utilizados para produzir um arranjo de eletrodos de Au com 200 nm de espessura e 40 μm de largura. A detecção com dois eletrodos em uma configuração em série foi demonstrada usando dois destes eletrodos. O ouro também tem sido utilizado na forma de fio para DA em microdispositivos fabricados em PDMS. Os trabalhos propostos pelo grupo do

professor Charles S. Henry [65, 71] têm focalizado a utilização de fios de Au com diâmetro de 25 e 50 μm , posicionados em um canal perpendicular ao canal de separação. Esta configuração tem apresentado aumento em sensibilidade e também em eficiência devido à maior área em contato com o fluxo.

Angnes e colaboradores [72] descreveram um processo simples e rápido para a construção de eletrodos de ouro a partir de discos compactos graváveis (CD-Rs). Os CD-Rs possuem em sua constituição uma película de ouro com uma espessura entre 50 e 100 nm e com área aproximada de 100 cm^2 . A espessura nanométrica do filme de ouro pode ser utilizada para construção de microeletrodos (CDtrodos) de banda com áreas inferiores a 10^{-6} cm^2 .

Combinando a idéia do processo apresentado por Angnes e colaboradores com o processo de impressão a laser proposto por Lago e colaboradores [73], Daniel e Gutz [74] desenvolveram um processo para rápida produção de microeletrodos. Estes CDtrodos foram, recentemente, avaliados em um sistema de CE-DA [75].

Eletrodos de Carbono

A utilização de eletrodos impressos de carbono é uma alternativa de baixo custo e bastante viável na construção de detectores eletroquímicos para microdispositivos. A potencialidade destes eletrodos impressos e removíveis têm sido apresentada na literatura por Wang e colaboradores [62]. Nestes trabalhos a facilidade de troca dos eletrodos passivados ou modificados, eliminando a necessidade de troca do sistema completo de separação, reduzindo assim o custo de confecção de um sistema completo.

A utilização de eletrodos de carbono na forma de fibras e também na forma de pasta tem sido muito explorada pelo grupo da profa. Susan M. Lunte [63, 76]. O

canal para o eletrodo, o canal de injeção e o canal de separação são fabricados em PDMS usando fotolitografia com radiação ultravioleta (UV). A camada inferior de PDMS contém o canal para posicionar a fibra de carbono, a pasta de carbono ou a pasta de carbono modificada. A camada superior de PDMS contém os canais para injeção e para separação que podem ser vedados reversível ou irreversivelmente com a camada inferior do PDMS.

Outros materiais para eletrodos

Apesar dos eletrodos mais convencionais serem fabricados usando Au, Pt ou C, outros materiais podem ser utilizados. Eletrodos de Pd fabricados a partir de evaporação térmica em substratos poliméricos têm sido demonstrados por Chen e colaboradores [61] na detecção de catecolaminas. O eletrodo de Pd é um excelente material para atuar como desacoplador, pois apresenta alta capacidade para absorver o hidrogênio produzido a partir da eletrólise da água. Eletrodos de cobre também podem ser utilizados para DA em microdispositivos. Schwarz e colaboradores [77] demonstraram a utilização destes eletrodos na separação de carboidratos e aminoácidos usando uma configuração de dois eletrodos, proposta anteriormente pelo mesmo grupo [58]. Lee e Chen [67] também demonstraram a separação para diversos aminoácidos utilizando eletrodos de Cu.

1.7. Tecnologias de microfabricação

Os μ TAS, LOC's, microchips ou microdispositivos de separação podem ser fabricados em uma superfície planar através processos litográficos como a litografia por raios-x, a litografia *soft*, a litografia por feixe de elétrons ou pela litografia com

radiação UV [78]. Estas tecnologias foram desenvolvidas nas décadas de 1970 e 1980 e são extensivamente utilizadas nas indústrias de microeletrônicos e semicondutores. Apesar dos processos litográficos serem os métodos mais utilizados na preparação dos μ TAS, a pesquisa por métodos alternativos, economicamente viáveis, será um permanente objetivo da comunidade científica.

Um dos caminhos alternativos é a produção de dispositivos poliméricos utilizando a tecnologia LIGA cuja sigla, do alemão, representa Litografia, Eletroformação e Moldagem (*Lithography, Galvo und Abformung*) [1]. A tecnologia LIGA foi originalmente concebida com base na litografia por raios-x (LIGA-RX), mas recentemente, graças a avanços na área de materiais, viabilizou-se uma variante tecnológica baseada em litografia com radiação UV (LIGA-UV). Esta tecnologia possibilita a fabricação de microestruturas com elevada razão de aspecto (por exemplo, uma parede de 200 μ m de altura por apenas 2 μ m de largura) [1].

Outro método bastante atrativo para a rápida produção de microdispositivos foi proposto recentemente por Lago e colaboradores [73]. Neste processo, os padrões de imagens são impressos em um filme de poliéster usando uma impressora laser para depositar seletivamente uma camada de toner, a qual define as dimensões dos canais microfluídicos. Após impressos, estes padrões são laminados contra uma folha de transparência ou contra uma imagem especular do padrão, formando canais com simples ou dupla camada de toner, respectivamente.

1.7.1. Processo Fotolitográfico

A litografia com radiação UV, por ser um método óptico, é comumente denominada de fotolitografia com radiação UV e é o método litográfico mais

utilizado na fabricação de μ TAS. A fotolitografia (*foto*: luz; *lito*: pedra; *grafia*: escrita) se resume na fotogravação de imagens (preparadas em uma máscara) em um substrato a partir da exposição à radiação UV, tornando possível a obtenção de microestruturas com dimensões na escala de 10-100 μ m. Estas dimensões são estritamente dependentes do tipo e da qualidade de máscara utilizada [78].

A imagem a ser transferida para o substrato deve apresentar uma boa resolução para que uma microestrutura regular seja obtida. Geralmente as máscaras são preparadas em vidro, de elevada planaridade e excelentes propriedades ópticas, utilizando filmes de Cr e Au para obtenção de alta resolução. No entanto, uma alternativa muito atrativa é o uso de máscaras impressas em fotolito, cuja fabricação é rápida e de baixo custo. No processo fotolitográfico utiliza-se um material fotossensível à radiação UV, denominado fotorresiste.

A absorção da luz afeta a estrutura química do fotorresiste provocando uma alteração em sua solubilidade. A imagem formada após exposição à radiação pode ser positiva ou negativa dependendo das regiões expostas e das características do próprio fotorresiste. A imagem fotogravada no resiste pode ser transferida para o substrato a partir de etapas subseqüentes de corrosão. A corrosão pode ocorrer por *via* úmida ou por *via* seca, sendo que a *via* seca fornece melhor resolução [78].

Vários materiais podem ser utilizados como substrato no processo fotolitográfico. Os mais comumente utilizados são o quartzo, o vidro e o silício. Após preparar as microestruturas, o maior desafio é obter uma vedação eficiente dos microcanais fabricados. A vedação pode ser reversível ou irreversível, dependendo do material e do processo utilizado [79].

A vedação de microcanais fabricados em vidro pode ser obtida através da fusão de duas lâminas de vidro à altas temperatura (> 500 °C, dependendo da

composição do vidro). Entretanto, os processos de vedação a altas temperaturas prejudicam os dispositivos microfabricados, podendo deformar o perfil dos canais fabricados de materiais sensíveis à temperatura, como arranjos químicos imobilizados, aspectos estruturais como eletrodos e comprimento de onda, ou materiais com diferentes coeficientes de expansão térmica [79]. Devido a estes fatores é desejável realizar processos sob baixas temperaturas. Existem várias técnicas, desenvolvidas na indústria microeletrônica, que podem ser utilizadas para vedar microcanais fluídicos. Entre estas técnicas destacam-se a vedação anódica, utilizada para vedar silício-silício, vidro-silício ou vidro-metal e a vedação eutética [79], utilizada para vedar silício-silício. Todos estes processos de vedação são irreversíveis.

Processos reversíveis podem ser obtidos através do uso de materiais elastoméricos como, por exemplo, o PDMS. A vedação ocorre devido à formação de interações de van der Waals, que por sua vez não resistem à aplicação de pressão superior a aproximadamente 5 psi [80].

1.7.2. Processos alternativos

1.7.2.1. Tecnologia LIGA

A primeira etapa do processo LIGA-UV é desenvolver um molde. O molde pode ser preparado a partir da fotogravação da configuração desejada, seguido pelo crescimento de material metálico. O material metálico pode ser depositado eletroliticamente nos microcanais através de diferentes processos [81]. O níquel é o material mais utilizado neste processo de deposição. Após a deposição do material

metálico, o fotorresiste é removido obtendo no final do processo uma máscara positiva, contendo a configuração das microestruturas em alto relevo.

Após a construção do molde metálico, a imagem formada pode ser transferida para um material polimérico. Dentre os vários materiais poliméricos utilizados, o PDMS é o mais utilizado. O PDMS é composto de dois componentes: o material de base e o catalisador, ou agente de cura. Os grupos de Si híbridos presentes no catalisador reagem com os grupos vinil presentes no material base formando um material sólido, elastomérico, com ligações cruzadas [80]. No processo de prototipagem as duas partes são misturadas (monômero do polímero e um catalisador) e injetados/despejados sobre o molde. A proporção da mistura depende do tipo do material utilizado e influi, diretamente, no tempo de cura do material. Devido à baixa energia de superfície e à elasticidade do PDMS, a etapa desmoldante ocorre facilmente não danificando o molde.

Desde a introdução do conceito de μ TAS, o vidro e o silício foram os materiais mais empregados como substrato. No entanto, a partir de 1998 com excelentes trabalhos propostos pelo grupo do Prof. George M. Whitesides [80-82], o uso de materiais poliméricos para produção de dispositivos foi apresentado. Os materiais poliméricos apresentam inúmeras vantagens como, propriedades químicas e mecânicas atrativas, baixo custo, facilidade de fabricação, biocompatibilidade e alta flexibilidade. Estas vantagens possibilitam seu uso para produzir dispositivos em larga escala e dispositivos integrados e descartáveis para aplicações *in-the-field* e no *point-of-care* [83].

Além da tecnologia LIGA, os dispositivos poliméricos podem ser fabricados diretamente por litografia com raios-X, litografia *soft*, *imprinting*, *hot embossing*, e *laser ablation* [83, 84]. Diversos materiais poliméricos têm sido explorados. Além do

PDMS, destaca-se o poli(metilmetacrilato) (PMMA) [85], o policarbonato, poliestireno (PS), nitrocelulose, poli(etileno tereftalato) (PET) e poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) [84].

1.7.2.2. Processo de Impressão Direta

Outro processo alternativo para produção de dispositivos a baixo custo foi proposto em 2003 por Lago e colaboradores [73]. Este processo baseia-se na impressão de padrões de imagem em uma folha de transparência (filme de poliéster) com uma subsequente etapa de laminação. Os padrões podem ser preparados em *softwares* como o Corel Draw ou AutoCad sendo impressos na transparência através de uma impressora laser, que possui um raio laser de poucos micrômetros. A impressora produz a imagem enviada pelo computador através de uma série de pontos. Conseqüentemente, a resolução é, geralmente, dada em *dpi* (*dots per inch* – pontos por polegada).

A impressora laser funciona como um carregador (uma barra de alta voltagem que carrega o cilindro com eletricidade estática) que fornece ao cilindro uma carga estática negativa e ao papel, uma carga positiva. O raio laser, ativado ou não, conforme o padrão a ser impresso, descarrega áreas específicas do cilindro. O cilindro atrai o toner nas regiões carregadas e o papel, carregado positivamente, quando pressionado contra o cilindro atrai as partículas de toner antes (toner pulverizado) e depois da fusão (toner polimerizado) [86].

Como o toner é um sólido particulado (pó fino), o papel e o toner são aquecidos de modo a fundir este último provocando a adesão entre ambos. Com a

folha de transparência ocorre exatamente o mesmo princípio quando usada para produzir dispositivos.

A brilhante idéia do professor Claudimir L. do Lago, resultou no processo mais simples, mais fácil, mais rápido e que apresenta o menor custo por dispositivo dentre todos os processos de microfabricação descritos na literatura. No entanto, conforme será observado nos resultados apresentados, a superfície da camada de toner apresenta uma alta porosidade e as estruturas resultantes apresentam uma baixa resolução. Por essa razão, a resolução e a eficiência dos microdispositivos fabricados em poliéster-toner ainda não estão bem estabelecidas. Otimizando estes parâmetros esta tecnologia brasileira poderá ser ainda mais atrativa e mais competitiva com as demais tecnologias existentes.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

✓ Fabricar e avaliar microdispositivos de separação eletroforética através do processo de impressão direta e do processo fotolitográfico integrando-os com métodos de detecção eletroquímicos.

2.2. Objetivos Secundários

2.2.1. Processo de impressão direta

- ✓ Caracterizar os materiais (toner e poliéster) utilizados no desenvolvimento de microdispositivos a partir da tecnologia de impressão direta.
- ✓ Avaliar as dimensões limites deste processo.
- ✓ Aplicar um efeito de cinza nos canais de modo a criar padrões impressos para pré-concentração.

2.2.2. Processo fotolitográfico

- ✓ Fabricar microdispositivos usando o fotorresiste negativo SU-8 e avaliar diferentes materiais como substratos.
- ✓ Fabricar eletrodos planares para detecção eletroquímica e para eletroforese e integrá-los juntamente com os microcanais eletroforéticos em único substrato.
- ✓ Construir moldes metálicos para prototipagem rápida em materiais poliméricos.

2.3. Detecção Eletroquímica

2.3.1. Detecção Oscilométrica

- ✓ Estudar a viabilidade deste método de detecção em microdispositivos fabricados em poliéster-toner usando eletrodos de Cu.

2.3.2. Detecção Amperométrica

- ✓ Integrar a detecção amperométrica em microdispositivos de separação.
- ✓ Avaliar o uso de eletrodos fabricados a partir de CDs.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Processo de Impressão Direta

O processo de microfabricação de microdispositivos em poliéster-toner está esquematizado na Figura 11. A primeira etapa, não apresentada na Figura, está relacionada com a preparação do desenho do dispositivo. A configuração do dispositivo foi desenhada, na escala de 1:1, em *software* Corel Draw versão 11.0 (Corel Corporation, Ottawa, Canadá), embora outros *softwares* como CAD possam ser usados para o mesmo propósito. O padrão foi impresso em um filme de poliéster (I) (modelo CG 3300, 3M, Sumaré-SP) usando uma impressora Laser (LaserJet 2200d, modelo C7058A, Hewlett Packard).

Figura 11. Etapas do processo de microfabricação baseado na impressão direta: (I) filme de poliéster; (II) filme de poliéster com uma camada de toner (a) depositada; (III) alinhamento entre o esquema do dispositivo impresso no filme de poliéster e sua imagem especular com acesso aos reservatórios; (IV) etapa de laminação e; (V) microdispositivo finalizado com reservatórios (b) colados (tubos de PVC ou a base de ponteiros de pipetadores de 100 μ L).

A impressão foi realizada no modo otimizado, com resolução de 600 *dpi* operando no modo vetorial. Durante a impressão, uma camada de toner (II) (modelo Q2613A, Hewlett Packard) foi depositada pela impressora de modo a formar os microcanais. A espessura da camada de toner, representada pela coloração preta, define a altura dos microcanais obtidos e as regiões brancas representam os reservatórios e microcanais formados.

A vedação dos microcanais é realizada através de uma etapa de laminação térmica. A partir deste processo pode-se obter canais com uma simples camada de toner (SCT) ou canais com uma dupla camada de toner (DCT). No caso mais simples, nas microestruturas com uma SCT o padrão é impresso no filme de poliéster é laminado juntamente com um pedaço de transparência sem toner e o canal resultante apresenta uma profundidade média de 6 μm . Para obter um dispositivo com uma DCT, o padrão do dispositivo é impresso juntamente com sua imagem especular em uma mesma transparência. As duas partes são alinhadas e laminadas juntas obtendo um canal com aproximadamente 12 μm de profundidade. Neste trabalho foram utilizadas somente estruturas com DCT.

Antes da etapa de laminação, orifícios foram feitos diretamente nos centros dos reservatórios da imagem especular do dispositivo com auxílio de um perfurador de papel adaptado. O padrão do dispositivo e a imagem especular, contendo os orifícios, foram alinhados (III) e laminados (IV) juntos. Para evitar maiores problemas com o alinhamento entre os dois filmes impressos, guias podem ser feitas para facilitar esta etapa.

A laminação foi realizada em uma laminadora modelo AC91-230 (Gazela, Divinópolis-MG, Brasil) operando a 120 °C e a 40 cm min^{-1} . Nesta temperatura, ocorre a fusão entre as camadas de toner provocando a vedação dos microcanais.

Depois da laminação, tubos de PVC com 5 mm de comprimento e diâmetro externo de 7 mm foram colados (V) nos microdispositivos, com resina epóxi, de modo a formar reservatórios para as soluções, finalizando assim o processo de microfabricação. Além dos tubos de PVC, tubos de poli-etileno ou a base de ponteiros de pipetadores de 100 μ L podem ser usados para o mesmo propósito.

A Figura 12 apresenta o esquema dos microdispositivos preparados para os experimentos eletroforéticos realizados com detecção oscilométrica (A) e também amperométrica (B). Maiores detalhes a respeito das dimensões e o manuseio destes dispositivos serão abordadas na discussão dos resultados relacionados aos métodos de detecção utilizados.

