WENDELL KARLOS TOMAZELLI COLTRO

**Detecção condutométrica sem contato: uma nova ferramenta para
monitoramento de interações biomoleculares em microssistemas analíticos**

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

Área de Concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2008

Dedico esse trabalho

A Deus, pela existência.

*Aos meus pais, Lucimar Tomazelli Coltro e Antonio Carlos Coltro,
por todo o apoio nessa longa e difícil trajetória e, primordialmente,
pelos esforços imensuráveis em proporcionar-me oportunidades que
não tiveram chances de ter.*

*Aos meus irmãos Diego, Willyann e Jennifer pelo amor, apoio e
compreensão ao longo dessa batalha.*

*À Maria Luiza, minha sobrinha e afilhada, que mesmo chegando na
reta final desta jornada transmitiu uma energia adicional com seu
lindo sorriso.*

*À minha tia Waldirene e minha vó Luiza pelos incentivos e
ensinamentos.*

*Ao meu avô Waldomiro Coltro (In memorian),
por todos os ensinamentos e conselhos inigualáveis e inesquecíveis!*

Agradecimentos

Nessas primeiras páginas, eu gostaria de tornar público todo o meu reconhecimento por aquelas pessoas que contribuíram direta e/ou indiretamente para minha formação acadêmica. Se, por acaso, tiver esquecido de alguém, me desculpem. Minha memória sempre falha.

✓ Por razões óbvias, a primeira pessoa a receber meus sinceros agradecimentos é você chefe, professor Emanuel Carrilho. Obrigado pela orientação, pela amizade, pela discussão freqüente de idéias novas, pelos conselhos (profissionais e pessoais), pelos exemplos de profissionalismo e simplicidade, pelos ensinamentos a respeito de liderança e gerenciamento e, principalmente, pela confiança no meu trabalho. Quem diria que aquela idéia esboçada em um guardanapo de papel, na cantina do Pão de Queijo durante um almoço em janeiro de 2004, traria tantos frutos ao longo destes anos. Com a idéia inicial rabiscada naquele guardanapo, buscamos as soluções misturando curiosidade científica com criatividade. Foi graças à sua orientação que tive o prazer de conhecer o Prof. Dr. José A. Fracassi da Silva e a Profa. Dra. Susan M. Lunte, duas pessoas que foram muito importantes na minha formação. Tenha certeza que serei eternamente grato pela sua orientação. Obrigado por todas as oportunidades oferecidas ao longo desta jornada.

✓ Ao Alberto (Joseph, Zé, Albert, Betão ou Fracassi) pela co-orientação, por todos os ensinamentos e pela grande amizade construída ao longo desses anos. Sem dúvidas, você teve uma participação efetiva em todos os estágios deste trabalho e, conseqüentemente, na minha formação. A admiração pelo seu dinamismo e profissionalismo sempre me incentivou a buscar algo diferencial no meu trabalho. Obrigado por ensinar-me a contornar as situações mais complicadas com a maior simplicidade possível.

✓ À Susan M. Lunte pela excelente recepção em seu grupo durante 5 meses para a realização do estágio de doutorado na Universidade do Kansas. A estadia em Kansas foi maravilhosa, mesmo naqueles dias com temperaturas abaixo de -10 °C. Com sua orientação, pude aprender aspectos fundamentais em microfluídica e também conviver com pesquisadores de países diferentes como: Estados Unidos, Japão, Índia, Espanha e Irlanda. Você foi mais que uma chefe, uma mãe. *Thanks Sue!*

- ✓ Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, pelo espaço concedido no grupo de Cromatografia para montarmos uma sala de microfabricação e instrumentação, e também por representar o Emanuel na defesa desta tese.
- ✓ Ao Prof. Dr. Claudimir Lúcio do Lago, por fornecer as placas com o circuito do detector usado neste trabalho e pelas colaborações/discussões realizadas ao longo dessa jornada.
- ✓ Aos professores do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá – em especial ao Makoto, ao Expedito, ao Ourides, ao Hioka e a Florângela - que sempre me apoiaram desde as indecisões durante a graduação.
- ✓ Aos professores Luiz H. Mazo, Sérgio S. A. Machado e Valtencir Zucolotto pelas idéias sugeridas no exame de qualificação, as quais tornaram esse trabalho ainda mais completo.
- ✓ Aos colaboradores: Álvaro, Carlos, Dosil, Evandro, Lincoln e Thiago pelas contribuições pontuais em alguma das fases do desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ Ao Prof. Dr. José Geraldo A. Brito-Neto (ZG) pela simulação dos efeitos da cela de detecção e pelas discussões freqüentes sobre o trabalho atual e propostas futuras.
- ✓ Ao Rodrigo de Santis Neves (TG), pelo trabalho intenso durante a caracterização eletroquímica dos eletrodos isolados e modificados. Espero ter lhe convencido sobre a definição do termo “sem contato”!
- ✓ À turma do café e/ou companheiros de bandex: Guilherme (Caetano), Marcão, Thiago, Rogério, Robson, Lincoln, Álvaro, Juliano (catatau), Guilherme (Generoso), Marcelo, Christian e Paulo, pelos momentos de descontração, pelas discussões rotineiras sobre futebol (principalmente nas segundas-feiras) e pelo companheirismo durante esses anos.
- ✓ Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pelo suporte e acesso à infra-estrutura dos laboratórios de apoio.
- ✓ Aos colegas e técnicos do LNLS: Angelo, Maria Helena e André (Laboratório de Microfabricação) além do Vínicius Pimentel (Laboratório de Microscopia e Tunelamento) por todo o suporte técnico durante o desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao Fábio Zambello (Laboratório de Filmes Finos) pela realização das análises de XPS.
- ✓ Aos funcionários e amigos das oficinas do IQSC: Alex, Milton, Ednelson, Élvio e o Toninho, pela colaboração, amizade, convívio e sugestões sobre os vários acessórios construídos nas oficinas.

- ✓ Aos colegas do BioMicS e do Croma (atuais e alguns já empregados): Leandro, Sheila, Thiago, Flávia, Ana Paula, Carlos, Evandro, Karina, Gabriela, Regiane, Juliane, Juliana, Sandro, Marcelo, Renato, Nilson, Valéria, Célia, Zé Carlos, Álvaro, Christian, Paulo, Guilherme, Lincoln, Alessandra, Paula, Ariane, Leidimara, Juliano, Rogério, Robson, Alcimar e Elaine, pela amizade, pelos churrascos, pelas discussões e, principalmente, pela convivência ao longo destes anos.
- ✓ À Vanessa e à Odete pela amizade e por todo o suporte prestado, sempre que solicitado.
- ✓ Ao Romano, pelo suporte técnico na parte de tesouraria.
- ✓ Ao pessoal da Secretaria de Pós-Graduação do IQSC, Andreia e Sílvia, pela assistência acadêmica ao longo desses anos.
- ✓ Ao Serviço de Biblioteca e Informação (SBI) do IQSC, em especial à Eliane pelas correções (em duas rodadas) na formatação das referências bibliográficas.
- ✓ Aos amigos do futebol de segunda (segunda-feira, não segunda divisão), pelos momentos de lazer longe da bancada ou do escaninho.
- ✓ Ao Guilherme (GMT) pela grande amizade, pela confiança e também pela colaboração no rateio das despesas do apartamento durante os últimos anos! Tenha certeza que amizades como a sua estão cada vez mais escassas.
- ✓ Às pessoas que, gentilmente, revisaram alguns Capítulos desta tese e deram sugestões profícuas (Juliane, Karina, Guilherme e Thiago). Obrigado ao Emanuel e ao Alberto pela correção virtual.
- ✓ À minha família, por compreender as poucas visitas, pelo suporte, pelas chances oferecidas e, principalmente, pelos ensinamentos de vida! Em especial à memória de meu avô (amigo e sempre conselheiro) Waldomiro Coltro. Como meu avô sempre disse: “*o importante é nunca desistir*”!
- ✓ À FAPESP pela bolsa de doutorado concedida (processo no. 04/01525-0), sem a qual esse trabalho não seria realizado e, em especial, à assessoria científica pelas sugestões descritas na avaliação dos relatórios e também na avaliação inicial do plano de trabalho.
- ✓ À CAPES, pela concessão da bolsa de PDEE (Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior) para a realização do estágio na Universidade do Kansas.
- ✓ Ao CNPq, pelo auxílio pesquisa concedido.
- ✓ Finalmente, à Monise, por todo seu amor, amizade, carinho, paciência, dedicação, compreensão, confiança e companheirismo.

*“...vem vamos embora que esperar não é saber
quem sabe faz a hora não espera acontecer...”*

(Geraldo Vandré)

Lista de Figuras

Figura 1. Esboço da idéia do projeto de doutorado.....	26
Figura 1.1. Configuração genérica de um microsistema eletroforético (MSE).....	35
Figura 1.2. Exemplo de um microsistema contendo funcionalidades analíticas integradas para análise de DNA. Adaptada da referência 34.....	38
Figura 1.3. Evolução do número de publicações com microsistemas analíticos ao longo dos anos.....	41
Figura 1.4. Configuração de Kretschmann para SPR.....	48
Figura 1.5. Representação de um microsistema usado para monitorar adsorção biomolecular através de admitância supercapacitiva.....	51
Figura 1.6. Representação da configuração convencional dos eletrodos para C^4D em formato capilar e em <i>microchip</i>	56
Figura 1.7. Circuito equivalente para a C^4D em capilar ou <i>microchip</i> em termos (A) das capacitâncias dos eletrodos e (B) da capacitância da parede do canal.....	57
Figura 1.8. Evolução do número de publicações com detecção condutométrica sem contato em função do ano.....	59
Figura 2.1. Geometria do microdispositivo utilizado para avaliação do desempenho analítico dos substratos diferentes.....	74
Figura 2.2. Processo de fabricação dos canais em vidro.....	76
Figura 2.3. Programação de temperatura utilizado na selagem térmica dos canais em vidro.....	76
Figura 2.4. Processo de fabricação de um molde em SU-8 e prototipagem de microcanais em PDMS.....	77
Figura 2.5. Fabricação de microcanais em poliéster-toner.....	79
Figura 2.6. Representação do controle eletrocinético (modo <i>gated</i>) aplicado nos microsistemas eletroforéticos.....	81
Figura 2.7. Estruturas químicas da (A) fluoresceína e da (B) cumarina.....	82
Figura 2.8. Curvas obtidas para a corrente eletroforética em função do potencial aplicado.....	85
Figura 2.9. Exemplo de eletroferograma registrado em MSE de PDMS/vidro usando um método de ILIF para determinação do EOF.....	89
Figura 2.10. Efeito do tempo de injeção na altura do pico (A) e na eficiência analítica (B) de um microchip fabricado em vidro.....	93

Figura 2.11. Exemplos de eletroferogramas registrados nos substratos diferentes para a mesma mistura sob as mesmas condições de análise.....	94
Figura 2.12. Exemplos de eletroferogramas registrados em pontos de detecção diferentes (10, 20, 30, 35 e 40 mm) em MSE de PDMS/vidro.....	99
Figura 2.13. Variância total para uma solução de FL 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em função do ponto de detecção para MSE fabricados em (■) PT, (●) PDMS nativo, (▼) PDMS oxidado, (▲) PDMS/vidro e (♦) vidro.....	100
Figura 2.14. Eletroferogramas registrados em MSE de vidro mostrando a repetibilidade entre as injeções número (a) 1, (b) 5, (c) 10, (d) 20, (e) 30 e (f) 50.....	103
Figura 2.15. Eletroferogramas obtidos para uma série de sete injeções cada para três MSE de PDMS/vidro idênticos.....	105
Figura 2.16. Eletroferogramas obtidos para séries de sete injeções realizadas em MSE de PDMS oxidado durante oito horas sem interrupção.....	106
Figura 2.17. Eletroferograma obtido para uma série de sete injeções consecutivas em MSE de PDMS nativo.....	108
Figura 2.18. Eletroferograma obtido para uma série de sete injeções consecutivas em MSE de PT.....	110
Figura 3.1. Exemplo da integração de eletrodos no mesmo plano que os microcanais...	121
Figura 3.2. Fotografia mostrando a integração dos eletrodos fora do plano dos microcanais.....	124
Figura 3.3. Diagrama do sistema de detecção oscilométrica simples em microssistemas.....	126
Figura 3.4. Diagrama do sistema de detecção oscilométrica dupla em microssistemas.....	127
Figura 3.5. Visualização da tela principal do <i>software</i> escrito em <i>LabVIEW</i> mostrando os três gráficos gerados em tempo real e a janela para configurar o transporte eletrocinético bem como o diretório do arquivo gerado.....	131
Figura 3.6. Processo de fabricação de eletrodos em filmes de poliéster usando máscaras de toner.....	133
Figura 3.7. Esquema de impressão dos canais (A) e a integração dos eletrodos fabricados no filme de poliéster (B).....	134
Figura 3.8. Representação de um microssistema fabricado em poliéster-toner contendo eletrodos e canais integrados.....	135
Figura 3.9. Esquema do processo de microfabricação sobre placas de circuito impresso.....	137

Figura 3.10. Esquema do controle eletrocinético nos microcanais.....	138
Figura 3.11. Representação das geometrias utilizadas para o sistema de C ⁴ D simples (A) e duplo (B-D).....	139
Figura 3.12. Componentes e montagem do sistema de detecção oscilométrica dupla....	142
Figura 3.13. Imagens da fonte de alimentação (A e B) e do suporte do microchip (C e D), no qual as conexões elétricas e com o ambiente macroscópico são feitas.....	143
Figura 3.14. Micrografias ópticas da máscara de toner impressa (A) e do eletrodo planar obtido após deposição metálica e remoção do toner (B).....	144
Figura 3.15. Otimização dos parâmetros do detector oscilométrico.....	146
Figura 3.16. Exemplos de eletroferogramas mostrando: (a) a separação de cátions de alta mobilidade em diferentes níveis de concentração e: (b) as curvas analíticas obtidas com o sistema descartável.....	148
Figura 3.17. Imagens dos MSE de PT com eletrodos integrados fabricados em geometrias diferentes.....	149
Figura 3.18. Exemplos de eletroferogramas obtidos em microssistemas com C ⁴ D dupla, cuja geometria foi composta de (a) três, (b) quatro e (c) cinco eletrodos.....	150
Figura 3.19. Representação qualitativa das linhas de campo geradas nas geometrias contendo três (A), quatro (B) e cinco (C) eletrodos.....	152
Figura 3.20. Exemplos dos eletrodos obtidos em PCI.....	153
Figura 3.21. Exemplo de eletroferogramas registrados em cinco diferentes microssistemas fabricados em PDMS/PET.....	155
Figura 3.22. Intensidade do sinal analítico (A) de uma amostra contendo K ⁺ 0,5 mM e largura do pico à meia altura (B) em função do espaçamento entre os eletrodos no duplo-sistema de detecção.....	157
Figura 3.23. Intensidade do sinal analítico (A) e largura do pico (B) em função da largura dos eletrodos no duplo-sistema de detecção.....	158
Figura 3.24. Nível de ruído (A) e razão sinal/ruído (B) em função da frequência de operação em geometrias contendo eletrodos com largura de 1 mm e espaçamento entre 0,5 e 2,0 mm.....	159
Figura 3.25. Superfícies de resposta do detector em função da largura e do <i>gap</i> (espaçamento) entre os eletrodos.....	162
Figura 3.26. Superfícies de resposta do detector em função da largura e da frequência de operação.....	163
Figura 3.27. Superfícies de resposta do detector em função do espaçamento entre os eletrodos e da frequência de operação.....	164

Figura 3.28. Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis na intensidade do sinal analítico registrado no sistema de C ⁴ D.....	165
Figura 3.29. Superfícies de resposta para a largura do pico (K ⁺) em função da largura e do <i>gap</i> (espaçamento) entre os eletrodos.....	167
Figura 3.30. Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis sobre a largura do pico detectado.....	168
Figura 3.31. Resposta da linha de base do detector (V _{dc}) em função da amplitude do sinal de excitação em valores de frequência iguais a (A) 100, (B) 300, (C) 500 e (D) 900 kHz.....	169
Figura 4.1. Representação da geometria dos eletrodos para detecção dupla (a) e dos formatos dos microcanais (b e c).....	182
Figura 4.2. Etapa de fabricação dos eletrodos microfabricados para C ⁴ D.....	184
Figura 4.3. Processo de fabricação dos microcanais em PDMS com conectores integrados e vedação irreversível.....	185
Figura 4.4. Micrografias ópticas de dispositivos fabricados a partir de processos convencionais.....	186
Figura 4.5. Representação de um sistema de PECVD usado para deposição de materiais dielétricos.....	187
Figura 4.6. Representação genérica do mecanismo de silanização da camada de SiO ₂ usando APTES.....	190
Figura 4.7. Processo de imobilização de moléculas de biotina usando radiação ultravioleta.....	190
Figura 4.8. Estrutura química do acetato de fotobiotina.....	191
Figura 4.9. Representação genérica da instrumentação desenvolvida para os experimentos de BIA-C ⁴ D.....	193
Figura 4.10. Ilustração da interface gráfica do <i>software</i> de controle e aquisição de dados do sistema de BIA-C ⁴ D.....	193
Figura 4.11. Espectros de XPS para a superfície da camada de SiO ₂ (A-C), SiO ₂ modificada com APTES (D-F) e SiO ₂ funcionalizada com fotobiotina.....	197
Figura 4.12. Imagens de microscopia de força atômica mostrando a topografia da superfície de SiO ₂ antes (A) e depois (B) das etapas de silanização (R-NH ₂) e fucionalização com moléculas de biotina (R-FB).....	199
Figura 4.13. Perfil da camada de SiO ₂ sobre o eletrodo microfabricado.....	200
Figura 4.14. Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos planares com (A e B) e sem (C) isolamento dielétrico.....	201

Figura 4.15. Espectros de impedância do eletrodo sem a camada de SiO ₂ , com a camada de SiO ₂ , com a camada de SiO ₂ silanizada e com a superfície funcionalizada com biotina representados como gráficos de Bode (A, B).....	203
Figura 4.16. Circuito equivalente proposto para os eletrodos de Ti/Au/Ti isolados com camada de SiO ₂ e modificados quimicamente com monocamadas auto-montadas (SAM) de APTES e biotina.....	204
Figura 4.17. Micrografias ópticas mostrando a geometria dos eletrodos do sensor oscilométrico e a região delimitada sobre a superfície do SiO ₂ delimitada para modificação química.....	206
Figura 4.18. Estabilidade do sinal elétrico do sistema oscilométrico duplo em função do tempo.....	207
Figura 4.19. Resposta do sensor oscilométrico para a introdução de avidina 1 mg mL ⁻¹ em dispositivos (A) sem modificação e (B) com superfície funcionalizada.....	209
Figura 4.20. Curvas para a condutividade de diferentes eletrólitos em função da concentração.....	211
Figura 4.21. Sensorgramas de condutividade obtidos com o protótipo 2, sob um fluxo induzido por uma bomba peristáltica à vazão de 10 µL min ⁻¹	212
Figura 4.22. Sensorgrama registrado sob fluxo induzido por duas bombas seringas com sistema automatizado para distribuição das soluções.....	214
Figura 4.23. Sensorgrama mostrando a variação de condutividade devido à introdução de água nos microcanais.....	215
Figura 4.24. Sensorgramas mostrando o efeito do preparo da amostra em tampão (A) e em água (B).....	216
Figura 4.25. Resultados em termos da intensidade do sinal e razão S/R em função da frequência.....	217
Figura 4.26. Efeito da tensão de excitação nos sensorgramas registrados com C ⁴ D.....	218
Figura 4.27. Exemplos da repetibilidade dos sensorgramas de condutividade registrados sob as mesmas condições.....	219
Figura 4.28. Sensorgramas registrados em uma faixa de concentração variando de 5 – 60 µg mL ⁻¹	219
Figura 4.29. Curva de calibração da interação entre avidina-biotina para concentrações na faixa entre 5-300 (A) e 5-100 µg mL ⁻¹ (B).....	220
Figura 4.30. Curvas de associação de avidina sobre superfície funcionalizada com biotina em uma faixa de concentração variando de 10 a 100 µg/mL.....	222

Figura 4.31. Representação dos valores da constante de formação observada (k_{obs}) em função da concentração de avidina.....	223
Figura S1. Espectros de fluorescência dos materiais utilizados para fabricação de microssistemas.....	234
Figura S2. Circuito do detector oscilométrico – Módulo 1. Adaptado da ref. 31, Capítulo 3.....	235
Figura S3. Circuito do detector oscilométrico – Módulo 2. Adaptado da ref. 31, Capítulo 3, com alterações.....	235
Figura S4. Representação do diagrama de blocos do <i>software</i> para controle eletrocinético e aquisição de dados do C ⁴ D (parte 1).....	236
Figura S5. Representação do diagrama de blocos do <i>software</i> para controle eletrocinético e aquisição de dados do C ⁴ D (parte 2).....	237
Figura S6. Representação do diagrama de blocos do <i>software</i> para do sistema de BIA-C ⁴ D (parte 1).....	238
Figura S7. Representação do diagrama de blocos do <i>software</i> para do sistema de BIA-C ⁴ D (parte 2).....	239
Figura S8. Circuito eletrônico para controle das válvulas.....	240
Figura S9. Sistema ilustrativo das duas faces da placa contendo o circuito construído para controle das válvulas solenóides implementadas na etapa de bombeamento hidrodinâmico.....	241
Figura S10. Curvas de calibração para a vazão do fluxo gerado nas bombas seringas...	242
Figura S11. Espectro completo da fotoemissão por raios-X da camada de SiO ₂ depositado sobre substrato de vidro <i>via</i> PECVD.....	243
Figura S12. Espectros de XPS registrados em uma superfície de SiO ₂ antes (A) e depois (B) de ser funcionalizada com 3-amino-propil-trietóxi-silano (APTES).....	243
Figura S13. Espectros de impedância do eletrodo sem a camada de SiO ₂ (A), com a camada de SiO ₂ (B), com a camada de SiO ₂ silanizada (C) e com a superfície funcionalizada com biotina (D) representados como gráficos de Bode.....	244
Figura S14. Perfil do molde fabricado em SU-8 (A) e da micro-estrutura replicada em PDMS (B).....	245

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Representação das etapas do controle eletrocínético (modo <i>gated</i>) e os potenciais aplicados em cada reservatório do MSE.....	80
Tabela 2.2. Mobilidade eletrosmótica e potencial zeta dos microcanais eletroforéticos fabricados em diferentes substratos.....	90
Tabela 2.3. Comparação da eficiência de separação e simetria de pico obtidas para os substratos microfluídicos.....	96
Tabela 3.1. Variáveis e níveis utilizados para avaliação das dimensões da cela e da frequência de trabalho do sistema de detecção.....	140
Tabela 3.2. Matriz completa para o planejamento experimental realizado contendo as respostas analíticas de cada ensaio.....	161
Tabela 4.1. Parâmetros operacionais do sistema de PECVD.....	188
Tabela 4.2. Parâmetros extraídos do circuito equivalente.....	205

Lista de abreviaturas e siglas

A/D – analógico/digital

AFM – microscopia de força atômica (*atomic force microscopy*)

APTES – amino-propil-trietóxi-silano

BIA – análise de interações biomoleculares (*biomolecular interaction analysis*)

BioMicS – bioanalítica, microfabricação e separações

C⁴D – detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (*capacitively coupled contactless conductivity detection*)

CD-R – disco compacto gravável (*recordable compact disc*)

CDT – camada dupla de toner

CE – eletroforese capilar (*capillary electrophoresis*)

CHES - ácido 2-(*N*-ciclohexilamino)etano-sulfônico

CM – cumarina 519

CST – camada simples de toner

EIE – espectroscopia de impedância eletroquímica

EOF – fluxo eletrosmótico (*electroosmotic flow*)

FB – foto-biotina

FL - fluoresceína

FRP – fotorresiste positivo

HEPES – ácido *N*-(2-hidróxi-etil)-piperazina-*N'*-2-etano-sulfônico

ILIF - fluorescência induzida a laser indireta (*indirect laser-induced fluorescence*)

LIF – fluorescência induzida a laser (*laser-induced fluorescence*)

LMF – Laboratório de Microfabricação

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

LOC – *lab on a chip*

MES - ácido *N*-morfolino-etano-sulfônico

MS – espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

MSE – microssistemas eletroforéticos

NI – *national instruments*

OPA – amplificador operacional (*operational amplifier*)

PE – poli(etileno)

PC – poli(carbonato)

PCI – placa de circuito impresso

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)

PDMS – poli(dimetilsiloxano)

PECVD – deposição química em fase de vapor assistida por plasma (*plasma enhanced chemical vapor deposition*)

PET – poli(etileno tereftalato)

PMMA – poli(metil metacrilato)

PT – poliéster-toner

PU – poli(uretana)

QCM – microbalança de cristal de quartzo (*quartz crystal microbalance*)

SAM – monocamadas auto-montadas (*self-assembled monolayers*)

SPR – ressonância plasmônica de superfície (*surface plasmon resonance*).

μTAS – microssistemas de análises totais (*micro total analysis systems*).

UV- ultra-violeta

V1 – válvula 1

V2 – válvula 2

VC – voltametria cíclica

XPS – espectroscopia de fotoelétrons por raios-X

Lista de símbolos

A - área do eletrodo (A)

A_{sec} – área seccional do canal

C – capacitância

C_P - capacitância da parede do canal (na região dos eletrodos)

C_F - capacitância do filme

c - velocidade da luz no vácuo

c_i – concentrações das espécies iônicas

D - coeficiente de difusão molecular

E – campo elétrico

e0 – eletrodo de excitação

e1 – eletrodo receptor

e2 – eletrodo receptor

f - frequência de operação

G - condutância de uma solução

k_a – constante de associação (k_1)

k_d – constante de dissociação (k_{-1})

k_{obs} – constante de formação observada

K - constante da cela

K_{ev} - vetor de onda do campo evanescente

K_{sp} - vetor de onda do plasma de superfície

L – comprimento total do canal

L_{ef} - comprimento efetivo do canal

l - distância entre os eletrodos

N – número de pratos (eficiência)

Q_{inj} – quantidade de material injetado no canal

R – resolução

R_F – resistência do filme

R_S – resistência da solução

R_T – resistência teórica

V – potencial elétrico aplicado

V_{pp} – amplitude do sinal de excitação

t_{eo} - tempo eletrosmótico foi utilizado

t_{inj} – tempo de injeção

t_m - tempo de migração

v_{eo} - velocidade eletrosmótica

X_c - reatância capacitiva

X_o - reatâncias capacitivas intereletrodos

X_w - reatâncias capacitivas da parede do microcanal

Y - admitância

$w_{1/2}$ - largura do pico a meia altura

W_o - frequência da luz incidente

Z – impedância

ϵ_m - constante dielétrica do filme metálico

ϵ_o - permissividade do vácuo

ϵ_r - permissividade relativa do meio

ζ - potencial zeta

η - viscosidade da solução

η_s - índice de refração no meio dielétrico

η_g - índice de refração do meio denso (vidro)

θ - ângulo de incidência da luz

κ - condutividade

λ_i - condutividade molar das espécies iônicas

μ_a - mobilidade observada

μ_{eo} - mobilidade eletrosmótica

μ_{ep} - mobilidade eletroforética

ρ - resistividade

σ^2_T - variância total

σ^2_{Dif} - variância referente à difusão longitudinal

σ^2_{Inj} - variância referente à zona de amostra injetada

σ^2_{Det} - variância referente à geometria do detector

σ^2_{Wall} - variância referente à interação do analito com a parede do canal

σ^2_{Eleto} - variância referente à eletrodispersão das zonas

σ^2_J - variância atribuída ao aquecimento provocado pelo efeito Joule

ω - velocidade angular ($2\pi f$)

Resumo

O trabalho descrito nesta tese mostra a aplicação de um sistema de detecção condutométrica sem contato acoplado capacitivamente (C^4D) para monitorar interações biomoleculares em microssistemas analíticos. Inicialmente, o desempenho analítico de microssistemas fabricados em vidro, poli(dimetilsiloxano) (PDMS) e poliéster-toner (PT) foi avaliado de modo a escolher o melhor material (em termos de facilidades de fabricação, custo e repetibilidade) para os ensaios biomoleculares. Dentre os materiais estudados, os dispositivos fabricados em PT mostraram-se mais adequados para testes rápidos, onde a repetibilidade analítica não é o parâmetro mais importante. Os dispositivos fabricados em PDMS e selados contra uma placa de vidro apresentaram os melhores resultados em termos de repetibilidade e o desempenho analítico foi similar aos dispositivos de vidro. Dessa maneira, os dispositivos fabricados em PDMS/vidro foram escolhidos para a demonstração dos objetivos da tese. Por outro lado, os dispositivos fabricados em PT foram explorados para estudar a configuração geométrica do sistema de C^4D . A instrumentação para monitoramento dos ensaios de ligação foi composta basicamente de dois sistemas de C^4D , um software escrito em *LabVIEW* e um sistema de bombeamento das soluções. De modo a encontrar a configuração ideal da cela de detecção, geometrias contendo três, quatro e cinco eletrodos foram avaliadas em dispositivos de PT. A configuração ótima foi composta de três eletrodos, espaçados simetricamente. Nesta geometria, um eletrodo é utilizado para aplicar o sinal senoidal de excitação e os outros dois são utilizados para capturar o sinal resultante. As dimensões dos eletrodos (largura e espaçamento entre eles) foram otimizados usando ferramentas quimométricas. O complexo avidina-biotina foi utilizado como modelo de ligação para mostrar a aplicabilidade do sistema proposto. Para os microssistemas biomoleculares, os eletrodos (com geometria otimizada) foram fabricados sobre a superfície de uma placa de vidro por fotolitografia, sputtering e lift-off. Os eletrodos de detecção foram isolados com uma camada de óxido de silício com espessura de 50 nm, depositada pelo processo de deposição química em fase de vapor assistida por plasma. A camada de SiO_2 foi modificada quimicamente com solução de 3-amino-propil-trietóxi-silano em etanol. Para imobilização covalente de biotina, uma alíquota de 10 μL de fotobiotina dissolvida em água (0,1 mg/mL) foi adicionada à superfície e exposta à radiação ultravioleta (365 nm, 10 mW/cm²) durante 15 min. A detecção foi realizada aplicando um sinal senoidal, a partir de um gerador de funções, ao eletrodo de excitação registrando o sinal resultante nos dois eletrodos receptores. Para minimizar a captura de ruído elétrico, os experimentos foram realizados em uma gaiola de Faraday. O controle e a aquisição de dados foi feito mediante um software escrito em *LabVIEW* monitorando os sensorgramas de condutividade em tempo real. Os canais microfluídicos foram fabricados em PDMS por litografia suave e selados irrevesivelmente contra a placa de vidro contendo os eletrodos isolados e modificados quimicamente. As soluções (tampão e amostra) foram manuseadas com auxílio de uma bomba peristáltica ou duas bombas seringas. Soluções contendo tampão e avidina foram introduzidas nos microcanais e as mudanças de condutividade foram monitoradas em função do tempo. As soluções contendo avidina permaneceram em contato com a superfície modificada até o sinal de condutividade atingir um patamar de equilíbrio. Depois disso, solução tampão foi introduzida no microcanal para remover os analitos adsorvidos à superfície. Duas válvulas solenóides foram utilizadas para permitir um controle automático da distribuição das soluções nos microcanais. O limite de detecção obtido para a interação entre avidina e biotina foi de 75 nmol L⁻¹.