Figura 12. Esquema dos microdispositivos utilizados nos experimentos eletroforéticos com detecção oscilométrica (A) e detecção amperométrica (B). Os reservatórios para amostra, tampão e descarte da amostra estão representados em ambas as figuras pelos números 1, 2 e 3, respectivamente. Em A, e1 e e2 representam o posicionamento externo dos eletrodos de cobre, espaçados por 1 mm e o reservatório 4 representa o reservatório de descarte do tampão, o qual foi cortado em B, de modo a facilitar o alinhamento com o eletrodo de trabalho.

3.2. Processo Fotolitográfico

As etapas fotolitográficas foram realizadas no Laboratório de Microfabricação (LMF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) localizado na cidade de Campinas-SP. O LMF é um laboratório multi-usuário que contém toda a infra-estrutura necessária para o desenvolvimento de microestruturas a partir de processos fotolitográficos.

O processo fotolitográfico se resume às etapas de escolha e limpeza do substrato, recobrimento com um material fotossensível (fotorresiste), fotogração da imagem desejada através da incidência à radiação UV, revelação do padrão fotogravado e corrosão do material. Neste trabalho a etapa de corrosão não foi realizada.

3.2.1. Limpeza dos substratos

A primeira etapa da limpeza dos substratos consistiu no desengraxamento orgânico (acetona, metanol e 2-propanol). Em seguida as amostras são secas com nitrogênio ultra-puro (White Martins) e lavadas novamente com uma solução piranha $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (1:10) de modo a remover os resíduos orgânicos e para promover uma melhor aderência do fotorresiste com o substrato. Após cada uma das etapas utilizando solução ácida, as amostras foram lavadas com água deionizada abundante e secas com nitrogênio ultra-puro.

3.2.2. *Spinning*

O recobrimento dos substratos com material fotosensível foi efetuado através do uso de um *spinner*. O *spinner* é um dispositivo mecânico utilizado para espalhar

filmes de uma maneira uniforme. Este dispositivo opera a uma alta rotação, está acoplado a um sistema de vácuo e a espessura dos filmes é determinada de acordo com uma curva de calibração do material. O tempo de *spinning* depende da característica do material sensível à radiação e também da espessura desejada. Na maioria dos experimentos realizados foi utilizado o fotorresiste negativo SU-8 (MicroChem Corporation Ltda, St. Louis, EUA) o qual possui uma transparência ótica alta que faz dele idealmente apropriado para filmes espessos. A etapa de *spinning* foi realizada a 3800 rpm durante 30 s, obtendo uma espessura de 50 μm .

3.2.3. Fotogravação

Após o espalhamento do fotorresiste foi realizada a etapa de *pré-bake* antes da etapa de fotogravação. A amostra foi colocada sobre uma chapa aquecedora a 65 °C durante 5 min e em seguida em outra chapa aquecedora a 95 °C durante 15 min. A amostra foi colocada novamente na chapa aquecedora a 65 °C durante outros 5 min. Este procedimento ajuda a reduzir o *stress* térmico. O tempo de *pré-bake* está diretamente relacionado com a eliminação do solvente contido no fotorresiste. Uma vez retiradas da chapa aquecedora, as amostras ficaram em repouso por 10 min antes de serem exposta à radiação UV.

O tempo de exposição está diretamente relacionado com a espessura e o tempo de *pré-bake*, ao qual o fotorresiste foi exposto. Nos experimentos realizados no LMF utilizou-se *hard contact* na Alinhadora Karl Suss MJB 3 UV300. Para uma potência de 10 mW/cm² foi utilizado um tempo de exposição de 40 s para todos os substratos utilizados.

3.2.4. Revelação

Como o SU-8 é uma resina termo ativada, após o processo de exposição, a amostra foi submetida a um tratamento térmico em uma chapa aquecedora a 95 °C, durante 15 min e em seguida a 65 °C durante 5 min. As amostras ficaram em repouso por 10 min antes de iniciar a etapa de revelação.

A etapa de revelação é necessária para remover o fotorresiste que não recebeu radiação. Foi utilizado o revelador para SU-8 (NANO XP SU-8 Developer), o qual foi colocado em um béquer sob agitação magnética a temperatura ambiente. A amostra foi fixada em um porta-amostra giratório para melhorar a uniformidade do processo. O tempo de revelação utilizado foi igual a 4 min.

Com a finalidade de reduzir o *stress* intrínseco do SU-8 ao final do processo de fotogração foi realizada uma etapa de *pós-bake*. O substrato com a imagem fotogravada foi submetido a um tratamento térmico a 95 °C por 15 min. Após esta etapa, o processo de fabricação dos microdispositivos estava finalizado. Uma etapa de corrosão ácida poderia ser adicionada após a última etapa descrita, com a finalidade de transferir a imagem fotogravada no fotorresiste para o próprio substrato. O SU-8 foi removido através da solução removedora NANO Remover PG a 85 °C.

Informações adicionais referentes a todo o procedimento utilizado para fabricar os mais diferentes dispositivos serão abordadas na segunda parte do capítulo referente aos resultados e discussão.

3.2.5. Preparo das máscaras

Usualmente as máscaras utilizadas nos processos fotolitográficos são fabricadas em vidro com filme de Au/Cr. Estas máscaras preparadas industrialmente, apresentam alto custo e o tempo de preparo é longo. No início do desenvolvimento deste trabalho foi utilizada uma máscara metálica preparada para o projeto Musa 2001. A partir dessa máscara os primeiros experimentos foram realizados de modo a se familiarizar com as etapas do processo de microfabricação.

No entanto, para os demais trabalhos as máscaras foram preparadas através do *software* Corel Draw versão 11.0 e impressas em filmes de poliéster de 0,10 mm de espessura através de um fotoploter com resolução de 3000 *dpi*. A etapa de impressão das máscaras foi realizada na gráfica do *Jornal Primeira Página de São Carlos*. Com esta resolução é possível obter microcanais com largura superior a 30 μm . A imagem impressa no filme de poliéster foi revelada usando um revelador específico, com adição de um gel fixador sendo lavada com água e seca com ar quente. O processo de impressão e revelação dos filmes dura em média 2 horas e o custo do preparo de uma máscara em uma folha tamanho A4 é de aproximadamente R\$ 20,00. O processo de revelação é idêntico à revelação de fotografias. As máscaras impressas em filmes de poliéster com subsequente etapa de revelação são comumente denominadas de máscaras impressas em fotolito.

3.3. Técnicas de Caracterização

3.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia Dispersiva de Raios-X (EDX)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas em um microscópio LEO, modelo 440, da empresa Zeiss-Leica. As amostras não condutoras foram metalizadas com Au, ou uma liga de Au/Pd (Modular High Vacuum Coating System). As análises espectroscópicas por dispersão de raios-X foram realizadas, com mapeamento elementar, no microscópio LEO-440 acoplado com um analisador dispersivo de energia de Si(Li) com janela de Be, da empresa Oxford, modelo 7060 e resolução de 133 eV. As análises de MEV e EDX foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Central de Análise Química e Instrumental (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

3.3.2. Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de microscopia de força atômica (AFM) foram obtidas em um microscópio modelo MultiMode SPM (Digital Instruments) no laboratório de Microscopia e Tunelamento do LNLS.

3.3.3. Espectroscopia por Reflectância Difusa

As análises de espectroscopia de reflectância difusa foram realizadas no laboratório de Química Supramolecular do Instituto de Química da USP/São Paulo usando um espectrofotômetro Guided Wave Model 260 (Shimadzu).

3.3.4. Análise Elementar

A análise elementar foi realizada no laboratório de Análise Elementar da CAQI no IQSC utilizando um Analisador Elementar CHNS-O, modelo EA 1110 (CE Instruments).

3.4. Técnicas de Análise

3.4.1. Eletroforese

Os experimentos eletroforéticos foram realizados em dois laboratórios. No Laboratório de Análise Instrumental e Automação (LAIA) foi utilizada uma fonte de alta tensão (Matsusada, R15-30N, Japão) com controle de 0-30 kV. No laboratório do Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME) foi utilizada uma fonte de alta tensão (Spellman, CZE 1000R) com controle de 0-30 kV.

3.4.2. Detecção Eletroquímica

A exemplo dos experimentos eletroforéticos, os experimentos com detecção eletroquímica foram realizados em dois laboratórios. No LAIA foi utilizado um detector EG&G PAR modelo 400 conectado a um microcomputador Pentium II 266 MHz e uma interface PCL 711 para aquisição de dados. Neste detector, o eletrodo de trabalho (Au) foi preparado a partir de um CD regravável. Um fio de platina foi usado como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl foi usado como eletrodo de referência, completando a célula de detecção. A aquisição de dados foi obtida em um *software* escrito em linguagem Delphi 5.0. Este *software* também foi usado para controlar o potencial e o tempo das etapas de injeção e de separação.

Maiores informações a respeito deste *software* podem ser encontradas nos trabalhos previamente descritos [87].

Nos experimentos realizados no GMEME foi utilizado um detector EG&G PAR modelo 174A conectado a um microcomputador Pentium 100-MHz através de uma interface serial RS-232. Os eletrodos utilizados neste detector foram os mesmos utilizados no LAIA. A aquisição de dados foi obtida em um *software* denominado AVOLM escrito em linguagem Microsoft Visual Basic, o qual permite realizar sucessivos experimentos visualizados em tempo real. Maiores informações a respeito deste *software* podem ser encontradas em trabalhos previamente descritos [88].

3.5. Reagentes

Para os experimentos de eletroforese com detecção eletroquímica, os seguintes reagentes foram utilizados: iodeto de potássio (Synth, Diadema-SP, Brasil), ácido ascórbico e catecol (Sigma, St. Louis, EUA), borato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro-RJ, Brasil), hidróxido de sódio (Fluka, Bluchs, Suécia), fosfato de potássio dihidrogenado e fosfato de dipotássio monohidrogenado (Mallinckrodt Baker, Xalostoc, México). A resina amberjet 4400 OH (Sigma, St. Louis, EUA) foi usada para substituir o bromo do brometo de cetil(tri)etil amônio (CTAB) (Vetec, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) por uma hidroxila, obtendo o hidróxido de cetil(tri)etil amônio (CTAH). Esta troca foi realizada através de uma reação de simples troca aniônica.

3.5.1. Preparo das Soluções

As soluções estoques de iodeto de potássio (5 mmol L^{-1}), ácido ascórbico (10 mmol L^{-1}) e catecol (5 mmol L^{-1}) foram preparadas diariamente em água ultrapura (resistividade de $18 \text{ M}\Omega\text{cm}$) e posteriormente diluídas. A solução tamponante de borato de sódio (10 mmol L^{-1} , pH 9,2) foi preparada pela mistura de ácido bórico e hidróxido de sódio. Ao tampão borato foi adicionado $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAH para promover a inversão do fluxo eletroosmótico. A solução de tampão fosfato (10 mmol L^{-1}) foi preparada pela mistura de fosfato de potássio dihidrogenado e fosfato de disódio monohidrogenado em diferentes valores de pH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I

MICROESTRUTURAS CONFECCIONADAS EM POLIÉSTER-TONER

4. Microestruturas confeccionadas em poliéster-toner

Este capítulo tem como objetivo apresentar e discutir todas as etapas envolvendo os experimentos com os microdispositivos fabricados em poliéster-toner. Ao longo do capítulo serão discutidos resultados de caracterização, avaliação das dimensões, aplicação de um gradiente de cinza e experimentos eletroforéticos utilizando detectores eletroquímicos.

4.1. Caracterização do Toner e do poliéster

O toner modelo HP Q2613A foi utilizado em todo o processo de microfabricação. De acordo com os resultados apresentados na dissertação de mestrado de H.D.T. da Silva [86], a composição do toner seria 45-55% de uma base polimérica (estireno-acrilato) e de 45-55% de óxido de ferro. Estas informações foram fornecidas pelo fabricante (HP). Segundo o material fornecido pela HP, o toner possui densidade entre 1,4 e 1,8 g mL⁻¹ e é parcialmente solúvel em tolueno e em xileno.

Para uma melhor compreensão da composição do toner foram realizadas algumas análises como análise elementar (carbono, hidrogênio e nitrogênio) e EDX, nos laboratórios da CAQI. Além dessas análises, foram obtidas várias imagens de MEV e AFM de modo a realizar uma caracterização da superfície do toner depositado sobre o filme de poliéster. Os apêndices A, B e C contêm maiores informações a respeito das técnicas de MEV, EDX e AFM, respectivamente.

Os resultados da análise elementar do toner e também do filme de poliéster estão apresentados na Tabela II. O percentual de oxigênio foi determinado pela diferença entre o valor total e a soma dos percentuais dos compostos elementares.

Tabela II. Resultados da Análise Elementar CHN-O para o toner e para o poliéster

	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)	Oxigênio* (%)
<i>Toner</i>	47,99	4,25	0,22	47,54
<i>Poliéster</i>	66,53	4,40	0,06	29,01

* O teor de oxigênio foi determinado por diferença.

De acordo com Lago [73], e também com o material fornecido pela Hewlett Packard [86] o toner é composto por uma base polimérica, contendo poliestireno e poli(metilmetacrilato) e também apresenta óxido de ferro em sua composição. Os resultados semi-quantitativos da análise por EDX, apresentados na Figura 13, permitiram determinar a porcentagem de óxido de ferro como sendo igual a 52-55%. O sinal de cloro visualizado no espectro deve ser resultado de alguma contaminação do material, ou algum aditivo presente na sua composição. Os picos de Au são resultados de uma etapa de metalização antes das análises.

Figura 13. Resultados das análises de espectrometria dispersiva de energia de raios-X para o toner.

A composição de Fe_2O_3 encontrada a partir das análises de EDX é compatível com a informação fornecida pelo fabricante e também com os resultados obtidos através do método espectrofotométrico e pelo método de ICP-AES, ambos apresentados por H.D.T. Silva [86].

O filme de poliéster, comumente denominado transparência, é composto de polietileno tereftalato (PET) revestido com uma camada de sílica. De acordo com o procedimento apresentado no item 3.1, a estrutura dos microcanais é definida por filmes de poliéster (base e tampa) e toner (paredes). A presença de PMMA, PS, PET e sílica podem influenciar na formação do EOF, bem como na sua modificação.

Alguns testes qualitativos de resistência química foram realizados com algumas soluções comumente utilizadas em CE. Filmes de poliéster impressos e microdispositivos laminados foram imersos nas seguintes soluções aquosas: metanol 30% (v/v), acetonitrila 30% (v/v), ácido fosfórico (pH 2) e hidróxido de sódio (pH 12). Em todos os casos nenhuma alteração na coloração e na estrutura foi observado visualmente após exposição por 36 h.

4.2. Avaliação das dimensões

4.2.1. Largura

As dimensões dos canais produzidos pela tecnologia de impressão direta são altamente dependentes da resolução da impressora. Para averiguar as possíveis dimensões a serem utilizadas, canais com valores de largura entre 10 e 300 μm foram estudados, usando a impressora LaserJet 2200d com 600 *dpi* de resolução.

Para valores menores do que 60 μm não foi possível observar a formação de canais, pois verificou-se a presença de partículas de toner dentro dos microcanais em

quantidade suficiente para obstruí-lo. Canais com dimensões entre 70 e 140 μm podem ser obtidos, mas uma melhor regularidade foi observada para canais com largura igual ou superior a 150 μm . No entanto, acreditamos que seja possível obter canais com melhor definição e com dimensões compatíveis com outros processos usando resolução superior a 2000 *dpi*. Testes com uma impressora contendo resolução de 1200 *dpi* já foram realizados e a principal diferença observada está relacionada à deposição do toner de uma forma mais compacta.

A Figura 14 apresenta duas imagens de MEV de microcanais com largura de 70 μm (A) e 150 μm (B). É possível observar que mesmo no canal com largura de 150 μm existe a presença de partículas de toner. Estas partículas têm dimensões de aproximadamente $6 \times 8 \mu\text{m}$ e a superfície do toner depositado sobre o filme de poliéster apresenta-se com elevada irregularidade.

Figura 14. Micrografias obtidas para microcanais obtidos a partir do processo de impressão direta. Microcanais com largura de 70 μm (A) e 150 μm (B).

A Figura 15 apresenta uma imagem com as dimensões da partícula de toner (A) e também uma imagem apresentando a intersecção dos canais de injeção e de separação (B), na qual é possível observar a irregularidade da superfície do toner.

Figura 15. Micrografias evidenciando as dimensões de uma partícula de toner (A) e a intersecção dos microcanais de injeção e de separação (B). Na imagem A a partícula apresenta dimensões de aproximadamente $6 \times 8 \mu\text{m}$ e na imagem B é possível observar a elevada irregularidade da superfície de toner.

4.2.2. Espessura

Além da avaliação dos valores limites para a largura dos microcanais fabricados em poliéster-toner, a espessura da camada de toner também foi avaliada uma vez que ela determina a altura dos microcanais obtidos. Foram realizadas cinco medidas perfilométricas em um simples canal aberto, ou seja, antes de ser laminado, com largura igual a $150 \mu\text{m}$. O valor médio para a espessura da camada de toner, ou para a profundidade, do microcanal foi igual a $6,6 \mu\text{m}$.

O valor médio encontrado está de acordo com o valor calculado por Lago e colaboradores [73]. Para obter o valor calculado, os inventores da técnica utilizaram a geometria do canal e medidas de condutividade e impedância. Os valores médios

calculados para canais formados com SCT e DCT foram 6 μm e 12 μm , respectivamente. O valor obtido através de medidas perfilométricas sugere que ao preparar os microdispositivos com DCT, o canal resultante deveria apresentar entre 13 e 14 μm . No entanto, como pode ser observado nas Figuras 16 e 17 as imagens obtidas por AFM mostram que a superfície da camada de toner é extremamente rugosa, apresentando alguns vales totalmente irregulares.

Figura 16. Perfil da superfície da camada de toner numa área de $19,9 \times 1,6 \mu\text{m}$. Os símbolos presentes na Figura indicam a presença de vales na superfície da camada de toner.

Figura 17. Perfil em 3D da superfície da camada de toner numa área de $20 \times 20 \mu\text{m}$.

A partir da imagem apresentada na Figura 17 pode-se estimar o valor da área superficial como sendo igual a $437,88 \mu\text{m}^2$ e também o valor da rugosidade como sendo igual a $1,365 \mu\text{m}$. No entanto, estes valores não são muito representativos, pois o microscópio utilizado apresentava um limite, em altura, igual a $5 \mu\text{m}$.

Devido a essa irregularidade após a etapa de laminação, o canal resultante com DCT apresenta uma altura de $12 \mu\text{m}$, conforme os cálculos apresentados por Lago e colaboradores. Essa diferença de $1\text{-}2 \mu\text{m}$ ocorre devido à fusão do toner, o que provoca um amolecimento das partículas de toner formando uma camada mais regular.

4.3. Aplicação de um efeito de cinza nos microcanais

A presença de partículas de toner dentro dos microcanais é uma característica deste processo de microfabricação e a quantidade de partículas está relacionada ao modo de impressão e também à resolução da impressora. Como estas partículas estão presentes no canal de modo a não obstruí-lo, estas partículas podem ser utilizadas como obstáculos para o fluxo que é gerado nos microcanais. Dessa maneira, acredita-se que seja possível criar um dispositivo de pré-concentração, ou mesmo de filtração usando estas partículas de toner.

Para estudar esta hipótese, aplicou-se um efeito, ou um gradiente, de cinza em um simples canal de $150 \mu\text{m}$ de largura. Nos primeiros testes foi aplicado um gradiente variando de 0-100% de preto em quatro diferentes modos: cônico, quadrático, radial e linear. Devido à resolução da impressora, o modo que ofereceu melhores resultados foi o modo linear. A Figura 18 apresenta três imagens em

diferentes posições (início, meio e fim) de um canal com 3 cm de comprimento e 150 μm de largura com o referido gradiente de preto aplicado.

Figura 18. Micrografias indicando o efeito do gradiente de cinza em um canal com largura de 150 μm com conseqüente aumento da quantidade de partículas de toner.

De acordo com as imagens apresentadas pode-se observar que há um aumento do número de partículas dentro do canal conforme aumenta o percentual de cinza. Obviamente, o percentual de 100% é elevado e neste valor o canal estará todo obstruído. A partir de cálculos realizados o gradiente ideal de cinza a ser aplicado, de modo a obter canais sem obstrução, estaria entre 80 e 95%. Em um canal com largura de 500 μm foram aplicados diferentes gradientes entre 80 e 95%, em intervalos de 5%. Nas imagens apresentadas na Figura 19 pode-se observar que o gradiente máximo que pode ser aplicado é 80%. A partir de 85% os canais ficam obstruídos, os quais apresentam uma geometria na forma de uma malha. O efeito de cinza está ainda em fase de testes para criar um dispositivo de pré-concentração. Problemas na demora da otimização do sistema de detecção atrasaram estes desenvolvimentos.

Figura 19. Imagens apresentando diferentes gradientes de cinza aplicados em um canal com 500 µm de largura. (A) 80%; (B) 85%; (C) 90%; (D) 95%.

4.4. Preparação de máscaras em transparência

O processo para produção de microdispositivos baseado na impressão de padrões usando uma impressora Laser também foi avaliado para a produção de máscaras a serem utilizadas no processo fotolitográfico. Um padrão foi desenhado em *software* Corel Draw 11.0 e impresso em uma folha de transparência, tamanho A4, usando uma impressora Laser com resolução de 600 *dpi*, similarmente ao processo de produção de microdispositivos. Após a impressão, este padrão (máscara) foi utilizado no processo fotolitográfico. A Figura 20 apresenta um esquema de um padrão impresso em transparência, com microcanais de 150 µm de largura, e a

Figura 21 apresenta algumas imagens dos microcanais fotogravados usando este padrão como máscara.

Figura 20. Esquema do padrão impresso em transparência.

Figura 21. Imagens obtidas dos microcanais fotogravados utilizando máscara preparada através da impressão em impressora laser com 600 *dpi* de resolução. (A) intersecção dos microcanais de 150µm de largura; (B) canal; (C) superfície do fotorresiste protegido da radiação UV pelo toner.

Nas imagens apresentadas é possível visualizar que os microcanais apresentaram uma boa definição, de modo que as partículas de toner presentes não interferiram na etapa de fotogração. Nas imagens A e B, apresentadas na Figura 21, é possível visualizar que não houve uma boa regularidade na definição dos canais devido a irregularidade da superfície do toner. Na imagem C pode-se

observar que a camada de fotorresiste ficou totalmente irregular, o que é resultado da insuficiente proteção da radiação UV, pelo toner. Com base nestas imagens, o uso de máscaras preparadas diretamente pela impressão Laser foi descartado, embora uma impressora com melhor resolução pudesse fornecer resultados mais satisfatórios.

4.5. Preparação de máscaras em fotolito

Um processo alternativo, e similar, para a preparação de máscaras é a impressão do padrão de imagem em fotolito. Na grande São Paulo existem várias empresas especializadas neste tipo de processo, o qual consiste na impressão do padrão de imagem em um filme de poliéster usando um *fotoploter* com elevada resolução. Após a impressão, uma etapa de revelação similar ao processo fotográfico, é realizada para obtenção das imagens. O uso do fotolito é uma alternativa bastante viável, considerando seu baixo custo perante as máscaras metálicas. Para efeito de comparação, uma máscara metálica com dimensões de 3×3 polegadas custa em torno de R\$ 600,00 (seiscentos reais). Na grande São Paulo, empresas como a CadService cobram o equivalente a R\$ 120 (cento e vinte reais) para preparar uma máscara de fotolito utilizando um filme de poliéster tamanho A4.

Na cidade de São Carlos-SP, a gráfica do *Jornal Primeira Página de São Carlos* possui um serviço de *interpress*, o qual também realiza processos de impressão em fotolito. Nesta gráfica, é utilizado um fotoploter com resolução de 3000 *dpi* o que possibilita obter microcanais com largura mínima de 30 μm . O custo do preparo destas máscaras é bastante atrativo, algo em torno de R\$ 20,00 (vinte reais) a folha tamanho A4. Considerando que em uma folha tamanho A4 podem ser preparadas várias máscaras, dependendo de suas dimensões, o custo por máscara é

bastante reduzido quando comparado com o custo das máscaras metálicas. Além disso, para desenvolver microcanais para eletroforese o valor limite de 30 μm é excelente, pois dificilmente canais com dimensões menores do que esta seriam desenvolvidos. A Figura 22 apresenta três imagens obtidas a partir do padrão apresentado na Figura 20. A única diferença é que o padrão foi preparado no fotolito com largura de 50 μm , ao invés de 150 μm .

É possível observar nas imagens A, B, e C que os canais de 50 μm ficaram bem definidos. Nas imagens apresentadas é possível observar a presença de pequenos pontos pretos dentro dos microcanais, o que aparentemente demonstra ser partículas de toner. No entanto, estes pontos podem estar relacionados também com a granulometria existente na superfície do filme de poliéster. De fato, estas partículas não influenciaram no processo de fotografação e esta tecnologia foi utilizada para preparar as máscaras necessárias no processo de fabricação de microdispositivos a partir de técnicas fotolitográficas (ver resultados e discussão – parte II).

Figura 22. Fotografias obtidas em um microscópio óptico, com aumento de 1000 X, de um padrão de imagem impresso em fotolito: (A) intersecção dos microcanais de 50 μm ; (B) canal transversal próximo ao reservatório; (C) extremidade do canal com reservatório mostrando um grande número de partículas de toner dentro do reservatório.

4.6. Microdispositivos para eletroforese com detecção eletroquímica

Os experimentos de detecção eletroquímica (DE) em microestruturas fabricadas em poliéster-toner foram realizados, inicialmente, em colaboração com o grupo de pesquisa LAIA¹ dos profs. Drs. Claudimir Lúcio do Lago e Lúcio Angnes. Essa colaboração foi intermediada através dos alunos Heron Dominguez Torres da Silva e Eduardo Mathias Richter (ambos doutorandos) além do pós-doc Dr. José Alberto Fracassi da Silva². Através dessa promissora colaboração foram realizados experimentos eletroforéticos utilizando o sistema de detecção oscilométrica (DO), ou condutométrica livre de contato, e também o sistema de detecção amperométrica (DA). Dessa colaboração resultou um artigo submetido [89], e aceito, ao periódico *Electrophoresis* para a edição especial sobre Miniaturização, a qual deve ser publicada em novembro de 2004.

4.6.1. Detecção condutométrica sem contato

A detecção condutométrica sem contato, ou oscilométrica, foi proposta para eletroforese capilar (CE), por Fracassi da Silva e Lago [90], como uma alternativa à detecção condutométrica convencional. Neste modo de detecção são utilizadas altas frequências de operação em comparação ao modo convencional, o que possibilita o posicionamento de dois eletrodos tubulares (e1 e e2) do lado externo de um capilar (Figura 23a). Este arranjo evita a contaminação dos eletrodos, além de proporcionar o desacoplamento entre o circuito do detector e os altos valores de potenciais utilizados na separação eletroforética.

---

¹ LAIA (Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica, Instituto de Química, USP, São Paulo)

² Atualmente professor do Instituto de Química da Unicamp

No sistema oscilométrico, quando um sinal alternado de alta frequência é aplicado em um dos eletrodos, a corrente resultante que passa pela cela oscilométrica é amplificada, retificada e medida. Esta corrente é uma função da admitância. Desde que o capilar seja preenchido com solução eletrolítica, a admitância é uma função da condutância na região entre os eletrodos. A propagação do sinal é feita por diversos caminhos: (1) transmissão direta entre os eletrodos, (2) pela camada de poliimida que recobre o capilar, (3) pela parede do tubo capilar, e (4) pela solução que preenche o interior do capilar. A Figura 23b ilustra os possíveis caminhos para transmissão de sinal na cela oscilométrica.

Figura 23. Representação do (a) posicionamento dos eletrodos e (b) dos possíveis caminhos para propagação do sinal na cela oscilométrica que podem ocorrer através da: (1) transmissão direta entre os eletrodos, (2) pela camada de poliimida que recobre o capilar, (3) pela parede do tubo capilar, e (4) pela solução que preenche o interior do capilar.

O circuito equivalente da cela oscilométrica foi descrito, previamente, por Fracassi da Silva [87] em sua excelente tese de doutorado. Na detecção oscilométrica, a corrente medida pelo circuito eletrônico reflete a impedância total do sistema. A impedância, por sua vez, é a combinação das reatâncias capacitivas da parede do capilar (X_w), intereletrodos (X_o) e a resistência da solução (R_s), e é melhor expressa em termos do inverso da impedância complexa: a admitância complexa (Y):

$$Y = G + jB = \frac{R_s}{R_s^2 + X_w^2} + j \frac{R_s^2 + X_w(X_o + X_w)}{X_o(R_s^2 + X_w^2)} \quad \text{Equação 6}$$

A parte real da admitância é chamada de condutância (G), e não deve ser confundida com a condutância da solução no interior do capilar. À parte imaginária, dá-se o nome de susceptância (B). O módulo da admitância, que é proporcional à corrente medida, é dado por:

$$|Y| = \frac{\sqrt{R_s^2 X_o^2 + [R_s^2 + X_w(X_o + X_w)]^2}}{X_o(R_s^2 + X_w^2)} \quad \text{Equação 7}$$

Ao trabalhar com valores fixos de frequência de operação, mantendo a geometria da cela oscilométrica e ignorando as variações de capacitância (ou mais corretamente de constante dielétrica) influenciadas pela temperatura, as variações na admitância Y serão devidas às variações na condutividade na solução. O sistema oscilométrico já tem sido utilizado em microdispositivos eletroforéticos fabricados em PMMA [91].

Para adaptar este sistema de detecção aos microdispositivos de poliéster-toner [73] os eletrodos foram posicionados na parte exterior do dispositivo, assim como nos capilares. Os eletrodos foram confeccionados com uma fita adesiva de cobre. No entanto, qualquer outro material condutor pode ser utilizado.

O dispositivo utilizado nesta etapa foi apresentado na Figura 12A, sendo que os canais apresentaram largura de 150 µm, o canal de separação teve um comprimento efetivo de 5 cm e o canal de injeção teve um comprimento de 2,5 cm. A geometria do canal de injeção foi projetada na forma de duplo-T, com um *plug* contendo 350 µm de comprimento. Dessa maneira o volume definido por 350 × 150 × 12 µm é igual a 630 pL.

Preenchimento dos canais

Os microcanais foram preenchidos com solução tampão através do fenômeno de capilaridade. Inicialmente, um dos reservatórios foi preenchido com solução tampão e em um intervalo de 2 minutos o canal foi facilmente preenchido. Problemas com bolhas no interior dos canais podem ser resolvidos efetuando-se vácuo em um dos reservatórios. Após o preenchimento dos microcanais, todos os reservatórios foram preenchidos com o mesmo volume de solução tampão e uma diferença de potencial foi aplicada entre os reservatórios até a estabilização da linha de base.

As separações eletroforéticas foram realizadas após a estabilização da linha de base. A amostra foi introduzida eletrocineticamente sob a aplicação de uma diferença de potencial de 1,0 kV/10 s entre os reservatórios 1 e 3. O *plug* da amostra, definido pela geometria em forma de duplo-T foi deslocado na direção do detector ao aplicar a diferença de potencial entre os reservatórios 2 e 4.

O objetivo inicial era utilizar este sistema para detectar uma separação de aminoácidos. Os primeiros testes foram realizados injetando uma solução de glutamato (Glu) 2 mmol L⁻¹ preparada em água. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-HCl 10 mmol L⁻¹, pH 9,50, com a adição de 0,2 mmol L⁻¹ de CTAH.

A Figura 24 apresenta um dos eletroferogramas obtidos para a detecção de glutamato. No eletroferograma obtido, o pico do glutamato e também o pico do EOF foram registrados com sinais negativos. A explicação para os sinais negativos está relacionado ao fato do *plug* de amostra apresentar menor condutividade do que o tampão de corrida. Vários eletroferogramas foram registrados sob diferentes potenciais de separação. A Figura 25 apresenta um gráfico do decréscimo do tempo de migração com o aumento do potencial de separação. Na Figura 25 pode ser

visualizado que há um desvio na curva em 2,5 kV. Esse desvio pode ter ocorrido devido a uma ineficiente dissipação de calor no potencial aplicado.

Figura 24. Eletroferograma obtido para a detecção de uma solução 2 mmol L^{-1} de glutamato. Condições: injeção eletrocinética, $1,0 \text{ kV}/10 \text{ s}$; potencial de separação: 1500 V ; tampão de corrida: Tris-HCl 10 mmol L^{-1} , pH 9,5, com a adição de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAH. Frequência: 500 kHz e 2 V_{pp} .

Figura 25. Efeito do potencial de separação no tempo de migração do analito.

O sistema oscilométrico apresentou-se bastante apropriado como método de detecção para sistemas miniaturizados e uma prova disso é que vários grupos já vem utilizando este método, porém utilizando outros materiais. No caso dos microdispositivos fabricados em poliéster-toner houveram muitos problemas relacionados à falta de reprodutibilidade e também devido à baixa sensibilidade encontrada. Foram realizados muitos outros experimentos, porém, os resultados obtidos para a separação de glutamato, histidina e aspartato não foram satisfatórios devido aos problemas citados.

4.6.2. Detecção Amperométrica na saída do canal de separação

Para trabalhar com DA nas microestruturas fabricadas em poliéster-toner foi construído um suporte em acrílico (Figura 26) de modo a acomodar as microestruturas e realizar a detecção amperométrica na saída do canal de separação (Fig. 26A). Neste suporte, um reservatório foi projetado para acomodar um grande volume (~5 mL) de solução tampão, de modo que os analitos deixem o canal de separação e sejam diluídos. Deste modo, pode-se efetuar várias separações sem que o tampão necessite ser trocado. Neste reservatório são posicionados os eletrodos de trabalho (WE), referência (RE) e auxiliar (AE) do detector amperométrico e o eletrodo de platina da fonte de alta tensão (Fig. 26B), conectado ao terra da fonte.

O suporte, cujo primeiro protótipo foi construído por Richter e Fracassi da Silva, foi fabricado em acrílico, sendo revestido posteriormente com uma manta de silicone para promover melhor aderência com a microestrutura. No reservatório de detecção, o eletrodo de trabalho é fixo em um bloco de acrílico, o qual pode ser facilmente alinhado com a saída do canal de separação usando uma guia controlada

por um parafuso. O suporte apresenta algumas vantagens como, facilidade e rapidez a troca de eletrodos e microestruturas, além do fácil alinhamento entre o eletrodo e a saída do canal de separação sem a necessidade de um micro-posicionador. A Figura 26C apresenta as dimensões do suporte desenvolvido.