Abstract

The study reported in this thesis shows the application of a capacitively coupled contactless conductivity detection (C^4D) for monitoring biomolecular interactions on analytical microsystems. Initially, the analytical performance of the microsystems fabricated in glass, poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and polyester-toner (PT) was investigated in order to choose the best material (in terms of fabrication facilities, costs and repeatability) for the biomolecular assays. Among all substrate materials studied, devices fabricated in PT showed suitability for quick experiments, in which the analytical repeatability is not the most important parameter. The devices fabricated in PDMS and sealed against a glass plate presented the best results in terms of repeatability and the analytical performance was similar to that one of glass devices. For this reason, PDMS/glass devices were chosen for showing the goals of this thesis. On the other hand, PT devices were employed to study the geometrical design of the C^4D system. The instrumentation for monitoring binding assays was basically composed of two C^4D systems, a software written in *LabVIEW* and a solution pumping system. In order to find the suitable detection cell configuration for this dual- C^4D system, designs containing three, four and five electrodes were evaluated on PT devices. The optimal design was composed of three electrodes symmetrically spaced. In this configuration, one electrode is used for applying an excitation sinusoidal wave and the other two for picking up the resulting signal. The dimensions of the electrodes (width and gap) were optimized by chemometric tools. The avidin-biotin complex was used as a binding model for showing the feasibility of the proposed system. For the biomolecular microsystems, electrodes were fabricated on glass surface using photolithographic, sputtering and lift-off processes. Detection electrodes were insulated with a 50-nm silicon oxide layer deposited by plasma-enhanced chemical vapor deposition. The SiO_2 layer was functionalized by immersing the cleaned surface in a 3-aminopropyltriethoxy-silane solution in ethanol for 3 h. For biotinylation of the amino-silane layer, 10 μ L of photobiotin dissolved in deionized water (0.1 mg/mL) was dropped on the modified glass surface and exposed to a 365 nm UV radiation at intensity of 10 mW/cm² for 15 min. Detection was carried out by passing a sinusoidal excitation signal from the function signal generator to the first electrode and picking up the resulting signal at the two receiver electrodes. To reduce electrical noise pickup, all measurements were carried out in a Faraday cage. The data acquisition was obtained in a software written in *LabVIEW* and the conductivity sensorgrams were recorded in real-time. The microfluidic network was fabricated in PDMS by soft lithography and irreversibly sealed against the electrodes plate. Solutions were handled into microfluidic channels using a peristaltic pump or two syringe pumps. Buffer and avidin-containing solution was injected into the microchannels and conductivity changes were monitored over time. Avidin solutions were allowed to remain in contact with the surface until a stable conductivity had reached equilibrium. Avidin-free buffer solutions were then injected to rinse off non-specifically bound analytes. Two solenoid valves were used to allow an automatic dispensing of the sample/buffer solution into microchannels. The limit of detection found for avidin-biotin system was 75 nmol L⁻¹.

SUMÁRIO

Prefácio.....	25
1. Apresentação geral sobre o tema e a estrutura da tese.....	26
Capítulo 1 – Introdução geral e objetivos.....	31
1.1. Introdução à miniaturização de sistemas analíticos.....	32
1.1.1. Introdução da amostra e transporte do fluido.....	33
1.1.2. Etapas analíticas desenvolvidas em <i>microchips (lab-on-a-chip)</i>	37
1.1.3. Métodos de detecção em microssistemas.....	39
1.1.4. Consolidação da linha de pesquisa.....	41
1.1.5. Miniaturização de sistemas analíticos no Brasil.....	42
1.2. Interações biomoleculares.....	45
1.2.1. Métodos de detecção para interações biomoleculares.....	46
1.2.1.1. Ressonância plasmônica na superfície (SPR).....	47
1.2.1.2. Onda acústica na superfície.....	49
1.2.1.3. Tomoscopia de admitância supercapacitiva.....	50
1.2.1.4. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).....	52
1.3. Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica).....	53
1.4. Objetivos gerais.....	60
Referências Bibliográficas.....	61
Capítulo 2 - Comparação do desempenho analítico de microssistemas fabricados em PDMS, vidro e poliéster-toner.....	68
2.1. Introdução.....	69
2.1.1. Objetivos.....	72
2.2. Experimental.....	73
2.2.1. Materiais, amostras e reagentes.....	73
2.2.2. Processos de microfabricação.....	74
2.2.2.1. Fabricação de microcanais em vidro.....	75
2.2.2.2. Fabricação de microcanais em PDMS.....	77
2.2.2.3. Fabricação de microcanais em poliéster-toner.....	78
2.2.3. Procedimentos eletroforéticos.....	79
2.2.3.1. Pré-condicionamento dos microcanais.....	79
2.2.3.2. Transporte eletrocinético.....	80
2.2.4. Detecção por fluorescência induzida a laser.....	81
2.2.5. Determinação da magnitude do fluxo eletrosmótico (EOF).....	82
2.2.6. Estrutura química dos analitos.....	82

2.3. Resultados e Discussão.....	83
2.3.1. Processos de microfabricação.....	83
2.3.2. Caracterização elétrica.....	84
2.3.3. Fluxo eletrosmótico (EOF).....	87
2.3.4. Otimização do tempo de injeção.....	92
2.3.5. Desempenho analítico.....	93
2.3.6. Repetibilidade e robustez.....	102
2.3.6.1. MSE de vidro.....	102
2.3.6.2. MSE de PDMS/vidro.....	104
2.3.6.3. PDMS oxidado.....	105
2.3.6.4. MSE de PDMS nativo.....	107
2.3.6.5. MSE de PT.....	109
2.4. Conclusões.....	111
Referências Bibliográficas.....	114
 Capítulo 3 - Detecção Condutométrica sem Contato em Microssistemas.....	 119
3.1. Introdução.....	120
3.1.1. Objetivos.....	125
3.2. Experimental.....	126
3.2.1. Construção do detector condutométrico sem contato (oscilométrico).....	126
3.2.1.1. Instrumentação: componentes do sistema de detecção.....	127
3.2.2. <i>Software</i> de aquisição de dados.....	130
3.2.3. Fabricação de microssistemas integrados.....	131
3.2.3.1. Microssistemas em poliéster-toner.....	132
3.2.3.2. Microssistemas em PDMS/PET/PCI.....	135
3.2.4. Transporte eletrocinético.....	137
3.2.5. Avaliação da geometria ideal.....	139
3.2.6. Otimização.....	139
3.3. Resultados e Discussão.....	141
3.3.1. Sistema de detecção.....	141
3.3.2. Integração de eletrodos para C ⁴ D em microssistemas de PT.....	143
3.3.3. Avaliação da geometria ideal para o sistema duplo.....	148
3.3.4. Microssistemas de PDMS/PET/PCI.....	152
3.3.4.1. Exemplo de sinais.....	154
3.3.4.2. Avaliação das dimensões da cela de detecção.....	156
3.3.4.3. Planejamento experimental.....	160
3.3.4.4. Influência da amplitude do sinal de excitação.....	168
3.4. Conclusões.....	170
Referências Bibliográficas.....	172

Capítulo 4 – Interações Biomoleculares com C⁴D.....	175
4.1. Introdução.....	176
4.1.1. Monocamadas auto-montadas.....	177
4.1.2. Modelo de interação e imobilização covalente.....	178
4.1.3. Objetivos.....	180
4.2. Experimental.....	181
4.2.1. Material, reagentes e amostras.....	181
4.2.2. Plataforma microfluídica.....	182
4.2.2.1. Configuração do detector e do sistema microfluídico.....	182
4.2.2.2. Fabricação dos eletrodos.....	183
4.2.2.3. Fabricação dos microcanais.....	184
4.2.3. Isolamento elétrico dos eletrodos	186
4.2.4. Química de superfície	189
4.2.4.1. Silanização.....	189
4.2.4.2. Imobilização de biotina.....	190
4.2.5. Transporte do fluido e <i>software</i> de controle.....	191
4.2.5.1 Bombas seringas.....	194
4.2.6 Técnicas de caracterização.....	194
4.2.6.1. Espectroscopia de fotoelétrons por raios-X	194
4.2.6.2. Microscopia de força atômica.....	195
4.2.6.3. Análise eletroquímica.....	195
4.3. Resultados e Discussão.....	196
4.3.1. Caracterização das superfícies modificadas.....	196
4.3.1.1. Espectroscopia de fotoelétrons por raios-X (XPS).....	196
4.3.1.2. Microscopia de força atômica (AFM).....	198
4.3.1.3. Perfilometria.....	199
4.3.1.4. Voltametria cíclica (VC).....	200
4.3.1.5. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).....	202
4.3.2. Seleção do eletrodo para funcionalização.....	205
4.3.3. Avaliação do microssistema biomolecular – protótipo 1	206
4.3.4. Escolha do eletrólito	210
4.3.5. Avaliação do microssistema biomolecular – protótipo 2	211
4.3.6. Repetibilidade, linearidade e limite de detecção.....	218
4.3.7. Estudo cinético das interações.....	221
4.4. Conclusões	225
Referências Bibliográficas.....	227

Capítulo 5 – Conclusões e Perspectivas.....	230
5.1. Conclusões gerais.....	231
5.2. Perspectivas.....	232
APÊNDICES.....	233
APÊNDICE A – Espectros de fluorescência dos materiais utilizados na fabricação de microssistemas analíticos.....	234
APÊNDICE B – Circuitos do detector condutométrico sem contato.....	235
APÊNDICE C – Documentação do <i>software</i> de controle e aquisição de dados do detector oscilométrico duplo.....	236
APÊNDICE D – Documentação do software de controle e aquisição de dados do sistema de BIA-C4D.....	238
APÊNDICE E – Sistema para controle das válvulas.....	240
APÊNDICE F – Calibração das bombas usando seringas de 1, 3 e 5 mL.....	242
APÊNDICE G – Espectros de XPS dos eletrodos isolados e silanizados.....	243
APÊNDICE H – Espectros de impedância dos eletrodos modificados.....	244
APÊNDICE I – Perfil do molde e do canal moldado em PDMS.....	245
SÚMULA CURRICULAR	246

Prefácio

Apresentação da Tese

1. Apresentação geral sobre o tema e a estrutura da tese

O tema desenvolvido nessa tese de doutorado é fruto de uma conversa informal realizada entre dezembro de 2003 e o começo de 2004, entre os professores Emanuel Carrilho e Claudimir Lúcio do Lago*. Essa conversa resultou na elaboração de um projeto cujo desenvolvimento deu-se durante os últimos quatro anos, com foco no monitoramento de interações biomoleculares em microssistemas analíticos com detecção condutométrica sem contato (detecção oscilométrica). O esboço da idéia, rabiscado em um guadarnapo de papel, foi digitalizado e está apresentado na Figura 1.

A idéia consistia basicamente em testar a viabilidade do uso do detector oscilométrico para medir variações de condutividade resultantes da interação entre biomoléculas no interior de uma estrutura microfluídica. Em teoria, a idéia parecia ser simples, mas muitos obstáculos apareceram no decorrer do projeto. Por exemplo, qual a melhor plataforma microfluídica?! Como realizar o transporte do fluido? Por que usar detecção oscilométrica? Qual a melhor configuração do detector? Uma vez que o sistema oscilométrico é considerado um detector universal, como provar que a resposta deve-se apenas às variações provocadas pela interação entre as biomoléculas e não pelas variações de condutividade do meio, por exemplo?

Figura 1. Esboço da idéia do projeto de doutorado.

*Professor do Instituto de Química, Departamento de Química Fundamental, Universidade de São Paulo.

O objetivo deste prefácio é justamente ajudar o leitor a compreender o desenvolvimento cronológico das idéias e o motivo pelo qual tais experimentos foram realizados.

Atualmente, uma das tendências da Química Analítica Moderna é a utilização de microssistemas analíticos nos laboratórios em substituição aos sistemas convencionais. Essa nova vertente na instrumentação analítica é denominada de *lab-on-a-chip*, cuja definição induz a idéia de integração de várias etapas analíticas desenvolvidas em um laboratório químico para um único *chip*. De modo a evitar uma confusão com os *chips* eletrônicos, os *chips* químicos são denominados de microdispositivos ou microssistemas analíticos. As vantagens do uso destes microssistemas são várias e dentre as principais destaca-se a potencialidade de integração de microcanais e eletrodos em um único substrato, resultando em microssistemas portáteis e, idealmente, descartáveis. Além disso, o uso de microcanais restringe o volume utilizado para a ordem de 10^{-9} a 10^{-6} L. O manuseio de volumes na ordem de nanolitros e microlitros abriu um novo foco de estudo: a microfluídica. Um entendimento completo dos fenômenos ocorridos em microfluídica é importante de modo a compreender os resultados obtidos e a solucionar os problemas encontrados freqüentemente como, por exemplo, adsorção, absorção, dispersão e difusão do analito no interior dos microcanais.

A escolha da plataforma microfluídica é de extrema importância antes da realização de qualquer experimento, independentemente da aplicação desejada. Os materiais mais utilizados em microfluídica são vidro, quartzo e silício. Atualmente já existem empresas, como a Micralyne (<http://www.micralyne.com>), a Micronit (<http://www.micronit.com>) e a Microfluidic ChipShop (<http://www.microfluidic-chipshop.com>), que comercializam esses microdispositivos. O problema, para a realidade brasileira, é o custo dos dispositivos comerciais. Segundo uma cotação realizada no mês de junho/2008 junto à empresa Micronit, constatou-se que o preço de um conjunto contendo três dispositivos para eletroforese era de

aproximadamente 400 euros. Na moeda brasileira corrente, isso equivale a quase R\$ 1.000,00 (um mil reais), ou em torno de R\$ 330,00 (trezentos reais) por dispositivo, excluindo-se as taxas de importação. Este custo elevado dificulta qualquer iniciativa de ingresso nessa área de pesquisa. No entanto, devido aos avanços na área de materiais, vários substratos alternativos estão disponíveis para serem empregados na fabricação destes sistemas miniaturizados. Cada material apresenta suas vantagens e suas desvantagens no desempenho analítico, além de aspectos relacionados ao custo, facilidade/tempo de fabricação e, principalmente, no que se refere à instrumentação necessária para a produção dos microssistemas.

Diante deste panorama, optou-se por realizar um estudo sistemático a respeito do desempenho analítico de microdispositivos fabricados em materiais convencionais, como o vidro, e materiais alternativos como o poli(dimetilsiloxano) (PDMS) e o poliéster-toner (PT). A partir deste estudo comparativo escolheu-se a melhor plataforma para a realização dos ensaios biomoleculares com detecção condutométrica sem contato, levando em consideração a facilidade de fabricação, o custo do dispositivo, a repetibilidade analítica entre cada microssistema e os efeitos de adsorção do analito à parede da plataforma microfluídica. O estudo analítico foi realizado em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Susan M. Lunte, da Universidade do Kansas, onde o autor realizou estágio de doutorado por um período de cinco meses através do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDPEE), da CAPES.

O interesse em trabalhar com interações biomoleculares deve-se à sua importância em setores ligados ao desenvolvimento de diagnósticos clínicos, por exemplo. Em geral, um diagnóstico é baseado em testes de interação entre antígeno-anticorpo, proteína-proteína, proteína-DNA, proteína-carboidrato, ou mesmo entre enzima-substrato. A detecção de uma interação biomolecular ocorre pela transdução de um sinal elétrico resultante da alteração de alguma propriedade físico-química ocorrida na superfície em que uma biomolécula está

imobilizada. Como será apresentado no Capítulo 1, essas interações podem ser detectadas por vários métodos, incluindo aqueles que se baseiam em fenômenos ópticos e eletroquímicos.

A opção pela escolha do detector oscilométrico deve-se, principalmente, à inovação tecnológica pretendida. O sistema de detecção oscilométrica completa, em 2008, cerca de 10 anos de desenvolvimento e é um dos sistemas mais robustos empregados em sistemas de separação analítica. O detector oscilométrico apresenta algumas vantagens relacionadas ao custo e à simplicidade instrumental. Como este modo de detecção é universal, optou-se pelo desenvolvimento de um sistema de detecção oscilométrica dupla, ou seja, dois detectores em série posicionados ao longo dos microcanais. Neste caso, um dos detectores teria a função de monitorar as variações de condutividade do meio e o outro detector seria responsável pelo registro do sinal referente às variações de condutividade na presença de um ligante imobilizado.

Para testar a viabilidade deste detector para monitorar interações biomoleculares em microssistemas, o modelo avidina-biotina foi escolhido devido sua estabilidade e bio-especificidade.

Diante deste contexto, a tese está organizada na forma de Capítulos.

O **Capítulo 1** apresenta uma introdução breve dos assuntos envolvidos no desenvolvimento da tese: sistemas miniaturizados, interações biomoleculares e detecção condutométrica sem contato.

O **Capítulo 2** descreve um estudo comparativo do desempenho analítico dos microssistemas fabricados em materiais diferentes, discutindo as características, vantagens e desvantagens de cada substrato.

O **Capítulo 3** aborda a construção do detector condutométrico sem contato duplo, a avaliação e a otimização da geometria ideal para integração dos eletrodos aos microcanais. Para esta finalidade, dois processos de fabricação foram desenvolvidos, sendo que um deles

foi passível de patente (P.I. 0.703.025-8, 2007). A otimização da geometria ideal foi realizada com o auxílio de um planejamento experimental, de modo a encontrar as dimensões ideais para a maximização da resposta analítica.

O **Capítulo 4** apresenta a construção dos dispositivos biomoleculares e os ensaios de interação entre avidina e biotina. O dispositivo ideal foi confeccionado usando as informações obtidas nos Capítulos 2 e 3. Adicionalmente, a implementação do sistema de bombeamento hidrodinâmico, a adaptação do *software* de controle e aquisição, e a caracterização morfológica e eletroquímica dos dispositivos estão descritos neste Capítulo.

A tese é finalizada com o **Capítulo 5**, o qual apresenta as conclusões sobre os resultados obtidos e as perspectivas para a continuidade, expansão e consolidação deste sistema de detecção como uma ferramenta simples e direta para monitorar ensaios biomoleculares diretamente ligados a setores de diagnósticos clínicos.

Em geral, o trabalho foi bastante desafiador e, ao mesmo tempo, estimulante. Para alcançar o objetivo inicial, a evolução instrumental contou com as etapas de desenvolvimento do programa de controle e aquisição, construção de um detector duplo, fabricação e avaliação de microssistemas, otimização da geometria ideal e modificação da superfície com aminosilanos para imobilização covalente de uma biomolécula. Ao final deste ciclo, pode-se já antecipar que temos um protótipo de um sistema inovador para monitorar interações biomoleculares em dispositivos miniaturizados. Alguns dos estudos pontuais, descritos em cada capítulo, já foram publicados e outros manuscritos estão em fase de submissão. Além disso, o pedido de patente da idéia desenvolvida nesta tese já foi formalizado junto ao I.N.P.I. (2008.1.464.75.8).

Capítulo 1

Introdução Geral e Objetivos

1.1. Introdução à miniaturização de sistemas analíticos

A área de pesquisa referente aos microssistemas de análises totais (*micro total analysis systems*, μ TAS), também denominados *lab-on-a-chip* ou, simplesmente, microssistemas analíticos foi implementada na década de 1990 e, atualmente, é uma tendência da Química Analítica Moderna. Essa revolução na instrumentação analítica pode ser acompanhada em detalhes através de artigos de revisão publicados, desde 2002, na *Analytical Chemistry*, o principal periódico em Química Analítica^[1-5]. Além da *Analytical Chemistry*, há outros periódicos especializados na área referente aos microssistemas, *lab-on-a-chip* ou microfluídica. Dentre eles, pode-se citar o *Lab on a Chip, Microfluidics and Nanofluidics* e a *Electrophoresis*, que publica anualmente uma edição especial sobre miniaturização. Além dos periódicos mencionados, um artigo de revisão foi publicado na Química Nova em 2007 e apresenta toda a evolução histórica desta nova vertente da Química Analítica Instrumental^[6].

O motivo principal para o início do desenvolvimento dos μ TAS estava relacionado ao aumento da frequência analítica, assim como o que ocorreu na miniaturização dos sistemas eletrônicos. No entanto, com a miniaturização dos dispositivos analíticos, outras vantagens foram obtidas como a redução do volume de amostra e do tempo total de análise. Com a miniaturização, tornou-se possível a obtenção de microssistemas portáteis, os quais podem ser transportados para análise no campo, por exemplo. Além disso, com os avanços no desenvolvimento de novos materiais, o custo final de cada microssistema pode ser desprezível viabilizando o seu uso como dispositivo descartável. Outra vantagem da miniaturização é a possibilidade de integração de várias funções analíticas em um único substrato como etapas de pré-tratamento e introdução da amostra, separação analítica e detecção^[1,2].

Em geral, os microssistemas analíticos são constituídos de microcanais fabricados em substratos planares com largura de 10 a 200 μ m, profundidade de 5 a 50 μ m e comprimento típico de 2 a 8 cm. Nas dimensões mencionadas, o volume manuseado nesses microcanais é

da ordem de 10^{-12} a 10^{-9} L (pL – nL). Nesse ponto, embora a miniaturização seja contemplada com vantagens importantes, a redução da escala dos sistemas analíticos também apresenta alguns desafios relacionados ao manuseio (ou transporte) do fluido e também aos métodos de detecção empregados nesses microssistemas^[1-6].

1.1.1. Introdução da amostra e transporte do fluido

A introdução da amostra em microcanais é, normalmente, realizada com o auxílio de reservatórios para soluções (tampão, amostra ou reagentes), os quais são implementados nos microssistemas de modo a permitir análises sequenciais^[7]. Estes reservatórios são feitos a partir da perfuração de orifícios em uma das peças constituintes do microssistema (tipicamente a tampa) antes da etapa de selagem (ou vedação). Dependendo do tipo de material utilizado como substrato, esses orifícios podem ser confeccionados com um perfurador de papel, como no caso do poliéster, por exemplo. Por outro lado, substratos como o vidro requerem a utilização de ferramentas mais sofisticadas, como uma furadeira de alta rotação, e brocas com pontas diamantadas. Após a perfuração, tubos plásticos podem ser fixados sobre estes orifícios permitindo a adição de soluções e também a conexão com o sistema de bombeamento fluídico.

A utilização de reservatórios é muito comum, inclusive em microssistemas comerciais. O único problema refere-se ao volume de solução adicionado a estes reservatórios. É extremamente importante que os reservatórios sejam preenchidos com o mesmo volume. Caso contrário, a quantidade de material introduzido nos microcanais será influenciada diretamente pela mobilização hidrodinâmica provocada pela diferença de pressão, em função da não homogeneidade do volume adicionado em cada reservatório^[7].

Além da introdução da amostra, o transporte do fluido é uma das etapas mais importantes de uma análise química em microssistemas. Como o volume de amostra é

extremamente reduzido, problemas relacionados à difusão e à dispersão são freqüentes e requerem muitos cuidados no manuseio^[7]. Em geral, o fluido pode ser manuseado através de fenômenos eletrocinéticos^[7-9] ou hidrodinâmicos^[10,11].

No transporte eletrocinético, o fluido é transportado pela eletrosmose gerada no interior dos microcanais através da aplicação de potenciais elétricos^[12,13]. O fenômeno eletrosmótico é altamente dependente da característica da composição do substrato utilizado. Em substratos de vidro, por exemplo, os grupos silanóis (Si-OH) podem ser deprotonados dando origem à presença de cargas negativas na parede interna do microcanal^[13]. Essas cargas negativas são balanceadas através de interações eletrostáticas com cátions presentes em uma solução eletrolítica gerando uma dupla camada elétrica. Quando um campo elétrico é aplicado, há a movimentação dos cátions carregando a solução em direção do cátodo. O fluxo transportado pela eletrosmose é denominado de fluxo eletrosmótico (EOF)^[12-14].

Devido sua simplicidade instrumental para o transporte do fluido, a eletroforese é o método de separação mais explorado em micro-escala^[14], existindo inclusive equipamentos comerciais. A Agilent[®], por exemplo, produz um equipamento de eletroforese para *microchip* denominado de Bioanalyzer^[15]. No entanto, com o avanço no desenvolvimento de bombas e válvulas miniaturizadas, métodos cromatográficos (em fase líquida^[16,17] e também em fase gasosa^[18]) estão começando a ser implementados em microssistemas. A exemplo do que ocorre com a eletroforese, já há equipamentos comerciais (Agilent[®]) que utilizam microssistemas para cromatografia líquida acoplada com um espectrômetro de massas^[19].

Em uma plataforma miniaturizada, os microssistemas podem ser confeccionados em geometrias variadas, podendo conter um único microcanal ou até múltiplos canais em paralelo^[20,21]. Como apresentado na Figura 1.1., um microssistema eletroforético (MSE) é constituído basicamente de dois microcanais delimitados por reservatórios para soluções. Para MSE, a geometria mais simples e a mais utilizada é em formato de uma cruz, como

apresentado na Figura 1.1. Neste caso, um microcanal é utilizado para realizar a injeção da amostra enquanto o outro é utilizado para efetuar a separação eletroforética. O sistema de detecção é, normalmente, posicionado no final do canal de separação. Estes microssistemas podem ser fabricados em uma variedade de substratos a partir de tecnologias convencionais ou alternativas^[4-7].

Para a introdução da amostra, o volume de injeção pode ser delimitado pela geometria do canal de injeção^[6]. Considerando um canal com largura e profundidade de 50 μm , por exemplo, o volume de injeção (para um sistema em formato de cruz) é de aproximadamente 125 pL (50 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$). O manuseio de volumes extremamente reduzidos requer, muitas vezes, sistemas de alta detectabilidade. No entanto, algumas estratégias podem ser realizadas para aumentar o volume a ser introduzido. Isso pode ser efetuado pela alteração do formato geométrico^[6-8]. Como a zona de amostra é definida pela intersecção dos canais, o canal de injeção pode ser ligeiramente alterado para uma configuração no formato de um duplo-T, como apresentado na Figura 1.1. Nesse caso, o volume é influenciado diretamente pelo comprimento total desse duplo-T.

Figura 1.1. Configuração genérica de um microssistema eletroforético (MSE).

A desvantagem do transporte fluídico a partir do EOF é a tendência em discriminar as espécies iônicas, ou ionizáveis, que são transportadas por esse fenômeno^[22]. Por esse motivo, o manuseio do fluido em microcanais com fluxo induzido por pressão está em expansão plena. O transporte hidrodinâmico pode ser realizado com pressão positiva ou negativa (vácuo), aplicada através de bombas seringas ou bombas peristálticas^[7,9,10,22]. Este fenômeno de transporte pode ser utilizado para manusear uma ampla variedade de soluções, incluindo fluidos não iônicos. Um dos principais requisitos concerne à resistência mecânica da plataforma microfluídica. Para o manuseio de fluxo induzido por pressão, é desejável que os microcanais sejam vedados irreversivelmente, de modo a evitar qualquer danificação (ruptura, vazamento ou quebra) da estrutura fluídica^[9,22].

Além dos fenômenos de transporte mencionados, a ação de forças centrífugas também pode ser utilizada para mobilizar o fluido a partir do princípio difusional. Esse fenômeno foi demonstrado por Duffy e colaboradores^[23] usando um sistema no formato de um disco compacto (CD). Ao girar, a amostra introduzida em um reservatório próximo ao centro é facilmente deslocada na direção de outro reservatório, posicionado próximo à borda do CD. Este tipo de transporte fluídico apresenta algumas vantagens, como a independência das propriedades físico-químicas do líquido (pH e força iônica)^[23].

Nessa verdadeira revolução instrumental, o uso de válvulas microfabricadas está contribuindo significativamente para o crescimento desta área de pesquisa^[24]. Essas válvulas permitem controlar a quantidade (volume) de amostra e direcionar o fluxo do fluido nos microcanais^[25]. A válvula mais comum é fabricada a partir de membranas elastoméricas, as quais podem ser ativadas por potenciais elétricos, pressão ou partículas magnéticas^[24-26]. Embora o processo de fabricação destas válvulas seja laborioso, a integração destes acessórios é uma das principais tendências para o auto-processamento analítico, principalmente no uso de múltiplos canais em paralelo^[24-27].

1.1.2. Etapas analíticas desenvolvidas em microchips (*lab-on-a-chip*)

Desde o início da miniaturização em Química Analítica, várias técnicas desenvolvidas em um laboratório químico podem ser implementadas em microssistemas. Além das técnicas de separação mencionadas no item anterior, métodos de pré-tratamento da amostra e sistemas de detecção podem ser adaptados para micro-escala, oferecendo vantagens relacionadas ao consumo de amostra e ao tempo total de análise. De um modo geral, os dispositivos analíticos vem sendo utilizados para solucionar uma ampla variedade de problemas analíticos e bioanalíticos^[2-6,11]. Dentre os processos de pré-tratamento da amostra em microdispositivos, podem-se destacar a extração em fase sólida^[28], purificação^[29], a mistura de soluções^[30], a pré-concentração^[31] e a reação em cadeia da polimerase (PCR)^[32,33].

Visando uma maior automação das análises químicas, a integração de várias etapas analíticas em um único *microchip* é um dos objetivos de muitos pesquisadores desta área de pesquisa^[5]. O desenvolvimento de microssistemas com etapas analíticas múltiplas integradas confere outra vantagem à miniaturização: a portabilidade^[2-4]. Os sistemas integrados que conferem maior simplicidade são compostos apenas de microcanais e eletrodos para detecção eletroquímica, por exemplo^[14]. No entanto, dispositivos mais complexos são formados pela integração de microcanais para preparo da amostra, análise eletroforética e sistema de transporte fluídico usando válvulas ou eletrosmose^[34,35]. Atualmente, dispositivos contendo múltiplas etapas integradas são utilizados por vários grupos de pesquisa^[34-37].