As microestruturas utilizadas foram similares àquela apresentada na Figura 12B. Os canais apresentaram largura de 150 μm , o canal de separação teve comprimento total de 5,5 cm e comprimento efetivo de 5,0 cm. O canal de injeção teve um comprimento total de 1,7 cm. Inicialmente utilizou-se um canal de injeção na com geometria na forma de duplo-T (*plug* de 630 pL) posteriormente alterado para a geometria na forma de cruz (*plug* de 270 pL).

Figura 26. Suporte desenvolvido para trabalhar com detecção amperométrica na saída do canal de separação dos microdispositivos. (A) Vista geral dos dispositivo construído em acrílico: a, manta de silicone; b, microestrutura; c, reservatório de detecção (5 mL); d, guia para controlar a distância entre o eletrodo de trabalho e a saída do canal de separação; e, bloco de acrílico para fixar o eletrodo de trabalho; f, eletrodo de trabalho; g, eletrodo de referência; h, eletrodo auxiliar e; i, eletrodo terra da eletroforese. (B) Vista detalhada da configuração dos eletrodos no reservatório de detecção. (C) Vista com dimensões do dispositivo, em mm.

O eletrodo de trabalho foi fabricado a partir de *compact discs* (CD-Rs), que possuem um depósito de ouro homogêneo e livre de contaminações. Foram confeccionados eletrodos de 100 μm de largura, sendo que um ou dois destes eletrodos foram posicionados na saída do canal. O posicionamento do WE em relação ao canal de separação é crucial para o bom funcionamento do sistema. Se o WE estiver muito distante da saída do canal de separação, a diluição causada pela difusão do analito no reservatório causa a diminuição da corrente faradaica e na pior das hipóteses, o analito não será detectado. Se o WE estiver muito próximo da saída, ou inserido no canal de separação o campo elétrico utilizado na separação causa interferência no potencial aplicado, elevando o ruído no detector.

4.6.2.1. Fabricação dos eletrodos

Os eletrodos utilizados neste trabalho foram fabricados a partir da combinação das tecnologias de produção a partir de CD-R e transferência térmica de uma máscara de toner. Os eletrodos foram produzidos pelo doutorando Eduardo M. Richter, cujas etapas estão rapidamente descritas a seguir.

O CD é composto de quatro camadas, conforme visualizado na Figura 27. Existe uma base de policarbonato (a), uma camada foto-degradável (b), uma camada de ouro (c) e uma ou duas camadas de um filme polimérico, com função de proteger a camada metálica. Primeiramente o filme protetor é removido com ácido nítrico e em seguida pequenos pedaços do CD são cortados com uma guilhotina, ou uma tesoura, nas dimensões desejadas.

Uma máscara com a configuração desejada dos eletrodos foi preparada no Corel Draw 11.0 e impressa em papel encerado (papel de etiquetas). A imagem

impressa no papel foi transferida termicamente (120 °C durante 2 minutos) para a peça de CD cortada e após a transferência, a camada de Au exposta foi removida com solução de iodo/iodeto (1:4). O toner foi removido com acetonitrila, obtendo os eletrodos. A Figura 28 apresenta todas estas etapas, bem como uma imagem amplificada dos eletrodos. A partir desta tecnologia é possível produzir eletrodos simples e duplos

Figura 27. Composição dos *compact-disks* (CD): (a) base de policarbonato; (b) camada foto-degradável; (c) camada de ouro e; (d) uma ou duas camadas poliméricas [72].

Figura 28. Representação das etapas de fabricação dos eletrodos. (a) impressão de uma máscara com a configuração desejada; (b) transferência térmica da máscara sobre uma peça de CD cortado; (c) remoção da camada de Au com solução de iodo/iodeto; (d) remoção do toner com acetonitrila e; (e) imagem amplificada dos eletrodos obtidos.

4.6.2.2. Detecção com dois eletrodos e sistema de injeção em duplo-T

Os primeiros testes usando o sistema de detecção amperométrico em microdispositivos fabricados em poliéster-toner foram conduzidos utilizando um duplo eletrodo. Uma solução contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de iodeto foi injetada através da aplicação de um potencial de $1,0 \text{ kV}/30 \text{ s}$. O potencial de separação aplicado foi igual a $1,5 \text{ kV}$ e o potencial de detecção aplicado aos dois eletrodos de trabalho foi igual a $0,900 \text{ V}$. O tampão de corrida utilizado foi o tampão borato 10 mmol L^{-1} , pH 9,2, na presença de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAH. A Figura 29 apresenta um eletroferograma obtido com os dois eletrodos.

Figura 29. Eletroferograma obtido com dois eletrodos de Au. Condições: injeção: $1,0 \text{ kV}/30 \text{ s}$; potencial de separação: $1,5 \text{ kV}$; potencial de detecção: $0,900 \text{ V}$ nos dois eletrodos; tampão de corrida: borato 10 mmol L^{-1} , pH 9,2, na presença de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAH

Os picos registrados, apresentados no eletroferograma da Figura 29, apresentaram-se extremamente largos, o que pode ter sido resultado de dois fatores. Primeiro, a distância entre a saída do canal de separação e o eletrodo de detecção

pode ter sido o primeiro fator a influenciar na largura dos picos. Segundo, a geometria do canal de injeção no microdispositivo usado apresentava-se na forma de duplo-T possuindo um *plug* com comprimento total de 350 μm . O volume de amostra definido pelo *plug* seria de 630 pL ($350 \times 150 \times 12 \mu\text{m}$). A diferença de intensidade entre os dois picos deve-se às diferentes distâncias dos respectivos eletrodos à saída do canal de separação, pois uma vez que o canal de separação apresenta largura de 150 μm e os eletrodos apresentam largura de 100 μm , espaçados por 100 μm , torna-se muito difícil obter um bom alinhamento para ambos os eletrodos. Além disso, o tempo de injeção também foi excessivo necessitando ser otimizado.

No sentido de maximizar a resposta amperométrica, o uso de dois eletrodos foi descartado, a priori, e a geometria do canal de injeção foi modificada para uma geometria na forma de cruz, conforme apresentada na Figura 12B. Além disso, o tempo de injeção e o potencial de detecção foram otimizados de modo a obter a melhor resposta possível.

4.6.2.3. Determinação do Tempo de Injeção da Amostra

Para determinar o tempo ideal de injeção, uma solução de iodeto de potássio ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi introduzida eletrocineticamente no canal sob aplicação de 1,0 kV variando o tempo de 1 a 10 s. O potencial de separação aplicado foi igual a 3,0 kV e o potencial de detecção foi de 0,900 V. O tampão de corrida utilizado foi o mesmo apresentado na Figura 29. Ao medir a altura do pico do iodeto e sua respectiva largura pode-se graficar estes parâmetros de acordo com o tempo de injeção, conforme pode ser visualizado nas Figuras 30 e 31.

Figura 30. Efeito do tempo de injeção da amostra versus a altura do pico.

Figura 31. Efeito do tempo de injeção da amostra versus a largura do pico.

De acordo com as Figuras apresentadas, pode-se observar que a partir de 8 s, sob aplicação de um potencial de 1,0 kV, ocorre uma estabilização tanto na altura quanto na largura do pico. Esta estabilização indica que o tempo de 8 s é o tempo necessário para ocorrer um completo preenchimento da intersecção entre os

canais de injeção e separação. Para nossos experimentos, utilizando o potencial de injeção igual a 1,0 kV, o tempo de injeção aplicado foi igual a 10 s.

4.6.2.4. Determinação do Potencial de Detecção

A detecção amperométrica é altamente seletiva. Por essa razão o potencial de detecção deve ser previamente determinado. Embora experimentos de voltametria cíclica possam ser utilizados para tal finalidade, a melhor maneira de determinar o valor adequado do potencial de detecção é a realização de experimentos de voltametria hidrodinâmica, pois o voltamograma é obtido sob as mesmas condições eletroforéticas que a separação. Para obter um voltamograma hidrodinâmico, os analitos devem ser injetados e detectados em diferentes potenciais de detecção. Ao graficar os valores de corrente máxima registrada para os analitos *versus* o potencial aplicado, os voltamogramas são obtidos.

Nos experimentos usando a DA, dois analitos na forma iônica foram estudados: o ascorbato e o iodeto. A Figura 32 apresenta os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para os dois analitos. Como pode ser observado, a corrente aumenta com o aumento do potencial de detecção até o valor de 0,900 V, para ambos os analitos. Após este valor, um decréscimo no valor de corrente é observado, o qual pode ser resultado da formação de uma camada de óxido na superfície do eletrodo. Para nossos experimentos, o valor de 0,900 V foi escolhido como o ótimo potencial de detecção de modo a maximizar a resposta dada em corrente.

Para os experimentos com estes dois analitos utilizou-se o tampão borato 10 mmol L⁻¹, pH 9,2, contendo 0,2 mmol L⁻¹ de CTAH.

Figura 32. Voltamogramas hidrodinâmicos (HDVs) para o iodeto ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e para o ascorbato ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$). Potencial de injeção: $1,0 \text{ kV}/10 \text{ s}$, potencial de separação: $3,0 \text{ kV}$. Tampão: borato de sódio, 10 mmol L^{-1} com CTAH $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 9,2.

4.6.2.5. Separação Eletroforética

Após alterar a geometria do canal de injeção para um formato em cruz, cujas dimensões foram iguais a $150 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m} \times 12 \mu\text{m}$ (270 pL) os resultados melhoraram e alguns parâmetros foram otimizados como o tempo de injeção e o potencial de detecção, conforme já apresentados. Após otimizar os parâmetros citados, a separação eletroforética do iodeto e do ascorbato foi avaliada. A Figura 33 apresenta um eletroferograma mostrando uma rápida e eficiente separação eletroforética para uma mistura de iodeto e ascorbato em concentrações submilimolares. A linha de base estável e o baixo nível de ruído são indicativos de um efetivo isolamento do alto campo elétrico sem o uso de um desacoplador.

Figura 33 Eletroferograma mostrando a separação de (a) iodeto ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (b) ascorbato ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$). Injeção eletrocinética: 1000 V/10 s, potencial de separação: 4,0 kV. Tampão: borato de sódio 10 mmol L^{-1} com $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAH, pH 9,2. Potencial de detecção: 0,900 V (vs Ag/AgCl).

4.6.2.6. Efeito do Potencial de Separação

O potencial de separação exerce um acentuado efeito na detecção dos analitos. Como era esperado, este efeito é observado na Figura 34 para a mistura contendo iodeto e ascorbato na qual pode-se visualizar que o tempo de migração diminui com o aumento do potencial de separação de 1,0 kV para 4,5 kV (em intervalos de 0,5 kV). O decréscimo do tempo de migração observado é uma combinação linear entre o campo elétrico aplicado e a velocidade de migração (equação 2, página 8) dos analitos (Figura 35). Estas Figuras indicam que não houve um aquecimento joule excessivo para a faixa de potencial utilizada.

Figura 34. Efeito do potencial de separação no tempo de migração dos analitos.

Figura 35. Efeito do potencial de separação na velocidade eletroforética dos analitos.

Além do decréscimo do tempo de migração, a largura dos picos também sofre um decréscimo com o aumento do potencial de separação. Esse decréscimo é resultado de um menor tempo de difusão do *plug* de amostra. Este efeito é mais pronunciado entre 1,0 kV e 1,5 kV, em cujos valores os picos apresentaram-se mais largos. A Figura 36 apresenta o decréscimo da largura dos picos de acordo com o aumento do potencial de separação. O procedimento de injeção da amostra foi similar ao apresentado na Figura 33.

Figura 36. Efeito do potencial de separação na largura do pico.

A Figura 37 apresenta o baixo nível de ruído detectado nos diferentes potenciais aplicados, o que é um indicativo de um efetivo isolamento do campo elétrico. Outro indicativo de um efetivo isolamento é que nos experimentos realizados nenhuma alteração na linha de base foi observada com o aumento do potencial de separação. De acordo com Wang e Chen [62] a presença de alterações (oscilações) na linha de base no início do eletroferograma é resultado de um incompleto isolamento elétrico.

Figura 37. Nível de ruído detectado sob diferentes potenciais de separação.

4.6.2.7. Eficiência e Resolução

Para os microdispositivos fabricados em poliéster-toner os dois picos foram bem resolvidos em toda a faixa de potencial estudada. A eficiência teórica total (N_T) que deveria ser obtida para o sistema desenvolvido é de $1,8 \times 10^6$ pratos m^{-1} . Este valor foi calculado com base no *plug* de 270 pL definido na intersecção dos canais. No entanto, a eficiência experimental, N_{exp} , obtida para o iodeto e para o ascorbato, a um potencial de 4,0 kV, foi de $1,0 \times 10^4$ pratos m^{-1} e $1,6 \times 10^4$ pratos m^{-1} , respectivamente. Estes valores representam 0,55 e 0,89 % da eficiência total. Estes valores são aparentemente baixos. No entanto, Gawron e colaboradores [76] realizaram uma avaliação similar para o estudo da eficiência. Usando um dispositivo fabricado em PDMS, com canais apresentando 25 μm de largura e 50 μm de profundidade, os autores obtiveram uma eficiência variando de $7,3 \times 10^4$ pratos m^{-1} para $9,1 \times 10^4$ pratos m^{-1} . Para o sistema proposto por Gawron e colaboradores o

valor de N_T seria de $2,8 \times 10^7$ pratos m^{-1} . No entanto, os valores de N_{exp} obtidos variaram de 0,26 a 0,32 %.

Apesar de nossos resultados serem ligeiramente superiores, efeitos relacionados a difusão e à alta rugosidade do toner, que define as paredes dos microcanais, são fatores contribuintes para a baixa eficiência obtida. Como as dimensões dos microcanais são dependentes da resolução da impressora Laser utilizada é possível melhorar estes valores com o decréscimo da largura dos microcanais, utilizando uma impressora com melhor resolução, o que diminuiria conseqüentemente o comprimento do *plug* de amostra.

4.6.2.8. Curva Analítica, Limites de Detecção e Repetibilidade

A Figuras 38 e 39 apresentam as curvas de calibração para o iodeto e para o ascorbato, respectivamente. Os valores de R refletem o problema relacionado à injeção eletrocinética nos microcanais. Os pontos das curvas foram determinados através da diluição serial da mistura dos analitos nas condições iniciais apresentadas na Figura 33. Cada ponto nas curvas é um valor médio de três medidas. Este problema já é uma preocupação de muitos grupos de pesquisa. O transporte eletrocinético das espécies apresenta algumas limitações, as quais resultam em injeções com baixa reprodutibilidade, em alguns casos. O problema está relacionado à tendência de amostragem (*BIAS*), uma vez que os analitos são transportados a diferentes velocidades devido às diferenças entre suas mobilidades [19].

Figura 38. Curva de calibração para o iodeto.

Figura 39. Curva de calibração para o ascorbato.

Para conseguir uma correlação linear, entre uma corrida eletroforética e outra, os microcanais foram lavados com solução tampão durante 10 minutos. Nas corridas em que esse procedimento não foi realizado, os resultados obtidos não foram coerentes com o que esperado. As características favoráveis com relação à relação sinal/ruído (S/R) permitiram a obtenção LD iguais a $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o iodeto e para o ascorbato, respectivamente. Considerando o valor teórico para o

plug como sendo de 270 pL, estes limites em massa representam 135 amol para o iodeto e 486 amol para o ascorbato. Os valores do LD foram determinados através de diluição em série até obter um eletroferograma com relação S/R igual a 3.

A alta sensibilidade e velocidade são acompanhadas de boa repetibilidade para os microdispositivos fabricados em poliéster-toner. Usando um dispositivo eletrônico para controlar a aplicação do potencial nos canais de injeção e separação, alternadamente, foi possível realizar múltiplas injeções em série de modo a observar, em tempo real, vários eletroferogramas em um único gráfico. A Figura 40 apresenta dez eletroferogramas obtidos seqüencialmente. É possível observar que no intervalo entre dois eletroferogramas há um sinal negativo e um sinal positivo, os quais estão indicados por setas no detalhe, ao lado da Figura 40.

Figura 40. Seqüência de dez eletroferogramas obtidos para a separação de (a) iodeto ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (b) ascorbato ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$) a partir do uso de um dispositivo eletrônico para controlar alternadamente a aplicação do potencial nas etapas de injeção e de separação. Potencial de injeção: 3,0 kV/5 s, potencial de separação: 3,0 kV, tampão de corrida: borato de sódio 10 mmol L^{-1} , pH 9,2, com $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAH. O ponto c no detalhe representa o tempo de injeção.

O dispositivo eletrônico utilizado representou um avanço no sentido de automatizar o processo, mas há ainda duas limitações. A primeira está relacionada ao potencial máximo que pode ser aplicado. O dispositivo não suporta valores de potencial superior a 4,0 kV. A segunda limitação é que não há uma divisão para os valores de potencial aplicados, ou seja, não há um controle que permita a aplicação de diferentes valores de potenciais. Desta maneira, o potencial usado na etapa de injeção foi igual ao potencial de separação, neste caso igual a 3,0 kV. A partir dessa limitação, foi possível obter uma boa sensibilidade usando um tempo de injeção igual a 5 s apenas.

A partir dos eletroferogramas obtidos sequencialmente, os tempos de migração para o iodeto e para o ascorbato foram $16,8 \pm 0,4$ e $39,2 \pm 0,3$ s, respectivamente ($n = 10$). Nestes experimentos foi observado um decréscimo na resposta em corrente de 12,6% para o iodeto e de 2,9% para o ascorbato.

4.6.3. Fluxo Eletroosmótico (EOF)

A magnitude do EOF foi medida através da injeção e detecção de catecol (CA) em valores de pH em que o composto se apresentava neutro. O CA é eletroquimicamente ativo em tampão fosfato e em eletrodo de ouro. Uma solução contendo 1 mmol L^{-1} de CA foi injetada sob 1,0 kV/10 s e detectada a 0,750 V. O tampão de corrida utilizado foi o fosfato de potássio 10 mmol L^{-1} , em pH 6, e o potencial de separação foi de 3,0 kV.

Medindo o tempo de migração do CA (211,2 s) e, dividindo comprimento efetivo do canal (5,1 cm) pelo tempo, pode-se calcular a velocidade eletroosmótica, a qual foi igual a $0,02415 \text{ cm s}^{-1}$. A mobilidade eletroosmótica ($4,83 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

foi obtida pela divisão da velocidade eletroosmótica pelo campo elétrico aplicado (500 V cm^{-1}) no canal de separação (comprimento total de 6 cm).

A mobilidade do CA foi avaliada na faixa de pH de 2 a 12 conforme visualizado na Figura 41. Em pHs 2 e 4 o CA foi determinado usando polaridade invertida porque em polaridade normal o analito não foi detectado. Esta inversão foi necessária porque houve, provavelmente, a formação de uma camada positiva na estrutura do canal devido a protonação do toner. Esta camada, conforme visualizado na Figura 41, é neutralizada em pH próximo a 5,5.

Figura 41. Efeito do pH na mobilidade do catecol.

Em pHs 6, 8 e 10 o CA foi determinado usando fluxo normal, ou seja, EOF catódico. O EOF nestes pHs pode ser resultado somente da dissociação da camada de sílica presente no filme de poliéster. Em pHs elevados, o poliéster pode ser hidrolisado formando grupos carboxilatos que resultam em um aumento da densidade de carga negativa na parede interna do canal. Para pH 12, foi observado um acentuado aumento na mobilidade do catecol/catecolato. A mobilidade

eletroforética do analito neste pH é aproximadamente 10 vezes maior do que o EOF e não pode ser determinado em polaridade normal. Após a inversão do potencial, o catecolato foi facilmente detectado, porém não foi possível medir o EOF.

O EOF calculado em pH 6,0 cujo valor foi igual a $4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, é aproximadamente 10 vezes menor do que o EOF em outros materiais como o vidro e o PDMS. No entanto, nenhum tipo de pré-condicionamento foi realizado nos microcanais antes dos experimentos. Em um trabalho colaborativo com o grupo do prof. Dr. Xinghua Xia (*Department of Chemistry, Nanjing University, Jiangsu, China*) que também resultou em um artigo submetido [92] ao periódico *Electrophoresis*, os microcanais foram lavados, na seqüência, com água deionizada, solução aquosa de etanol 50% (v/v), solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH e novamente com água deionizada por 2 minutos. Após o processo de lavagem, os canais foram recondicionados com solução de tampão fosfato 10 mmol L^{-1} . Usando o método proposto por Huang e colaboradores [31] o EOF foi determinado na faixa de pH de 3 a 10, cujos valores estão apresentados na Figura 42.

Figura 42. Relação entre o EOF e o pH. Condições: tampão fosfato 10 mmol L^{-1} ; potencial aplicado: $1,0 \text{ kV}$.

O processo de impressão direta, descrito pelo grupo do prof. Claudimir Lúcio do Lago [73], sugere que os dispositivos sejam preparados individualmente. No entanto, desde que o filme de transparência utilizado tenha um tamanho A4, vários dispositivos, dependendo de suas dimensões, podem ser impressos no mesmo filme e posteriormente separados. Este procedimento reduz o custo do processo de microfabricação, permitindo ainda uma prototipagem rápida.

O custo de fabricação de cada dispositivo pode ser estimado da seguinte maneira. O preço unitário do filme de poliéster custa aproximadamente R\$ 1,00 e o preço de um cartucho de toner custa aproximadamente R\$ 300,00. Com um cartucho de toner, no modo otimizado é possível realizar 5000 cópias de texto em papel tamanho A4, considerando que a impressão ocupe apenas 5% da área total. Para preparar dispositivos com dimensões de 5×3 cm este número é reduzido a 1000 cópias. O custo, apenas do toner, por transparência seria de R\$ 0,30. Assim o preço por filme de transparência impresso totaliza R\$ 1,30. Se em um filme forem produzidos 10 dispositivos, o custo por dispositivo resulta em R\$ 0,13. Para ter idéia do tempo de fabricação de um dispositivo, entre a preparação da configuração do dispositivo no *software* Corel Draw até a confecção dos reservatórios de PVC são necessários, no máximo, 60 minutos.

A potencialidade do uso de CDtrodos de Au em microdispositivos de poliéster-toner foi também apresentada neste capítulo. De acordo com os resultados apresentados pode-se concluir que a partir do momento em que uma impressora de melhor resolução (superior a 2000 *dpi*) for utilizada, canais e eletrodos com menores dimensões e melhor definição poderão ser obtidos.

PARTE II

MICRODISPOSITIVOS FABRICADOS

ATRAVÉS DE PROCESSOS

FOTOLITOGRÁFICOS

5. Microdispositivos fabricados através de processos fotolitográficos

Este segundo capítulo de resultados aborda toda a discussão envolvida em torno dos microdispositivos fabricados direta e indiretamente por processos fotolitográficos. Ao longo do capítulo, todo o detalhamento das etapas realizadas no LMF será abordado de modo a apresentar as microestruturas desenvolvidas e mostrar um pouco do que é possível fabricar usufruindo da infra-estrutura do LNLS.

5.1. Processo Fotolitográfico

O processo fotolitográfico, ao contrário do processo baseado na impressão direta, é um pouco mais complexo e requer um maior número de etapas. Além disso, diferentes substratos e fotorresistes com características completamente diferentes podem ser utilizados. Como descrito na seção 3.2, o processo fotolitográfico se resume na escolha e limpeza do substrato, recobrimento com uma camada de fotorresiste através de *spinning*, *pré-bake*, exposição à radiação UV, *pós-bake*, revelação e vedação dos microcanais obtidos. A Figura 43 apresenta um esquema das principais etapas requeridas no processo fotolitográfico.

A primeira etapa do processo é a escolha do substrato (I) a ser utilizado. Dentre os materiais descritos na literatura, o vidro, o silício e o quartzo são os mais utilizados. Neste trabalho foram utilizados três substratos: o vidro, a alumina e o silício. Após escolher o substrato, o mesmo deve ser limpo adequadamente de modo que uma boa aderência entre o substrato e o fotorresiste seja obtida. O fotorresiste negativo SU-8 foi utilizado na etapa de fotogração dos microdispositivos, mas outros fotorresistes também podem ser utilizados. O SU-8 foi espalhado sobre o substrato através do uso de um *spinner* (II).

Figura 43. Esquema com as principais etapas do processo fotolitográfico: (I) escolha e limpeza do substrato; (II) revestimento com fotoresiste e etapa de *pré-bake*; (III) posicionamento da máscara e exposição à radiação UV; (IV) revelação dos microcanais fotogravados e etapa de *pós - bake*; (V) etapa de corrosão e; (VI) etapa de vedação dos microcanais.

O SU-8 é um fotoresiste negativo, à base de resina epóxi, que absorve na região do ultravioleta próximo (350-400 nm) [93]. Este resiste tem sido muito utilizado no desenvolvimento de estruturas nano e microfabricadas por permitir alta razão de aspecto, boa aderência com diferentes materiais e boa estabilidade térmica. O SU-8 pode ser encontrado comercialmente sob diferentes formulações, referentes à viscosidade. A viscosidade do resiste é indicada após o termo SU8.

No processo desenvolvido foi utilizado o SU8-100 e a curva de calibração para o controle da espessura versus a velocidade do *spinner* está apresentada na Figura 44. Utilizando a velocidade de espalhamento de 3800 rpm durante 30 s, a espessura de SU-8 obtida foi igual a 50 μm . Após o revestimento com SU-8 foi realizada a etapa de *pré-bake*. Em seguida, a máscara foi posicionada adequadamente e a imagem foi transferida para o SU-8 através de exposição à radiação UV (III). O tempo de exposição foi de 40 s para todos os substratos e o tempo de revelação (IV) foi igual a 2 minutos. A etapa de vedação foi realizada com o uso de uma manta de silicone.

Figura 44. Curva da espessura do filme SU8-100 em função da velocidade de rotação do *Spinner* durante 30 s.

5.2. Fotorresistes

Os fotorresistes utilizados no processo fotolitográfico são classificados como negativos ou positivos e podem ser definidos como polímeros orgânicos de alta massa molecular. Quando um polímero orgânico é exposto à radiação eletromagnética, a energia absorvida induz à mudanças químicas no polímero que afetam as suas propriedades físicas e químicas. A absorção de energia pelo fotorresiste resulta em alterações de algumas interações específicas.

Existem dois tipos genéricos de interações. Um destes é a ligação cruzada do polímero, na qual cadeias adjacentes juntam-se para formar cadeias cruzadas e dar origem a uma estrutura tridimensional complexa, apresentando massa molecular média, maior do que a original. Se ocorrerem ligações cruzadas suficientes, o material irradiado não poderá ser dissolvido em solventes usados para remover o material não irradiado. Este processo constitui um dos métodos de transferência de padrões. As áreas irradiadas permanecem intactas após a revelação com o solvente, enquanto que as áreas não irradiadas são removidas com um solvente apropriado,

denominado de revelador. Tais materiais com ligações cruzadas são denominados *fotorresistes negativos*.

O outro processo está relacionado com a quebra das ligações químicas ou a cisão da cadeia. Assim, a massa molecular na área irradiada é menor que a massa original. Se ocorrerem suficientes quebras da estrutura, o material irradiado pode ser dissolvido em um solvente orgânico, o qual não remove as áreas não irradiadas. Os materiais que sofrem cisão na estrutura como, por exemplo, o PMMA, são denominados *fotorresistes positivos*.

Dessa maneira deve-se avaliar exatamente o que se deseja obter nos substratos, uma vez que a estrutura final depende da característica do fotorresiste, bem como da máscara a ser utilizada. Uma máscara de alta qualidade deve apresentar regiões bem escuras (para proteger a superfície da exposição à radiação) e regiões claras (para definir a área a ser exposta). A Figura 45 apresenta um exemplo da diferença entre o uso do fotorresiste positivo (A) e do fotorresiste negativo (B).

Figura 45. Diferenciação do uso de fotorresistes positivos (A) e negativos (B).

5.3. Avaliação de diferentes substratos

5.3.1. Alumina, Silício e Vidro

Nesta parte do trabalho, o procedimento ilustrado na Figura 43, com exceção da etapa de corrosão, foi utilizado para fotografar os primeiros microdispositivos usando três diferentes substratos: alumina, silício e vidro. A Figura 46 apresenta o esquema do primeiro dispositivo desenvolvido. O silício e o vidro são materiais freqüentemente utilizados para as mais diversas aplicações com sistemas miniaturizados. No entanto, a alumina foi um substrato a ser estudado, uma vez que seu uso quase não era relatado na literatura.

O dispositivo apresentado na Figura 46 apresenta área igual a 1 cm^2 e é composto basicamente de um canal de injeção com comprimento igual a 2 mm e um canal de separação, com uma geometria na forma de uma serpentina, com comprimento total de aproximadamente 4 cm. A largura destes canais é de $50\text{ }\mu\text{m}$ e os reservatórios, posicionados nas extremidades dos microcanais, apresentaram diâmetro de 2 mm.

Figura 46. Imagem digitalizada do primeiro dispositivo desenvolvido.

O perfil dos canais fotogravados em SU-8 está apresentado na Figura 47 para os substratos de silício (A) e de vidro (B). As imagens apresentadas na Figura 47 foram obtidas por MEV.

Figura 47. Perfil dos microcanais fotogravados em SU-8 usando o silício (A) e o vidro (B) como substratos.

Para efeitos comparativos, as superfícies das microestruturas fotogravadas nos três diferentes materiais foram analisadas por MEV, conforme pode ser visualizado nas Figuras 48, 49 e 50.

Figura 48. Imagens dos microdispositivos em três diferentes substratos: (A) alumina, (B) silício e, (C) vidro. Mag. 24 X.

Figura 49. Imagens dos reservatórios interligados pelos microcanais de injeção e separação. (A) alumina, (B) silício e, (C) vidro. Mag. 50 X.

Figura 50. Imagens das intersecções dos microcanais de injeção e separação. (A) alumina, (B) silício e, (C) vidro. Mag. 1500 X.

As estruturas fotogravadas sobre o silício e o vidro apresentaram bons resultados, os quais são muito bem explorados na literatura. Analisando comparativamente as imagens apresentadas é possível observar uma diferenciação para as estruturas usando a alumina como substrato. Para este substrato, a princípio, é possível acreditar que não houve a formação adequada dos microcanais. Fatores experimentais como velocidade e tempo de espalhamento do fotorresiste, tempo de exposição à radiação UV, temperatura de *pré-bake* e *pós-bake* e tempo de revelação foram os mesmos para os três substratos. A primeira hipótese levantada é de que um ou mais destes fatores poderiam estar interferindo nos resultados.

A velocidade e o tempo de *spinning* são fatores dependentes da viscosidade do fotorresiste, conforme já apresentado. As temperaturas de *pré-bake* e *pós-bake* também dependem do fotorresiste utilizado. Dessa maneira, estes fatores não influenciariam nos resultados apresentados. Com isso, o tempo de exposição à radiação UV e o tempo de revelação são dois fatores que poderiam ser os responsáveis pelas imperfeições visualizadas nas imagens. Para eliminar estas dúvidas, experimentos com diferentes tempos de exposição à radiação UV e também diferentes tempos de revelação foram realizados. No entanto, os resultados obtidos foram muito semelhantes, mostrando inclusive que as condições iniciais eram as mais adequadas.

De modo a entender o que, de fato, ocorreu para os experimentos usando a alumina, novas imagens foram obtidas por MEV da secção transversal. O corte da alumina foi realizado com uma ponteira de diamante, comumente utilizada para cortar vidros. Estas imagens estão apresentadas na Figura 51.

Figura 51. Imagens obtidas da secção transversal dos dispositivos fabricados com a alumina: (A) detalhe evidenciando o perfil curvado do fotorresiste na extremidade do reservatório; (B) detalhe comprovando que os canais não foram completamente formados.

Observando as imagens apresentadas, fica claro e evidente que a polimerização do SU-8 ocorreu onde não deveria. O perfil curvado apresentado na Figura 51A não era esperado uma vez que o resiste deveria comportar-se uniformemente. Além da obtenção de um perfil inesperado, os microcanais não foram completamente formados, cuja hipótese havia sido inicialmente questionada. A Figura 51B apresenta uma imagem na qual é possível visualizar a presença de SU-8 ao longo de todo o canal, confirmando a hipótese da formação incompleta dos canais.

Como nenhum dos fatores experimentais da etapa fotolitográfica foi encontrado como o responsável pelos resultados observados, a solução para o problema encontrado poderia ser dependente do material (alumina) ou da interação entre o resiste e o substrato. Foram realizados alguns experimentos usando o princípio da refletância difusa na região do UV/Vis, medindo a absorbância nos três materiais utilizados, cujos resultados estão apresentados na Figura 52.

Figura 52. Espectros de reflectância difusa na região do UV/Vis realizados para a alumina, o silício e para o vidro.

Pelos resultados apresentados no espectro, pode-se observar que a alumina apresenta uma alta absorção da radiação UV na região 300-400 nm, diferentemente dos outros materiais. No processo de fotogração, uma lâmpada de tungstênio é utilizada como fonte de radiação UV, a qual é emitida em um comprimento de onda de 365 nm. Obviamente, neste comprimento de onda fica evidente que a alumina absorve boa parte da radiação emitida. Além de absorver nesta região, a alumina apresenta um elevado índice de refração ($n = 2,00$), o que provoca a difração da energia absorvida ao longo do substrato.

De acordo com estas informações é possível concluir a energia absorvida pela alumina é dinamicamente refratada devido ao elevado índice de refração gerando guias de onda. Estas informações são coerentes com os resultados observados. Com a difração da luz na superfície da alumina, ocorre a polimerização indesejável do SU-8 em contato com a alumina em áreas protegidas da luz. O perfil curvado observado na extremidade do reservatório indica que as guias de onda são geradas até aquele ponto.

Estes resultados permitiram concluir que a alumina não é um material apropriado para ser usado diretamente como substrato na fabricação de microdispositivos. No entanto, este material foi utilizado na produção de diferentes moldes metálicos para prototipagem rápida usando materiais poliméricos.

O perfil da superfície do SU-8 polimerizado pelos efeitos explicados foi avaliado por AFM. A hipótese proposta foi comprovada com as imagens apresentadas nas Figuras 53 e 54, as quais permitem observar a presença do SU-8 em alto relevo, ao invés da obtenção do canal desejado. As imagens permitiram ainda medir a altura e a largura média do SU-8, que foram iguais a 890 nm e 48 μ m, respectivamente.