A Figura 1.2 apresenta um exemplo de um dos primeiros microssistemas analíticos contendo múltiplas etapas para análise de DNA^[34]. Como observado na Figura 1.2, o microssistema foi fabricado em três camadas usando substratos de vidro, silício e placa de circuito impresso. Dentre as funcionalidades analíticas, o microssistema contém conectores para entrada de ar, canais microfluídicos, barreiras hidrofóbicas para filtração, sensores de temperatura, controlador de volume, eletrodos para o controle de temperatura utilizado na

reação de PCR, sistema para preenchimento com gel e eletrodos para controle eletrocinético. Com o dispositivo proposto, uma amostra contendo DNA com volume de 120 nL foi manuseada e detectada após a reação de PCR. Com o dispositivo proposto, o limite de detecção descrito pelos autores foi igual a $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Usando microssistemas integrados, o perfil genético de uma amostra de sangue pode ser obtido em um tempo inferior a 30 min utilizando um volume de amostra da ordem de 100 nL. Estes aspectos estimulam a utilização dos microssistemas analíticos para setores de diagnósticos clínicos^[35-37], onde o termo *sample-in-answer-out* é frequentemente destacado.

Figura 1.2. Exemplo de um microssistema contendo funcionalidades analíticas integradas para análise de DNA. Adaptada da referência 34.

1.1.3. Métodos de detecção em microssistemas

Com o avanço na área de microfluídica e a redução do volume de amostra, o interesse em desenvolver ou adaptar sistemas de detecção para micro-escala tornou-se bastante relevante^[38]. Vários métodos de detecção podem ser adaptados para sistemas miniaturizados. Dentre eles pode-se mencionar a espectrometria de massas (MS, *mass spectrometry*)^[39], a fluorescência induzida a laser (LIF, *laser-induced fluorescence*)^[40], e os modos de detecção eletroquímica, como a amperometria^[41] e a condutometria^[42].

Dos métodos citados, a detecção por LIF é, e provavelmente sempre será, uma das técnicas que possibilita a obtenção dos melhores níveis de detectabilidade^[40]. O limite de detecção obtido por essa técnica pode ser da ordem de 100 fmol L^{-1} , o que equivale a detecção de algumas dezenas de moléculas. As vantagens relacionadas à seletividade, sensibilidade e ao consumo de amostra são extremamente importantes para análise de DNA, onde a quantidade de amostra é sempre problemática^[40]. Apesar dos níveis excelentes de detectabilidade, a detecção por LIF requer que os compostos apresentem grupos fluoróforos em suas estruturas. Caso contrário, há a necessidade de uma etapa de derivação, a qual pode ser realizada fora ou no próprio dispositivo^[40,41].

Por outro lado, o aperfeiçoamento das técnicas de deposição de filmes finos tem contribuído para a miniaturização de detectores eletroquímicos, permitindo a fabricação e a integração de eletrodos metálicos em microssistemas de análise. Essa compatibilidade é responsável pelo aumento considerável do interesse por estas técnicas eletroquímicas, que foi primeiramente proposta em 1998 por Woolley e colaboradores^[43].

Dentre as modalidades eletroquímicas, a detecção amperométrica é a técnica eletroquímica mais explorada em microssistemas^[6,41,43]. Com o uso destes detectores, muitos compostos podem ser detectados sem derivação e com seletividade e sensibilidade são, em alguns casos, comparáveis com a detecção por LIF. No entanto, o posicionamento do eletrodo

de trabalho em relação ao microcanal (dentro, na saída ou fora do canal) é crítico, pois o potencial eletroquímico aplicado ao eletrodo de trabalho pode ser significativamente influenciado pela presença de um campo elétrico, como acontece nos MSE^[41]. Para a detecção amperométrica, os eletrodos podem ser fabricados na mesma plataforma ou em um dispositivo externo ao microssistema. Maiores detalhes sobre este modo de detecção podem ser encontrados em uma tese de doutorado publicada recentemente^[44], a qual apresenta uma revisão excelente sobre todos os aspectos relacionados à detecção amperométrica em microssistemas.

Para a detecção condutométrica, os eletrodos são necessariamente fabricados e integrados na mesma plataforma que os microcanais. Ao contrário da detecção amperométrica, a condutometria é considerada um método de detecção universal e sua resposta independe da composição metálica do material do eletrodo^[41,42,45]. No entanto, como será abordado em detalhes no Capítulo 3, os eletrodos podem estar em contato direto ou isolados fisicamente do contato com o canal microfluídico. Em ambos os casos, a integração dos detectores eletroquímicos (amperométricos e condutométricos) com os microssistemas requer cuidados para evitar a danificação das estruturas. Em outras palavras, a integração deve ser feita de modo que a selagem não fique comprometida e em temperaturas que não provoquem a degradação do material metálico^[41,42,45].

Os eletrodos planares são convencionalmente fabricados a partir de processos físicos, como o *sputtering*, feixe de elétrons ou evaporação^[41,44]. Para fabricar os eletrodos com as dimensões desejadas, há a necessidade de uma máscara contendo geometria dos eletrodos. Essa máscara é utilizada para definir a região dos eletrodos sobre a superfície do substrato. Em processos convencionais, uma camada de fotorresiste pode ser utilizada para essa finalidade^[43]. Em processos alternativos, uma camada de toner impressa por uma impressora laser pode servir para os mesmos propósitos^[46].

1.1.4. Consolidação da linha de pesquisa

Todos os avanços instrumentais mencionados anteriormente têm corroborado para a expansão e a consolidação desta área na instrumentação analítica moderna em nível nacional e internacional. A Figura 1.3 apresenta um levantamento do número de publicações encontradas no banco de dados da *ISI Web of Knowledge*. Como pode ser visualizado, há um crescimento constante desde a implementação do primeiro microssistema analítico, no início da década de 1990. A pesquisa foi realizada com as seguintes palavras-chaves: *micro total analysis systems or lab on a chip or microfluidic devices or microchips or microdevices or miniaturized devices or micromachined devices*. Os resultados obtidos englobam artigos relacionados a microssistemas analíticos publicados em periódicos da área de química analítica, instrumentação, nanotecnologia, eletroquímica, microfabricação e ciência de materiais. Para o ano de 2008 foi feita uma estimativa do número de publicações com base nas informações encontradas em 03/07/2008. A expansão observada na Figura 1.3 tende a continuar nas próximas décadas, principalmente com o avanço tecnológico na escala nanométrica (nm).

Figura 1.3. Evolução do número de publicações com microssistemas analíticos ao longo dos anos. Os dados foram extraídos do banco de dados da *ISI Web of Knowledge* usando as seguintes palavras-chave: *micro total analysis systems or lab on a chip or microfluidic devices or microchips or microdevices or miniaturized devices or micromachined devices*. Para 2008, foi feita uma estimativa com base nas informações encontradas em 03/07/2008.

1.1.5. Miniaturização de sistemas analíticos no Brasil

O desenvolvimento de microsistemas analíticos começou a ser implementado no Brasil no início dos anos 2000 e essa linha de pesquisa já foi objeto de pesquisa na formação de recursos humanos (mestres e doutores) em diferentes centros de pesquisa, como o Instituto de Química da Universidade de São Paulo^[47-50], Instituto de Química de São Carlos (Universidade de São Paulo)^[44,51] e Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas^[52]. Outros trabalhos de pós-doutoramento têm colaborado para a expansão desta linha de pesquisa no país^[53-55].

No início da década, uma tecnologia inovadora para fabricar dispositivos através da impressão direta de microcanais em filmes de poliéster foi proposto por do Lago e colaboradores^[56]. Esse processo baseia-se no uso de uma impressora laser para imprimir um desenho gráfico contendo a configuração do dispositivo desejado sobre uma transparência. De maneira bastante simples, a impressora deposita uma camada de toner sobre a superfície de uma transparência e os canais podem ser obtidos ao desenhar linhas, que após a impressão, ficam sem a presença de toner. Neste caso, a espessura da camada de toner define a altura dos microcanais enquanto a largura da linha delimita a largura do canal resultante. Essas dimensões são limitadas pela resolução da impressora laser. Essa tecnologia brasileira vem sendo explorada para a produção de uma ampla variedade de dispositivos analíticos.

No trabalho pioneiro, dispositivos para eletroforese com detecção condutométrica sem contato e para espectrometria de massas foram apresentados^[47,56]. Em 2004, essa mesma tecnologia foi utilizada para a produção de dispositivos eletroforéticos acoplados com detecção amperometria na saída do canal de separação^[51,57]. Em 2005, dispositivos para eletroforese e isotacoforese foram fabricados em PT e integrados com detecção condutométrica sem contato. Neste trabalho, os eletrodos para detecção condutométrica foram fabricados em placas de circuito impresso (PCI)^[49] e a integração foi feita pela fixação dos

dispositivos sobre a PCI, usando fitas adesivas. Em 2008, o processo de impressão direta foi utilizado para produzir microcanais e máscaras de toner para fabricação de eletrodos metálicos sobre o filme de poliéster. Neste caso, as máscaras de toner foram utilizadas para delimitar a área dos eletrodos a serem formados através da deposição metálica usando a técnica de *sputtering*. Os eletrodos planares foram integrados com os microcanais de PT através de laminação térmica e foram utilizados para detecção condutométrica sem contato^[46].

A principal característica eletroforética dos dispositivos fabricados em PT é o valor reduzido do fluxo eletrosmótico (EOF)^[51,57]. Para tentar contornar essa situação, o processo de impressão direta foi adaptado, em 2004, para produzir microssistemas analíticos em vidro-toner^[48,58], substituindo assim o filme de poliéster por uma placa de vidro. Como o vidro não pode ser colocado diretamente na impressora laser, a camada de toner contendo a geometria dos microcanais é primeiramente impressa em uma folha de papel vegetal e, em seguida, transferida termicamente para a superfície do vidro. A presença do vidro possibilita a geração do EOF com maior magnitude^[58]. Em 2006, esse processo foi também utilizado para a fabricação de dispositivos para eletroforese de fluxo contínuo^[54].

Resultados preliminares com os dispositivos de vidro-toner mostraram que a porosidade da camada de toner é um fator limitante da frequência analítica destes dispositivos. Este mesmo processo foi então usado para transferir a geometria, definida pelo toner, diretamente para a superfície do vidro através de corrosão química por *via* úmida. Neste caso, a camada de toner funciona como uma máscara para selecionar a área a ser corroída quando exposta à uma solução de ácido fluorídrico^[48,59]. Essas máscaras de toner substituem as máscaras convencionais de metal, fotorresiste ou ainda dielétricos. As máscaras de toner apresentam uma resistência suficiente para produzir microcanais com profundidade de até 40 μm usando uma solução de ácido fluorídrico 25%. Assim como o processo de fabricação dos

dispositivos em PT, a resolução da impressora laser é determinante para a definição da máscara e regularidade dos microcanais resultantes.

Em adição aos dispositivos em PT e vidro-toner, o processo de impressão direta vem sendo explorado para a produção de eletrodos planares (simples ou múltiplos) sobre a superfície de um disco compacto não regravável (CD-R)^[60] e também para a produção de células eletroquímicas microfluídicas para injeção em fluxo^[55,61,62]. Os CD's são compostos de uma base de poli(carbonato), um filme metálico de Au (Ag, ou Al) e uma camada polimérica protetora^[63]. Neste caso, uma imagem negativa da geometria dos eletrodos é impressa em uma folha de papel vegetal e transferida para a superfície do CD (já com a camada protetora removida, deixando a camada metálica exposta) com aquecimento e pressão. O toner depositado sobre a superfície metálica define a região dos eletrodos e o excesso de Au pode ser corroído com exposição a uma solução de iodo/iodeto. Após a corrosão, a camada de toner é removida com acetonitrila e os CDtrodos são obtidos^[60-62].

Além das técnicas de impressão direta e transferência térmica, outros avanços vêm sendo alcançados nos últimos anos em trabalhos desenvolvidos nas Instituições mencionadas anteriormente. Para microfabricação, a poli(uretana) (PU) preparada a partir do óleo de mamona foi explorada recentemente para a produção de dispositivos eletroforéticos através do processo de litografia suave, ou moldagem^[44,64]. Outro tipo de PU, derivada de uma resina à base de acrilato, também foi investigada como substrato fotossensível para a produção de dispositivos analíticos para injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica^[52,65].

Com o incentivo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), algumas colaborações internacionais têm proporcionado estágios de doutorado e pós-doutorado no exterior. Através deste incentivo, um intercâmbio entre grupos brasileiros e grupos americanos com destaque na área de microfluídica foi estabelecido e, conseqüentemente,

resultando em publicações em periódicos de grande relevância internacional^[66-70]. Através dessas colaborações, avanços científicos na integração de biossensores em microcanais^[66], adaptação de fenômenos magnéticos a microfluídica^[67] bem como o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos em papel^[69] para experimentos de telemedicina com câmeras de telefones celulares foram recentemente divulgados na literatura.

Essa colaboração internacional vem sendo bastante importante para o avanço desta linha de pesquisa no país e o aperfeiçoamento da capacitação dos recursos humanos. Devido às restrições em termos de infra-estrutura, o desenvolvimento de métodos alternativos vem sendo fundamental para o avanço nessa área no país^[71]. No Brasil, há apenas um laboratório aberto a comunidade científica contendo as instalações básicas necessárias para o desenvolvimento de microssistemas analíticos usando tecnologias convencionais: o Laboratório de Microfabricação (LMF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (<http://www.lnls.br>), localizado na cidade de Campinas (SP). Além da importância em consolidar essas colaborações internacionais, há uma preocupação com a manutenção do acesso às instalações do LNLS para que essa linha de pesquisa não fique restrita às tecnologias alternativas^[71].

1.2. Interações biomoleculares

Atualmente, um dos maiores desafios na era pós-genômica é a busca por uma completa descrição das interações entre moléculas biológicas, ou biomoléculas^[72]. A caracterização de interações entre um ligante e um receptor tem sido o foco dos estudos em novas áreas do conhecimento, como a proteômica e a metabolômica^[73,74]. Há vários métodos para estudar interações entre proteína-proteína, proteína-ácido nucléico, proteína-carboidrato, proteína-lipídio, proteína-solvente, dentre outros. O desafio primário do desenvolvimento destas interfaces para estudos é avaliar algumas propriedades desejáveis tais como,

especificidade, biocompatibilidade e reversibilidade de eventos de ligações como, por exemplo, associação e dissociação do complexo ligante-receptor^[75-76].

Qualquer que seja o método empregado, o objetivo é entender como as forças (de interação) estão envolvidas, ou como elas afetam o sistema experimental utilizado. A análise de um fenômeno de ligação envolve não apenas a verificação da interação, mas também a determinação de alguns parâmetros quantitativos, como constantes de ligação e dissociação, estequiometria, constantes cinética e termodinâmica^[72].

A detecção de uma interação biomolecular ocorre pela transdução de um sinal elétrico resultante à alteração de alguma propriedade física ocorrida na superfície em que o ligante está imobilizado, a qual é proporcional ao acúmulo de massa. O transdutor, neste caso um *biochip* (ou seja, um microdispositivo com uma biomolécula imobilizada), converte o sinal de uma forma energética em um outro sinal com energia diferenciada, cuja magnitude do sinal resultante deve ser mensurável. A transdução desse sinal pode ser conduzida através de diferentes formas energéticas, tais como: elétrica, mecânica, óptica, térmica ou radiante^[77].

1.2.1. Métodos de detecção para interações biomoleculares

O método mais utilizado para monitorar estas interações é a ressonância plasmônica de superfície (SPR)^[78]. Outros sistemas, como o uso de dispositivos de onda acústica na superfície^[79] e a espectroscopia de impedância eletroquímica^[80] surgem como métodos alternativos à SPR. Outra técnica, a tomoscopia de admitância supercapacitiva^[81], foi recentemente proposta para estudos de adsorção biomolecular à superfície. O conceito básico destas técnicas está descrito a seguir, bem como uma descrição do conceito de detecção condutométrica sem contato, cuja aplicação para interações biomoleculares é o foco desta tese.

1.2.1.1. Ressonância plasmônica na superfície (SPR)

O reconhecimento da técnica de SPR, como ferramenta para a caracterização de filmes finos e monitoramento de fenômenos de superfícies em interfaces metálicas, surgiu quando Nylander e Liedberg propuseram seu uso em sensores^[82] e biossensores^[83] para detecção de gases. Atualmente, a técnica de SPR é intensamente explorada para o estudo de interações biomoleculares^[84,85], existindo, inclusive, alguns equipamentos comerciais voltados para este propósito. Dentre estes o mais conhecido é o sistema da BIAcore (Uppsala, Suécia, <http://www.biacore.com>), o qual pode ser encontrado em diferentes versões. Além deste equipamento poderoso e eficiente, outros fabricantes também fornecem equipamentos de SPR para o monitoramento de interações biomoleculares, tais como a Affinity Sensors (Franklin, EUA), Windsor Scientific Ltda (Berks, Reino Unido), Nipon Laser & Electronics (Tokio, Japão), Texas Instruments (Dallas, EUA), a AUTOLAB (Utrecht, Holanda) e a SensiQ (Oklahoma, EUA).

O princípio da SPR baseia-se nas propriedades ópticas e pode ser utilizada para investigação de fenômenos ocorridos na superfície, monitorando o índice de refração^[86]. Alterações nesta propriedade ocorrem tipicamente devido às ligações (*via* adsorção) de uma camada orgânica à uma interface metálica^[83,84,86]. O efeito de SPR é uma oscilação da densidade de carga longitudinal, ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas com sinais opostos, no qual um dos meios é uma superfície metálica e o outro é um dielétrico. O metal deve exibir o comportamento de elétrons livres, sendo o ouro e a prata os metais mais utilizados. Para excitação do plasma, a principal configuração utilizada nos sistemas comerciais é a de reflectância total atenuada, desenvolvida por Kretschmann^[87]. Esta configuração baseia-se no princípio de reflexão interna total (ver Figura 1.4).

Este fenômeno ocorre quando a luz polarizada atravessa um meio denso (por exemplo, o vidro) e atinge uma interface entre este meio e um meio de menor densidade óptica (por

exemplo, ar), sendo refletida de volta para o meio de maior densidade. Embora o feixe incidente seja totalmente refletido internamente, uma componente desta radiação, onda ou campo evanescente, penetra na interface do meio de menor densidade até a distância de um comprimento de onda, 1λ . Em um determinado ângulo de incidência, quando o vetor de onda do componente do plasma na superfície é igual ao vetor da onda do campo evanescente ($K_{sp} = K_{ev}$), uma fração da radiação acopla com os elétrons livres oscilantes (plasma) no metal, ocorrendo a ressonância plasmônica na superfície^[84-86].

Figura 1.4. Configuração de Kretschmann para SPR. A ressonância plasmônica de superfície é excitada na interface metal/ar quando o ângulo de incidência da luz é tal que a componente evanescente do próprio vetor onda (K_{ev}) é igual ao vetor da onda da propagação do plasma de superfície (K_{sp}). Reproduzida da referência 84.

Como consequência dessa ressonância, ocorre uma perda de energia do feixe refletido, a qual pode ser detectada em um arranjo bidimensional de fotodiodos. Os instrumentos de SPR empregam, tipicamente, uma fonte de luz monocromática *p*-polarizada e a interface entre os dois meios opticamente densos é recoberta por um filme fino de Au ou Ag, de espessura menor que um comprimento de onda da luz^[84-86]. O vetor de onda do campo evanescente (K_{ev}) é dado por:

$$K_{ev} = \left(\frac{W_o}{c} \right) \eta_g \sin \theta \quad (\text{Equação 1.1})$$

onde, W_o é a frequência da luz incidente, η_g o índice de refração do meio denso (vidro), θ o ângulo de incidência da luz e c , a velocidade da luz no vácuo. O vetor de onda do plasma de superfície (K_{sp}) pode ser aproximado para:

$$K_{sp} = \left(\frac{W_o}{c} \right) \left[\frac{(\epsilon_m \eta_s)^2}{(\epsilon_m + \eta_s)^2} \right]^{1/2} \quad (\text{Equação 1.2})$$

onde ϵ_m é a constante dielétrica do filme metálico e η_s o índice de refração no meio dielétrico.

O vetor da onda de plasma de superfície é dependente do índice de refração, do meio água/ar acima do metal, o qual pode ser monitorado para a espessura de aproximadamente 300 nm acima da superfície do metal. Se o índice de refração sofre alguma variação, pela adsorção de uma camada biomolecular ou qualquer outra molécula, uma mudança no ângulo de incidência é requerida para que a excitação do plasma ocorra. Através do monitoramento desta propriedade, um perfil de adsorção pode ser obtido em função do tempo usando SPR, assim como o perfil para o efeito de dissociação^[78,84,86].

1.2.1.2. Onda acústica na superfície

O uso de propagação de ondas acústicas para monitorar interações biomoleculares em microdispositivos é uma técnica emergente que surge como ferramenta alternativa frente aos sistemas ópticos. As reações de ligação são detectadas por mudanças na velocidade da onda acústica, causadas principalmente por adsorção de massa ou mudanças de viscosidade na superfície. Os dispositivos de onda acústica têm apresentado sensibilidade similar aos

dispositivos ópticos e, por esse motivo, apresentam-se como sensores alternativos de custo reduzido aos sensores de SPR^[79,88,89]. Embora a utilização de dispositivos acústicos seja mais voltada como sensores para gás, sua aplicação como biossensores começou a despertar interesse da comunidade científica no final do século XX. A microbalança de cristal de quartzo (QCM) é o dispositivo mais utilizado. No entanto, a baixa frequência de operação limita a sensibilidade e, conseqüentemente, a aplicabilidade do sistema. Com a aplicação de altas frequências, a propagação das ondas acústicas pode promover uma alternativa atrativa para o desenvolvimento de biossensores, podendo detectar compostos de interesse clínico como proteínas e anticorpos^[79,88,89].

1.2.1.3. Tomoscopia de admitância supercapacitiva

Uma nova técnica para medir adsorção de biomoléculas à parede de um microcanal foi recentemente descrita por Gamby e colaboradores^[81]. Neste trabalho inovador, um microdispositivo foi desenvolvido contendo uma fina camada dielétrica e dois eletrodos em paralelo em um dos lados, e a superfície modificada quimicamente no lado oposto, no qual ocorre a adsorção das moléculas. Sobre a aplicação de um sinal alternado de alta frequência entre os dois eletrodos, o acoplamento capacitivo é estabelecido na camada dielétrica e a admitância pode ser então monitorada de modo a avaliar as alterações superficiais da interface quimicamente modificada. O princípio de funcionamento baseia-se em um modo de detecção sem contato no qual variações na impedância da superfície são monitoradas^[81]. A técnica foi denominada pelos autores de tomoscopia de admitância supercapacitiva.

Os microcanais foram fabricados em poli(etileno tereftalato) (PET) através do processo de ablação a laser, os quais apresentam um perfil trapezoidal. Para a fabricação dos eletrodos, dois microcanais foram fabricados também por ablação a laser e então preenchidos com tinta de grafite misturada com nanopartículas de ouro de modo a aumentar a

condutividade elétrica. Após a cura do material condutor, o material polimérico foi plastificado termicamente com uma película de PET/poli(etileno) (PE) promovendo a vedação do canal microfluídico. Os experimentos de admitância foram realizados através da aplicação de uma faixa de frequência de 1 kHz a 1 MHz, com amplitude de 3 V. A corrente medida reflete a admitância total do sensor. A adsorção de imunoglobina anti-coelho na superfície do microcanal recoberta com nanopátículas de Au foi usada para mostrar a eficiência deste novo sistema^[81].

A Figura 1.5 apresenta uma seqüência de imagens do microsensor proposto por Gambey e colaboradores^[90]. As Figuras 1.5A e 1.5B mostram uma vista frontal e uma perfil de um corte transversal do dispositivo. O esquema do acoplamento supercapacitivo está apresentado na Figura 1.5C. Os níveis de detectabilidade desta técnica foram consideravelmente melhorados pela utilização de nanofios de Au para modificação dos microcanais^[90], em substituição as nanopátículas. Usando este sistema, com princípios bastante semelhantes ao detector oscilométrico, os autores reportaram um limite de detecção de aproximadamente 6 fmol L^{-1} para anticorpos.

Figura 1.5. Representação de um microsistema usado para monitorar adsorção biomolecular através de admitância supercapacitiva. (A), vista frontal do dispositivo; (B), vista da secção transversal e; (C), esquema do acoplamento supercapacitivo. Reproduzida da referência 81.

1.2.1.4. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

Como um sistema alternativo aos métodos ópticos de detecção, Lasseter e colaboradores^[80] propuseram recentemente o uso da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para detectar interações biomoleculares em microcanais fabricados em PDMS. Neste trabalho, a biotina foi imobilizada diretamente sobre a superfície de um eletrodo de ouro e sua aplicabilidade foi avaliada usando a avidina, num sistema clássico avidina-biotina.

Essa técnica envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema de interesse. A perturbação do sistema é feita mediante a aplicação de um potencial contínuo sobre o qual é superposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude. Este método de aplicação do potencial possibilita que o sistema seja perturbado empregando uma amplitude da ordem de mV, permitindo a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Além disto, é possível perturbar o sistema usando valores de frequência diferentes, uma vez que a onda utilizada é uma onda senoidal^[80,91].

Na EIE surge uma corrente de natureza senoidal como resultado da perturbação aplicada ao sistema. Através do monitoramento das relações entre o potencial aplicado e a corrente, pode-se obter a impedância do sistema e o ângulo de fase, ou melhor, a defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado. O conceito de impedância foi originalmente aplicado para descrever a resposta de sistemas compostos por capacitâncias, resistências e indutâncias. No entanto, este conceito foi estendido para descrever sistemas eletroquímicos, sendo que inúmeros processos podem contribuir para a relação entre o potencial e a corrente do sistema. A partir das medidas da impedância e ângulo de fase é possível avaliar processos como transporte de carga, condutividade de filmes, capacitância redox e de dupla camada, coeficientes de difusão de portadores de carga, entre outros^[91].

No trabalho proposto por Lasseter e colaboradores^[80], os resultados mostraram que a avidina pode ser detectada através deste transdutor elétrico em microcanais de PDMS usando o conceito de EIE. Resumidamente, neste tipo de sistema, a avidina foi detectada em níveis de nanomolar em valores de frequência inferiores a 1 Hz. Para frequências mais elevadas, por exemplo 1 kHz, o sinal não é tão influenciado pela concentração de avidina, mas sim pela composição da solução tampão utilizada. Este fator pode ser explicado pela resistência ôhmica da solução. A EIE também é uma ótima ferramenta para controlar, quimicamente, a funcionalização da superfície de eletrodos para hibridização de DNA^[92].

1.3. Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica)

A detecção condutométrica é, em princípio, um método de detecção universal desde que os analitos forneçam uma diferença de condutividade mensurável em relação ao eletrólito^[41]. A condutância de uma solução (L) é dependente da área do eletrodo (A), da distância entre os eletrodos (l), das concentrações (c_i) de todas as espécies carregadas e de sua condutividade molar (λ_i), de acordo com a Equação 1.3:

$$L = \frac{A}{l} \sum \lambda_i c_i \quad (\text{Equação 1.3})$$

Este tipo de detecção pode ser conduzido por dois modos diferentes: (i) modo com contato e; (ii) modo sem contato. No modo convencional (com contato), os eletrodos são posicionados diretamente em contato com a solução, fato que pode gerar alguns problemas na presença de um campo elétrico, como é o caso das separações eletroforéticas^[41]. Dentre os possíveis problemas, destaca-se a formação de bolhas causadas pela eletrólise e também a degradação do eletrodo. Além disso, a presença de um campo elétrico requer uma proteção adequada do circuito eletrônico do detector para eliminar possíveis interferências elétricas. No

modo sem contato, os eletrodos são posicionados do lado externo de um microcanal ou de um capilar (sem contato com a solução), prevenindo os problemas relacionados ao modo com contato^[41].

Na detecção condutométrica sem contato, ao aplicar um sinal senoidal a um dos eletrodos, uma corrente alternada pode ser acoplada capacitivamente no eletrólito de trabalho e registrada no segundo eletrodo de medida^[42,45]. Isso é possível, porque os eletrodos formam capacitores com a solução eletrolítica utilizada. Estes capacitores são caracterizados pela impedância, X_c , também conhecida como reatância capacitiva, a qual é inversamente dependente da capacitância, C , que é calculada pela Equação 1.4:

$$X_c = \frac{1}{\omega C} \quad (\text{Equação 1.4})$$

sendo que C representa a capacitância, e ω é dado por $(2\pi \times \text{frequência})$.

Como observado na Equação 1.4, quanto maior a frequência de trabalho, menor a reatância capacitiva ou impedância que um capacitor oferece ao fluxo de carga, permitindo que as variações de condutividade da solução no interior do microcanal sejam observadas mesmo com os eletrodos posicionados do lado externo do microcanal.

No modo sem contato, o princípio de funcionamento não é fundamentalmente diferente da detecção condutométrica convencional (com contato). Em ambos os casos, os experimentos são conduzidos com sinais alternados de modo a garantir que as correntes não sejam limitadas pelas reações faradaicas, mas apenas pela concentração e condutividade molar das espécies iônicas presentes na solução^[45], como demonstrado na Equação 1.3.

Devido à presença de uma camada isolante no modo sem contato, as capacitâncias são muito menores do que as capacitâncias da dupla camada dos eletrodos sem o isolamento

elétrico. Deste modo, a frequência de trabalho precisa ser significativamente maior no modo sem contato^[45].

A detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C^4D , *capacitively coupled contactless conductivity detection*) foi aplicada às técnicas de eletromigração no início dos anos 1980 para a determinação isotacoforética de ânions orgânicos e inorgânicos^[93,94]. Em 1998, Zemann e colaboradores^[95] e Fracassi da Silva e do Lago^[96] propuseram, de forma independente, a utilização da C^4D como método de detecção para eletroforese capilar (CE). A partir deste momento, o número de publicações relacionadas à instrumentação e diferentes aplicações com CE- C^4D tem aumentado consideravelmente. Maiores detalhes sobre a fundamentação teórica deste método de detecção podem ser encontrados em alguns artigos de revisão publicados recentemente^[42,45,97-101]. Com o rápido desenvolvimento dos microssistemas aliado à compatibilidade com as técnicas de microfabricação, este método de detecção foi rapidamente implementado no formato miniaturizado no início dos anos 2000^[102-105]. O desenvolvimento histórico da C^4D em sistemas miniaturizados será abordado em detalhes no Capítulo 3.

Em sistemas capilares, os eletrodos são posicionados sobre o capilar formando capacitores cilíndricos, como demonstrado na Figura 1.6. Já em *microchip*, os eletrodos podem ser posicionados no mesmo plano que os microcanais ou fora do plano^[42]. No primeiro caso, os eletrodos precisam ser fabricados necessariamente por processos fotolitográficos^[105]. No modo fora do plano, os eletrodos podem ser fixados sobre a tampa do dispositivo ou na parte inferior da micro-estrutura (base). Esse modo (fora do plano) é vantajoso, pois os eletrodos podem ser confeccionados com fitas adesivas metálicas e fixados em uma das partes constituintes do microssistema. Em ambos os casos, ao contrário dos capilares, os eletrodos foram capacitores planares. A Figura 1.6 apresenta um esquema da integração dos eletrodos para C^4D em capilar e em *microchip*.