Figura 53. Perfil do SU-8 polimerizado inadequadamente sobre substrato de alumina.

Figura 54. Imagem em 3D da superfície do SU-8 dentro do canal de separação.

5.3.2. Poliuretana

Além do uso da alumina, do silício e do vidro como substratos alguns testes usando um material polimérico também foram realizados. O processo de fabricação da poliuretana (PU), a partir do óleo de mamona foi patenteado recentemente por pesquisadores do laboratório de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros do IQSC. Este novo material tem sido utilizado com muito sucesso nos mais diversos campos da ciência incluindo a odontologia e a medicina, além é claro, da Química.

A PU foi preparada em um recipiente plástico sendo posteriormente cortada em formato circular, junto à oficina mecânica do IQSC, apresentando diâmetro de 7,5 cm e espessura de 3 mm. Após o corte, as faces destes substratos foram polidas e a limpeza dos substratos foi realizada da mesma maneira como descrito no item 3.2.1.

A metodologia inicialmente adotada para uso da PU como substrato foi a mesma usada para os outros substratos. O SU-8 foi espalhado sobre o substrato através de *spinning* de 1000 rpm durante 30 s. Durante as etapas de *pré-bake* pôde-se observar que o SU-8 não teve aderência com a PU. Na Figura 55 está apresentada uma fotografia da superfície da PU após espalhamento do SU-8 e etapa de *pré-bake*. O problema de aderência poderia ser resolvido com a adição de um promotor de aderência. Uma camada de hexadimetilsiloxano (HDMS) foi espalhada sobre o substrato antes da formação da camada de SU-8, porém, o problema não foi solucionado. Outras propriedades seriam mais tarde observadas. Diante da inviabilidade do uso da PU para recobrimento com SU-8, a mesma foi recoberta com uma camada de Níquel através de processo eletrolítico.

Figura 55. Fotografia da superfície da poliuretana após espalhamento do fotorresiste. Imagem obtida em microscópio óptico com aumento de 1000 X.

A PU contendo uma camada de Ni foi revestida com uma camada de SU-8 e durante a etapa de *pré-bake* foi observado um problema (em apenas um dos substratos) relacionado a uma *fissura* do filme metálico. Isso ocorreu devido a um manuseio inadequado, ao trocar de uma chapa aquecedora (65 °C) para outra (95 °C). Em seguida foi realizada a etapa de fotogração usando a máscara similar àquela apresentada na Figura 12A.

A Figura 56 apresenta duas imagens dos canais fotogravados na PU recoberta com níquel. Teoricamente, o canal de injeção deveria apresentar largura de 100 μm e o canal de separação deveria ter largura de 50 μm . Com o uso do perfilômetro pôde-se observar que as dimensões dos canais apresentaram um pequeno erro. O canal de injeção apresentou largura igual a 95 μm e o canal de separação, largura de aproximadamente 56 μm . Este pequeno erro, 5%, pode ser considerado aceitável, levando-se em consideração que uma máscara impressa em fotolito foi utilizada e que a resolução da mesma não é a igual a uma máscara metálica.

Figura 56. Fotografias apresentando a formação dos micro-canais em substrato de poliuretano recoberto com níquel: (A) geometria do injetor na forma de duplo-T e (B) canal de separação com canal adicional para posicionamento do eletrodo de trabalho.

Durante os experimentos com a PU, várias propriedades foram observadas. Durante as etapas de *pré e pós-bake* nas quais são utilizadas temperaturas de 65 °C e 95 °C, respectivamente, observou-se uma deformação da PU que pode estar relacionada com suas propriedades mecânicas e termoelásticas. No entanto, verificou-se que problema estava relacionado com a temperatura de transição vítrea, cujo valor experimental³ é de aproximadamente 85 °C. Verificou-se também que ao colocar a PU na chapa de aquecimento suas bordas sofriam uma certa deformação, retornando ao estado normal quando retornada à temperatura ambiente.

Para efeito de curiosidade, uma amostra da PU foi colocada e mantida em uma chapa aquecedora a 95 °C por 30 horas. Nesse tempo, nada foi realizado com esta amostra. Ao fim das 30 h, a mesma apresentou uma leve perda da coloração, porém, sem alterações adicionais. Testes entre a PU e as soluções reveladora (acetato de n-butila) e removedora (n-metil-pirrolidona) foram realizados. Duas tiras (aproximadamente 2 cm de comprimento) foram cortadas e enquanto uma delas foi

³ Informação fornecida pelo pesquisador e técnico Salvador Claro Neto, do laboratório de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros do IQSC.

imersa em uma solução de acetato, a outra foi imersa numa solução de n-metil pirrolidona. Após 15 min, as mesmas foram retiradas e observadas. Ambas apresentaram-se mais macias com relação ao estado inicial. A tira que ficou na solução reveladora apresentou um certo caráter elástico. A outra tira apresentou um caráter mais aproximado de um material elastomérico.

De fato, estes dois testes mostraram que a PU não seria um bom material para uso no processo de fotolitografia convencional, pelo menos com esta metodologia. As duas tiras foram então lavadas com água, a temperatura ambiente. Ao lavar com água deionizada o caráter opaco, característico da PU, se tornou momentaneamente transparente. Ao mesmo tempo, a PU apresentou um certo aumento de imagem, parecido com uma lente de contato. Isto é comum para alguns tipos de polímeros, segundo pesquisadores do LMF. As mesmas tiras de PU, após a lavagem com água, foram colocadas na chapa aquecedora e a tira que permanecera anteriormente na solução reveladora não apresentou mais o caráter elástico, mas sim um caráter quebradiço.

Este material foi utilizado como substrato para litografia com raios-X no LNLS. Os resultados iniciais (os quais não serão apresentados) mostraram que houve uma marcação no substrato devido à radiação altamente energética. Além disso, nenhum problema com o material foi observado, como naqueles experimentos com fotolitografia convencional. Os resultados não serão apresentados porque há a necessidade de realizar mais testes para tirar melhores conclusões.

5.4. Produção de Moldes para Prototipagem Rápida

A produção de moldes metálicos possibilita a rápida fabricação de dispositivos poliméricos através do processo de moldagem. Os materiais poliméricos oferecem várias vantagens como baixo custo, elasticidade, biocompatibilidade e a exemplo dos dispositivos fabricados em poliéster-toner, podem ser utilizados para produção de dispositivos descartáveis e em larga escala. O processo de fabricação é rápido, quando comparado com os métodos fotolitográficos. Uma vez que o molde esteja pronto, o dispositivo pode ser preparado em um intervalo de 2 horas. Vários materiais podem ser utilizados no processo de moldagem como, por exemplo, o PDMS. A PU, apresentada no item anterior, também pode ser usada como material moldante.

O molde de Ni foi preparado de acordo com as etapas apresentadas na Figura 57. Uma placa de alumina de 3×3 polegadas foi utilizada como substrato (I). A alumina foi metalizada com Au (II) e em seguida foram realizadas as etapas de *spinning* (1000 rpm/30 s), *pré-bake* e exposição à radiação UV (40 s) (III). Após a etapa de revelação (IV), a placa de alumina com a imagem fotogravada no SU-8 foi imersa em uma solução eletrolítica contendo sulfato de níquel, cloreto de níquel, ácido bórico e alguns aditivos. A solução eletrolítica apresentou um pH variável de 3,8 a 4,5 e a temperatura de trabalho foi de 45 °C. Nesta solução foi aplicada uma densidade de corrente de 1 A cm^2 e o crescimento eletrolítico de Ni (etapa V) ocorreu a uma taxa de $1 \text{ } \mu\text{m min}^{-1}$. O crescimento de Ni foi monitorado com um amperímetro, um cronômetro e de um perfilômetro. A altura final do molde metálico foi igual a 45 μm , exatamente o mesmo valor da espessura do SU-8. O fotorresiste

foi removido (etapa VI) usando uma solução removedora (n-metil pirrolidona) finalizando o processo de fabricação do molde.

Figura 57. Etapas necessárias na tecnologia LIGA-UV. I, substrato; II, recobrimento com metal (geralmente Au); III, espalhamento do fotorresiste, posicionamento da máscara e exposição à radiação UV; IV, formação dos microcanais após etapa de revelação da imagem; V, crescimento de Ni a partir de processo eletrolítico; VI, remoção do fotorresiste com solvente orgânico; VII, moldagem com material polimérico (PDMS ou silicone-polisiloxano); VIII, desmoldagem; IX obtenção de microestruturas poliméricas e, X, vedação (com vidro ou PDMS).

Para obter os dispositivos poliméricos, o molde foi fixado na base de um suporte em acrílico, e uma solução do material polimérico foi adicionada sobre o molde (processo conhecido como *molding injection*). A solução polimérica é composta pelo polímero e um catalisador. A espessura do material polimérico pode ser controlada pela quantidade de solução adicionada. A etapa de desmoldagem foi realizada com muita simplicidade não requerendo nenhum aditivo desmoldante.

No presente trabalho, dois diferentes moldes foram fabricados pelo mesmo processo. A Figura 58 apresenta os esquemas dos moldes preparados. O molde A está sendo utilizado por nosso grupo para a produção de dispositivos em silicone pré-vulcanizado como material moldador. O material moldante é preparado pela mistura do catalisador (4% m/m) e o silicone. O molde B é parte de uma colaboração com o grupo de pesquisa do prof. Dr. Xinghua Xia (*Department of Chemistry, Nanjing University, Jiangsu, China*). O grupo chinês tem utilizado este molde para preparar dispositivos em PDMS. Estes dispositivos serão utilizados para separações eletroforéticas de neurotransmissores usando um sistema de detecção amperométrica recentemente proposto [94]. A geometria complexa apresentada no molde B tem sido projetada de acordo com simulações numéricas.

Figura 58. Esquema dos moldes metálicos fabricados. O molde A apresenta quatro estruturas em dimensões de 3×3 cm, com um canal de injeção (I), canal de separação (II) e um canal para posicionamento de um eletrodo de trabalho (III) para detecção eletroquímica. O molde B apresenta uma estrutura com geometria complexa.

O molde A apresenta quatro estruturas com dimensões de 3×3 cm. Estas estruturas apresentam um canal de injeção da amostra (I), um canal de separação (II) e um canal para posicionamento de um eletrodo de trabalho (III). A diferença entre estas estruturas está na geometria do canal de injeção. A estrutura (a) apresenta uma geometria na forma de cruz. No entanto, as demais estruturas apresentam uma geometria na forma de duplo-T, com intervalos de 50 (b), 100 (c) e 150 μm (d) entre os canais de injeção. Usando este molde é possível obter as quatro estruturas em uma única etapa, separando-as posteriormente. Todos os canais apresentaram largura de 50 μm . O molde B apresenta uma estrutura bastante complexa. A parte esquerda desta estrutura tem sido usada como um sistema de injeção e também como um reator.

A Figura 59 apresenta duas imagens MEV dos moldes preparados enfatizando a altura do depósito de Ni (A) e o canal para posicionamento do eletrodo (B). As imagens apresentadas foram obtidas para os moldes preparados a partir das máscaras apresentadas na Figura 58A.

Figura 59. Imagens obtidas a partir dos moldes preparados.

5.5. Microdispositivos poliméricos

A partir dos moldes fabricados, microdispositivos poliméricos foram obtidos usando o PDMS e a borracha de silicone como materiais moldantes. Uma vantagem do uso de materiais poliméricos é que os microcanais podem ser vedados usando o próprio polímero. Devido ao caráter elastomérico, o simples contato (interações de van der Waals) é suficiente para promover a vedação. A vedação pode ser reversível, se o contato foi efetuado após a cura do material, ou irreversível, se o contato for realizado antes da cura.

Os dispositivos produzidos em PDMS foram caracterizados, com relação aos efeitos eletroforéticos. Um gráfico de Ohm foi construído para estes dispositivos usando duas soluções tampão diferentes (Figura 60). Para construir o gráfico A, utilizou-se uma solução de tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 8,0) e para construir o gráfico B, utilizou-se uma solução de tampão acetato 20 mmol L⁻¹ (pH 5,0). Os pontos foram obtidos através da medida da corrente eletroforética sob diferentes valores de campo elétrico aplicados. Pode-se observar nos gráficos apresentados que há uma eficiente dissipação de calor para valores inferiores a 500 V cm⁻¹ (A) e até 700 V cm⁻¹ (B). A partir destes valores há um desvio resultante do aquecimento provocado pelo efeito Joule.

O EOF nos dispositivos em PDMS foi medido através do método de monitoramento da corrente [31]. Os valores obtidos para o EOF em tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 8,0) e em tampão acetato 20 mmol L⁻¹ (pH 5,0) foram $6,15 \times 10^{-4}$ (cm² s⁻¹ V⁻¹) e $4,24 \times 10^{-4}$ (cm² s⁻¹ V⁻¹), respectivamente.

Figura 60. Curvas de Ohm para dispositivos de PDMS usando tampão fosfato 20 mmol L⁻¹, pH 8,0 (A) e tampão acetato 20 mmol L⁻¹, pH 5,0 (B)

A geometria complexa apresentada no molde B (Figura 61) foi utilizada para produção de dispositivos em PDMS e para avaliar um novo sistema de injeção da amostra dentro dos microcanais. Para avaliar a nova geometria como um sistema de injeção, uma solução de fluoresceína, preparada em tampão fosfato, foi adicionada ao reservatório 1, enquanto os demais reservatórios foram preenchidos com solução de tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 7,4). Um potencial de 1,0 kV foi aplicado aos reservatórios 1, 2, 3, 4 e 5 mantendo o reservatório 6 aterrado. Duas imagens (Figura

62) usando uma câmera CCD fora obtidas, uma antes (Fig. 62A) e outra depois (Fig. 62B) da amostra atingir o ponto R. Na Figura 62B é possível concluir que o sistema de injeção *pinched* não foi eficiente, uma vez que houve uma dispersão do *plug* de amostra devido a grande distância (2 mm) entre os pontos R e C.

Figura 61. Esquema do dispositivo utilizado para avaliar a geometria complexa como um sistema de injeção.

Figura 62. Imagens de CCD obtidas com a nova geometria proposta.

Apesar dos resultados obtidos não serem satisfatórios, resultados de simulações numéricas mostram que o sistema de injeção pode funcionar com uma alteração na geometria, conforme apresentado na Figura 63. De acordo com a nova geometria e com as simulações numéricas realizadas (Figura 64), se o reservatório 1 for preenchido com amostra e os demais com solução tampão e considerando que o mesmo potencial elétrico seja aplicado aos reservatórios 1, 2, 3, 4 e 5, mantendo o reservatório 6 aterrado, a injeção poderá ser eficiente, resultando em um *plug* de amostra pequeno e bem definido, o que possibilitará a injeção *pinched* bastante controlável.

Figura 63. Configuração do dispositivo para simulação numérica.

Figura 64. Resultados da simulação numérica, sugerindo uma modificação na geometria apresentada na Figura 58B.

5.6. Fabricação de microeletrodos em substratos planares

A alta compatibilidade do sistema de detecção eletroquímico com técnicas fotolitográficas permite a fabricação de microeletrodos em substratos planares com ou sem a integração dos microcanais fluídicos. Os eletrodos são fabricados com a combinação de etapas de fotogravagem e deposição metálica. Entre a etapa de deposição metálica e uma nova etapa de fotogravagem, os eletrodos são obtidos pela técnica denominada *lift-off*, a qual é frequentemente usada para a delineação de padrões de metal com alta resolução.

A Figura 65 apresenta as etapas do processo de fabricação dos microeletrodos (A) e também a integração destes eletrodos com microcanais para eletroforese (B). Na fabricação dos eletrodos, inicialmente, o substrato deve ser revestido com uma camada de fotorresiste positivo (AZ 400 – Clariant, New York, EUA). A configuração dos eletrodos, contida em uma máscara negativa, foi transferida para o fotorresiste positivo (II) e, após a etapa de revelação (III) uma camada metálica foi

depositada através de diferentes processos como evaporação ou *sputtering* (IV). Ao remover o fotorresiste com acetona, eletrodos são facilmente obtidos (V) um vez que tenham aderido perfeitamente na superfície do substrato. A remoção da camada de fotorresiste e conseqüente obtenção dos eletrodos é denominada de *lift-off*.

Figura 65. Esquematização da técnica *lift-off* para obtenção de eletrodos microfabricados (A) e a integração destes eletrodos com microcanais eletroforéticos (B).

Existem duas dificuldades que podem ser encontradas na técnica *lift-off*. A primeira delas é evitar o aquecimento do substrato durante a deposição do metal. Se a temperatura aumenta ao redor da temperatura de transição vítrea do resiste, então o resiste vai fluir e arruinar o perfil radical ou subcortado necessário na técnica de *lift-off*. Uma maneira de reduzir este problema é começar com um material resiste positivo que já possua suas ligações cruzadas e por isso tem uma alta estabilidade ao

aumento da temperatura. Sob radiação, as ligações cruzadas são quebradas e o resiste é revelado em um bom solvente para o material sem ligação cruzada, conforme já descrito.

A outra dificuldade que pode ser encontrada com a técnica é o *lift-off* incompleto do material desejado, particularmente para padrões espessos do metal condutor. Além disso, pode ocorrer também uma fraca adesão do metal ao substrato, devido presença de resíduos orgânicos.