Figura 1.6. Representação da configuração convencional dos eletrodos para C^4D em formato capilar e em *microchip*. Os eletrodos e1 e e2 indicam os eletrodos para excitação e registro do sinal resultante, respectivamente.

O circuito equivalente para a C^4D em capilar ou em microchip é similar e está apresentado na Figura 1.7. Este circuito (Fig. 1.7A) consiste de um capacitor para cada eletrodo (C_1 e C_2) e um resistor formado pela solução eletrolítica (R_S) dentro do canal ou no capilar^[45]. Como pode ser observado no circuito equivalente, há uma outra capacitância, denominada capacitância de fuga (C_F), referente ao acoplamento entre os dois eletrodos da cela de detecção. Esta capacitância é indesejada, pois permite um fluxo de corrente contribuindo para a intensidade do sinal absoluto da linha de base que, conseqüentemente, afeta negativamente os limites de detecção. Na prática, o efeito desta capacitância pode ser minimizado usando um plano de terra ou otimizando a frequência de trabalho^[45,101]. As capacitâncias C_1 e C_2 podem ser substituídas pela capacitância equivalente, C_P , a qual refere-se à capacitância da parede do canal na região dos eletrodos. Com essa substituição, o circuito equivalente pode ser simplificado, como mostrado na Figura 1.7B.

Figura 1.7. Circuito equivalente para a C⁴D em capilar ou *microchip* em termos (A) das capacitâncias dos eletrodos (C₁ e C₂) e (B) da capacitância da parede do canal (C_p).

Devido ao formato planar, a capacitância dos eletrodos, em *microchip*, é menor do que as capacitâncias dos eletrodos tubulares utilizados em capilares. Em consequência desse fator, quando comparado aos capilares, a capacitância do acoplamento é menor para os microcanais^[45]. A resposta analítica do detector oscilométrico depende basicamente da diferença de condutividade entre os analitos e o eletrólito utilizado^[101]. Dessa maneira, dependendo da magnitude da condutividade do meio, é possível obter sinais positivos e/ou negativos para as espécies analisadas.

Como mencionado anteriormente, a idéia básica dos sistemas de C⁴D é aplicar um sinal AC com amplitude constante e medir a corrente que flui pela cela de detecção. Desprezando os efeitos da capacitância de fuga, a resposta do detector pode ser explicada em termos do módulo da admitância $|Y|$, como apresentado na Equação 1.5^[101]:

$$|Y| = \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{K}{\kappa}\right)^2 + \frac{1}{4\pi^2 f^2 C_p^2}}} \quad (\text{Equação 1.5})$$

em que K representa a constante da cela, κ é a condutividade, f é a frequência de operação e C_P é a capacitância da parede do canal (na região dos eletrodos), cuja magnitude pode ser calculada pela relação $C_1 C_2 / (C_1 + C_2)$.

Brito-Neto e colaboradores^[101] demonstraram que a admitância varia linearmente com a condutividade quando uma frequência de 5 MHz é aplicada. No entanto esta linearidade não é observada para frequências de 50 ou 500 kHz. Uma interpretação simplificada dos estudos teóricos apresentados pelos autores é que, para baixas condutividades, a admitância da cela é essencialmente uma função da condutividade da solução. Por outro lado, para altas condutividades, a sensibilidade da condutividade da solução é praticamente perdida, pois a admitância é determinada pelas capacitâncias da parede do canal^[101] na região dos eletrodos (C_P).

Além de ser considerado um método de detecção universal^[95-105], a C^4D também é considerada uma técnica não destrutiva^[45] e pode ser acoplada com outros detectores para monitoramento simultâneo. Em sistemas capilares, alguns grupos de pesquisa têm demonstrado a integração de detectores condutométricos com detectores fotométricos^[106], ou detectores de fluorescência^[107]. Em *microchip*, a integração de detectores condutométricos e amperométricos também foi demonstrada, por Wang e Pumera^[108], para análise de compostos neurotransmissores utilizando microssistemas comerciais de vidro.

As vantagens mencionadas ao sistema de detecção oscilométrica refletem diretamente no número de publicações inseridas no banco de dados da *ISI Web of Knowledge*. Como pode ser visualizado na Figura 1.8, há um constante aumento no número de publicações referentes ao método de detecção oscilométrico desde 1998. A pesquisa foi realizada com as seguintes palavras-chaves: *contactless conductivity detection or contactless conductivity detector or oscillometric detector*.

Os resultados obtidos englobam aspectos instrumentais e aplicações deste tipo de detecção em sistemas de eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese em microcanais, além de alguns trabalhos com análise por injeção em fluxo. Independente do tipo de aplicação, um fato que deve ser considerado é o salto no número de artigos a partir de 2001. Esse ponto de inflexão coincide com o início da implementação da C^4D em microssistemas. Em outras palavras, os dados apresentados na Figura 1.8 comprovam que a C^4D é uma ferramenta em expansão na atualidade, assim como os microssistemas analíticos.

Figura 1.8. Evolução do número de publicações com detecção condutométrica sem contato em função do ano. Os dados foram extraídos do banco de dados da *ISI Web of Knowledge* usando as seguintes palavras-chave: *contactless conductivity detection or contactless conductivity detector or oscillometric detector* em 03/07/2008.

1.4. Objetivos gerais

O objetivo principal da tese visa a demonstração que o método de detecção condutométrica sem contato pode ser utilizado como ferramenta para monitorar interações biomoleculares em microssistemas analíticos.

Como observado neste Capítulo introdutório, o tema da tese envolve três assuntos em destaque na Química Analítica Moderna: miniaturização de sistemas analíticos, detecção condutométrica sem contato e interações biomoleculares. Sendo assim, os três capítulos seguintes descreverão toda a evolução instrumental, referente a cada tópico, de modo a comprovar os objetivos propostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] REYES, D. R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P. A.; MANZ, A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2623-2636, 2002.
- [2] AUROUX, P. A.; IOSSIFIDIS, D.; REYES, D. R.; MANZ, A. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2637-2652, 2002.
- [3] VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Recent developments **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 12, p. 3373-3385, 2004.
- [4] DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 3887-3907, 2006.
- [5] WEST, J.; BECKER, M.; TOMBRINK, S.; MANZ, A.; Micro total analysis systems. Latest Achievements. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 12, p. 4403-4419, 2008.
- [6] COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; CARRILHO, E.; DE JESUS, D. P.; DA SILVA, J. A. F.; SILVA, H. D. T.; DO LAGO, C. L. Microssistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1986-2000, 2007.
- [7] GREENWOOD, P. A.; GREENWAY, G. M. Sample manipulation in micro total analysis systems. Trends in Analytical Chemistry, v. 21, n. 11, p. 726-740, 2002.
- [8] FU, L. M.; YANG, R. J.; LEE, G. B.; LIU, H. H. Electrokinetic injection techniques in microfluidic chips. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 19, p. 5084-5091, 2002.
- [9] MA, J. P.; CHEN, L. X.; GUAN, Y. F. Research on electrokinetic pump techniques. **Progress in Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 1826-1831, 2007.
- [10] GUILLO, C.; KARLINSEY, J. M.; LANDERS, J. P. On-chip pumping for pressure mobilization of the focused zones following microchip isoelectric focusing. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 1, p. 112-118, 2007.
- [11] EASLEY, C. J.; KARLINSEY, J. M.; LANDERS, J. P. On-chip pressure injection for integration of infrared-mediated DNA amplification with electrophoretic separation. **Lab on a Chip**, v. 6, n. 5, p. 601-610, 2006.
- [12] TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.
- [13] WANG, W.; ZHOU, F.; ZHAO, L.; ZHANG, J. R.; ZHU, J. J. Measurement of electroosmotic flow in capillary and microchip electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 170, n. 1-2, p. 1-8, 2007.
- [14] HENRY, C. S. **Microchip capillary electrophoresis: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2006. 248 p.
- [15] HATHAWAY, L. J.; BRUGGER, S.; MARTYNOVA, A.; AEBI, S.; MUHLEMANN, K. Use of the agilent 2100 bioanalyzer for rapid and reproducible molecular typing of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45. n. 3, p. 803-809, 2007.
- [16] OSTMAN, P.; JANTTI, S.; GRIGORAS, K.; SAARELA, V.; KETOLA, R. A.; FRANSSILA, S.; KOTIAHO, T.; KOSTIAINEN, R. Capillary liquid chromatography-microchip atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Lab on a Chip**, v. 6, n. 7, p. 948-953, 2006.

- [17] HAAPALA, M.; LUOSUJARVI, L.; SAARELA, V.; KOTIAHO, T.; KETOLA, R. A.; FRANSSILA, S.; KOSTIAINEN, R. Microchip for combining gas chromatography or capillary liquid chromatography with atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 13, p. 4994-4999, 2007.
- [18] HAAPALA, M.; LUOSUJARVI, L.; SAARELA, V.; FRANSSILA, S.; THEVIS, M.; KOTIAHO, T.; KOSTIAINEN, R. Analysis of selective androgen receptor modulators by gas chromatography-microchip atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 1, p. S34-S34, 2008.
- [19] YIN, H. F.; KILLEEN, K. The fundamental aspects and applications of Agilent HPLC-Chip. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 10, p. 1427-1434, 2007.
- [20] WOOLLEY, A. T.; SENSABAUGH, G. F.; MATHIES, R. A. High-speed DNA genotyping using microfabricated capillary array electrophoresis chips. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 19, p. 2181-2186, 1997.
- [21] EMRICH, C. A.; TIAN, H. J.; MEDINTZ, I. L.; MATHIES, R. A. Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 11, p. 5076-5084, 2002.
- [22] HENARES, T. G.; MIZUTANI, F.; HISAMOTO, H. Current development in microfluidic immunosensing chip. **Analytica Chimica Acta**, v. 611, n. 1, p. 17-30, 2008.
- [23] DUFFY, D. C.; GILLIS, H. L.; LIN, J.; SHEPPARD, N. F.; KELLOGG, G. J. Microfabricated centrifugal microfluidic systems: Characterization and multiple enzymatic assays. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 20, p. 4669-4678, 1999.
- [24] CHEN, H.; GU, W.; CELLAR, N.; KENNEDY, R.; TAKAYAMA, S.; MEINERS, J. C. Electromechanical properties of pressure-actuated poly(dimethylsiloxane) microfluidic push-down valves. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 15, p. 6110-6113, 2008.
- [25] LI, M. W.; HUYNH, B. H.; HULVEY, M. K.; LUNTE, S. M.; MARTIN, R. S. Design and characterization of poly(dimethylsiloxane)-based valves for interfacing continuous-flow sampling to microchip electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 1042-1051, 2006.
- [26] LONDE, G.; CHUNDER, A.; WESSER, A.; ZHAI, L.; CHO, H. J. Microfluidic valves based on superhydrophobic nanostructures and switchable thermosensitive surface for lab-on-a-chip (LOC) systems. **Sensors and Actuators B**, v. 132, n. 2, p. 431-438, 2008.
- [27] UNGER, M. A.; CHOU, H. P.; THORSEN, T.; SCHERER, A.; QUAKE, S. R. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 113-116, 2000.
- [28] LONG, Z. C.; SHEN, Z.; WU, D. P.; QIN, J. H.; LIN, B. C. Integrated multilayer microfluidic device with a nanoporous membrane interconnect for online coupling of solid-phase extraction to microchip electrophoresis. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 12, p. 1819-1824, 2007.
- [29] TORIELLO, N. M.; LIU, C. N.; BLAZEJ, R. G.; THAITRONG, N.; MATHIES, R. A. Integrated affinity capture, purification, and capillary electrophoresis microdevice for quantitative double-stranded DNA analysis. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 22, p. 8549-8556, 2007.
- [30] AOKI, N.; MAE, K. Effects of channel geometry on mixing performance of micromixers using collision of fluid segments. **Chemical Engineering Journal**, v. 118, n. 3, p. 189-197, 2006.
- [31] ZHANG, Y.; TIMPERMAN, A. T. Integration of nanocapillary arrays into microfluidic devices for use as analyte concentrators. **Analyst**, v. 128, n. 6, p. 537-542, 2003.

- [32] TSUCHIYA, H.; OKOCHI, M.; NAGAO, N.; SHIKIDA, M.; HONDA, H. On-chip polymerase chain reaction microdevice employing a magnetic droplet-manipulation system. **Sensors and Actuators B**, v. 130, n. 2, p. 583-588, 2008.
- [33] ZHANG, C. S.; XING, D.; LI, Y. Y. Micropumps, microvalves, and micromixers within PCR microfluidic chips: Advances and trends. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 483-514.
- [34] BURNS, M. A.; JOHNSON, B. A.; BRAHMASANDRA, S. N.; HANDIQUE, K.; WEBSTER, J. R.; KRISHNAN, M.; SAMMARCO, T. S.; MAN, P. M.; JONES, D.; MASTRANGELO, C. H.; BURKE, D. T. **Science**, v. 282, n. 5388, p. 484-487, 1998.
- [35] EASLEY, C. J.; KARLINSEY, J. M.; BIENVENUE, J. M.; LEGENDRE, L. A.; ROPER, M. G.; FELDMAN, S. H.; HUGHES, M. A.; HEWLETT, E. L.; MERKEL, T. J.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 51, p. 19272-19277, 2006.
- [36] EASLEY, C. J.; KARLINSEY, J. M.; LANDERS, J. P. On-chip pressure injection for integration of infrared-mediated DNA amplification with electrophoretic separation. **Lab on a Chip**, v. 6, n. 5, p. 601-610, 2006.
- [37] MARCHIARULLO, D. J.; LIM, J. Y.; VAKSMAN, Z.; FERRANCE, J. P.; PUTCHA, L.; LANDERS, J. P. Towards an integrated microfluidic device for spaceflight clinical diagnostics Microchip-based solid-phase extraction of hydroxyl radical markers. **Journal of Chromatography A**, v. 1200, n. 2, p. 198-203, 2008.
- [38] MOGENSEN, K. B.; KLANK, H.; KUTTER, J. P. Recent developments in detection for microfluidic systems. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21, p. 3498-3512, 2004.
- [39] SIKANEN, T.; TUOMIKOSKI, S.; KETOLA, R. A.; KOSTIAINEN, R.; FRANSSILA, S.; KOTIAHO, T. Fully microfabricated and integrated SU-8-based capillary electrophoresis-electrospray ionization microchips for mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 23, p. 9135-9144, 2008.
- [40] JONHNSON, M. E.; LANDERS, J. P. Fundamentals and practice for ultrasensitive laser-induced fluorescence detection in microanalytical systems. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21, p. 3513-1527, 2004.
- [41] VANDERVEER, W. R.; PASAS-FARMER, S. A.; FISCHER, D. J.; FRANKENFELD, C. N.; LUNTE, S. M. Recent developements in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21, p. 3528-3549, 2004.
- [42] PUMERA, M. Contactless conductivity detection for microfluidics: designs and applications. **Talanta**, v. 74, n. 3, p. 358-364, 2007.
- [43] WOOLLEY, A. T.; LAO, K. Q.; GLAZER, A. N.; MATHIES, R. A. Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 684-688, 1998.
- [44] PICCIN, Evandro. **Novas tecnologias para fabricação de microsistemas analíticos e detecção eletroquímica**. 2008. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- [45] KUBÁN, P.; HAUSER, P. C. A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, n. 1, p. 15-29, 2008.
- [46] COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E. Fabrication and integration of planar electrodes for contactless conductivity detection on polyester-toner electrophoresis microchips. **Electrophoresis**, v. 29, n. 11, p. 2260-2265, 2008.

- [47] SILVA, Heron Dominguez Torres da. **Fabricação de microcanais por moldagem em poliéster a partir de matriz de silício e pela utilização de toner como resiste para corrosão de vidro.** 2001. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- [48] SILVA, Heron Dominguez Torres da. **Estratégias de microfabricação utilizando toner para produção de dispositivos microfluídicos.** 2006. 135f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- [49] NEVES, Carlos Antonio. **Desenvolvimento de instrumentação para eletroforese capilar de zona e isotacoforese capilar em microdispositivos de toner-poliéster.** 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- [50] BLANES, Lucas. **Inovações instrumentais em sistemas de eletroforese capilar com detecção eletroquímica e aplicações em análises de mono e oligossacarídeos, aminoácidos e proteínas.** 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- [51] COLTRO, Wendell Karlos Tomazelli. **Fabricação e avaliação de microdispositivos para eletroforese com detecção eletroquímica.** 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- [52] FONSECA, Alexandre. **Construção e avaliação de microssistemas para análise em fluxo.** 2008. 155 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- [53] DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L.; FURLAN, R. Retention of copper(II) metal ions in a silicon-glass microfluidic device. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1531-1536, 2007.
- [54] DE JESUS, D. P.; BLANES, L.; DO LAGO, C. L. Microchip free-flow electrophoresis on glass substrate using laser-printing toner as structural material. **Electrophoresis**, v. 27, n. 24, p. 4935-2942, 2006.
- [55] DANIEL, D.; GUTZ, I. G. R. Microfluidic cell with a TiO₂-modified gold electrode irradiated by an UV-LED for in situ photocatalytic decomposition of organic matter and its potentiality for voltammetric analysis of metal ions. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 3, p. 522-528, 2007.
- [56] DO LAGO, C. L.; DA SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA, J. A. F. A dry process for production of microfluidic devices based on the lamination of laser-printed polyester films. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3853-3858, 2003.
- [57] COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; SILVA, H. D. T.; RICHTER, E. M.; FURLAN, R.; ANGNES, L.; DO LAGO, C. L.; MAZO, L. H.; CARRILHO, E. Electrophoresis microchip fabricated by a direct-printing process with end-channel amperometric detection. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3832-3838, 2004.
- [58] DO LAGO, C. L.; NEVES, C. A.; de JESUS, D. P.; DA SILVA, H. D. T.; BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA, J. A. F. Microfluidic devices obtained by thermal toner transferring on glass substrate. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3825-3831, 2004.
- [59] COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L.; CARRILHO, E. A toner-mediated lithographic technology for rapid prototyping of glass microchannels. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 7, p. 931-934, 2007.
- [60] 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. **Electrochemistry Communications**, v. 5, n. 9, p. 782-786, 2003.

- [61] DANIEL, D.; GUTZ, I. G. R. Microfluidic cells with interdigitated array gold electrodes: Fabrication and electrochemical characterization. **Talanta**, v. 68, n. 2, p. 429-436, 2005.
- [62] DANIEL, D.; GUTZ, I. G. R. Electronic micropipettor: A versatile fluid propulsion and injection device for micro-flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 571, n. 2, p. 218-227, 2006.
- [63] ANGNES, L.; RICHTER, E. M.; AUGELLI, M. A.; KUME, G. H. Gold electrodes from recordable CDs. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 21, p. 5503-5506, 2000.
- [64] PICCIN, E.; COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; CLARO-NETO, S.; CARRILHO, E. Polyurethane from biosource as a new material for fabrication of microfluidic devices by rapid prototyping. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, n. 1-2, p. 151-158, 2007.
- [65] FONSECA, A.; RAIMUNDO, I. M.; ROKWEDDER, J. J. R.; FERREIRA, L. O. S. Construction and evaluation of a flow injection micro-analyser based on urethane-acrylate resin. **Analytica Chimica Acta**, v. 603, n. 2, p. 159-166, 2007.
- [66] BLANES, L.; MORA, M. F.; DO LAGO, C. L.; AYON, A.; GARCIA, C. D. Lab-on-a-chip biosensor for glucose based on a packed immobilized enzyme reactor. **Electroanalysis**, v. 19, n. 23, p. 2451-2456, 2007.
- [67] PICCIN, E.; LAOCHAROENSUK, R.; BURDICK, J.; CARRILHO, E.; WANG, J. Adaptive nanowires for switchable microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 12, p. 4720-4723, 2007.
- [68] DOSSI, N.; PICCIN, E.; BONTEMPELLI, G.; CARRILHO, E.; WANG, J. Rapid analysis of azo-dyes in food by microchip electrophoresis with electrochemical detection. **Electrophoresis**, v. 28, n. 22, p. 4240-4246, 2007.
- [69] MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S. W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G.M. Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3699-3707, 2008.
- [70] COLTRO, W. K. T.; LUNTE, S. M.; CARRILHO, E. A comparison of the analytical performance of electrophoresis microchannels fabricated in glass, poly(dimethylsiloxane) and polyester-toner. **Electrophoresis**, v. 29, 2008. In press.
- [71] COLTRO, W. K. T., CARRILHO, E. Low-cost technologies for microfluidic applications. In: LANDERS, J. P. (Ed.). **Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. 3 ed. New York: CRC, 2007. p. 1169-1184.
- [72] HE, X.; DING, Y.; LI, D.; LIN, B. Recent advances in the study of biomolecular interactions by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 4-5, p. 697-711, 2004.
- [73] PALLANDRE, A.; LAMBERT, B.; ATTIA, R.; JONAS, A. M.; VIOVY, J. Surface treatment and characterization: Perspectives to electrophoresis and lab-on-chips. **Electrophoresis**, v. 27, n. 3, p. 584-610, 2006.
- [74] KRENKOVÁ, J.; FORET, F. Immobilized microfluidic enzymatic reactors. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3550-3563, 2004.
- [75] CHOI, H. J.; KIM, N. H.; CHUNG, B. H.; SEONG, G. H. Micropatterning of biomolecules on glass surfaces modified with various functional groups using photoactivatable biotin. **Analytical Biochemistry**, v. 347, n. 1, p. 60-65, 2005.
- [76] WILCHEK, M.; BAYER, E. A.; LIVNAH, O. Essentials of biorecognition: The (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. **Immunology Letters**, v. 103, n. 1, p. 27-32, 2006.

- [77] LAMBRECHTS, M.; SANSEN, W. **Biosensors**: microelectrochemical devices. New York: IOP. 1992, 304 p.
- [78] WHELAN, R. J.; WOHLAND, T.; NEUMANN, L.; HUANG, B.; KOBILKA, B. K.; ZARE, R. N. Analysis of bimolecular interactions using a miniaturized surface plasmon resonance sensor. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 17, 4570-4576, 2002..
- [79] GIZELI, E.; GLAD, J. Single-step formation of a biorecognition layer for assaying histidine-tagged proteins. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 14, p. 3995-4001, 2004.
- [80] LASSETER, T. L.; CAI, W.; HAMERS, R. J. Frequency-dependent electrical detection of protein binding events. **Analyst**, v. 129, n. 1, p. 3-8, 2004.
- [81] GAMBY, J.; ABID, J.; GIRAULT, H. H. Supercapacitive admittance tomography. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 38, p. 13300-13304, 2005.
- [82] NYLANDER, C.; LIEBERG, B.; LIND, T. Gas-detection by means of surface-plasmon resonance. **Sensors and Actuators B**, v. 3, n. 1, p. 79-88, 1982.
- [83] LIEBERG, B.; NYLANDER, C.; LUNDSTROM, I. Biosensing with surface-plasmon resonance - how it all started. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10, n. 8, p. R1-R9, 1995.
- [84] DE CARVALHO, R. M.; RATH, R.; KUBOTA, L. T. SPR – uma nova ferramenta para biossensores. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 97-104, 2003.
- [85] MORGAN, H.; TAYLOR, D. M. A surface-plasmon resonance immunosensor based on the streptavidin biotin complex. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 7, n. 6, p. 405-410, 1992.
- [86] TUMOLO, T.; ANGNES, L.; BAPTISTA, M. S. Determination of the refractive index increment (dn/dc) of molecule and macromolecule solutions by surface plasmon resonance. **Analytical Biochemistry**, v. 333, n. 2, p. 273-279, 2004.
- [87] KRETSCHMANN, E.; KROGER, E. Reflection and transmission of light by a rough surface, including results for surface-plasmon effects. **Journal of the Optical Society of America**, v. 65, n. 2, p. 150-154, 1975.
- [88] GIZELI, E. Study of the sensitivity of the acoustic waveguide sensor. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 24, p. 5967-5972, 2000.
- [89] GIZELI, E.; LOWE, C.R.; LILEY, M.; VOGEL, H. Antibody binding to a functionalized supported lipid layer: A direct acoustic immunosensor. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 23, p. 4808-4813, 1997.
- [90] GAMBY, J.; ABID, J. P.; ABID, M.; GIRAULT, H. H. Nanowires network for biomolecular detection using contactless impedance tomography technique. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 15, p. 5289-5295, 2006.
- [91] DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)ssensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.
- [92] PAN, S.; ROTHBERG, L. Chemical control of electrode functionalization for detection of DNA hybridization by electrochemical impedance spectroscopy. **Langmuir**, v. 21, n. 3, p. 1022-1027, 2005.
- [93] GAS, B.; DEMJANENKO, M.; VACÍK, J. High-frequency contactless conductivity detection in isotachopheresis. **Journal of Chromatography**, v. 192, n. 2, p. 253-257, 1980.
- [94] VACÍK, J.; ZUSKA, J.; MUSELASOVÁ, I. Improvement of the performance of a high-frequency contactless conductivity detector for isotachopheresis. **Journal of Chromatography**, v. 320, n. 1, p. 233-239, 1985.

- [95] ZEMANN, A. J.; SCHNELL, E.; VOLGGER, D.; BONN, G. K. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 563-567, 1998.
- [96] DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4339-4343, 1998.
- [97] KUBÁN, P.; HAUSER, P. C. Contactless conductivity detection in capillary electrophoresis: A review. **Electroanalysis**, v. 16, n. 24, p. 2009-2021, 2004.
- [98] KUBÁN, P.; HAUSER, P. C. Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part I: Frequency behavior and cell geometry. **Electrophoresis**, v. 25, n. 20, p. 3387-3397, 2004.
- [99] KUBÁN, P.; HAUSER, P. C. Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part II: Signal-to-noise ratio and stray capacitance. **Electrophoresis**, v. 25, n. 20, p. 3398-3405, 2004.
- [100] BRITO-NETO, J. G.; DA SILVA, J. A. F.; BLANES, L.; DO LAGO, C. L. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1198-1206, 2005.
- [101] BRITO-NETO, J. G.; DA SILVA, J. A. F.; BLANES, L.; DO LAGO, C. L. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1207-1214, 2005.
- [102] GUIJT, R. M.; BALTUSSEN, E.; VAN DEN STEEN, G.; FRANK, J.; BILLIET, H. A. H.; SCHALKHAMMER, T.; LAUGERE, F.; VELLEKOOP, M. J.; BERTHOLD, A.; SARRO, P. M.; VAN DEDEM, G. W. K. Capillary electrophoresis with on-chip four-electrode capacitively coupled conductivity detection for application in bioanalysis. **Electrophoresis**, v. 22, n. 12, p. 2537-2541, 2001.
- [103] LAUGERE, F.; LUBKING, G. W.; BASTEMEIJER, J.; VELLEKOOP, M. J. Design of an electronic interface for capacitively coupled four-electrode conductivity detection in capillary electrophoresis microchip. **Sensors and Actuators B**, v. 83, n. 1-3, p. 104-108, 2002.
- [104] PUMERA, M.; WANG, J.; OPEKAR, F.; JELÍNEK, I.; FELDMAN, J.; LÖWE, H.; HARDT, S. Contactless conductivity detector for microchip capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 9, p. 1968-1971, 2002.
- [105] LICHTENBERG, J.; ROOIJ, N. F.; VERPOORTE, E. A microchip electrophoresis system with integrated in-plane electrodes for contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 23, n. 21, p. 3769-3780, 2002.
- [106] NOVOTNY, M.; OPEKAR, F.; JELÍNEK, I.; STULIK, K. Improved dual photometric-contactless conductometric detector for capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 525, n. 1, p. 17-21, 2004.
- [107] TAN, F.; YANG, B. C.; GUAN, Y. F. Simultaneous light emitting diode-induced fluorescence and contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. **Analytical Sciences**, v. 21, n. 5, p. 583-585, 2005.
- [108] WANG, J.; PUMERA, M. Dual conductivity/amperometric detection system for microchip capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 23, p. 5919-5923, 2002.

Capítulo 2

Comparação do Desempenho Analítico de Microssistemas

Fabricados em PDMS, Vidro e Poliéster-Toner

2.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a aplicação de microssistemas de eletroforese (MSE) em laboratórios de química analítica e bioanalítica vêm crescendo significativamente nos últimos anos^[1-5]. Estes dispositivos apresentam algumas vantagens sobre a instrumentação convencional de eletroforese capilar (CE), incluindo o consumo reduzido de amostra e eletrólito, tempo de análise inferior, auto processamento da amostra e maiores eficiências de separação^[1,2]. Quando comparado com CE convencional, valores de potenciais elétricos de menor magnitude são aplicados em MSE devido ao menor comprimento dos microcanais utilizados para separação. Isso torna possível o uso de fontes de alta tensão miniaturizadas^[1-3], com potenciais de até 5 kV, possibilitando o desenvolvimento de microssistemas portáteis. Os MSE podem ser fabricados em uma grande variedade de materiais (substratos), usando tecnologias fotolitográficas convencionais bem como métodos alternativos para prototipagem rápida^[1-5].

O vidro é o substrato mais popular utilizado na fabricação de MSE. Essa popularidade deve-se à similaridade da superfície do vidro com a superfície dos capilares de sílica fundida^[6-8]. Além disso, o vidro apresenta outras vantagens para aplicação em sistemas microfluídicos, incluindo transparência óptica alta, isolamento elétrico adequado e reatividade química baixa. Convencionalmente, os dispositivos de vidro são fabricados através de processos fotolitográficos combinados com corrosão química em *via* úmida^[4-11]. Algumas desvantagens estão relacionadas com o custo final e a dificuldade de fabricação. A produção destes dispositivos requer o acesso a salas limpas e o manuseio de soluções ácidas altamente corrosivas como o ácido fluorídrico (HF), por exemplo^[5,10]. Adicionalmente, a técnica de selagem térmica, que é freqüentemente utilizada para promover a vedação dos microcanais em vidro, é laboriosa, requer temperaturas elevadas (~ 550 – 650 °C) e apresenta repetibilidade baixa^[5].

As desvantagens relacionadas à fabricação de microssistemas em vidro têm estimulado a investigação de materiais alternativos. Em especial, a produção de dispositivos microfluídicos em substratos poliméricos vem conferindo considerável interesse devido à sua biocompatibilidade, flexibilidade, custo reduzido e facilidade de fabricação^[12-15]. Além disso, um grande número de microdispositivos pode ser fabricado usando um único molde e a produção destas réplicas não requer ambiente limpo nem a necessidade de temperaturas elevadas para promover a selagem. Essas vantagens permitiram que de vários grupos de pesquisa introduzissem MSE em suas linhas de pesquisa^[12-15].