A técnica *lift-off* pode ser melhorada pelo uso de materiais poliméricos em multicamadas. Como consequência, são produzidos resistes subcortados com espessura relativamente elevada, o que facilita o processo de *lift-off*. O polímero inferior em um sistema de duas camadas deve ser um resiste com elevada sensibilidade à radiação. O padrão é formado no resiste da camada superior o que fornece um perfil muito favorável à técnica de *lift-off*. Nas regiões irradiadas a camada superior é apenas parcialmente exposta ao feixe incidente e assim, têm uma taxa de solubilidade maior que as regiões não expostas.

5.6.1. Fabricação de Eletrodos de Ouro

Os primeiros eletrodos foram fabricados em um substrato de vidro de 4×4 cm usando Au como material condutor. De acordo com as etapas descritas na Figura 65, a imagem da configuração dos eletrodos foi fotogravada no resiste positivo e após revelação, o Au foi evaporado sobre o substrato, obtendo uma espessura de 30 nm. Após evaporação, o resiste foi removido com acetona e os eletrodos de Au foram obtidos no substrato de vidro.

Após a obtenção dos microeletrodos pela técnica *lift-off*, outras etapas de *spinning* (VII), exposição à radiação UV (VIII), revelação (IX) e vedação dos microcanais (X) são realizados de modo a integrar os eletrodos aos microcanais eletroforéticos.

As máscaras usadas neste processo também foram preparadas em fotolito. Duas diferentes configurações de eletrodos foram fabricadas, cujas máscaras estão apresentadas na Figura 66 juntamente com o esquema dos microcanais eletroforéticos. A Figura 67 apresenta duas imagens, obtidas em microscópio óptico, para dispositivos desenvolvidos com as duas diferentes configurações de eletrodos. As dimensões dos eletrodos, assim como o espaçamento inter-eletrodos estão detalhadas nas imagens.

A configuração apresentada na Figura 67A pode ser utilizada para realizar detecção amperométrica numa configuração com apenas dois eletrodos (eletrodo de trabalho e eletrodo de pseudo-referência) ou também para uma dupla detecção amperométrica, utilizando os dois eletrodos como eletrodos de trabalho. Na outra configuração proposta, Fig. 67B, um arranjo com quatro eletrodos pode ser utilizado para detecção amperométrica numa configuração com três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência), sendo que o quarto eletrodo poderia ser utilizado como um desacoplador. A função de desacoplador é de fundamental importância para eliminar a interferência sofrida pelo eletrodo de trabalho devido ao alto campo elétrico aplicado na eletroforese [60, 61].

Figura 66. Máscaras utilizadas no processo de integração de diferentes configurações de eletrodos (a e b) com microcanais eletroforéticos (c).

Figura 67. Configuração com dois (A) e quatro (B) eletrodos de Au posicionados na saída do canal de separação.

5.6.2. Fabricação de Eletrodos de Ti/Pt

Após fabricar os microeletrodos de Au para DE e ver a potencialidade dessa técnica devido à alta compatibilidade, novos dispositivos foram fabricados, porém, tentando corrigir alguns problemas de aderência entre o fotorresiste e o substrato. Ao contrário do procedimento descrito na etapa 5.6.1., na qual eletrodos de Au para DE foram integrados aos microcanais eletroforéticos, nesta etapa realizou-se a integração de todos os eletrodos necessários para realizar experimentos de eletroforese com

detecção amperométrica. Em outras palavras, os eletrodos necessários para aplicação de potencial elétrico em todos os reservatórios (total de quatro) e também os eletrodos necessários para realizar a detecção amperométrica (dois ou três) foram integrados com microcanais eletroforéticos em um único substrato planar.

O procedimento experimental, descrito no item anterior, teve duas alterações. Na primeira, o substrato de vidro foi revestido com uma camada de HDMS, antes da etapa fotolitográfica, para promover uma melhor aderência com o fotorresiste positivo. Na segunda, ao invés de Au foram obtidos eletrodos de Ti/Pt por *sputtering*. A camada de Ti (20 nm) foi depositada para promover uma melhor aderência entre o substrato e a camada de Pt (180 nm). Dessa forma, uma camada com espessura total de 200 nm foi obtida. Estas peculiaridades evitaram problemas como quebra da camada de fotorresiste ou como a falta de contato elétrico, observados em alguns dos primeiros dispositivos.

Diferentes arranjos, relacionados ao posicionamento do eletrodo de trabalho e também com relação ao número de eletrodos (2 ou 3) para a célula eletroquímica foram desenvolvidos. Estes arranjos ainda necessitam de testes e não foi possível concluir essa etapa antes do término da dissertação. Estes estudos terão continuidade ao longo dos próximos meses, estudando as mais diferentes aplicações com amostras biológicas.

Os eletrodos para eletroforese foram projetados com largura de 200 μm . Com relação às dimensões dos eletrodos de detecção, o eletrodo de trabalho apresentou largura de 50 μm , o eletrodo de referência foi de 100 μm e o eletrodo auxiliar teve a mesma largura que os eletrodos para eletroforese, ou seja, 200 μm .

A Figura 68 apresenta algumas máscaras utilizadas e também algumas imagens obtidas em microscópio óptico para os dispositivos. A etapa de vedação dos

microcanais, nestes microdispositivos, foi realizada com uma manta de silicone, a qual apresenta um caráter altamente elastomérico. Para preencher os canais, inicialmente, um dos reservatórios foi preenchido com solução de tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , pH 7,0. Em seguida, foi realizado vácuo nos outros reservatórios durante 15 minutos. Após este tempo, todos os canais haviam sido preenchidos. Para comprovar se o canal estava, ou não preenchido, aplicou-se uma diferença de potencial entre os reservatórios e mediu-se a corrente eletroforética. A Figura 69 apresenta os valores da corrente eletroforética obtida nestes microdispositivos sob diferentes valores de potencial aplicado.

Figura 68. Máscaras utilizadas para a fabricação dos eletrodos de Ti/Pt (A) e consequente integração com os microcanais eletroforéticos (B). Imagem do dispositivo integrado (C) com seu respectivo detalhamento da geometria dos eletrodos de detecção: WE, eletrodo de trabalho; RE, eletrodo de referência; AE, eletrodo auxiliar (D).

Figura 69. Medida da corrente eletroforética nos microdispositivos integrados sob aplicação de diferentes potenciais.

Na Figura 69 é possível observar que a corrente medida entre os reservatórios 2 e 4 é um pouco superior às correntes medidas entre os outros reservatórios. Ao observar o esquema dos microcanais apresentado na Figura 68B, a explicação fica bastante simplificada. A distância entre os reservatórios 2 e 4, interligados pelo canal de separação, é a menor distância dentre os reservatórios em que se efetuou a medida da corrente eletroforética. Como a distância é menor, o campo elétrico apresenta um maior valor e conseqüentemente a corrente também será maior. Por outro lado, a corrente medida entre os reservatórios 1 e 4 e também entre os reservatórios 3 e 4 apresentam praticamente o mesmo valor devido ao fato da distância entre os referidos reservatórios serem idênticas.

Os resultados apresentados neste capítulo mostraram que é possível desenvolver microcanais em diferentes materiais, moldes metálicos para rápida prototipagem e integração de eletrodos planares através dos processos fotolitográficos disponíveis no Laboratório de Microfabricação do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Este laboratório começou a ser usado por nosso grupo em 2001, e no Projeto Musa do mesmo ano foi desenvolvido o primeiro protótipo do grupo de Cromatografia. Na época, o LMF trabalhava sob a seguinte filosofia: *você pensa, nós desenvolvemos e você testa*. A partir de 2002, a filosofia de trabalho do LMF mudou para: *você pensa, você desenvolve e você testa*. Essa alteração permitiu que o uso da infra-estrutura do LNLS ficasse muito mais dinâmico. Com isso, após um treinamento com técnicos especializados o próprio usuário estava apto a operar toda a instrumentação e todo o protocolo de microfabricação, bem como o desenvolvimento de novos processos e novas metodologias.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com o desenvolvimento do presente trabalho pode-se afirmar que os objetivos originais, relacionados ao desenvolvimento e avaliação de microdispositivos de separação, foram alcançados e uma grande diversidade de possibilidades foi criada para futuros estudos. As conclusões podem ser separadas de acordo com a generalidade dos casos.

👉 Processos de Microfabricação

- ✓ O desenvolvimento de microdispositivos por processos alternativos, como no caso da tecnologia brasileira, foi o processo que forneceu resultados mais surpreendentes, além do fato de serem inéditos. A química do toner despertou muita curiosidade a cada experimento e ao mesmo tempo gerava mais motivação, principalmente nas etapas de caracterização e aplicação do efeito de cinza.
- ✓ O estudo do fluxo eletrosmótico nos microcanais fabricados em poliéster-toner mostrou resultados interessantes, com uma magnitude de aproximadamente 10 vezes menor que os demais materiais já estudados como o vidro e o PDMS, e com certeza uma modificação química na estrutura do toner poderá fornecer resultados ainda mais surpreendentes.
- ✓ O estudo das dimensões apontou alguns fatores em que este novo processo possa ser ainda melhorado. Pelos resultados apresentados ficou claro, e evidente, que o uso de uma impressora com uma maior resolução tornará possível fabricar microcanais com largura inferior a 100 μm . Além de reduzir as dimensões, a deposição do toner ocorrerá de uma forma mais compacta, diminuindo a rugosidade da interface. Estes

aspectos permitirão obter microdispositivos com maior eficiência analítica, superiores aos parâmetros de outros dispositivos fabricados por diferentes processos. Um outro fator que poderá contribuir para a melhoria do processo de microfabricação é o uso de uma sala limpa para preparar os microcanais, evitando qualquer tipo de contaminação. Mas o custo de uma sala totalmente limpa é alto e praticamente inviável para as atuais condições do país.

✓ O uso de processos fotolitográficos ainda é o método mais utilizado para fabricar microdispositivos com excelente resolução e definição dos canais projetados. A avaliação dos diferentes substratos forneceu resultados muito interessantes com relação ao uso da alumina, necessitando recorrer às técnicas espectroscópicas para entender o que ocorreu. A alumina, embora não considerada como um bom substrato para o processo de microfabricação, foi utilizada para a construção de moldes metálicos, e não foi verificado nenhum problema. A poliuretana, outro material estudado, apresentou resultados interessantes e com certeza será explorado em novos estudos. Este material já está sendo estudado mais detalhadamente por nosso grupo com outros alunos.

✓ A prototipagem rápida é, assim como o processo de impressão direta, um processo alternativo para a produção de dispositivos de baixo custo quando comparados com os processos fotolitográficos. A produção de moldes a partir do crescimento eletrolítico de Ni se mostrou extremamente eficiente para a produção de dispositivos poliméricos através do processo de moldagem. Apesar de vários grupos explorarem este processo e principalmente o PDMS, a colaboração com o prof. Dr. Xinghua Xia mostrou que é possível realizar novos desenvolvimentos a partir deste processo.

Deteccão Eletroquímica

✓ O maior desafio deste trabalho foi a integração da detecção amperométrica aos microdispositivos. Os primeiros seis meses de desenvolvimento do trabalho foram dedicados aos testes usando os microdispositivos fabricados no Projeto Musa 2001 (1×1 cm), nos quais não foram obtidos resultados satisfatórios e nem foram apresentados nessa dissertação. Problemas relacionados à dificuldade em se trabalhar com pequenas dimensões, falta de automação, posicionamento manual de microeletrodos com d.i. de 10, 20 μ m e também falta de experiência com processos eletroanalíticos atrapalharam o andamento até então.

✓ O problema do posicionamento manual dos eletrodos foi resolvido com a fabricação e integração dos eletrodos planares juntamente com os microcanais através de processos fotolitográficos. Dessa maneira, tornou-se possível obter um perfeito posicionamento dos eletrodos em regiões pré-determinadas. Além da integração dos eletrodos para detecção eletroquímica, a alta compatibilidade com técnicas fotolitográficas tornou possível a integração dos eletrodos necessários para a eletroforese. A integração dos eletrodos e dos microcanais em um único substrato foi a primeira etapa realizada no sentido de se construir um completo *lab-on-a-chip*, o que será possível num futuro próximo.

✓ O autor acredita que a maior contribuição deste trabalho foi a viabilização da detecção amperométrica aos microdispositivos fabricados em poliéster-toner. No sistema proposto, tudo foi novidade. O suporte foi projetado de modo a facilitar uma rápida troca tanto dos eletrodos quanto das microestruturas. A utilização de eletrodos fabricados a partir do CD se mostrou bastante atrativa economicamente, da mesma maneira que as microestruturas. Para efeito de valores, conforme apresentado o custo

do microdispositivo fabricado em poliéster-toner é de aproximadamente R\$ 0,13. Usando um CD é possível fabricar mais do que 50 eletrodos. Se o custo do CD for igual a R\$ 5,00, o valor por eletrodo é de aproximadamente R\$ 0,10. Certamente não há nenhum outro processo com custo da mesma ordem. Além do custo, o tempo de fabricação é bastante curto. A exemplo dos microdispositivos, os eletrodos podem ser fabricados em um intervalo de 1 hora.

✓ O uso de sistemas miniaturizados já é uma realidade nos mais diversos grupos de pesquisa de todo o mundo. No Brasil, há dois grupos trabalhando efetivamente com o desenvolvimento de microdispositivos analíticos. Além de seguir atuando na área, o autor espera contribuir no seu projeto de doutorado para ajudar a divulgar e atrair mais pesquisadores para esta área.

✓ A nova tecnologia adotada será utilizada para estudar algumas aplicações de interesse biológico. Dois projetos estarão sendo desenvolvidos a partir dos próximos meses. O primeiro será a utilização de microdispositivos eletroforéticos para estudar alguns neurotransmissores. O segundo estará relacionado com o desenvolvimento de um microdispositivo, com eletrodos integrados, para estudar interações biomoleculares em tempo real, usando um princípio similar à técnica de ressonância plasmônica de superfície. Além destes projetos, que resultarão em duas teses de doutorado, há um grande interesse em desenvolver microdispositivos em poliéster-toner com eletrodos poliméricos integrados. Este será um dos objetivos secundários que serão trabalhados paralelamente nos próximos anos.

---

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- [1] MADOU, M. J. **Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization**. 2. ed. Boca Raton, CRC Press, 2002. 589 p.
- [2] EHRFELD, W. Electrochemistry and Microsystems. **Electroch. Acta**, v.20, p.2857-2868, 2003.
- [3] MANZ, A.; EIJKEL, J.C.T. Miniaturization and chip technology. What can we expect? **Pure Appl. Chem**, v.73, p.1555-1561, 2001.
- [4] WOOLEY, A.T.; LAO, K.; GLAZER, A.N.; MATHIES, R.A. Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection. **Anal. Chem.**, v.70, p.684-688, 1998.
- [5] REYES, D.R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P.; MANZ, A. A Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, theory, and technology. **Anal. Chem.**, v.74, p.2623-2636, 2002.
- [6] MANZ, A.; MIYAHARA, Y.; MIURA, J.; WATANABE, Y.; MIYAGI, H.; SATO, K. Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology. **Sens. Actuators B**, v.1, p.249-255, 1990
- [7] MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H.M. Miniaturized total chemical-analysis systems - a novel concept for chemical sensing. **Sens. Actuators B**, v.1, p.244-248, 1990.
- [8] GULLIKSEN, A.; SOLLI, L.; KARLSEN, F.; ROGNE, H.; HOVIG, E.; NORDSTROM, T. SIREVÁG, R. Real-time nucleic acid sequence-based amplification in nanoliter volumes. **Anal. Chem**, v.76, p.9-14, 2003.
- [9] **LAB-ON-A-CHIP: The Revolution in portable instrumentation**. New York, John Wiley, 2001. p.7-135.
- [10] MARTIN, K.; HENKEL, T.; BAIER, V.; GRODIAN, A.; SCHON, T.; ROTH, M.; KOHLER, J.M.; METZE, J. Generation of larger numbers of separated microbial populations by cultivation in segmented-flow microdevices. **Lab Chip**, v.3, p.202-207, 2003.
- [11] TAYLOR, A.M.; RHEE, S.W.; TU, C.H.; CRIBBS, D.H.; COTMAN, C.W.; JEON, N.L. Microfluidic multicompartiment device for neuroscience research. **Langmuir**, v.19, p.1551-1556, 2003.
- [12] LI, P.H.; WANG, W.J.; PARAMESWARAN, M. An acoustic wave sensor incorporated with a microfluidic chip for analyzing muscle cell contraction. **Analyst**, v.128, p. 225-231, 2003.