Atualmente, a fabricação de MSE pode ser realizada em uma variedade de polímeros incluindo o poli(metil metacrilato) (PMMA)^[16-18], poli(carbonato) (PC)^[19,20], poli(etileno tereftalato) (PET)^[21], poliéster termo-sensível^[22,23], poliéster-toner (PT)^[24-26], poli(uretana) (PU)^[27], polímero termoplástico à base de olefina de estrutura amorfa (TOPAS)^[28] e o poli(dimetilsiloxano) (PDMS)^[29-33]. Os microcanais poliméricos podem ser fabricados através de processos convencionais ou alternativos como ablação a laser^[34], litografia suave^[27,29-33], litografia por impressão^[35], estampagem a quente^[15,20], moldagem por injeção^[36] e impressão direta^[24-26,37]. Informações adicionais a respeito das tecnologias de microfabricação podem ser encontradas em artigos de revisão publicados recentemente, os quais apresentam, em detalhes, os processos convencionais^[5,9,12].

Dentre os materiais poliméricos, o PDMS é o substrato mais utilizado para aplicações microfluídicas^[15,33]. Este material é elastomérico, barato, possui boa transparência óptica e pode ser também usado para construir válvulas e bombas^[32,38]. Outra vantagem significativa do PDMS é sua capacidade de selagem contra qualquer superfície plana, reversível ou irreversivelmente, sem distorção dos canais resultantes. Um elemento essencial para a prototipagem de microcanais em PDMS é a produção de um molde contendo a configuração desejada em alto relevo. Este molde pode ser fabricado em fotorresiste (como o SU-8, por

exemplo), silício ou níquel^[29,32]. As desvantagens do PDMS incluem sua característica hidrofóbica, a qual pode levar à adsorção dos analitos e à difusão de oligômeros não polimerizados na parede do canal, os quais acarretam na alteração do fluxo eletrosmótico em função do tempo^[29,32]. Em geral, a eficiência da separação analítica neste material é inferior à eficiência obtida em microssistemas fabricados em vidro^[39].

De todas as tecnologias de microfabricação, o processo de impressão direta é o mais simples, o mais rápido e o mais barato para a obtenção de dispositivos microfluídicos^[24-26,37]. Como descrito no Capítulo 1, este processo baseia-se na impressão direta de dispositivos em uma folha de transparência (filme de poliéster) usando uma impressora laser. Durante a impressão, uma camada fina de toner é depositada sobre o filme de poliéster, sendo que a região microfluídica é definida por linhas brancas (região sem toner). O dispositivo impresso é então laminado contra um filme de poliéster branco (sem toner), ou contra uma imagem especular do dispositivo, produzindo dispositivos com uma camada simples de toner (CST) ou com uma camada dupla de toner (CDT). Desse modo, canais com altura de $6 \pm 1 \mu\text{m}$ ou $12 \pm 2 \mu\text{m}$ são obtidos para CST ou CDT, respectivamente. O acesso aos microcanais é obtido com a perfuração de orifícios na região dos reservatórios com um perfurador de papel^[24,25,37]. Este método simples e barato vem sendo usado para fabricar MSE em PT com detecção eletroquímica integrada^[24-26,40]. Técnicas de microfabricação usando a impressão direta em um ou mais estágios vêm sendo empregadas para a produção de dispositivos para mistura de soluções^[41], moldes de toner para prototipagem de microcanais poliméricos^[42-44], microssistemas em vidro-toner^[45,46], vidro-vidro^[47] e microeletrodos usando discos compactos graváveis (CD-R)^[25,48-50], como fonte metálica de custo reduzido.

2.1.1. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho visa o estudo comparativo do desempenho analítico de microcanais eletroforéticos fabricados em PT com o desempenho de outros substratos convencionais, como o vidro, PDMS (nativo e oxidado) e dispositivos híbridos de PDMS/vidro. Os dispositivos em PT têm proporcionado uma alta potencialidade para MSE e apresentam várias vantagens sobre os substratos convencionais em termos de custo, tempo de fabricação e, principalmente, instrumentação necessária para microfabricação. Por esse motivo, uma comparação direta dos chips em PT com os materiais convencionais é necessária de modo que pesquisas futuras possam ser conduzidas com o conhecimento amplo das características eletroforéticas deste substrato. Para realizar uma comparação precisa entre os substratos, todos os tipos de microcanais foram fabricados com dimensões similares. Para o estudo comparativo, a detecção por fluorescência induzida a laser (LIF, *laser-induced fluorescence*) foi utilizada para evitar qualquer perda em eficiência devido à configuração do detector. Os parâmetros eletroforéticos como fluxo eletrosmótico (EOF), dissipação de calor, repetibilidade de injeção eletrocinética, eficiência de separação e a contribuição da parede do canal para o alargamento da zona eletroforética foram estudados.

Secundariamente, esse o desenvolvimento deste trabalho tem como objetivo escolher a melhor plataforma para confecção de dispositivos biomoleculares com eletrodos integrados para detecção condutométrica sem contato. Neste caso, a etapa de selagem é bastante crítica de modo a evitar a danificação do material metálico bem como a degradação do material biológico imobilizado. A construção dos dispositivos biomoleculares será detalhada no Capítulo 4, levando em consideração os resultados analíticos descritos neste Capítulo.

2.2. EXPERIMENTAL

2.2.1. Materiais, amostras e reagentes

Os substratos de vidro (10 cm × 10 cm), do tipo *soda-lime*, revestidos com camadas de cromo (50 nm) e fotorresiste positivo (AZ 1500) (1 µm) foram adquiridos da Telic (Santa Mônica, CA) enquanto os substratos de silício (diâmetro de 10 cm) e o *kit* polimérico Sylgard 184 foram obtidos da Silicon Inc (Boise, ID) e Ellsworth Adhesives Co. (Germantown, WI), respectivamente. O fotorresiste negativo (SU-8) e a solução reveladora (SU-8 *developer*) foram comprados da Microchem Corporation (Newton, MA). A solução reveladora do fotorresiste positivo (AZ *developer*) foi adquirida junto a Clariant Corporation (Sommerville, MA). Os filmes de transparência (modelo CG 3300) e o cartucho de toner (modelo Q2612A) foram obtidos junto a 3M (São Paulo, Brasil) e a Hewlett Packard (Palo Alto, CA), respectivamente. As brocas de ponta diamantada, para perfuração das placas de vidro, e a resina epóxi (J-B Weld), para fixação de reservatórios, foram compradas na Ace Hardware (Lawrence, KS).

A solução de HF tamponada com fluoreto de amônio (NH₄F) e a solução para corrosão da camada de cromo foram adquiridas junto a Fox Scientific (Alvarado, TX). Hidróxido de sódio, ácido bórico e borato de sódio foram compradas da Sigma Co. (St. Louis, MO). Os fluoróforos: fluoresceína de sódio e cumarina 519 (Kodak Eastman Fine Chemicals, Nova Iorque, NY) foram doadas pelo grupo do Prof. Craig Lunte (Universidade do Kansas). Ácido sulfúrico, peróxido de hidrogênio 30% e hidróxido de amônio foram adquiridos junto à Fisher Scientific Co. (Pittsburgh, OH). A solução tamponante de ácido bórico/borato de sódio 20 mmol L⁻¹, pH 9,0, foi preparada semanalmente em água deionizada (resistividade de 18 MΩ cm) e filtrada em membranas descartáveis com diâmetro de 0,45 µm. As soluções estoque de fluoresceína e cumarina (5 mmol L⁻¹ cada) foram preparadas diariamente em água e acetona, respectivamente.

2.2.2. Processos de microfabricação

Para o estudo comparativo do desempenho analítico dos diferentes substratos (vidro, PDMS e PT), os MSE foram fabricados com um formato geométrico na forma de uma cruz, como apresentado na Figura 2.1. A configuração dos microssistemas foi desenvolvida usando o *software* gráfico Corel Draw versão 11.0. Para a fabricação de microcanais em vidro e PDMS, a geometria foi impressa em uma folha de transparência de alta resolução (8000 *dpi*) em uma gráfica local (Laser Graphics Co., Lawrence-KS, EUA). Essa transparência de alta resolução foi usada como máscara no processo fotolitográfico. Para a fabricação de microcanais em PT, a geometria do dispositivo foi impressa diretamente sobre um filme de poliéster usando uma impressora laser modelo 1100 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) com resolução de 600 *dpi*.

Para todos os processos, a máscara foi preparada com quatro réplicas do dispositivo. Substratos de vidro e de silício foram usados para fabricar quatro dispositivos cada (vidro e PDMS), enquanto uma folha de poliéster, tamanho A4, foi usada para imprimir 12 dispositivos em uma única impressão.

Figura 2.1. Geometria do microdispositivo utilizado para avaliação do desempenho analítico dos substratos diferentes. A projeção foi a mesma para todos os tipos de materiais. Os pontos 1, 2, 3 e 4 representam os reservatórios para soluções de descarte da amostra, amostra, tampão e descarte do tampão, respectivamente. A Figura representa a imagem negativa do dispositivo impressa no fotolito. Ao longo do canal de separação algumas linhas (marcas) foram adicionadas para facilitar o alinhamento do feixe do laser com o ponto de detecção.

2.2.2.1. Fabricação de microcanais em vidro

Os microcanais em vidro foram fabricados a partir de fotolitografia convencional^[11,51], cujo processo está esquematizado na Figura 2.2. Os substratos de vidro foram adquiridos comercialmente já revestidos com uma camada metálica de Cr e uma camada de fotorresiste positivo AZ-1500 (I). A máscara contendo quatro dispositivos idênticos foi colocada sobre o substrato e exposto à radiação UV durante 15 s (II). A região exposta foi então revelada (III) usando uma solução reveladora do fotorresiste AZ-1500 por 3 min e, em seguida, lavada com água deionizada (III). Após a lavagem, o substrato foi aquecido a 95 °C durante 10 min. Após esse tratamento térmico, a camada de Cr foi corroída com uma solução corrosiva durante 2 min para deixar a superfície de vidro exposta (IV). O vidro foi então corroído (V) com a solução de HF-NH₄F, com agitação contínuo, durante 35 min. De modo a evitar a precipitação de cristais de NaF, MgF₂ ou CaF₂ o substrato foi lavado, a cada 5 min, com solução de HCl 10%^[11]. A evolução do processo de corrosão foi acompanhada com medidas de perfilometria.

Após a corrosão, a máscara usada (Cr/AZ-1500) foi removida usando acetona e a solução corrosiva de Cr. Após esta etapa, obteve-se o perfil semi-circular do microcanal corroído no substrato de vidro (VI). Antes da etapa de selagem, a tampa do dispositivo foi perfurada usando uma ferramenta Dremel[®] com brocas diamantadas com diâmetro de 0,75 mm. Após a perfuração, a tampa e o substrato contendo os canais foram rigorosamente limpos em uma solução piranha (H₂SO₄:H₂O₂, 7:3) por 30 min, de modo a remover qualquer impureza orgânica. Além da solução piranha, as placas de vidro também foram colocadas em uma outra solução composta de H₂O, H₂O₂ e NH₄OH (5:2:2) durante 30 min. Em seguida, as duas placas foram lavadas com água e secas com N₂. Finalmente, os dois substratos foram colocados em contato e algumas gotas de água foram adicionadas para promover uma aderência inicial das duas peças até serem colocadas no forno (Fisher Scientific Isotemp) para

promover a vedação. O programa de temperatura usado para selagem térmica foi composto de cinco etapas, como demonstrado na Figura 2.3. Inicialmente, o forno foi aquecido até 500 °C, numa taxa de 10 °C/min, e então mantido por 30 min. Em seguida, a temperatura foi elevada para 580 °C, a 2 °C/min, e mantida por 1 h. Na sequência, a temperatura foi elevada até 630 °C, a 2 °C/min, e mantida por 5 h. Após etapa laboriosa de aquecimento, o forno foi resfriado para 450 °C, a 2 °C/min, e finalmente para 25 °C, numa taxa de 10 °C/min^[11]. Depois da etapa de selagem térmica, a base de ponteiros de pipetadores de 100 µL foram colados, com resina epóxi, sobre o dispositivo para formar reservatórios para as soluções.

Figura 2.2. Processo de fabricação dos canais em vidro. I, substrato revestido com camada de Cr e fotorresiste AZ-1500; II, posicionamento da máscara e exposição à radiação UV; III, revelação da imagem gravada; IV, corrosão da camada de Cr na geometria fotogravada; V, corrosão do vidro com HF-NH₄F; VI, obtenção do canal com perfil semi-circular e; VII, obtenção do dispositivo final após selagem térmica.

Figura 2.3. Programação de temperatura utilizado na selagem térmica dos canais em vidro.

2.2.2.2. Fabricação de microcanais em PDMS

Os microcanais de PDMS foram fabricados através do processo de litografia suave (ou moldagem), usando um molde definido em SU-8 sobre um substrato de silício^[52,53]. A Figura 2.4 apresenta a etapa de fabricação do molde e a prototipagem de canais em PDMS. Inicialmente, o substrato de silício (I) foi limpo com álcool isopropílico e em seguida recoberto com uma camada de SU-8 (fotorresiste negativo) usando *spin-coating* (II). A velocidade do *spinner* e o tempo de rotação foram 2500 *rpm* e 20 s, respectivamente. Antes da exposição à radiação UV, o SU-8 foi submetido a um tratamento térmico a 95 °C durante 5 min para remoção do excesso de solvente. Em seguida, o substrato com a camada de SU-8 foi exposto à radiação UV durante 45 s (III). Após a exposição, o substrato foi submetido a outra etapa de tratamento térmico a 95 °C durante 5 min. A região do SU-8 protegida da radiação UV foi removida na etapa de revelação (IV), obtendo assim a estrutura microfluídica em alto relevo (molde). O elastômero (Sylgard 184) e o catalisador foram misturados na proporção de 10:1 (m:m) e adicionados/despejados sobre o molde (V). A cura (polimerização) do material foi obtida a 70 °C durante 2 h. Após a etapa de cura, o PDMS foi desmoldado do molde de SU-8, similarmente a uma etapa de decalcagem (VI).

Figura 2.4. Processo de fabricação de um molde em SU-8 e prototipagem de microcanais em PDMS. I, substrato de silício; II, deposição de uma camada de SU-8 sobre o substrato usando *spin-coating*; III, etapa de fotogração da geometria do molde sobre o SU-8; IV, revelação da imagem gravada e obtenção do molde; V, moldagem da estrutura microfluídica em material elastomérico; VI, desmoldagem e obtenção de microcanais poliméricos.

Os canais fabricados em PDMS foram selados contra três tipos de superfícies: PDMS nativo, PDMS oxidado *via* plasma de O₂ e vidro. No caso do PDMS nativo, os canais moldados foram selados reversivelmente contra uma base lisa (sem canais) de PDMS através do contato direto entre as duas superfícies. O mesmo procedimento foi utilizado para vedar os canais contra uma placa de vidro devidamente limpa, produzindo assim um dispositivo híbrido de PDMS/vidro. Em ambos os casos, a selagem reversível foi promovida através de interações de van der Waals. Para obter uma selagem irreversível, os canais de PDMS e uma base lisa de PDMS foram colocados em um sistema de plasma de O₂ (*plasma cleaner*, PDG-32G) e oxidados durante 150 s. Após a oxidação, as duas peças foram colocadas em contato (sem aplicação de pressão) e uma selagem extremamente forte foi obtida devido à formação de uma ligação Si-O-Si.

2.2.2.3. Fabricação de microcanais em poliéster-toner

Os microcanais de PT foram fabricados através do processo de impressão direta^[24,25], como demonstrado na Figura 2.5. Nesse processo, a geometria desenhada no *software* gráfico é depositada diretamente sobre um filme de poliéster (I) com de uma impressora laser. A camada de toner define a profundidade dos microcanais (II). Neste trabalho, micro-estruturas com CDT foram fabricadas. Para esta finalidade, os canais impressos foram alinhados (III) contra uma imagem especular e laminados em uma plastificadora de documentos para promover a selagem da estrutura (IV). Antes da laminação, orifícios para acesso aos microcanais foram confeccionados com auxílio de um perfurador de papel. Após a selagem, a base de ponteiros de pipetadores foi utilizada para formar reservatórios de soluções. Estes reservatórios foram colados usando uma resina epóxi.

Figura 2.5. Fabricação de microcanais em poliéster-toner. I, filme de poliéster; II, microcanais impressos, com uma camada de toner (a); III, alinhamento do filme impresso contra uma imagem especular perfurada; IV, laminação dos dois filmes e; V, dispositivo final contendo reservatórios para soluções colados na superfície.

2.2.3. Procedimentos eletroforéticos

2.2.3.1. Pré-condicionamento dos microcanais

Antes do uso, os microcanais fabricados nos materiais diferentes, exceto os chips de PT, foram tratados com a lavagem com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão por 15 min cada. De modo a evitar a formação de bolhas, os canais em PDMS sem oxidação (nativo) foram primeiramente preenchidos com álcool isopropílico. Em seguida, estes canais também foram lavados com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão, como descrito acima. As etapas de lavagem foram realizadas com a aplicação de vácuo no reservatório de descarte do tampão. Para os chips de PT, a solução tampão foi adicionada a um reservatório e os canais foram preenchidos por capilaridade. A mesma solução foi adicionada aos demais reservatórios e os canais foram lavados eletrocineticamente durante 5 min até a estabilização da corrente eletroforética.

Depois da etapa de pré-condicionamento, o tampão no reservatório da amostra foi substituído pela solução da amostra (para todos os tipos de dispositivos). Todos os reservatórios foram preenchidos com o mesmo volume ($50 \text{ }\mu\text{L}$), e os experimentos eletroforéticos foram realizados em temperatura ambiente.

2.2.3.2. Transporte eletrocinético

O transporte eletrocinético do fluido foi realizado com uma fonte de alta tensão miniaturizada contendo quatro canais paralelos (Jenway, Essex, Inglaterra). O controle eletrocinético foi realizado com auxílio de um computador portátil. Eletrodos de platina foram colocados nos reservatórios dos MSE e conectados à fonte. As injeções eletrocinéticas foram realizadas usando um procedimento denominado de *gated*, o qual envolve um protocolo de três etapas, como exemplificado na Tabela 2.1 e ilustrado na Figura 2.6.

Inicialmente, o fluxo foi estabelecido pela aplicação de 1200 V no reservatório da amostra e 1800 V no reservatório do tampão mantendo, simultaneamente, os reservatórios de descarte aterrados (Fig. 2.6 I). Para introduzir zonas de amostras dentro do canal de separação, o potencial aplicado no reservatório do tampão foi desligado por um intervalo de tempo de 1 s (Fig. 2.6 II). Depois da injeção, os potenciais iniciais foram aplicados novamente e o fluxo foi reestabelecido (Fig. 2.6 III). O tempo da etapa III foi alterado de acordo com a magnitude do fluxo eletrosmótico. Para um melhor entendimento deste modo de injeção, a Figura 2.6 apresenta as etapas do controle eletrocinético (I, II e III) e as respectivas imagens capturadas (IV, V e VI) em um microscópio de fluorescência equipado com uma câmera CCD (*charge-coupled device*).

Tabela 2.1. Representação das etapas do controle eletrocinético (modo *gated*) e os potenciais aplicados em cada reservatório do MSE.

Etapas	Tempo	Reservatório 1	Reservatório 2	Reservatório 3	Reservatório 4
I	15 s	Terra	1200 V	1800 V	Terra
II	1 s	Terra	1200 V	0 V	Terra
III	90 s	Terra	1200 V	1800 V	Terra

Figura 2.6. Representação do controle eletrocinético (modo *gated*) aplicado nos MSE. A etapa I indica o esquema para estabelecimento do fluxo com a aplicação de valores de potenciais nos reservatórios 2 e 3 (indicados por AT1 e AT2). A etapa II apresenta a introdução da zona de amostra (representada pela cor vermelha) no canal de separação ao manter o potencial do reservatório 3 desligado. A etapa III ilustra o reestabelecimento do fluxo com a introdução de um volume de amostra (ver destaque em vermelho) na direção do detector. As imagens IV, V e VI apresentam imagens de fluorescência para demonstrar as etapas I, II e III em MSE de PT. Para obtenção das imagens, uma solução de fluoresceína $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi utilizada. Os valores dos potenciais elétricos foram aqueles indicados na Tabela 2.1.

2.2.4. Detecção por fluorescência induzida a laser

A detecção por LIF foi realizada usando um laser de He-Cd (Kimmon, Englewood, CO, EUA) com excitação em 442 nm e emissão em 490 nm^[34,52]. O sinal de fluorescência resultante foi amplificado, enviado para uma interface analógica/digital (A/D) (*Chromatograph Interface* (BAS)) e monitorado, em tempo real, usando um *software* comercial (*Chromatograph data collection software*). Para otimização do ponto focal, o microcanal foi preenchido eletrocineticamente com solução de fluoresceína $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Mantendo o fluxo contante (para evitar fotodegradação), o ponto focal foi ajustado em um sistema XYZ até o valor máximo do sinal ser observado^[34,52].

2.2.5. Determinação da magnitude do fluxo eletrosmótico (EOF)

A magnitude do EOF foi determinada usando um método indireto de detecção por LIF (ILIF)^[54], pela introdução de uma zona de amostra contendo acetona 2% em tampão contendo fluoresceína $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. O marcador do EOF (acetona) foi detectado como um pico negativo. Para os MSE em PT, a magnitude do EOF foi confirmada usando o método de monitoramento da corrente^[55].

2.2.6. Estrutura química dos analitos

Para a comparação do desempenho analítico dos substratos, dois fluoróforos foram utilizados como analitos modelo. A Figura 2.7 apresenta a estrutura química da (A) fluoresceína (FL) e da (B) cumarina (CM) 519.

Figura 2.7. Estruturas químicas da (A) fluoresceína e da (B) cumarina.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Processos de microfabricação

De modo a produzir canais com dimensões similares nos três tipos de substratos avaliados (vidro, PDMS e PT), alguns parâmetros relacionados aos processos de microfabricação tiveram que ser considerados. Nos processos fotolitográficos, a largura é definida pela resolução da máscara utilizada. Convencionalmente, microcanais podem ser fabricados com largura inferior a 10 μm usando máscaras definidas em vidro, por exemplo^[5]. No método de impressão direta, a largura é limitada pela resolução da impressora laser^[24,25]. Com o uso de uma impressora laser com resolução de 600 *dpi*, por exemplo, é possível imprimir canais com largura inferior a 100 μm , no entanto, com repetibilidade baixa. Para este processo, quanto maior a largura do canal, melhor a repetibilidade. O erro estimado para um canal com largura de 150 μm é de aproximadamente 8% ($n = 10$), e esta é considerada a dimensão limitante para o processo de impressão direta usando uma impressora com resolução de 600 *dpi*^[37].

Por essa razão, todos os microssistemas foram fabricados com largura de 150 μm . Os comprimentos dos canais de injeção e de separação foram, respectivamente, 15 e 50 mm. Enquanto a profundidade dos canais em vidro e em PDMS é definida pelo tempo de corrosão ou pela altura do molde, respectivamente, com os dispositivos em PT este parâmetro é definido pela espessura da camada de toner. Para uma impressora com resolução de 600 *dpi*, a espessura da camada de uma SCT é $7,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$ ($n = 5$). Para dispositivos com CDT, a profundidade do canal foi $12 \pm 2 \mu\text{m}$. Dessa maneira, o processo de impressão direta foi limitante para a largura e também para a profundidade dos canais fabricados neste trabalho.

Devido ao perfil isotrópico dos canais corroídos em vidro, a máscara para o processo de fabricação em vidro foi preparada com largura de 130 μm . A largura resultante foi

aproximadamente 152 μm no topo do canal e ~ 130 μm na base. A profundidade final dos canais em vidro foi $12,3 \pm 0,4$ μm ($n = 4$). Para a prototipagem dos canais em PDMS, a geometria foi definida no fotorresiste negativo SU-8 sobre um substrato de silício. A altura e a largura dos canais definidos no molde foram $13,1 \pm 0,6$ μm e 148 ± 6 μm , respectivamente ($n = 4$).

Os procedimentos envolvidos na fabricação de MSE em vidro e em PDMS resultam em microcanais com rugosidade baixa. Por outro lado, os canais definidos pelo processo de impressão direta apresentam uma rugosidade elevada^[24,25,37], influenciada tanto pelo filme de poliéster quanto pela camada de toner. Este parâmetro foi investigado por medidas perfilométricas e os valores para o filme de poliéster e para a camada de toner foram $0,13 \pm 0,06$ μm e $1,8 \pm 0,1$ μm , respectivamente. Esses valores médios foram obtidos para cinco dispositivos diferentes, varrendo-se uma região de 500 μm sob uma força de 0,15 N. É importante observar que estes valores referem-se às estruturas com CST. Para estruturas com CDT, os parâmetros precisam ser considerados para ambos os filmes.

2.3.2. Caracterização elétrica

Como mencionado no prefácio, a escolha de uma plataforma microfluídica é extremamente importante para qualquer tipo de aplicação. Em microssistemas de eletroforese, uma das características desejáveis de uma plataforma ideal é a capacidade de dissipar calor provocado pelo efeito Joule. Por esse motivo, essa propriedade foi investigada nos substratos diferentes através da caracterização elétrica a partir da lei de Ohm^[56]. Em outras palavras, um microcanal foi inicialmente preenchido com a solução tampão (ácido bórico/borato de sódio 20 mmol L^{-1} , pH 9) e uma diferença de potencial foi aplicada ao microcanal. Com o estabelecimento do campo elétrico, a corrente eletroforética resultante foi medida em função

dos valores dos potenciais aplicados. A Figura 2.8 apresenta as curvas obtidas para todos os substratos com as respectivas equações de correlação.

Figura 2.8. Curvas obtidas para a corrente eletroforética em função do potencial aplicado. Eletrólito: ácido bórico/borato de sódio 20 mmol L⁻¹, pH 9. Comprimento do canal: 5 cm.

Como observado na Figura 2.8, todas as plataformas exibiram uma relação linear entre a corrente eletroforética e o potencial elétrico aplicado para um campo elétrico inferior a

500 V cm⁻¹ (ou seja, 2,5 kV). Os dispositivos em vidro e em PT apresentaram linearidade até 1000 V cm⁻¹ (5 kV). Os valores das resistências dos microcanais foram calculados através dos coeficientes angulares das curvas obtidas pela lei de Ohm^[56]. Os valores fornecidos pelas equações (inseridas na Figura 2.8) equivalem ao inverso da resistência, 1/R. Desse modo, os valores experimentais para a resistências dos canais em vidro, PT, PDMS nativo, PDMS oxidado e PDMS/vidro foram 224, 185, 94, 163 e 128 MΩ, respectivamente.

As áreas estimadas para a secção transversal dos canais definidos em vidro, PT e PDMS foram 1660, 1705, e 1830 μm², respectivamente. A resistividade (ρ) da solução tampão foi calculada através de medidas de condutividade (κ) em temperatura ambiente. A relação $\kappa = 1/\rho$ foi utilizada para estes cálculos^[56]. O valor teórico encontrado foi de aproximadamente 760 Ω cm para uma solução de tampão borato 20 mmol L⁻¹. Através destes valores, as resistências teóricas (R_T) dos microcanais fabricados em vidro, PT e PDMS, preenchidos com a solução tampão, foram 255, 240 e 228 MΩ. Estes valores foram calculados de acordo com a Equação 2.1, levando em consideração o comprimento do canal, L e a área, A , da secção transversal, a qual foi obtida por perfilometria^[56].

$$R_T = \frac{\rho L}{A} \quad \text{(Equação 2.1)}$$

Os valores encontrados para as resistências nos chips de vidro e PT foram, respectivamente, em torno de 15 e 25% maiores que os valores teóricos calculados. Para os dispositivos em PDMS oxidado, híbrido PDMS/vidro e PDMS nativo, os dados experimentais foram, respectivamente, 30, 45 e 60% menores que as resistências teóricas estimadas para os canais em PDMS. Através dessa comparação pode-se observar que os MSE de vidro apresentaram a melhor eficiência na dissipação de calor enquanto os MSE de PDMS nativo foram os que tiveram o pior desempenho. De acordo com os resultados descritos por Fletcher

e colaboradores^[57], esta discrepância pode estar relacionada à condutividade da superfície do material, que provoca uma contribuição significativa para a medida total da corrente elétrica nos canais microfluídicos.

2.3.3. Fluxo eletrosmótico (EOF)

Em sistemas capilares, a aplicação de um campo elétrico acarreta na geração da eletrosmose, que é o movimento de um líquido através de um capilar ou um microcanal. A velocidade linear desse fluxo dividida pelo campo elétrico aplicado, E , é denominada de mobilidade eletrosmótica, μ_{eo} . O valor de μ_{eo} , também denominado de fluxo eletrosmótico (EOF), pode fornecer informação sobre a natureza da superfície do microcanal e pode afetar diretamente o desempenho da separação eletroforética, mesmo quando sua presença não é necessária^[58].

A presença de um EOF catódico, ou seja, EOF que se move na direção do cátodo, é um indicativo de uma superfície com excesso de carga negativa. A magnitude do EOF é determinada pela densidade de carga na superfície^[59]. Uma vez que o EOF é um dos parâmetros eletroforéticos mais importantes, a determinação de sua magnitude é importante e necessária, principalmente na comparação do desempenho analítico de MSE fabricados em substratos diferentes.

A magnitude da μ_{eo} pode ser determinada através de métodos diretos ou indiretos^[60]. No modo direto, a μ_{eo} pode ser facilmente determinada pela injeção de um analito neutro no pH de interesse, desde que este forneça uma resposta mensurável no sistema de detecção empregado. No uso de detectores de fluorescência, por exemplo, a existência de um grupo fluoróforo no analito neutro é um requerimento adicional. Neste contexto, a rodamina B é o fluoróforo neutro mais utilizado devido sua neutralidade em uma ampla faixa de pH^[61]. No entanto, o uso deste analito como marcador do EOF é problemático com alguns substratos

poliméricos, como o PDMS. Devido à característica hidrofóbica deste polímero, o analito tende a ser adsorvido e também absorvido para a superfície do substrato^[62]. Deste modo, o uso da rodamina B não propicia uma medida confiável da magnitude do EOF, devido às variações de sua magnitude em função do tempo. Para os canais em vidro, a adsorção é mínima e os valores do EOF apresentam uma repetibilidade satisfatória.

Em experimentos preliminares com os dispositivos de PT, verificou-se que a detecção da rodamina B não foi possível em uma faixa de concentração de 0,1 a 10 mmol L⁻¹. Embora a visualização do canal completamente preenchido com o corante tenha sido observado, não foi possível detectar nenhuma variação do sinal analítico. Este problema pode estar associado com a fluorescência intrínseca do filme de poliéster. Espectros de fluorescência (ver Apêndice A) mostraram que os filmes de poliéster e PT, quando comparado aos demais substratos, exibiram os níveis mais elevados de fluorescência na região de emissão (490 nm). Este nível elevado de fluorescência é atribuído à presença de funcionalidades aromáticas tanto no filme de poliéster quanto na camada de toner. Por esse motivo, o sinal analítico pode ter sido mascarado pela fluorescência do substrato.