-
- [13] CHRISTODOULIDES, N.; TRAN, M.; FLORIANO, P.N.; RODRIGUEZ, M.; GOODEY, A.; ALI, M.; NEIKIRK, D.; McDEVITT, J.T. A microchip-based multianalyte assay system for the assessment of cardiac risk. **Anal. Chem.**, v.74, p.3030-3036, 2002.
- [14] OHIRA, S.I.; TODA, K.; IKEBE, S.I.; DASGUPTA, P.K. Hybrid microfabricated device for field measurement of atmospheric sulfur dioxide. **Anal. Chem.**, v.74, p. 5890-5896, 2002.
- [15] BROMBERG, A.; MATHIES, R.A. Homogeneous immunoassay for detection of TNT and its analogues on a microfabricated capillary electrophoresis chip. **Anal. Chem.**, v.75, p.1188-1195, 2003.
- [16] JIANG, X.Y.; Ng, J.M.K.; STROOCK, A.D.; DERTINGER, S.K.W.; WHITESIDES, G.M. A miniaturized, parallel, serially diluted immunoassay for analyzing multiple antigens. **J. Am. Chem. Soc.**, v.125, p. 5294-5295, 2003.
- [17] SATO, K.; YAMANAKA, M.; TAKAHASHI, H.; TOKESHI, M.; KIMURA, H.; KITAMORI, T. Microchip-based immunoassay system with branching multichannels for simultaneous determination of interferon- γ . **Electrophoresis**, v.23, p. 734-739, 2002.
- [18] JIN, L.J.; FERRANCE, J.; SANDERS, J.C.; LANDERS, J.P. A microchip-based proteolytic digestion system driven by electroosmotic pumping. **Lab Chip**, v.3, p. 11-18, 2003.
- [19] SLENTZ, B.E.; PENNER, N.A.; REGNIER, F.E. Sampling BIAS at channel junctions in gated flow injection on chips. **Anal. Chem.**, v.74, p.4835-4840, 2002.
- [20] SANDERS, J.C.; BREADMORE, M.C.; KWOK, Y.C.; HORSMAN, K.M.; LANDERS, J.P. Hydroxypropyl cellulose as an adsorptive coating sieving matrix for DNA separations: Artificial neural network optimization for microchip analysis. **Anal. Chem.**, v.75, p. 986-994, 2003.
- [21] TIAN, H.J.; LANDERS, J.P. Hydroxyethylcellulose as an effective polymer network for DNA analysis in uncoated glass microchips: optimization and application to mutation detection via heteroduplex analysis. **Anal. Biochem.**, v.309, p.212-223, 2002.
- [22] SUN, K.; YAMAGUCHI, A.; ISHIDA, Y.; MATSUO, S.; MISAWA, H. A Heater-integrated transparent microchannel chip for continuous-flow PCR. **Sens. Actuators, B**, v.84, p.283-289, 2002.
- [23] LIU, S. A microfabricated hybrid device for DNA sequencing. **Electrophoresis**, v.24, p.3755-3761, 2003.

-
- [24] SHI, Y.N.; ANDERSON, R.C. High-resolution single-stranded DNA analysis on 4.5 cm plastic electrophoretic microchannels. **Electrophoresis**, v.24, p.3371-3377, 2003.
- [25] BLAZEJ, R.G.; PAEGEL, B.M.; MATHIES, R.A. Polymorphism ratio sequencing: A new approach for single nucleotide polymorphism discovery and genotyping. **Genome Res.**, v.13, p.287-293, 2003.
- [26] AUROUX, P.; IOSSIFIDIS, D.; REYES, D.R.; MANZ, A. A Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical standard operations and applications. **Anal. Chem.**, v.74, p.2637-2652, 2002.
- [27] BILITEWSKI, U.; GENRICH, M.; KADOW, S.; MERSAL, G. Biochemical analysis with microfluidic devices. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.377, p.556-569, 2003.
- [28] ERMAKOV, S.Y.; JACOBSON, S.C.; RAMSEY, J.M. Computer simulations of electrokinetic injection techniques in microfluidic devices. **Anal. Chem.**, v.72, p.3512-3517, 2000.
- [29] TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos básicos. **Quím. Nova**, v.19, n.2, p.173-181, 1996.
- [30] BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. New York, John Wiley, 1995. 244 p.
- [31] HUANG, X.; GORDON, M.J.; ZARE, R.N. Current-monitoring method for measuring the electroosmotic flow rate in capillary zone electrophoresis. **Anal. Chem.**, v.60, p. 1837-1838, 1988.
- [32] VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro Total Analysis Systems. Recent Developments. **Anal. Chem.**, v.76, p.3373-3386, 2004.
- [33] MANZ, A.; HARRISON, D.J.; VERPOORTE, E.; FETTINGER, J.C.; PAULUS, A.; LUDI, H.; WIDMER, H.M. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems - capillary electrophoresis on a chip. **J. Chromatogr.**, v.593, p.253-258, 1992.
- [34] HARRISON, D.J.; MANZ, A.; FAN, Z.H.; LUDI, H.; WIDMER, H.M. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. **Anal. Chem.**, v.64, p.1926-1932, 1992.
- [35] EFENHAUSER, C.S.; MANZ, A.; WIDMER, H.M. Glass chips for high-speed capillary electrophoresis separations with submicrometer plate heights. **Anal. Chem.**, v.65, p. 2637-2642, 1993.
- [36] HARRISON, D.J.; FLURI, K.; SEILER, K.; FAN, Z.H.; EFENHAUSER, C.S.; MANZ, A. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical-analysis system on a chip. **Science**, v.261, p. 895-897, 1993.

- [37] HARRISON, D.J.; FAN, Z.H.; SEILER, K.; MANZ, A. ; WIDMER, H.M. Rapid separation of fluorescein derivatives using a micromachined capillary electrophoresis system. **Anal. Chim. Acta**, v.283, p.361-366, 1993.
- [38] HARRISON, D.J.; GLAVINA, P.G.; MANZ, A. Towards miniaturized electrophoresis and chemical-analysis systems on silicon - an alternative to chemical sensors. **Sens. Actuators B**, v.10, p.107-116, 1993.
- [39] SEILER, K.; HARRISON, D.J.; MANZ, A. Planar glass chips for capillary electrophoresis - repetitive sample injection, quantitation, and separation efficiency. **Anal. Chem.**, v.65, p.1481-1488, 1993.
- [40] ERMAKOV, S.V.; JACOBSON, S.C.; RAMSEY, J.M. Computer simulations of electrokinetic injection techniques in microfluidic devices. **Anal. Chem.**, v.72, p.3512-3517, 2000.
- [41] CHEN, G.; WANG, J. Fast and Simple Sample Introduction for capillary electrophoresis Microsystems. **Analyst**, v.129, p.507-511, 2004.
- [42] FANG, Q. Sample Introduction for Microfluidic Systems. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.378, p.49-51, 2004.
- [43] BACKOFEN, U.; MATYSIK, F.-M.; LUNTE, C.E. A chip-based electrophoresis system with electrochemical detection and hydrodynamic injection. **Anal. Chem.**, v.74, p.4054-4059, 2002.
- [44] SOLIGNAC, D.; GIJS, M.A.M. Pressure Pulse Injection : a powerful alternative to electrokinetic sample loading in electrophoresis microchips. **Anal. Chem.**, v.75, p.1652-1657, 2003.
- [45] MARTIN, R.S.; GAWRON, A.J.; LUNTE, S.M.; HENRY, C.S. Dual-electrode electrochemical detection for poly(dimethylsiloxane)-fabricated capillary electrophoresis microchips. **Anal. Chem.**, v.72, p.3196-3202, 2000.
- [46] ALARIE, J.P.; JACOBSON, J.C.; RAMSEY, J.M. Electrophoretic Injection bias in a microchip valving scheme. **Electrophoresis**, v.22, p.312-317, 2001.
- [47] JACOBSON, S.C.; RAMSEY, J.M. Microchip electrophoresis with sample stacking. **Electrophoresis**, v.16, p.481-486, 1995.
- [48] WANG, J. Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review. **Talanta**, v.56, p.223-231, 2002.
- [49] SCHWARZ, M.A.; HAUSER, P.C. Recent developments in detection methods for microfabricated analytical devices. **Lab Chip**, v.1, p.1-6, 2001.
- [50] SEILER, K.; HARRISON, D.J.; MANZ, A. Planar glass chips for capillary electrophoresis : repetitive sample injection, quantitation, and separation efficiency. **Anal. Chem.**, v.65, p.1481-1488, 1993.

-
- [51] RAMSEY, R.S.; RAMSEY, J.M. Generating electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping. **Anal. Chem.**, v.69, p.1174-1178, 1997.
- [52] BINGS, N.H.; WANG, SKINNER, C.D; COLYER, C.L.; THIBAUT, P.; HARRISON, D.J. Microfluidic devices connected to fused-silica capillaries with minimal dead volume. **Anal. Chem.**, v.71, p.3292-3296, 1999.
- [53] LACHER, N.A.; GARRISON, K.E.; MARTIN, R.S.; LUNTE, S.M. Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry. **Electrophoresis**, v.22, p. 2526-2536, 2001.
- [54] VANDAVEER IV, W.R.; PASAS, S.A.; MARTIN, R.S.; LUNTE, S.M. Recent developments in amperometric detection for microchip capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.23, p.3667-3677, 2002.
- [55] GALLOAWAY, M.; STRYJEWSKI, W.; HENRY, A.; FORD, S.M.; LLOPIS, S.; McARLEY, R.L.; SOPER, S.A. Contact conductivity detection in poly(methylmethacrylate)-based microfluidic devices for analysis of mono- and polyanionic molecules. **Anal. Chem.**, v.74, p.2407-2415, 2002.
- [56] TANYANJIWA, J.; LEAUTHARDT, S.; HAUSER, P.C. Conductimetric and potentiometric detection in conventional and microchip capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.23, p.3659-3666, 2002.
- [57] HOLLER, F.J.; ENKE, C.G.; KISSINGER, P.T.; HEINEMAN, W.R. **Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry**. 2.ed. New York, Marcel Dekker, 1996. p.237-265.
- [58] KAPPES, T.; HAUSER, P.C. Simplified amperometric detector for capillary electrophoresis. **Analyst**, v.124, p.1035-1039, 1999.
- [59] WOOLLEY, A.T.; LAO, K.; GLAZER, A.N.; MATHIES, R.A. Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection. **Anal. Chem.**, v.70, p.684-688, 1998.
- [60] LAI, C.-J.; CHEN, C.-C. ; KO, F.-H. In-channel dual-electrode amperometric detection in electrophoretic chips with a palladium film decoupler. **J. Chromatogr. A**, v.1023, p.143-150, 2004.
- [61] CHEN, D.-C.; HSU, F.-L.; ZAN, D.-Z.; CHEN, C.-H. Palladium Film Decoupler for Amperometric Detection in Electrophoresis Chips. **Anal. Chem.**, v.73, p. 758-762, 2001.
- [62] WANG, J.; CHEN, G. Microchip capillary electrophoresis with electrochemical detector for fast measurements of aromatic amino acids. **Talanta**, v.60, p.1239-1244, 2003.

- [63] MARTIN, R.S.; GAWRON, A.J.; FOGARTY, B.A.; REGAN, F.B.; DEMPSEY, E.; LUNTE, S.M. Carbon paste-based electrochemical detectors for microchip capillary electrophoresis/electrochemistry. **Analyst**, v.126, p.277-280, 2001.
- [64] WANG, J.; CHEN, G.; CHATRATHI, M.P.; MUSAMEH, M. Capillary electrophoresis microchip with a carbon nanotube-modified electrochemical detector. **Anal. Chem.**, v.76, p.298-302, 2004.
- [65] GARCIA, C.D.; HENRY, C.S. Direct Determination of carbohydrates, amino acids, and antibiotics by microchip electrophoresis with pulsed amperometric detection. **Anal. Chem.**, v.75, p.4778-4783, 2003.
- [66] KEYNTON, R.S.; ROUSSEL, T.J.; CRAIN, M.M.; JACKSON, D.J.; FRANCO, D.B.; NABER, J.F.; WALSH, K.M.; BALDWIN, R.P. Design and development of microfabricated capillary electrophoresis devices with electrochemical detection. **Anal. Chim. Acta.**, v.507, p.95-105, 2004.
- [67] LEE, H.-L.; CHEN, S.-C. Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for several carbohydrates. **Talanta**, v.64, p.210-216, 2004.
- [68] GAVIN, P.F.; EWING, A.G. Characterization of electrochemical array detection for continuous channel electrophoretic separations in micrometer and submicrometer channels. **Anal. Chem.**, v.69, p.3838-3845, 1997.
- [69] WANG, J.; TIAN, B.; SAHLIN, E. Integrated electrophoresis chips/amperometric detection with sputtered gold working electrodes. **Anal. Chem.**, v.71, p. 3901-3904, 1999.
- [70] HILMI, A.; LUONG, J.H.T. Electrochemical detectors prepared by electroless deposition for microfabricated electrophoresis chips. **Anal. Chem.**, v.72, p.4677-4682, 2000.
- [71] LIU, Y.; VICKERS, J.A.; HENRY, C.S. Simple and sensitive electrode design for microchip electrophoresis/electrochemistry. **Anal. Chem.**, v.76, p.1513-1517. 2004.
- [72] ANGNES, L.; RICHTER, E.M.; AUGELLI, M.A.; KUME, G.H. Gold electrodes from recordable CDs. **Anal. Chem.**, v.72, p.5503-5506, 2000.
- [73] LAGO, C.L.; SILVA, H.D.T.; NEVES, C.A.; BRITO-NETO, J.G.A.; SILVA, J.A.F. A dry process for production devices base don the lamination of laser-printed polyester films. **Anal. Chem.**, v.75, p. 3853-3858, 2003.
- [74] DANIEL, D.; GUTZ, I.G.R. Quick production of gold electrode sets or arrays and of microfluidic flow cells based on heat transfer of laser printed toner masks onto compact discs. **Electrochim. Comm.**, v.5, p.782-786, 2003.

- [75] RICHTER, E.M.; SILVA, J.A.F.; LAGO, C.L.; ANGNES, L. Disposable Twin Gold Electrodes for Amperometric Detection in Capillary Electrophoresis. **Electrophoresis**, v.25, p.2965-2969, 2004.
- [76] GAWRON, A.J.; MARTIN, R.S.; LUNTE, S.M. Fabrication and evaluation of a carbon-based dual-electrode detector for poly(dimethylsiloxane) electrophoresis chips. **Electrophoresis**, v.22, p.242-248, 2001
- [77] SCHWARZ, M.A.; GALLIKER, B.; FLURI, K.; KAPPES, T.; HAUSER, P.C. A two-electrode configuration for simplified amperometric detection in a microfabricated electrophoretic separation device. **Analyst**, v.126, p.147-151, 2001.
- [78] CHEN, Y.; PÉPIN, A. Nanofabrication: Conventional and nonconventional methods. **Electrophoresis**, v.22, p. 187-207, 2002.
- [79] WANG, H.Y.; FOOTE, R.S.; JACOBSON, S.C.; SCHNEIBEL, J.H.; RAMSEY, J.M. Low temperature bonding for microfabrication of chemical analysis devices. **Sens. Actuators B**, v.45, p.199-207, 1997.
- [80] MCDONALD, J.C.; WHITESIDES, G.M. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. **Acc. Chem. Res.**, v.35, p.491-499, 2002.
- [81] DUFFY, D.C.; MCDONALD, J.C.; SCHUELLER, O.J.A.; WHITESIDES, G.M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Anal. Chem.**, v.70, p.4974-4984, 1998.
- [82] SIA, S.; WHITESIDES, G.M. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. **Electrophoresis**, v.24, p.3563-3576, 2003.
- [83] BECKER, H.; LOCASCIO, L.E. Polymer microfluidic devices. **Talanta**, v.56, p.267-287, 2002.
- [84] DOLNIK, V.; LIU, S.; JOVANOVIĆ, S. Capillary electrophoresis on microchip. **Electrophoresis**, v.21, p.41-54, 2000.
- [85] CHEN, Z.; GAO, Y.; SU, R.; LI, C. ; LIN, J. Fabrication and characterization of poly(methylmethacrylate) microchannels by *in situ* polymerization with a novel metal template. **Electrophoresis**, v.24, p.3246-3252, 2003.
- [86] SILVA, Heron Dominguez Torres. **Fabricação de microcanais por moldagem em poliéster a partir de matriz de silício e pela utilização de toner como resiste para corrosão de vidro**. São Paulo, 2001. 93p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

-
- [87] SILVA, José Alberto Fracassi da. **Deteccção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocinética**. São Paulo, 2001. 178p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- [88] CAMARA, Carlos Alberto Paulinetti da. **Desenvolvimento de instrumentação eletroquímica para aplicação em fluxo com ultramicroeletrodos**. São Carlos, 1999. 163p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- [89] COLTRO, W.K.T.; SILVA, J.A.F.; SILVA, H.D.T.; RICHTER, E.M.; FURLAN, R.; ANGNES, L.; LAGO, C.L.; MAZO, L.H.; CARRILHO, E. Electrophoresis microchip fabricated by direct-printing process with end-channel amperometric detection. **Electrophoresis**, v.25, p.3832-3839, 2004.
- [90] SILVA, J.A.F.; LAGO, C.L. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. **Anal. Chem.**, v.70, p.4339-4343, 1998.
- [91] TABYANYIWA, J.; ABAD-VILLAR, E.M.; HAUSER, P.C. Contactless conductivity detection of selected organic ions in on-chip electrophoresis. **Electrophoresis**, v.25, p.903-908, 2004.
- [92] HE, F.; LIU, A.; YUAN, J.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E.; XIA, X. Electrokinetic control of fluid in plastified printed poly(ethylene-terephthalate)-toner microchip. **Electrophoresis**, 2004. /Submetido/.
- [93] FENG, R.; FARRIS, R.J. The characterization of thermal and elastic constants for an epoxy photoresist SU8 coating. **J. Mat. Sci.**, v.37, p.4793-4799, 2002.
- [94] BAO, N.; XU, J.-J.; DOU, Y.-H.; CAI, Y.; CHEN, H.-Y.; XIA, X.-H. Electrochemical detector for microchip electrophoresis of poly(dimethylsiloxane) with a three-dimensional adjustor. **J. Chromatogr.A**, v.1041, p.245-248, 2004.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.