Devido aos problemas com a rodamina B, e na ausência de outro fluoróforo neutro, optou-se pelo uso de um método indireto^[54] de detecção por LIF para determinação da magnitude do EOF nos substratos avaliados. Neste caso, uma solução tampão contendo FL 25 µmol L⁻¹ foi preparada de modo a elevar o sinal de fluorescência. Dessa maneira, com a injeção de um analito neutro (acetona 2% em tampão) foi introduzida no canal e o sinal referente ao marcador de EOF foi detectado como um sinal negativo. Além da acetona, uma alíquota de cumarina 519 na concentração de 25 µmol L⁻¹ foi adicionada à amostra introduzida no canal. A Figura 2.9 apresenta um exemplo de um eletroferograma registrado pelo método indireto de detecção por LIF. Como observado na Figura 2.9, o marcador do EOF foi detectado como um pico negativo, antes do pico da CM.

Figura 2.9. Exemplo de eletroferograma registrado em MSE de PDMS/vidro usando um método de ILIF para determinação do EOF.

Usando o método indireto de detecção por LIF, um EOF catódico foi observado para todos os substratos. O tempo de migração do marcador do EOF, denominado de tempo eletrosmótico, t_{eo} , foi utilizado para calcular a velocidade eletrosmótica, v_{eo} . De acordo com a Equação 2.2, a velocidade eletrosmótica foi determinada dividindo o comprimento efetivo do canal, L_{ef} , pelo tempo eletrosmótico^[58,59]. O valor encontrado para a velocidade eletrosmótica foi dividido pelo campo elétrico, E , aplicado na separação permitindo encontrar o valor da mobilidade eletrosmótica, μ_{eo} (Equação 2.3)^[58,59].

$$v_{eo} = \frac{L_{ef}}{t_{eo}} \quad (\text{Equação 2.2})$$

$$\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E} \quad (\text{Equação 2.3})$$

Os resultados para a mobilidade eletrosmótica, μ_{eo} , e para o potencial zeta, ζ , foram determinados em pH 9 e os valores estão apresentados na Tabela 2.2. Os valores do potencial zeta de cada substrato foram calculados através da Equação de Smoluchowski (Equação 2.4):

$$\mu_{eo} = -\frac{\varepsilon_o \varepsilon_r \zeta}{\eta} \quad (\text{Equação 2.4})$$

sendo que ε_o é a permissividade do vácuo ($8,854 \times 10^{12} \text{ C}^2 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-2}$), ε_r é a permissividade relativa do meio (~ 80 para água em temperatura ambiente), e η é a viscosidade da solução ($0,001 \text{ N s m}^{-2}$ para água a 20°C)^[59]. Como esperado, os canais de vidro e PDMS oxidado exibiram os maiores valores de EOF e também potencial zeta. Por outro lado, os menores valores de EOF e potencial zeta foram encontrados nos dispositivos de PT.

Tabela 2.2. Mobilidade eletrosmótica e potencial zeta dos microcanais eletroforéticos fabricados em diferentes substratos.

Substratos	$\mu_{eo} (\times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$\zeta (\text{mV})$
<i>Vidro</i>	$3,90 \pm 0,08$	-55 ± 1
<i>PDMS Oxidado</i>	$3,52 \pm 0,06$	-49 ± 1
<i>PDMS/vidro</i>	$2,30 \pm 0,07$	-32 ± 1
<i>PDMS nativo</i>	$1,12 \pm 0,10$	-15 ± 1
<i>Poliéster-Toner</i>	$0,35 \pm 0,02$	$-4,2 \pm 0,3$

A magnitude extremamente baixa do EOF gerado nos dispositivos de PT foi confirmada pelo método de monitoramento da corrente^[55]. O valor encontrado para o potencial zeta no canal de PT indica uma densidade baixa de carga negativa na sua superfície. Esta densidade de carga reduzida resulta da presença de uma camada fina de sílica no filme de poliéster. A diferença nos valores de EOF encontrados para os MSE de vidro, PDMS/vidro, PDMS nativo e PDMS oxidado são similares aos valores obtidos por outros grupos de pesquisa^[54,56,61,62].

Os dispositivos de PT apresentaram um EOF muito reduzido quando comparado aos materiais convencionais (ver Tabela 2.2.)^[25]. Neste caso, o filme de poliéster define a base e a tampa do microcanal, enquanto a camada de toner define a parede do canal e, conseqüentemente, sua profundidade. O toner é composto principalmente de óxido de ferro e um co-polímero de estireno-acrilato^[24,25,37]. O filme de poliéster é revestido com uma camada de sílica, onde a espessura varia para cada marca e cada fabricante. A quantidade de sílica no filme de poliéster é estimada em torno de 0,6%^[26] da composição total. Nos MSE de vidro e PDMS, a magnitude do EOF é basicamente uma função da ionização dos grupos silanóis, presentes na superfície de ambos os materiais. Nos MSE de PT, os parâmetros que afetam o EOF são inúmeros e não estão completamente entendidos até o momento uma vez que a base e a tampa do canal são compostos de poliéster com uma camada de sílica e as paredes são compostas de toner. No entanto, a baixa abundância de sílica no canal ajuda a explicar o baixo valor de EOF encontrado nos chips de PT, os quais são aproximadamente 10 vezes menor que os materiais convencionais^[25,37].

Estratégias diferentes foram investigadas para aumentar a magnitude do EOF nos MSE de PT. O uso de NaOH para ativação da superfície não resultou em qualquer alteração. Aliás, esta solução danifica a estrutura microfluídica de PT em questão de minutos, devido ao ataque químico na superfície do poliéster e também à parede do toner. A oxidação da

superfície com plasma de O₂ também não provocou nenhuma alteração mensurável na magnitude do EOF. No entanto, observou-se que esta etapa reduziu a formação de bolhas na superfície, provavelmente devido à eliminação de material orgânico na etapa de oxidação. De acordo com um artigo publicado por Qiao^[63], a magnitude do EOF em um canal rugoso é significativamente menor que o EOF em um canal de rugosidade baixa devido a falta de uniformidade da dupla camada elétrica. Sendo assim, acredita-se que o EOF poderia ser melhorado substancialmente pelo uso de uma impressora laser de alta resolução, possibilitando a fabricação de canais mais estreitos e menos rugosos.

2.3.4. Otimização do tempo de injeção

O desempenho analítico dos substratos diferentes foi avaliado usando FL e CM como analitos modelo. A injeção eletrocinética (modo *gated*) destes analitos foi otimizada em MSE de vidro com uma solução de FL 10 µmol L⁻¹. Experimentos com tempos de injeção entre 0,25 e 5 s foram realizados e os resultados para a intensidade do sinal e a eficiência obtida estão apresentados nas Figuras 2.10A e 2.10B, respectivamente. Como pode ser visualizado na Figura 2.10B, eficiências superiores a 2×10^4 pratos m⁻¹ foram obtidas para tempos de injeção inferiores a 750 ms. As injeções foram realizadas em intervalos de 60 s.

No entanto, nenhum sinal foi registrado nos MSE de PT usando tempos de injeção inferiores a 1 s. Devido ao valor de EOF extremamente baixo, o tempo de injeção mínimo requerido para detectar sinal de FL nos MSE de PT foi igual a 1 s, com polaridade negativa. Por esta razão, este tempo de injeção (1 s) foi escolhido como tempo padrão para todos os experimentos.

Figura 2.10. Efeito do tempo de injeção na altura do pico (A) e na eficiência analítica (B) de um microchip fabricado em vidro. Os potenciais elétricos aplicados aos reservatórios da amostra e do tampão foram, respectivamente, 1,2 e 1,8 kV. O eletrólito utilizado para os experimentos eletroforéticos foi ácido bórico/borato de sódio 20 mM, pH 9,0.

2.3.5. Desempenho analítico

Com o tempo de injeção otimizado, experimentos eletroforéticos foram realizados com os analitos modelo nos microssistemas fabricados nos substratos diferentes. Exemplos dos eletroferogramas obtidos em cada material estão apresentados na Figura 2.11. Todos os experimentos foram conduzidos sob as mesmas condições eletroforéticas (composição do tampão, força iônica, pH, campo elétrico, tempo de injeção). Os analitos (FL e CM) foram diluídos no tampão de corrida, antes da análise, na concentração de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (cada). Deve-se observar que no pH do eletrólito utilizado (pH 9,0), ambos os analitos estão carregados negativamente. Como demonstrado na Figura 2.11, a separação nos MSE de vidro, PDMS oxidado e PDMS/vidro foi obtida em um intervalo de tempo menor que nos MSE de PDMS nativo. Essa diferença é explicada pela diferença na magnitude do EOF, como discutido no item anterior (item 2.3.4).

Figura 2.11. Exemplos de eletroferogramas registrados nos substratos diferentes para a mesma mistura sob as mesmas condições de análise. O controle eletrocinético foi realizado pela aplicação de 1200 V no reservatório da amostra e 1800 V no reservatório do tampão. Os reservatórios de descarte da amostra e do tampão foram mantidos constantes. Tempo de injeção: 1 s. Tampão borato de sódio/ácido bórico 20 mM, pH 9,0. Para todos os substratos a injeção e a separação foram realizadas sob polaridade normal, exceto para os MSE de PT. Nos eletroferogramas, FL e CM indicam os analitos fluoresceína e cumarina, respectivamente.

É interessante destacar que os analitos aniônicos não foram detectados nos MSE de PT usando polaridade normal. Isso indica que a magnitude das mobilidades eletroforéticas, μ_{ep} , de cada ânion é maior do que a mobilidade eletrosmótica, μ_{eo} , gerada nos canais de PT. Conforme a Equação 2.5, a mobilidade observada, μ_a , no eletroferograma é resultado da soma da mobilidade eletroforética, μ_{ep} , da espécie com a mobilidade eletrosmótica, μ_{eo} . Para as espécies negativas, a μ_{ep} tem sinal negativo e tende a migrar contra a direção do EOF. Neste

caso, se a μ_{ep} for muito maior, em módulo, que a magnitude do EOF, μ_{eo} , a espécie em questão não será introduzida no microcanal sob polaridade normal. E foi justamente isso que aconteceu com os MSE de PT, ou seja, as espécies aniônicas não migraram para o interior do microcanal.

$$\mu_a = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (\text{Equação 2.5})$$

Por esse motivo, o uso de polaridade negativa foi necessário para detectar os analitos nos MSE de PT. Nessa ocasião, a ordem de migração das espécies foi invertida (ver Figura 2.10), quando comparado aos demais substratos. A diferença observada na intensidade do sinal nos eletroferogramas é atribuída à fluorescência intrínseca de cada substrato. Para os MSE de PT, a intensidade do sinal de ambos os analitos foi maior que a intensidade observada nos demais materiais. Essa distinção deve-se ao fato do uso de polaridade negativa na introdução dos ânions nos canais de PT. Nesse caso, como as espécies estão carregadas negativamente, o uso de polaridade negativa induz a uma tendência eletrocinética que acarreta na injeção de um volume de amostra diferente nos canais de PT.

O desempenho da separação eletroforética realizada nos MSE fabricados nos materiais diferentes está comparado na Tabela 2.3, com os resultados expressos em termos de número de pratos, N , e simetria de pico. A eficiência foi calculada de acordo com a Equação 2.6, sendo que t_m e $w_{1/2}$ representam o tempo de migração e a largura do pico a meia altura, respectivamente.

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{Equação 2.6})$$

Tabela 2.3. Comparação da eficiência de separação e simetria de pico obtidas para os substratos microfluídicos.

Substratos	Eficiência (N)		Simetria de Pico	
	Cumarina	Fluoresceína	Cumarina	Fluoresceína
<i>PDMS Nativo</i>	6980	6265	1,28	1,20
<i>PDMS/Vidro</i>	1865	3330	1,32	1,18
<i>PDMS Oxidado</i>	1265	2720	1,35	1,29
<i>Vidro</i>	812	1410	1,24	1,17
<i>Poliéster-Toner</i>	895	925	1,21	1,26

O *software* Microcal™ Origin™ versão 5.0 foi utilizado para integrar e analisar os dados da eficiência. A simetria do pico foi medida no mesmo *software* empregado para coletar o sinal de fluorescência (BAS)^[64]. Como pode ser visualizado na Tabela 2.3, as melhores eficiências de separação foram obtidas nos MSE de PDMS nativo, o qual necessitou de um tempo de separação maior que os demais substratos (ver Figura 2.10). Como apresentado nas Tabelas 2.2 e 2.3, quanto menor a magnitude do EOF, maior a eficiência de separação, exceto para os dispositivos de PT. A mesma tendência não é observada para os MSE de PT devido ao uso de polaridade negativa associada com a interação entre o analito e a parede do microcanal e também devido à rugosidade elevada do microcanal. Em termos de simetria de pico, um pico simétrico idealmente deveria ter um valor igual a 1,0. Valores superiores a 1,0 indicam a presença de picos com cauda^[64]. A eficiência pode ser afetada pela geometria do canal (ou uniformidade da superfície do canal), magnitude do EOF, processo de introdução da amostra ou ainda a interação do analito com a parede da micro-estrutura^[39,65].

A geometria do canal é um dos parâmetros mais importantes que influenciam o desempenho analítico nos MSE^[54,65]. Neste trabalho deve-se considerar que os MSE foram

fabricados através de processos de microfabricação diferentes. Conseqüentemente, o perfil do microcanal resultante foi diferente para cada substrato utilizado. Os canais microfluídicos fabricados em PDMS usando moldagem exibem um formato retangular^[29-32]. A corrosão dos canais em vidro com solução de HF ou HF-NH₄F gera um formato trapezoidal devido à característica isotrópica da corrosão química por *via úmida*^[54]. Por outro lado, o formato dos canais em PT é definido pela resolução da impressora laser e não é perfeitamente regular devido às limitações discutidas anteriormente. No entanto, a geometria do canal de PT é similar a um formato cilíndrico^[24,26,37].

O comprimento do *plug* de injeção, ou zona de amostra, também tem uma influência significativa na eficiência de separação. Em MSE, usando o modo de injeção eletrocinético denominado *gated*, a quantidade de amostra introduzida no canal (Q_{inj}) depende do potencial aplicado (V), da concentração da amostra (c), da mobilidade eletroforética do analito (μ_{ep}), da mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}), do tempo de injeção (t_{inj}) da área transversal do canal (A) e do comprimento do canal (L), como demonstrado na Equação 2.7.

$$Q_{inj} = V A c t_{inj} \frac{\mu_{eo} + \mu_{ep}}{L} \quad (\text{Equação 2.7})$$

Os experimentos realizados neste trabalho foram conduzidos sob a mesma intensidade do campo elétrico usando MSE fabricados em materiais diferentes com dimensões similares, porém, tendo valores diferentes de EOF. Dessa maneira, a quantidade de material introduzido variou dependendo do tipo de substrato, influenciando diretamente a eficiência de separação.

Além dos efeitos da geometria do canal, da magnitude do EOF e do protocolo de injeção, outros fatores podem afetar negativamente a eficiência de separação. As contribuições para a variância total (σ_T^2) obtida em MSE são:

$$\sigma^2_T = \sigma^2_{Dif} + \sigma^2_{Inj} + \sigma^2_{Det} + \sigma^2_{Wall} + \sigma^2_{Eletro} + \sigma^2_J \quad (\text{Equação 2.8})$$

sendo que σ^2_{Dif} refere-se à difusão longitudinal, σ^2_{Inj} é atribuída à zona de amostra injetada, σ^2_{Det} está relacionado à geometria do detector, σ^2_{Wall} é atribuído à interação do analito à parede do canal, σ^2_{Eletro} refere-se à eletrodispersão das zonas e σ^2_J está relacionado ao aquecimento provocado pelo efeito Joule^[59]. Desde que todos os parâmetros experimentais sejam mantidos constantes neste trabalho (exceto o tipo de substrato), as contribuições σ^2_{Dif} , σ^2_{Inj} , σ^2_{Eletro} e σ^2_{Det} para a variância total, σ^2_T , são constantes. Além disso, como todos os substratos exibiram uma dissipação de calor eficiente em valores de campo elétrico igual ou inferior a 500 V cm^{-1} , a contribuição deste parâmetro, σ^2_J , para a variância total pode ser desprezada.

Dessa maneira, qualquer variação σ^2_T está relacionada diretamente aos efeitos de interação entre o analito e a parede do canal, σ^2_{Wall} . De modo a investigar esse parâmetro e estabelecer uma relação direta do efeito da parede para a perda de eficiência analítica, a mistura dos dois analitos modelo foi realizada em pontos de detecção diferentes ao longo do canal de separação. A geometria do dispositivo utilizada no trabalho (ver Figura 2.1) foi projetada com linhas, ou marcas, para auxiliar o alinhamento do feixe do laser no ponto de detecção. O manuseio foi feito com um posicionador do tipo XYZ, o qual permitiu uma variação máxima de 3 cm. Um exemplo de separações realizadas em pontos de detecção diferentes está apresentado na Figura 2.12. No exemplo demonstrado, MSE de PDMS/vidro foram utilizados.

Figura 2.12. Exemplos de eletroferogramas registrados em pontos de detecção diferentes (10, 20, 30, 35 e 40 mm) em MSE de PDMS/vidro. Condições experimentais: ver Figura 2.11. Para cada eletroferograma, uma sequência de três injeções foi realizada a cada 120 s.

As variâncias dos picos obtidos nos pontos de detecção diferentes foram medidas e graficadas em função do comprimento efetivo do canal de separação. Os valores da variância total dos picos da FL $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram calculados usando o *software* Microcal™ Origin™ versão 5.0. O mesmo procedimento foi realizado para os picos da CM. No entanto, como o comportamento foi bastante similar, os dados não estão apresentados. A Figura 2.13 mostra os resultados obtidos para a variância total em função do ponto de detecção para cada plataforma microfluídica avaliada neste trabalho. Uma correlação linear foi observada para todos os substratos na detecção a 30, 35 e 40 mm.

Para os dispositivos de PT, por exemplo, σ_T^2 foi igual a $1,8 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$. Para uma molécula pequena como a FL, o coeficiente de difusão, D_i , é igual a $1,0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Considerando o tempo de migração de 72 s, o valor de σ_{Dif}^2 é igual a $1,4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$

($\sigma_{Dif}^2 = 2D_i \times t_m$). Para os dispositivos de PT, o comprimento do *plug* de injeção, l_{inj} , foi medido e o valor foi de aproximadamente 300 μm (540 pL). Desde que a magnitude do EOF é diferente para cada substrato, o comprimento da zona de amostra (ou o volume de injeção) foi determinado separadamente usando imagens de fluorescência (dados não apresentados).

Figura 2.13. Variância total para uma solução de FL 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em função do ponto de detecção para MSE fabricados em (■) PT, (●) PDMS nativo, (▼) PDMS oxidado, (▲) PDMS/vidro e (◆) vidro. Condições experimentais: ver Figura 2.11.

No entanto, para o tempo de injeção utilizado (1 s), nenhuma variação significativa foi observada para o comprimento da zona de amostra. Os valores variaram de 270 a 310 μm , muito provavelmente devido à contribuição da parede do canal. Por esse motivo, o valor encontrado para σ_{Inj}^2 nos MSE de PT também foi utilizado nos demais materiais. Usando o valor de 300 μm , a contribuição da injeção (σ_{Inj}^2) para a variância total nos MSE de PT foi $7,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$ ($\sigma_{Inj}^2 = l_{Inj}^2/12$). Assumindo que σ_{Det}^2 e σ_{Inj}^2 tem uma contribuição aproximadamente similar para a variância total e que σ_J^2 é desprezível, a variância

relacionada à interação com a parede do canal, σ_{wall}^2 , é $1,6 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$. Estes valores indicam que σ_{wall}^2 é o parâmetro que apresenta a maior contribuição (aproximadamente 90%) para o alargamento da banda (ou perda de eficiência) nos MSE de PT. Em MSE de vidro, o valor de σ_{wall}^2 foi igual a $9,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$, o que representa aproximadamente quase 25% da variância total, σ_T^2 .

No geral, várias informações podem ser extraídas da Figura 2.13. Como visualizado, as plataformas microfluídicas compostas de vidro e PDMS/vidro foram as que apresentaram menor contribuição para a variância total. Em outras palavras, as paredes das plataformas mencionadas foram as que proporcionaram menor adsorção, ou interação, com os analitos (corantes aniônicos) utilizados neste trabalho. Os dois tipos de MSE (vidro e PDMS/vidro) apresentaram um comportamento similar nos três pontos de detecção demonstrados na Figura 2.13. Uma boa correlação também pode se observada entre os MSE de PDMS nativo e PDMS oxidado. Para os MSE de PDMS nativo, a variação significativa dos valores σ_T^2 está relacionada à instabilidade do EOF em função do tempo. Para os fluoróforos negativos, os dispositivos de PT demonstraram a menor eficiência de separação. Além disso, a parede dos canais de PT apresentou a maior contribuição para a perda de eficiência quando comparada aos demais substratos. Estes parâmetros poderiam ser melhorados pela adição de um inversor de EOF, invertendo assim sua direção, ou selecionando fluoróforos catiônicos. Neste caso, a separação eletroforética poderia ser realizada sob polaridade normal em todos os substratos.

Resultados similares em termos de variância total foram obtidos para MSE de vidro fabricados a partir de uma tecnologia baseada no uso de máscaras de toner para corrosão química^[47]. Neste caso, a rugosidade do canal foi definida pelo processo de impressão direta, assim como na confecção dos MSE de PT. No entanto, o tempo de fabricação curto e o custo muito reduzido dos dispositivos de PT são vantagens significativas sobre todos os demais substratos.

Obviamente, uma comparação mais realística do desempenho analítico seria avaliar todos os três substratos usando tecnologias de resolução baixa para microfabricação ou confeccionando dispositivos de PT com impressoras laser de resolução maior (3000 *dpi*)^[37]. Nos últimos anos, uma variedade de processos usando toner em um ou mais estágios foram descritos para produzir dispositivos em PDMS^[42-44], vidro^[47] e PT^[24-26]. Usando tecnologias deste tipo para produzir dispositivos descartáveis, a rugosidade da camada de toner seria transferida para a superfície do PDMS ou do vidro durante a moldagem, transferência térmica ou corrosão química. Neste caso, os dispositivos de PT poderiam apresentar um desempenho analítico melhor do que os dispositivos de PDMS ou vidro fabricados com resolução baixa.

2.3.6. Repetibilidade e robustez

A repetibilidade das injeções consecutivas foi avaliada para todos os materiais. Para um estudo comparativo, uma sequência automática de sete injeções foi programada no *software* de controle para todos os substratos, exceto para os MSE de vidro. A única variável que sofrera modificação foi o intervalo de tempo entre as injeções. Os melhores resultados em termos de repetibilidade das injeções foram obtidos para os MSE de vidro e PDMS/vidro.

2.3.6.1. MSE de vidro

Os MSE de vidro-vidro apresentaram uma repetibilidade excelente durante 50 injeções realizadas individualmente. A Figura 2.14 mostra os eletroferogramas referentes às injeções número 1, 5, 10, 20, 30 e 50. Avaliando estas 50 injeções, os tempos de migração da CM e da FL foram, respectivamente, 65 ± 1 s e 103 ± 2 s. Os valores para o desvio padrão relativo (RSD) para a altura e para a área do pico da CM foram de aproximadamente 8% e 12%, respectivamente. Para o pico da FL, os valores do RSD para altura e para a área foram iguais

a 3% e 6%, respectivamente. A diferença do RSD para a CM e FL pode ser atribuída aos efeitos eletrocinéticos durante a introdução da amostra. Considerando apenas as 10 primeiras injeções, os valores mencionados foram inferiores a 6%.

Figura 2.14. Eletroferogramas registrados em MSE de vidro mostrando a repetibilidade entre as injeções número (a) 1, (b) 5, (c) 10, (d) 20, (e) 30 e (f) 50. Condições experimentais: ver Figura 2.11.

Os valores mencionados poderiam ser melhorados por um tratamento químico igual àquele descrito para pré-condicionamento do canal (item 2.2.3.1). No entanto, os resultados apresentados na Figura 2.14 mostram que este tipo de plataforma pode ser utilizado em análises rotineiras para obtenção de resultados de alta confiabilidade. A única desvantagem desse tipo de estrutura é o tempo excessivo para sua fabricação. Considerando as etapas de limpeza, fotogração, corrosão e selagem, o processo final precisa de aproximadamente 16 h

para sua conclusão. A selagem térmica apresenta ainda outro ponto negativo neste processo: a repetibilidade. Embora quatro dispositivos tenham sido fabricados simultaneamente, o processo para selagem nem sempre fornece os mesmos resultados. Após o ciclo de temperatura, alguns dispositivos apresentaram bolhas de ar, comprometendo a vedação e, principalmente, a repetibilidade do processo de selagem. Por este motivo, a avaliação analítica entre dispositivos diferentes de vidro-vidro não foi investigada.

2.3.6.2. MSE de PDMS/vidro

Assim como os MSE de vidro, a plataforma composta de PDMS/vidro também exibiu um desempenho analítico excelente, tanto na comparação da repetibilidade entre injeções consecutivas quanto na repetibilidade entre dispositivos diferentes. A Figura 2.15 apresenta uma seqüência de três eletroferogramas obtidos em três MSE diferentes. Cada eletroferograma contém uma série de sete injeções realizadas em intervalos de 30 min. O ponto de detecção foi igual a 35 mm.

Para uma comparação *intra-chip*, os valores dos RSD's em termos de tempo de migração, área do pico, altura do pico e eficiência de separação variaram de 2,3 a 6,9%. Para uma comparação *inter-chip*, os tempos de migração para CM e FL foram 84 ± 1 e 114 ± 2 s, respectivamente. A comparação em termos de área do pico mostrou uma variação de 15% (CM) e 22% (FL). Resultados similares foram observados para a eficiência de separação, com variação de 12% (CM) e 27% (FL). A discrepância para a variação *inter-chip* está associada exclusivamente à variação do EOF entre os dispositivos diferentes. A μ_{eo} apresentou uma variação média de 13% entre os três dispositivos.

Figura 2.15. Eletroferogramas obtidos para uma série de sete injeções cada para três MSE de PDMS/vidro idênticos. Condições experimentais: ver Figura 2.11.

2.3.6.3. PDMS oxidado

Os MSE de PDMS oxidado foram avaliados durante 8 h contínuas de injeções sucessivas. A Figura 2.16 apresenta uma série de oito eletroferogramas registrados em intervalos de 1 h. Cada eletroferograma contém uma série de sete injeções realizadas a cada 90 s. O primeiro eletroferograma (a) foi registrado exatamente 1 h após a etapa de oxidação no plasma de O_2 . Os demais eletroferogramas foram registrados após 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e), 6 (f), 7 (g) e 8 (h) horas. É importante mencionar que os microcanais foram lavados eletrocineticamente após cada série de injeções, ou seja, a cada 12 min. A detecção foi feita a 40 mm do ponto de injeção. A Figura 2.16, especialmente, contém os dados referentes ao tempo de preenchimento inicial do microcanal (20 s) antes da primeira injeção.

Os tempos de migração durante as oito horas para CM e FL foram 89 ± 2 e 116 ± 4 s, respectivamente (tempo de preenchimento do canal não descontado). Esta variação é inferior a 4%. Comparando os valores das áreas, observou-se uma variação de 16,3% (CM) e 18,1%

(FL). Para a intensidade do sinal, uma variação de 19,6% (CM) e 25,7% (FL) foi obtida. De acordo com os resultados apresentados na Figura 2.16, nenhuma variação significativa na simetria dos picos foi encontrada. Para a primeira injeção do eletroferograma A, os valores da simetria foram 1,39 (CM) e 1,23 (FL), respectivamente. Para a última injeção do eletroferograma H, os valores foram 1,37 (CM) e 1,30 (FL).

Estes resultados mostram que o tempo de oxidação (150 s) promoveu uma selagem ideal e que nenhuma modificação aparente (em termos de tempo de migração) ocorreu como resultado da variação da mobilidade eletrosmótica em função do tempo. Estes aspectos conferem uma estabilidade desejável para os MSE de PDMS oxidados em plasma de O_2 .

Figura 2.16. Eletroferogramas obtidos para séries de sete injeções realizadas em MSE de PDMS oxidado durante oito horas sem interrupção. Condições experimentais: ver Figura 2.11. Os eletroferogramas foram registrados após (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 5, (f) 6, (g) 7 e (h) 8 h da oxidação em plasma de O_2 .

2.3.6.4. MSE de PDMS nativo

Para os MSE de PDMS nativo, as injeções foram realizadas a cada 120 s. Um eletroferograma mostrando sete injeções sequenciais nesta plataforma está apresentado na Figura 2.17. Os tempos de migração para CM e FL foram 159 ± 5 s e 200 ± 10 s, respectivamente. Os valores de RSD em termos de altura e área dos picos para CM e FL variaram de 9 a 11% e 24 a 26%, respectivamente. Os valores de RSD elevados são atribuídos à instabilidade do EOF, cujo parâmetro sofreu uma variação de aproximadamente 10% durante 5 injeções consecutivas (ver Tabela 2.2).

Os valores de RSD para a altura e a área do pico foram maiores para FL do que CM. Esta diferença é resultado da tendência eletrocinética do modo de injeção. A instabilidade do EOF afeta a resolução da separação entre os dois analitos. A resolução, R , entre os picos foi calculada com base na Equação 2.9, considerando os tempos de migração da FL e CM como t_{m2} e t_{m1} , respectivamente. Os termos w_1 e w_2 equivalem às larguras na base dos picos da CM e da FL, respectivamente.

$$R = \frac{2(t_{m2} - t_{m1})}{w_1 + w_2} \quad (\text{Equação 2.9})$$

Como visualizado na Figura 2.17, a resolução aumenta de 1,9 para 3,0 da primeira para a sétima injeção. Além disso, o valor da simetria do pico foi sistematicamente afetado pela mudança contínua no EOF, resultando em RSD de 2,6% (CM) e 5,9% (FL). O efeito da μ_{eo} na resolução pode ser demonstrado pela Equação 2.10, deduzida por Jorgenson e Lukacs^[59], sendo que μ_1 , μ_2 e μ_m representam as mobilidades eletroforéticas dos dois analitos (CM e FL) e a mobilidade média entre eles, respectivamente. Os termos D e V representam o coeficiente de difusão da molécula e o potencial aplicado na separação. De acordo com a Equação 2.10, o valor da resolução é inversamente proporcional ao valor da magnitude da μ_{eo} .

Em outras palavras, com a redução do EOF, o valor da resolução aumenta^[59], como visualizado na Figura 2.17.

$$R = 0,177(\mu_1 - \mu_2) \left[\frac{V}{(\mu_m + \mu_{eo})D} \right]^{1/2} \quad (\text{Equação 10})$$

Como demonstrado na Figura 2.17, a resolução é influenciada pela redução do EOF nos MSE de PDMS nativo. Essa variação acarretou também na diminuição da intensidade dos picos, fator que está diretamente relacionada com a quantidade de material introduzida nos microcanais. Em alguns casos, nenhum pico foi detectado após uma série de injeções consecutivas.

Figura 2.17. Eletroferograma obtido para uma série de sete injeções consecutivas em MSE de PDMS nativo. Condições experimentais: ver Figura 2.11.

2.3.6.5. MSE de PT

A repetibilidade das injeções sequenciais também foi investigada nos dispositivos de PT. Como mencionado, foi necessário inverter a polaridade de modo a detectar os analitos nestes dispositivos. Essa inversão foi necessária porque o EOF gerado nos microcanais de PT não é alto o suficiente para transportar as espécies aniônicas sob polaridade normal. A Figura 2.18 apresenta um eletroferograma com sete injeções consecutivas realizadas a cada 120 s. A primeira injeção resultou em picos de intensidade baixa comparada com as demais injeções. Esse efeito é atribuído ao valor de EOF reduzido, no qual o transporte eletrocinético nestes dispositivos requer um tempo maior para o preenchimento total do canal de amostragem. Os valores dos tempos de migração para FL e CM foram 66 ± 3 s e 104 ± 8 s, respectivamente.

Os valores de RSD para a altura e área dos picos nestas sete injeções foram maiores que 20%. Ao ignorar os dados da primeira injeção, os valores de RSD são reduzidos para aproximadamente 10%. Uma diferença notável da resolução é observada depois das três primeiras injeções. A resolução (calculada a partir da Equação 9) para a primeira, segunda e terceira injeção foi 2,7, 2,3 e 1,9, respectivamente. A partir da quarta injeção, a resolução variou de 1,4 a 1,6. Este decréscimo também é resultado da instabilidade do EOF. O decréscimo nos valores da resolução pode ser explicado pela redução da magnitude do EOF, assim como nos MSE de PDMS nativo. No entanto, como neste caso usou-se polaridade negativa, o efeito sobre os valores da resolução foi o inverso daquele observado nos dispositivos de PDMS nativo.

O desempenho analítico, em termos de repetibilidade, dos MSE de PT foi ligeiramente melhor que os MSE de PDMS nativo. A repetibilidade ruim do EOF pode ser um problema para o uso de MSE (independente do tipo de substrato) em análises de rotina. No entanto, uma das maiores vantagens do PDMS e do PT é que ambos são muito baratos, podem ser

fabricados em um curto intervalo de tempo e podem ser utilizados como dispositivos descartáveis. Neste caso, mudanças no EOF em função do tempo não têm muita importância.

Figura 2.18. Eletroferograma obtido para uma série de sete injeções consecutivas em MSE de PT. Condições experimentais: ver Figura 2.11.

2.4. CONCLUSÕES

A comparação do desempenho analítico dos MSE fabricados através de processos convencionais (fotolitografia e litografia suave) e uma técnica alternativa (impressão direta) fornece uma referência útil para os pesquisadores desenvolverem dispositivos para análises eletroforéticas. Os dispositivos em vidro, PDMS nativo, PDMS oxidado, PDMS/vidro e PT foram fabricados de acordo com as dimensões limitantes (largura/profundidade = 150 μm /12 μm) do processo de impressão direta. De acordo com os resultados apresentados, os dispositivos em PDMS nativo e em vidro apresentaram, respectivamente, a menor e a maior capacidade de dissipação de calor provocada pelo efeito Joule. Adicionalmente, os dispositivos em PT apresentaram o menor EOF entre todos os materiais investigados. O valor de EOF encontrado para os chips de PT não foi alto o suficiente para detectar os analitos negativos com polaridade normal. Por outro lado, como esperado, os dispositivos em vidro e PDMS oxidado ofereceram EOF de maior magnitude. Embora o EOF nos MSE de PT tenha sido extremamente baixo, acredita-se que esse parâmetro possa ser atrativo para aplicações onde o EOF necessita ser suprimido.

Para os analitos carregados negativamente, as melhores eficiências foram obtidas para os dispositivos de PDMS nativo e PDMS/vidro. Estudos quantitativos demonstraram que a parede do canal, σ_{wall}^2 , é a principal contribuinte para a variância total. Dentre os substratos, a parede dos MSE de PT foi responsável por aproximadamente 90% da variância total. Por outro lado, nos dispositivos em vidro e em PDMS/vidro, a contribuição da σ_{wall}^2 foi inferior a 30%.

Apesar de alguns pontos desfavoráveis, os dispositivos fabricados em PT apresentam várias vantagens em relação aos materiais convencionais. O processo de fabricação é extremamente simples, rápido e requer equipamentos disponíveis em qualquer escritório (impressora laser, transparências, plastificadora, perfurador de papel). Os dispositivos são

muito baratos e podem ser considerados descartáveis. Além disso, estes dispositivos são leves e não tão frágeis quanto os chips em vidro. Apesar de apresentar menor eficiência de separação que os dispositivos em PDMS e vidro, os resultados mostraram que é possível realizar experimentos eletroforéticos com detecção óptica nestes dispositivos. Além disso, os dispositivos em PT podem ser muito úteis para aplicações clínicas no *point-of-care*, onde dispositivos de baixo-custo e descartáveis são desejáveis. Estudos futuros estarão focalizados na investigação de impressoras lasers com maior resolução para produzir canais mais estreitos com melhor definição e regularidade, aspectos que podem contribuir para a melhora do desempenho analítico destes dispositivos.

Um artigo contendo os resultados apresentados neste Capítulo foi aceito (DOI: 10.1002/elps.200700897) para publicação na edição especial sobre miniaturização de 2008 do periódico *Electrophoresis*, com data de publicação prevista para novembro. A partir da avaliação sistemática das plataformas microfluídicas, pode-se concluir que os dispositivos fabricados em PT são ideais para testes rápidos ou estudos em que a repetibilidade analítica não seja, a priori, tão importante. Estes dispositivos foram empregados na avaliação da geometria ideal do detector condutométrico sem contato, como será abordado no Capítulo 3.

Além disso, os dados sobre o efeito da parede do canal para o alargamento das bandas eletroforéticas em substratos diferentes são inéditos e mostram que o vidro, como esperado, é o melhor material para a análise rotineira. Os valores referentes à eficiência de separação podem ser significativamente melhorados pelo uso de canais mais estreitos. Depois do vidro, os dispositivos de PDMS/vidro foram os que apresentaram melhores resultados, tanto em termos de repetibilidade *inter* como *intra-chips*. Comparando os dois sistemas, a etapa de selagem térmica dos MSE em vidro é a principal desvantagem, a qual requer aproximadamente 12 h para promover a selagem. Já para os dispositivos em PDMS/vidro, a selagem é obtida imediatamente ao contato dos canais poliméricos com a placa de vidro.

Essas vantagens permitiram selecionar este tipo de plataforma para a fabricação dos dispositivos biomoleculares, os quais serão discutidos no Capítulo 4.

Em geral, com o trabalho descrito neste Capítulo, foi possível aprender e compreender muitos dos parâmetros eletroforéticos fundamentais presentes nos sistemas microfluídicos. Além do estágio no exterior, a discussão extensiva com os revisores do manuscrito propiciou uma abordagem ainda mais completa deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Recent developments. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 12, p. 3373-3385, 2004.
- [2] DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 3887-3907, 2006.
- [3] AUROUX, P. A.; IOSSIFIDIS, D.; REYES, D. R.; MANZ, A. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2637-2652, 2002.
- [4] REYES, D. R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P. A.; MANZ, A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2623-2636, 2002.
- [5] DOLNIK, V.; LIU, S. R.; JOVANOVIĆ, S. Capillary electrophoresis on microchip. **Electrophoresis**, v. 21, n. 1, p. 41-54, 2000.
- [6] SEILER, K.; HARRISON, D. J.; MANZ, A. Planar glass chips for capillary electrophoresis - repetitive sample injection, quantitation, and separation efficiency **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 10, p. 1481-1488, 1993.
- [7] EFFENHAUSER, C. S.; MANZ, A.; WIDMER, H. M. Glass chips for high-speed capillary electrophoresis separations with submicrometer plate heights. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 19, p. 2637-2642, 1993.
- [8] EFFENHAUSER, C. S.; MANZ, A.; WIDMER, H. M. Manipulation of sample fractions on a capillary electrophoresis chip. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 13, p. 2284-2287, 1995.
- [9] MCCREEDY, T. Fabrication techniques and materials commonly used for the production of microreactors and micro total analytical systems. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 396-400, 2000.
- [10] CHEN, Y.; PEPIN, A. Nanofabrication: Conventional and nonconventional methods. **Electrophoresis**, v. 22, n. 2, p. 187-207, 2001.
- [11] HUYNH, B. H.; FOGARTY, B. A.; SCOTT MARTIN, R.; LUNTE S. M. On-line coupling of microdialysis sampling with microchip-based capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 13, p. 6440-6447, 2004.
- [12] BECKER, H.; GARTNER, C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 1, p. 89-111, 2008.
- [13] BECKER, H.; LOCASCIO, L. E. Polymer microfluidic devices. **Talanta**, v. 56, n. 2, p. 267-287, 2002.
- [14] FIORINI, G. S.; CHIU, D. T. Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. **Biotechniques**, v. 38, n. 3, p. 429-446, 2005.
- [15] SHADPOUR, H.; MUSYIMI, H.; CHEN, J.; SOPER, S. A. Physiochemical properties of various polymer substrates and their effects on microchip electrophoresis performance. **Journal of Chromatography A**, v. 111, n. 2, p. 238-251, 2006.
- [16] MARTYNOVA, L.; LOCASCIO, L. E.; GAITAN, M.; KRAMER, G. W. Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 23, p. 4783-4789, 1997.

- [17] GALLOWAY, M.; STRYJEWSKI, W.; HENRY, A.; FORD, S. M.; SOPER, S. A. Contact conductivity detection in poly(methyl methacrylate)-based microfluidic devices for analysis of mono- and polyanionic molecules. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 10, p. 2407-2415, 2002.
- [18] KELLY, R.T.; WOOLLEY, A. T. Thermal bonding of polymeric capillary electrophoresis microdevices in water. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1941-1945, 2003.
- [19] LIU, Y.; GANSER, D.; SCHNEIDER, A.; LIU, R.; GRODZINSKI, P.; KROUTCHININA, N. Microfabricated polycarbonate CE devices for DNA analysis. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 17, p. 4196-4201, 2001.
- [20] SHADPOUR, H.; HUPERT, M. L.; PATTERSON, D.; LIU, C. G.; SOPER, S. A. Multichannel microchip electrophoresis device fabricated in polycarbonate with an integrated contact conductivity sensor array. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 870-878, 2007.
- [21] ROSSIER, J. S.; SCHWARZ, A.; REYMOND, F.; FERRIGNO, R.; GIRAULT, H. H. Microchannel networks for electrophoretic separations. **Electrophoresis**, v. 20, n. 4-5, p. 727-731, 1999.
- [22] FIORINI, G. S.; JEFFRIES, G. D. M.; LIM, D. S. W.; KUYPER, C. L.; CHIU, D. T.; Fabrication of thermoset polyester microfluidic devices and embossing masters using rapid prototyped polydimethylsiloxane molds. **Lab on a Chip**, v. 3, n. 3, p. 158-163, 2003.
- [23] FIORINI, G. S.; LORENZ, R.M.; KUO, J. S.; CHIU, D. T. Rapid prototyping of thermoset polyester microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 16, p. 4697-4704, 2004.
- [24] DO LAGO, C. L.; DA SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA, J. A. F. A dry process for production of microfluidic devices based on the lamination of laser-printed polyester films. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3853-3858, 2003.
- [25] COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; SILVA, H. D. T.; RICHTER, E. M.; FURLAN, R.; ANGNES, L.; DO LAGO, C. L.; MAZO, L. H.; CARRILHO, E. Electrophoresis microchip fabricated by a direct-printing process with end-channel amperometric detection. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3832-3838, 2004.
- [26] HE, F. Y.; LIU, A. L.; YUAN, J. H.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; XIA, X. H. Electrokinetic control of fluid in plastified laser-printed poly(ethylene terephthalate)-toner microchips. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 1, p. 192-197, 2005.
- [27] PICCIN, E.; COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; CLARO-NETO, S.; CARRILHO, E. Polyurethane from biosource as a new material for fabrication of microfluidic devices by rapid prototyping. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, n. 1-2, p. 151-158, 2007.
- [28] CASTAÑO-ÁLVAREZ, M.; FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T.; COSTA-GARCÍA, A.; Poly(methylmethacrylate) and Topas capillary electrophoresis microchip performance with electrochemical detection. **Electrophoresis**, v. 26, n. 16, p. 3160-3168, 2005.
- [29] DUFFY, D. C.; MCDONALD, J. C.; SCHUELLER, O. J. A.; WHITESIDES, G. M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 4974-4984, 1998.
- [30] McDONALD, J. C.; DUFFY, D. C.; ANDERSON, J. R.; CHIU, D. T.; WHITESIDES, G. M. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Electrophoresis**, v. 21, n. 1, p. 27-40, 2000.
- [31] ANDERSON, J. R.; CHIU, D. T.; JACKMAN, R. J.; CHEMIAVSKAYA, O.; WHITESIDES, S. H.; WHITESIDES, G. M. Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 14, p. 3158-3164, 2000.

- [32] McDONALD, J. C.; WHITESIDES, G. M. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 7, p. 491-499, 2002.
- [33] VICKERS, J. A.; CAULUM, M. M.; HENRY, C. S. Generation of hydrophilic poly(dimethylsiloxane) for high-performance microchip electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 21, p. 7446-7452, 2006.
- [34] FOGARTY, B. A.; HEPPERT, K. E.; CORY, T. J.; HULBUTTA, K. R.; SCOTT MARTIN, R.; LUNTE, S. M. Rapid fabrication of poly(dimethylsiloxane)-based microchip capillary electrophoresis devices using CO₂ laser ablation. **Analyst**, v. 130, n. 6, p. 924-930, 2005.
- [35] NIELSEN, T.; NILSSON, D.; BUNDGAARD, F.; SHI, P.; KRISTENSEN, A. Nanoimprint lithography in the cyclic olefin copolymer, Topas(R), a highly ultraviolet-transparent and chemically resistant thermoplast. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 22, n. 4, p. 1770-1775, 2004.
- [36] McCORMICK, R. M.; NELSON, R. J.; ALONSO-AMIGO, M. G.; BENVEGNI, D. J.; HOOPER, H. H. Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 14, p. 2626-2630, 1997.
- [37] COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E. Low-cost technologies for microfluidic applications. In: LANDERS, J. P. (Ed.). **Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. 3. ed. New York: CRC, 2007. p. 1169-1184.
- [38] LI, M. W.; HUYNH, B. H.; HULVEY, M. K.; LUNTE, S. M.; SCOTT MARTIN, R. Design and characterization of poly(dimethylsiloxane)-based valves for interfacing continuous-flow sampling to microchip electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 1042-1051, 2006.
- [39] LACHER, N. A.; ROOJI, N. F.; VERPOORTE, E.; LUNTE, S. M. Comparison of the performance characteristics of poly(dimethylsiloxane) and Pyrex microchip electrophoresis devices for peptide separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1004, n. 1-2, p. 225-235, 2003.
- [40] LIU, A. L.; HE, F. Y.; HU, Y. L.; XIA, X. H. Plastified poly(ethylene terephthalate) (PET)-toner microfluidic chip by direct-printing integrated with electrochemical detection for pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1303-1309, 2006.
- [41] LIU, A. L.; HE, F. Y.; WANG, K.; ZHOU, T.; XIA, X. H. Rapid method for design and fabrication of passive micromixers in microfluidic devices using a direct-printing process. **Lab on a Chip**, v. 5, n. 9, p. 974-977, 2005.
- [42] BAO, N.; ZHANG, Q.; XU, J. J.; CHEN, H. Y. Fabrication of poly(dimethylsiloxane) microfluidic system based on masters directly printed with an office laser printer. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1-2, p. 270-275, 2005.
- [43] VULLEV, V. I.; WAN, J. D.; HEINRICH, V.; LANDSMAN, P.; MILLARE, B.; JONES, G. Nonlithographic fabrication of microfluidic devices. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 50, p. 16062-16072, 2006.
- [44] KAIGALA, G. V.; HO, S.; PENTERMAN, R.; BACKHOUSE, C. J. Rapid prototyping of microfluidic devices with a wax printer. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 3, p. 384-387, 2007.
- [45] DO LAGO, C. L.; NEVES, C. A.; DE JESUS, D. P.; DA SILVA, H. D. T.; BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA, J. A. F. Microfluidic devices obtained by thermal toner transferring on glass substrate. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3825-3831, 2004.
- [46] DE JESUS, D. P.; BLANES, L.; DO LAGO, C. L. Microchip free-flow electrophoresis on glass substrate using laser-printing toner as structural material. **Electrophoresis**, v. 27, n. 24, p. 4935-2942, 2006.

- [47] COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L.; CARRILHO, E. A. toner-mediated lithographic technology for rapid prototyping of glass microchannels. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 7, p. 931-934, 2007.
- [48] RICHTER, E. M.; DA SILVA, J. A. F.; GUTZ, I. G. R.; DO LAGO, C. L.; ANGNES, L. Disposable twin gold electrodes for amperometric detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 17, p. 2865-2969, 2004.
- [49] 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. **Electrochemistry Communications**, v. 5, n. 9, p. 782-786, 2003.
- [50] DANIEL, D.; GUTZ, I. G. R. Microfluidic cells with interdigitated array gold electrodes: Fabrication and electrochemical characterization. **Talanta**, v. 68, n. 2, p. 429-436, 2005..
- [51] HUYNH, B. H.; FOGARTY, B. A.; NANDI, P.; LUNTE, S. M. A microchip electrophoresis device with on-line microdialysis sampling and on-chip sample derivatization by naphthalene 2,3-dicarboxaldehyde/2-mercaptoethanol for amino acid and peptide analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 5, p. 529-534, 2006.
- [52] LACHER, N. A.; SCOTT MARTIN, R.; LUNTE, S. M. Development of a microfabricated palladium decoupler/electrochemical detector for microchip capillary electrophoresis using a hybrid glass/poly(dimethylsiloxane) device. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 9, p. 2482-2491, 2004.
- [53] KIKUNA-HANAJINI, R.; SCOTT MARTIN, R.; LUNTE, S. M. Indirect measurement of nitric oxide production by monitoring nitrate and nitrite using microchip electrophoresis with electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 24, p. 6370-6377, 2002.
- [54] KIM, M. S.; CHO, S.; LEE, K. N.; KIM, Y. K. Fabrication of microchip electrophoresis devices and effects of channel surface properties on separation efficiency. **Sensors and Actuators B**, v. 107, n. 2, p. 818-824, 2005.
- [55] HUANG, X. H.; GORDON, M. J.; ZARE, R. N. Current-monitoring method for measuring the electroosmotic flow-rate in capillary zone electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 17, p. 1837-1838, 1988.
- [56] MOURZINA, Y.; STEFFEN, A.; KALYAGIN, D.; CARIUS, R.; OFFENHAUSSER, A. Capillary zone electrophoresis of amino acids on a hybrid poly(dimethylsiloxane)-glass chip. **Electrophoresis**, v. 26, n. 9, p. 1849-1860, 2005.
- [57] FLETCHER, P. D. I.; HASWELL, S. J.; ZHANG, X. Electrical currents and liquid flow rates in micro-reactors. **Lab on a Chip**, v. 1, n. 2, p. 115-121, 2001.
- [58] DA SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740-747, 2007.
- [59] BAKER, D. R. **Capillary electrophoresis**. New York: John Wiley, 1995. 272 p.
- [60] WANG, W.; ZHOU, F.; ZHAO, L.; ZHANG, J. R.; ZHUA, J. J. Measurement of electroosmotic flow in capillary and microchip electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1170, n. 1, p. 1-8, 2007.
- [61] MOURZINA, Y.; KALYAGIN, D.; STEFFEN, A.; OFFENHAUSSER, A. Electrophoretic separations of neuromediators on microfluidic devices. **Talanta**, v. 70, n. 3, p. 489-498, 2006.

- [62] REN, Z.; BACHMAN, M.; SIMS, C.; LI, G. P.; ALLBRITTON, N. Electroosmotic properties of microfluidic channels composed of poly(dimethylsiloxane). **Journal of Chromatography B**, v. 762, n. 2, p. 117-125, 2001.
- [63] QIAO, R. Effects of molecular level surface roughness on electroosmotic flow. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 3, n. 1, p. 33-38, 2007.
- [64] SCOTT MARTIN, R.; RATZLAFF, K. L.; HUYNH, B. H.; LUNTE, S. M. In-channel electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis using an electrically isolated potentiostat. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 1136-1143, 2002.
- [65] PU, Q. S.; LUTTGE, R.; GARDENIERS, H. J. G. E.; VAN DEN BERG, A. Comparison of capillary zone electrophoresis performance of powder-blasted and hydrogen fluoride-etched microchannels in glass. **Electrophoresis**, v. 24, n. 1-2, p. 162-171, 2003.

Capítulo 3

*Deteccção Condutométrica sem Contato em
Microsistemas*

3.1. INTRODUÇÃO

A detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C⁴D) foi adaptada como método de detecção para sistemas eletroforéticos convencionais no final da década de 1990^[1,2]. A expansão do desenvolvimento dos microssistemas associada à compatibilidade com as técnicas de microfabricação permitiu a implementação da C⁴D em formato de *chip* no início dos anos 2000. O primeiro trabalho com C⁴D em microssistemas foi descrito por Guitj e colaboradores^[3] no ano de 2001 e, desde esta data, houve um forte desenvolvimento da eletrônica, da geometria ideal, dos métodos de fabricação dos eletrodos e também da integração com microcanais^[4,5]. Comparado com a detecção amperométrica, o uso da C⁴D em microssistemas eletroforéticos (MSE) é vantajoso, pois os eletrodos de detecção podem ser posicionados sobre os microcanais (configuração denominada *on-channel*), porém isolados fisicamente do contato com a solução. O posicionamento dos eletrodos fora dos microcanais evita a degradação da superfície do metal e, adicionalmente, a resposta não sofre interferência do campo elétrico aplicado^[6,7].

No trabalho pioneiro, Guitj e colaboradores^[3] desenvolveram um MSE com quatro eletrodos para C⁴D. Os eletrodos foram fabricados, através de *sputtering*, sobre uma superfície de vidro através da deposição de um filme de Ti/Al (100/500 nm de espessura). Os eletrodos foram isolados do contato físico com os microcanais por uma camada de nitreto de silício (Si₃N₄), a qual foi depositada através de deposição química em fase de vapor à pressão baixa (LPCVD, *low pressure chemical vapor deposition*). A integração dos eletrodos com os microcanais (fabricados em vidro) foi obtida com uma selagem anódica, sob a aplicação de 100 V durante 1 h a 400 °C. Este sistema foi utilizado para monitorar a separação eletroforética de uma mistura de metais alcalinos e peptídeos. O mesmo grupo apresentou outro trabalho explorando a otimização dos parâmetros operacionais, como a frequência e o uso de uma geometria com dois ou quatro eletrodos^[8].

No ano seguinte, em 2002, Lichtenberg e colaboradores^[9] propuseram uma metodologia para fabricação de eletrodos integrados no mesmo plano que os microcanais. Neste caso específico, os eletrodos de Ta/Pt foram isolados do contato com os microcanais por uma parede de vidro, definida na etapa de corrosão, com espessura de aproximadamente 10-15 μm . O substrato contendo os eletrodos microfabricados e os canais corroídos foi selado termicamente contra uma superfície de vidro plana a 650 °C. A Figura 3.1 mostra um exemplo da geometria dos eletrodos fabricados no mesmo plano que os microcanais.

Também em 2002, Pumera e colaboradores^[10] desenvolveram um sistema de C⁴D para *microchips*, usando um circuito eletrônico similar ao desenvolvido por Fracassi da Silva e do Lago^[2]. Neste trabalho, os autores usaram folhas de alumínio para a confecção dos eletrodos para detecção, os quais foram fixados sobre a superfície da tampa do dispositivo com auxílio de uma fita adesiva. Esse sistema, bastante simples, foi utilizado para monitorar a separação de cátions (K^+ , Ba^{2+} , Na^+ , Li^+) e ânions (Cl^- , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , PO_4^{3-}). O mesmo grupo^[11] usou o sistema desenvolvido para monitorar a presença de compostos iônicos (nitrato, perclorato, cloreto, sódio, potássio, amônio e metil-amônio) em amostras de explosivos.

Figura 3.1. Exemplo da integração de eletrodos no mesmo plano que os microcanais. O isolamento dos eletrodos é obtido por uma parede de vidro com largura de 10-15 μm . Adaptada da referência 9.

Em 2003, Wang e colaboradores^[12] desenvolveram um sistema móvel de C⁴D para MSE. Neste sistema, os eletrodos foram fabricados com folhas de alumínio e fixados em uma placa de poli(metil metacrilato) (PMMA). Esse suporte de PMMA contendo os eletrodos colados foi então posicionado sobre o microssistema e fixado com o auxílio de uma presilha, permitindo seu deslocamento para qualquer posição sobre o dispositivo através. A potencialidade deste sistema móvel foi demonstrada pela detecção de espécies catiônicas em pontos diferentes sobre o microcanal, possibilitando a otimização do ponto de detecção ideal para a obtenção de uma resposta com maior resolução entre os picos^[12].

Assim como para os CE convencional, Tanyanywa e Hauser^[13] implementaram o conceito de C⁴D com alta tensão (HV-C⁴D, *high-voltage capacitively coupled contactless conductivity detection*) em MSE. No sistema proposto, a cela de detecção é excitada com um sinal senoidal com amplitude da ordem de centenas de Volts (100-500 V). A vantagem do uso de HV-C⁴D é a detecção de íons inorgânicos em níveis de concentração inferiores a 1 µM. Neste trabalho pioneiro, os eletrodos foram preparados usando tinta condutiva de prata em microdispositivos de vidro. Este sistema foi usado para separar cátions inorgânicos, metais pesados e fármacos.

Tanyanywa e colaboradores^[14] desenvolveram, posteriormente, um suporte externo para fixação dos eletrodos e integração, de forma independente, nos microssistemas. No primeiro protótipo, fitas adesivas de cobre foram utilizadas para fabricação dos eletrodos. Os dispositivos comerciais de PMMA, ou vidro, foram então posicionados sobre este suporte contendo os eletrodos. Este sistema com os eletrodos posicionados em um suporte externo foi utilizado para monitorar a separação de metais alcalinos, metais pesados, ânions, ácidos orgânicos e amino ácidos^[14]. As fitas adesivas de cobre foram, posteriormente, substituídas por placas de circuito impresso (PCI) contendo uma camada de cobre^[15]. Essa metodologia foi adotada para otimizar as dimensões da cela de detecção como a largura, espaçamento e

comprimento dos eletrodos, além da espessura da camada isolante entre os eletrodos e o microcanal^[15].

As vantagens do uso de um suporte contendo eletrodos externos pode ser confirmado pelo grande número de publicações. Além dos exemplos já mencionados, o uso de HV-C⁴D com eletrodos externos vem sendo aplicado para detecção de anticorpos^[16], ácidos carboxílicos^[17], açúcares^[17], fármacos^[18,19], amino ácidos^[17,19], peptídeos^[19], proteínas^[19], fragmento de DNA^[19], vitamina C^[20], conservantes alimentícios^[20] e compostos enantioméricos^[21,22]. A Figura 3.2 apresenta uma foto da plataforma contendo os eletrodos preparados em um suporte externo e um microssistema fixado sobre a superfície. Nessa configuração os eletrodos estão fora do plano dos microcanais. Como observado na Figura 3.2, os eletrodos estão posicionados abaixo da micro-estrutura, na qual a espessura da base do dispositivo limita a distância entre os eletrodos e o microcanal.

O sistema de C⁴D também foi adaptado para microssistemas fabricados a partir do uso de um processo de impressão direta como o poliéster-toner (PT)^[23], vidro-toner^[24] e vidro-vidro^[25]. Nos três casos, os eletrodos para C⁴D foram fabricados através do uso de fitas adesivas de cobre. As fitas foram recortadas em dimensões de aproximadamente 1 mm e fixadas sobre os dispositivos. A espessura da tampa do dispositivo limita a distância dos eletrodos aos microcanais. No caso do poliéster, a espessura é de $100 \pm 10 \mu\text{m}$ ^[23]. Para os dispositivos de vidro-toner^[24] e vidro-vidro^[25], a distância entre os canais e os eletrodos é delimitada pela espessura de uma lamínula de vidro, usada para selar os canais definidos pela parede de toner^[24] ou pela corrosão química em meio ácido^[25]. A espessura dessas lamínulas é de aproximadamente $200 \mu\text{m}$ ^[24,25].

Figura 3.2. Fotografia mostrando a integração dos eletrodos fora do plano dos microcanais. Nesta configuração, a espessura da base do dispositivo ($\sim 125\ \mu\text{m}$) promove o isolamento entre os eletrodos e o microcanal. Imagem reproduzida da referência 15 com permissão da *The Royal Society of Chemistry*.

A fabricação de eletrodos para C⁴D com fitas adesivas metálicas é vantajosa devido à simplicidade e ao custo reduzido. No entanto, a repetibilidade do preparo destes eletrodos é o ponto crítico deste processo devido à dependência da habilidade manual em recortar e fixar os eletrodos com as mesmas dimensões sempre na mesma posição. Diante deste ponto desfavorável, um processo baseado no uso de PCI contendo uma camada simples de cobre foi desenvolvido para a confecção de eletrodos para C⁴D usando máscaras de toner para corrosão química do metal^[26]. Neste processo, os eletrodos são fabricados em um suporte externo e o dispositivo microfluídico é fixado com auxílio de fitas adesivas. A aplicabilidade foi demonstrada para eletroforese e isotacoforese em microsistemas fabricados em PT^[26].

Embora o uso de eletrodos planares seja predominante em microsistemas, Lee e colaboradores^[27] descreveram a implementação de eletrodos semicirculares para C⁴D em MSE confeccionados em vidro. Os eletrodos foram fabricados no mesmo plano que os microcanais, porém isolados por uma distância de $40\ \mu\text{m}$. Esse isolamento foi definido na máscara fotolitográfica de modo a delimitar a área durante a corrosão química dos canais em vidro. Os limites de detecção para íons de alta mobilidade, como o K^+ e o Cl^- , foram da ordem de dezenas de ppb. Esses limites são aproximadamente 100 vezes melhores do que os limites

encontrados com o uso de eletrodos planares^[27]. A diferença observada na sensibilidade é atribuída ao aumento da área superficial dos eletrodos. No entanto, a integração dos eletrodos e os microcanais é dependente da etapa de selagem térmica em temperaturas elevadas^[27].

Além de todo o desenvolvimento instrumental e as aplicações mencionadas acima, a C⁴D encontra outras aplicações em microfluídica. Abad-Villar e colaboradores^[19] demonstraram que a C⁴D pode ser utilizada para monitorar os produtos da digestão enzimática de uma proteína. No trabalho apresentado, os autores demonstraram que a clivagem da proteína HSA (*human serum albumine*) com a enzima *pepsina* pode ser realizada em um reservatório do microssistema e monitorada, em função do tempo, com C⁴D. Schuchert-Shi e colaboradores^[28] propuseram o uso da C⁴D como ferramenta para monitorar reações enzimáticas, em tempo real, usando MSE. Exemplos de reações enzimáticas para a glicose, etanol e ésteres foram utilizados para demonstrar a aplicabilidade do sistema proposto. Em 2008, Ding e colaboradores^[29] demonstraram que microssistemas de poli(dimetil siloxano) (PDMS) com eletrodos integrados para C⁴D podem ser aplicados para o monitoramento da degradação de compostos químicos empregados em ações terroristas.

3.1.1. Objetivos

O trabalho descrito neste Capítulo visa, principalmente, a construção de um sistema inédito de C⁴D dupla para microssistemas, além da avaliação da geometria ideal e da otimização das dimensões da cela de detecção (largura e espaçamento) para posterior aplicação em sistemas biomoleculares. Os objetivos secundários referem-se à fabricação de eletrodos planares e a respectiva etapa de integração com microcanais a partir de processos simples, rápidos e economicamente viáveis para implementação em qualquer laboratório químico. Além do sistema de detecção, o desenvolvimento de um *software* genérico em *LabVIEW* versão 8.0 para controle e aquisição de dados também está descrito neste Capítulo.

3.2. EXPERIMENTAL

3.2.1. Construção do detector condutométrico sem contato (oscilométrico)

O detector oscilométrico foi construído, em duas versões, de acordo com a eletrônica desenvolvida por Fracassi da Silva e do Lago^[2,30,31]. A primeira versão constituiu-se de um sistema com um único detector, o qual foi utilizado para MSE fabricados em vidro-vidro^[25] e para a otimização da construção dos microssistemas integrados^[32]. A segunda versão foi desenvolvida com dois detectores em série para aplicação em estudos biomoleculares, os quais serão discutidos no Capítulo 4. A eletrônica de ambos os sistemas é idêntica e será detalhada genericamente mais adiante.

Em um sistema de C⁴D simples para *microchips*, a configuração da cela de detecção é composta de dois eletrodos posicionados em orientação antiparalela. Como apresentado na Figura 3.3, um sinal senoidal de frequência da ordem de centenas de kHz é aplicado, através de um gerador de funções, ao eletrodo de excitação da cela de detecção (e0). Ao se aplicar esse sinal, a corrente flui pelo dispositivo sendo capturada pelo eletrodo e1, refletindo todos os possíveis caminhos percorridos pelo sinal. Após a transformação do sinal de corrente em tensão, pelo conversor i/e (a), segue-se a retificação do sinal efetuado por um circuito retificador de precisão, operando em meia onda (b). O sinal resultante é filtrado e amplificado antes de passar pela etapa de compensação da linha de base (*offset*). O sinal analógico é então enviado para uma interface analógica/digital (A/D) para aquisição de dados^[30,31].

Figura 3.3. Diagrama do sistema de detecção oscilométrica simples em microssistemas. O eletrodo de excitação e o eletrodo receptor estão representados por e0 e e1, respectivamente. As etapas (a) e (b) indicam os estágios de conversão da corrente em tensão e retificação do sinal, respectivamente.

Para o sistema de C⁴D dupla, as etapas relacionadas ao registro e ao tratamento do sinal são idênticas. A única diferença baseia-se na geometria dos eletrodos. Para um sistema de C⁴D simples, a geometria é composta de dois eletrodos, sendo um responsável pela excitação da cela e o outro pela captura do sinal resultante. Para o sistema duplo, como apresentado na Figura 3.4, dois eletrodos são utilizados para realizar a captação do sinal. Intuitivamente, dois eletrodos seriam necessários para promover a excitação da cela, resultando numa configuração composta de 4 eletrodos. No entanto, geometrias contendo um, dois e até três eletrodos para promover a excitação do sistema duplo foram avaliadas, como será abordado no item 3.3.5.

Figura 3.4. Diagrama do sistema de detecção oscilométrica dupla em microssistemas. Os eletrodos de excitação são representados por e0. Os eletrodos receptores estão representados por e1 e e2. Outros detalhes: ver Fig. 3.1.

3.2.1.1. Instrumentação: componentes do sistema de detecção

A instrumentação do sistema envolve um gerador de funções, os circuitos dos detectores, uma fonte para alimentação eletrônica e uma interface para aquisição de dados. Além disso, para os experimentos eletroforéticos ou biomoleculares há a necessidade de um sistema para manuseio dos fluidos. A caracterização do detector e a avaliação da geometria da cela de detecção foram realizadas através de experimentos eletroforéticos, usando um sistema automatizado para controle eletrocinético do fluido nos microcanais. Por outro lado, os ensaios biomoleculares foram realizados com fluxo hidrodinâmico, o qual será detalhado oportunamente no Capítulo 4.

Gerador de funções

O sinal de excitação para o circuito oscilométrico foi gerado a partir de um gerador de funções MFG 4202 (Minipa, São Paulo, SP). O gerador é capaz de gerar formas de onda senoidal, quadrada e triangular na faixa de frequência de 0,2 Hz a 2 MHz, com ajuste de amplitude (1-20 V) e simetria da onda. A impedância de saída do gerador é de 50 Ω .

Circuito eletrônico

O circuito do detector, mostrado no apêndice B, foi montado em dois módulos. No primeiro módulo, a cela oscilométrica, o estágio de conversão i/e, o retificador e um filtro RC (passa-baixas) foram colocados em uma única placa utilizando-se a tecnologia de montagem em superfície (SMD, *surface mounted devices*). Uma blindagem (caixa de alumínio) foi colocada em torno desta para minimizar a captação de ruído. No segundo módulo, foram colocados os estágios finais de amplificação e compensação da linha base, bem como a fonte de alimentação do circuito. Os circuitos também foram colocados em uma caixa metálica para eliminar a captação de ruído.

Fonte de alimentação e fonte de alta tensão

A alimentação do circuito eletrônico do equipamento foi feita através de uma fonte simétrica comercial com ± 12 V, adquirida junto à empresa LabTools (São Paulo, Brasil). Para realizar o manuseio eletrocinético dos líquidos nos canais microfluídicos, foi utilizada uma fonte de alta tensão (CZE 1000R, Spellman, NY) com capacidade de aplicação de potencial de até 30 kV.

Interface de aquisição

A aquisição de dados foi realizada com uma interface A/D comercial da *National Instruments* (modelo NI USB-6009) com porta USB para comunicação com o microcomputador, cuja resolução é de 14 *bits*.

Funcionamento do detector oscilométrico

Assim como nos sistemas capilares^[31], 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 microcanal (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):

$$Y = G + jB = \frac{R_s}{R_s^2 + X_w^2} + j \frac{R_s^2 + X_w(X_o + X_w)}{X_o(R_s^2 + X_w^2)} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

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

$$|Y| = \frac{\sqrt{R_s^2 X_o^2 + [R_s^2 + X_w(X_o + X_w)]^2}}{X_o(R_s^2 + X_w^2)} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

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.

3.2.2. *Software* de aquisição de dados

O *software* de aquisição foi escrito em *LabVIEW*[®] de modo a abranger todos os sistemas microfluídicos desenvolvidos no grupo de pesquisa, diferenciando-se apenas de acordo com as necessidades específicas de cada sistema. Para a C⁴D dupla, o *software* controla e exibe, em tempo real, o sinal dos dois detectores e a corrente gerada no interior dos microcanais devido à aplicação de um campo elétrico. Além disso, uma etapa de controle eletrocinético pode ser facilmente realizada escolhendo-se os potenciais elétricos e o tempo de aplicação dos mesmos. Parâmetros de amostragem, como taxa de leitura e número de pontos para processamento gráfico podem ser facilmente alterados de acordo com a necessidade requerida. A Figura 3.5 apresenta uma imagem da tela principal do programa. O desenvolvimento da versão número 1 do *software* de aquisição e a montagem dos circuitos eletrônicos do detector duplo teve a colaboração do Dr. Carlos A. Neves. Como observado na Figura 3.5, a interface do programa permite a seleção dos potenciais elétricos para injeção e separação, além do tempo de injeção. A planilha dos dados a serem gerados pode ser arquivada escolhendo-se a extensão .dat (ou txt), a qual permite uma fácil importação dos dados em um *software* gráfico, como o Microcal[™] Origin[™]. A documentação do *software* desenvolvido está apresentada no apêndice C.

Figura 3.5. Visualização da tela principal do *software* escrito em *LabVIEW* mostrando os três gráficos gerados em tempo real e a janela para configurar o transporte eletrocinético bem como o diretório do arquivo de dados.

3.2.3. Fabricação de microssistemas integrados

Para avaliar o comportamento do detector e estudar a geometria ideal para o sistema duplo, houve a necessidade de desenvolver microssistemas integrados, ou seja, microssistemas contendo microcanais e eletrodos em uma mesma plataforma. Devido à simplicidade e a independência de instrumentação de alto custo, optou-se pelo desenvolvimento das micro-estruturas a partir de métodos alternativos, usando o princípio de impressão direta em um ou mais estágios.

Neste sentido, dois métodos foram desenvolvidos. O primeiro baseia-se no uso da impressão direta para a fabricação de canais e eletrodos metálicos. Neste caso, máscaras de toner, impressas sobre o filme de poliéster, foram usadas para delimitar a área dos eletrodos, os quais foram obtidos através de deposição metálica por *sputtering*. Após a remoção do toner, os eletrodos fabricados sobre o poliéster foram integrados com os canais em PT através

de selagem. Este tipo de microssistema foi utilizado para avaliar o comportamento do detector e estudar a geometria ideal do detector duplo.

O segundo método surgiu em consequência de um problema na bomba vácuo do sistema de *sputtering*, o que impediu a continuidade do uso dos microssistemas de PT. Este segundo método baseou-se na utilização de uma PCI para confecção dos eletrodos, similarmente ao processo desenvolvido por C. A. Neves^[26] para os microssistemas descartáveis. No entanto, no método proposto neste trabalho, os eletrodos foram isolados fisicamente do contato com a solução a partir do uso de um filme de poli(etileno tereftalato) (PET) contendo uma camada de resina termo-sensível. A partir do isolamento elétrico, microcanais foram fabricados em PDMS e integrados à plataforma contendo os eletrodos isolados com o filme de PET. Esse processo alternativo foi utilizado para avaliar as dimensões (largura e espaçamento) do detector duplo usando um planejamento experimental. Os dois métodos alternativos estão descritos a seguir.

3.2.3.1. Microssistemas em poliéster-toner

Os eletrodos para C⁴D foram fabricados sobre o filme de poliéster como visualizado na Figura 3.6. Inicialmente, a máscara contendo a geometria desejada foi desenhada e impressa sobre o filme de poliéster (I) usando uma impressora laser. A camada de toner depositada (II), com espessura de aproximadamente 7 µm, tem a função inovadora de delimitar a região para deposição do metal de interesse. Dessa maneira, o filme de poliéster contendo a geometria (definida pela máscara de toner) impressa foi, primeiramente, fixado em uma placa de vidro para conferir maior robustez e submetido a uma etapa de limpeza com plasma de O₂ (não representado na Figura).

Figura 3.6. Processo de fabricação de eletrodos em filmes de poliéster usando máscaras de toner. I, filme de poliéster; II, impressão de uma máscara de toner; III, deposição metálica através de *sputtering* e; IV, obtenção dos eletrodos planares após remoção da camada de toner com solvente orgânico.

Em seguida, o substrato foi colocado em uma câmara do sistema de *sputtering* e uma camada metálica constituída de titânio (20 nm) e alumínio (150 nm) foi depositada sobre a superfície do substrato (III). Como representado na Figura 3.6, o metal foi depositado sobre toda a superfície. No entanto, a exemplo do que ocorre com as máscaras convencionais (fotorresiste), a máscara de toner pode ser removida pela imersão em um recipiente contendo solvente orgânico. Para a remoção do toner, o filme de poliéster foi colocado em um recipiente contendo acetona e mantido por 2-3 min. Com a exposição ao solvente, a camada de toner foi removida e o material metálico depositado (eletrodos) na região definida pela máscara permaneceu aderido sobre o substrato (IV). Esta etapa de remoção da máscara é denominada convencionalmente de *lift-off*.

Os microcanais também foram fabricados sobre o filme de poliéster usando o processo de impressão direta (ver Capítulo 2), como ilustrado na Figura 3.7A. Analogamente à impressão da máscara de toner, a geometria dos microcanais foi desenhada e impressa sobre o poliéster através da impressora laser. A integração dos dois substratos, contendo os

microcanais e os eletrodos, foi realizada através da laminação térmica, usando uma plastificadora de documentos (modelo AC 0012-30, Gazela, Divinópolis-SP). Para isso, o substrato contendo os eletrodos foi perfurado na região dos reservatórios e alinhado com o substrato contendo os canais impressos, como apresentado na Figura 3.7B.

Com o objetivo de utilizar os eletrodos para detecção condutométrica sem contato, antes do alinhamento, o lado do substrato contendo os eletrodos planares foi cuidadosamente mantido para cima, ou seja, externo ao contato com os microcanais. Após a perfuração e o alinhamento, os dois filmes foram laminados e a estrutura microfluídica contendo eletrodos integrados foi obtida. Neste caso, ao contrário das estruturas de PT utilizadas no Capítulo 2, os dispositivos foram definidos por apenas uma camada de toner, com profundidade de aproximadamente 6 μm . Para finalizar o processo, tubos (d.i. = 4 mm; d.e. = 6 mm) de poli(etileno) (PE) foram colados, com resina epóxi, sobre a região perfurada para formar reservatórios para soluções. A Figura 3.8 apresenta um esquema de um MSE com eletrodos integrados para C⁴D. O contato elétrico dos eletrodos planares foi obtido com auxílio de uma cola condutora e resina epóxi (araldite).

Figura 3.7. Esquema de impressão dos canais (A) e a integração dos eletrodos fabricados no filme de poliéster (B). Os números 1, 2 e 3 representam o filme de poliéster (antes da impressão), filme de poliéster contendo os canais impressos e o filme de poliéster (perfurado) contendo os eletrodos planares para detecção oscilométrica.

Figura 3.8. Representação de um microssistema fabricado em poliéster-toner contendo eletrodos e canais integrados. Os pontos 1, 2, 3 e 4 indicam os reservatórios para amostra, tampão, descarte da amostra e descarte do tampão, respectivamente. Os pontos i e ii indicam os eletrodos para excitação da cela e registro do sinal resultante, respectivamente.

3.2.3.2. Microssistemas em PDMS/PET/PCI

Uma alternativa encontrada para o estudo das dimensões geométricas da cela de detecção foi a utilização de PCI como fonte metálica para a fabricação dos eletrodos. De modo a promover o isolamento elétrico, os eletrodos foram protegidos com um filme de PET. Os microcanais foram fabricados em PDMS, conforme procedimento descrito no Capítulo 2, e integrados ao sistema de detecção definido em PET/PCI. O processo de fabricação dos eletrodos em PCI e o isolamento com um filme de PET estão representados na Figura 3.9.

A PCI tem uma camada de Cu com espessura de $30 \pm 2 \mu\text{m}$ e testes preliminares mostraram que essa espessura era excessiva e provocava irregularidades na região dos eletrodos. Por esse motivo, antes de definir a área dos eletrodos, a superfície do Cu foi exposta a uma solução corrosiva composta de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (5:1:7 v:v) à 55°C durante 30 min. Nesse período, a camada de Cu foi lentamente corroída à uma taxa de $0,5 \mu\text{m min}^{-1}$, reduzindo a espessura da camada metálica para $\sim 15 \mu\text{m}$.

Como mostrado na Figura 3.9, após a corrosão inicial, a superfície foi lavada com água e seca com N_2 (I). A configuração dos eletrodos foi desenhada e impressa sobre uma

folha de papel vegetal. A imagem impressa (uma imagem negativa da desejada) foi então transferida termicamente para a superfície do Cu a 135 °C durante 2 min sob a aplicação de uma pressão de aproximadamente 0,1 MPa (II). A máscara de toner ($\leq 5 \mu\text{m}$), nesse caso, tem a função de proteger a superfície do Cu durante a exposição à solução corrosiva. A área não protegida foi corroída em uma solução comercial de FeCl_3 (III) a uma taxa de $5 \mu\text{m min}^{-1}$. Após a corrosão, a máscara de toner foi removida na presença de acetonitrila (IV).

Uma vez obtidos os eletrodos, houve a necessidade de promover o isolamento elétrico para uso na detecção condutométrica sem contato. O isolamento “ideal” foi conseguido com o uso de um filme de PET revestido com uma resina termo-sensível. Este material é utilizado para a plastificação de documentos. A resina é composta de PMMA e tem um ponto de transição vítrea em 120 °C. Logo, quando aquecida à uma temperatura superior a esse valor, a resina se funde à superfície do substrato, neste caso a PCI contendo os eletrodos de Cu para C⁴D. Um pedaço deste filme polimérico (com tamanho igual ao da PCI) foi recortado e posicionado sobre a placa com os eletrodos (V). O sistema foi submetido a um aquecimento (140 °C) durante 2 min. Após esta etapa, os eletrodos isolados eletricamente foram obtidos (VI).

Os microcanais foram fabricados em PDMS a partir de moldagem usando o mesmo procedimento descrito no Capítulo 2. Adicionalmente, o mesmo molde (definido em SU-8) foi utilizado para a prototipagem dos canais para avaliação das dimensões da cela de detecção. Os microcanais foram confeccionados com largura de 150 μm e profundidade de 12 μm . A réplica moldada em PDMS foi então colocada em contato com a superfície do filme de PET, promovendo uma selagem reversível, a exemplo do que ocorre com os sistemas de PDMS/vidro. Neste caso, um sistema híbrido de PDMS/PET/PCI foi obtido.

Figura 3.9. Esquema do processo de microfabricação sobre placas de circuito impresso. I, limpeza da superfície do Cu com água; II, camada de toner depositada sobre a superfície metálica para delimitar a área a ser corroída; III, corrosão do metal com FeCl₃; IV, obtenção dos eletrodos após remoção da máscara de toner; V, filme de PET posicionado sobre a superfície da PCI e; VI, eletrodos isolados eletricamente do contato físico.

3.2.4. Transporte eletrocinético

O comportamento e a avaliação da geometria do detector duplo foram avaliados com experimentos eletroforéticos usando os microssistemas fabricados de acordo com o item 3.3.3. Nestes experimentos, a amostra foi introduzida nos canais usando o processo eletrocinético mais simples, denominado de *unpinched*. Essa simplicidade deve-se à necessidade de apenas uma fonte de alta tensão para realizar as etapas de injeção e separação. Deve-se observar que este método de introdução da amostra é diferente daquele apresentado no Capítulo 2.

O processo de controle eletrocinético do fluido está apresentado na Figura 3.10. Nos dispositivos de PT, o volume de injeção foi definido por uma geometria no formato de um duplo-T. Nessa configuração, os reservatórios da amostra, tampão, descarte da amostra e descarte do tampão são representados pelos números 1, 2, 3 e 4, respectivamente (ver Figura 3.10A). O canal de injeção é delimitado pelos pontos 1 e 3, enquanto o canal de

separação é delimitado pelos pontos 2 e 4. A Figura 3.10 apresenta uma série de imagens obtidas em um microscópio óptico para ilustrar o processo de injeção mencionado.

Para o preenchimento do canal de injeção (Figura 3.10B), a amostra é colocada no reservatório número 1 e uma diferença de potencial (tipicamente 700 – 1000 V) é aplicada (símbolo +) ao reservatório 1, mantendo o reservatório 3 aterrado (símbolo -). Com isso, todo o canal é preenchido em aproximadamente 10 s (Figura 3.10C). Nesse processo, a geometria no formato de um duplo-T define o volume de amostra a ser introduzido no canal de separação. Após essa etapa, o potencial no canal de injeção é interrompido e aplicado ao canal de separação, com demonstrado na Figura 3.10D. Dessa maneira, a zona de amostra definida pela geometria da intersecção dos microcanais é introduzida no canal de separação e transportada na direção do ponto de detecção (Figuras 3.10E e 3.10F).

Figura 3.10. Esquema do controle eletrocinético nos microcanais. (A), representação da configuração do dispositivo no formato de um duplo-T contendo um microcanal de injeção (delimitado pelos pontos 1 e 3) e um canal de separação (delimitado pelos pontos 2 e 4); (B) e (C), etapas de preenchimento do canal de injeção após 1 e 10 s, respectivamente; (D-F), introdução e separação de uma zona de amostra dentro do canal de separação. Os números 1, 2, 3 e 4 indicam os reservatórios para amostra, tampão, descarte da amostra e descarte do tampão, respectivamente.

3.2.5. Avaliação da geometria ideal

Para o sistema de C⁴D simples, a geometria contendo dois eletrodos (ver Figura 3.11A) foi utilizada. Para o sistema de C⁴D duplo, geometrias contendo três, quatro e cinco eletrodos foram avaliadas monitorando-se a intensidade do sinal analítico em relação à linha de base. Especificamente, buscou-se encontrar uma geometria em que ambas as alturas fossem similares, desprezando-se os efeitos de difusão e interação com a parede do microcanal. Devido à facilidade, a avaliação da geometria ideal foi realizada através de experimentos eletroforéticos. As geometrias avaliadas para o sistema duplo estão apresentadas nas Figuras 3.11B, 3.11C e 3.11D. Em todos os casos, a excitação do sinal foi aplicada ao eletrodo e0, enquanto os sinais dos dois detectores foram registrados pelos eletrodos e1 e e2. Para as geometrias propostas nas Figuras 3.11C e 3.11D, os eletrodos de excitação foram interligados através de uma conexão única ao gerador de funções.

Figura 3.11. Representação das geometrias utilizadas para o sistema de C⁴D simples (A) e duplo (B-D). (A), geometria tradicional com dois eletrodos posicionados em orientação anti-paralela; (B), geometria contendo três eletrodos; (C), geometria de quatro eletrodos (dois pares) posicionados de forma análoga à (A) e; (D), geometria contendo cinco eletrodos. Os termos e0, e1 e e2 indicam os eletrodos conectados ao gerador de funções, detector 1 e detector 2, respectivamente.

3.2.6. Otimização

Após a determinação da geometria ideal do sistema duplo, as dimensões da cela de detecção foram avaliadas com auxílio de um planejamento experimental^[33]. Parâmetros geométricos, como a largura e o espaçamento entre os eletrodos foram avaliados. Além disso, a frequência de trabalho também foi investigada. A amplitude do sinal é outro parâmetro instrumental que interfere significativamente na resposta do detector. No entanto, este

parâmetro será tratado à parte, devido a dependência intrínseca da característica do amplificador operacional utilizado. O parâmetro analítico avaliado foi a intensidade do sinal (altura do pico).

Para todos os parâmetros, os limites inferiores (-), superiores (+) e o ponto central (0) foram definidos e estão apresentados na Tabela 3.1. Com os três parâmetros definidos, um planejamento do tipo 2^3 foi montado. O número total de ensaios foi igual a $2^3 + 1$, ou seja, nove ensaios. No entanto, cada ensaio foi realizado em triplicata, totalizando assim 27 experimentos. Para evitar a propagação de um erro sistemático, a ordem dos ensaios foi sorteada.

Os valores obtidos foram analisados no software STATISTICA versão 6.1 (StatSoft Inc, Tulsa, EUA), o qual utiliza um modelo matemático empírico para ajustar a equação quadrática do conjunto de dados. Os resultados estão apresentados na forma de superfície de resposta e os efeitos de cada variável, bem como a interação entre elas, foram avaliados por análise de variância (ANOVA).

Tabela 3.1. Variáveis e níveis utilizados para avaliação das dimensões da cela e da frequência de trabalho do sistema de detecção.

Variáveis	(-)	(0)	(+)
1. Largura (mm)	1,0	1,5	2,0
2. Espaçamento (mm)	1,0	1,5	2,0
3. Frequência (kHz)	100	300	500

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Sistema de detecção

Como mencionado na parte experimental, dois protótipos do C⁴D foram desenvolvidos com circuitos eletrônicos idênticos. Para os dois módulos eletrônicos, os circuitos dos dois detectores foram inseridos em uma caixa metálica de modo a minimizar a captação de ruído externo. A Figura 3.12 apresenta uma sequência de imagens do sistema de detecção dupla.

A versão final do sistema de C⁴D dupla apresentou uma maior robustez devido ao uso de conectores comerciais, os quais reduziram o nível de ruído capturado, e também devido ao uso de um terra comum entre todos os módulos. Como pode ser visualizado na Fig. 3.12A, a placa SMD foi conectada com quatro pinos dispostos na configuração de 90°. Estes quatro pinos são responsáveis pela transmissão da alimentação com ± 12 V, terra e também o sinal de saída do módulo. Os dois circuitos foram fixados em um sistema de barramento colado na superfície da caixa de alumínio (Fig. 3.12B). A idéia em usar esse tipo de conexão confere maior flexibilidade de operação com um ou os dois circuitos. Os dois circuitos foram protegidos, ou blindados, por uma tampa metálica mantendo-os também ocultos (Fig. 3.12C). Módulos adicionais para amplificação e compensação da linha de base (Figs. 3.12D-F) foram fixados em uma placa de poli(carbonato) (PC) usando tubos de silicone como espaçadores, ou suportes para a fixação. A placa de PC com os dois circuitos foi colada em uma caixa metálica. Nestes circuitos, o uso de conectores na forma de pinos também favoreceu a montagem do sistema (Figs. 3.12D-H). Como pode ser visualizado nas Figs. 3.12G-I, dois potenciômetros foram adicionados à caixa metálica para ajuste da linha de base. Após a montagem, este módulo foi fechado com uma tampa metálica para isolamento elétrico (Fig. 3.12I). As saídas dos sinais foram posicionadas na caixa metálica na parede oposta aos potenciômetros através do uso de conectores do tipo “banana”, sendo que as cores vermelha e preta representam, respectivamente, o sinal do detector e o terra (Fig. 3.12J).

Figura 3.12. Componentes e montagem do sistema de detecção oscilométrica dupla. (A), imagem de um circuito SMD oscilométrico montado; (B), imagem dos dois circuitos SMD fixados em um barramento (ver setas) com suporte para conexão; (C), isolamento dos circuitos com uma tampa de alumínio com destaque (ver área destacada) ao ponto de fixação que foi usado para aterramento de todo o sistema; (D-F), circuitos do módulo 2 montados sobre uma base de polícarbonato (PC) isolados com espaçadores de silicone (~5 mm) e alocados em um suporte metálico; (G-J), suporte de alumínio do módulo 2 destacando os dois potenciômetros (ver setas em G) na parte frontal, detalhe das conexões (H), suporte fechado (I) e conectores – tipo banana – da saída dos sinais de ambos os detectores, posicionados no lado oposto aos potenciômetros. Em (J), os cabos são usados para a alimentação dos circuitos.

A fonte de alimentação foi montada em um módulo adicional e conectada ao módulo 2 através de cabos co-axiais. As Figuras 3.13A e 3.13B apresentam imagens da fonte comercial e suas conexões elétricas. As imagens 3.13C e 3.13D mostram o suporte para o microchip antes (C) e depois (D) da conexão com os eletrodos planares. Uma base plástica de PC foi fixada com adesivos colantes para evitar o contato direto das micro-estruturas com a caixa metálica.

Figura 3.13. Imagens da fonte de alimentação (A e B) e do suporte do microchip (C e D), no qual as conexões elétricas e com o ambiente macroscópico são feitas.

3.3.2. Integração de eletrodos para C⁴D em microssistemas de PT

Como demonstrado no Capítulo 2, os microssistemas analíticos podem ser fabricados em uma ampla variedade de materiais a partir de processos convencionais ou processos alternativos. Dentre os processos de microfabricação, o grande destaque é a impressão direta de microcanais em PT. Neste trabalho, eletrodos foram integrados aos microcanais fabricados em PT usando máscaras de toner impressas, como descrito no item 3.3.3.1. A Figura 3.14 apresenta uma imagem da máscara de toner depositada sobre o filme de poliéster (A), uma imagem do eletrodo formado após a deposição metálica e conseqüente remoção do toner (B) e uma imagem do dispositivo final contendo eletrodos integrados com os microcanais fabricados em PT. Como observado nessas imagens, a definição da máscara apresenta algumas imperfeições, as quais são resultantes da resolução da impressora laser utilizada.

Figura 3.14. Micrografias ópticas da máscara de toner impressa (A) e do eletrodo planar obtido após deposição metálica e remoção do toner (B). A imagem (C) apresenta uma micrografia do microssistema de PT contendo os eletrodos integrados após laminação térmica. Em (C), o eletrodo de excitação e o eletrodo receptor estão representados por e0 e e1, respectivamente.

Como detalhado na parte experimental, os eletrodos e os microcanais foram integrados através de laminação a 120 °C numa velocidade de aproximadamente 10 cm min⁻¹. Quando comparado aos processos convencionais, a integração dos eletrodos em microssistemas de PT é vantajosa, pois a selagem ocorre em questão de minutos e não requer o uso de temperaturas elevadas. Esses aspectos são responsáveis pela preservação da estrutura dos eletrodos, os quais não sofrem nenhuma danificação durante a laminação.

Assim como em outros microssistemas, a integração de eletrodos em filmes de poliéster requer a otimização dos parâmetros operacionais do sistema de detecção, como a frequência e a amplitude. Essas duas variáveis são essenciais para a maximização da sensibilidade do detector. Em linhas gerais, quanto maior a amplitude do sinal aplicado (V_{pp}), maior o sinal de saída. A melhor alternativa para otimizar estes parâmetros seria avaliar a relação sinal-ruído (RSR). No entanto, a RSR não segue necessariamente a mesma tendência, uma vez que o ruído total do circuito tem a contribuição do ruído eletrônico, mecânico, térmico e químico^[34,35]. Como observado no item 3.4.1, dois potenciômetros foram utilizados para ajuste da linha de base (*offset*). Estes potenciômetros sofrem um desgaste mecânico em função do uso e é comum, em muitos casos, o ruído sofrer uma alteração. Por esse motivo, as variáveis operacionais foram otimizadas em função do sinal de base (V_{DC}), ou valor absoluto, do sinal resultante antes do estágio de amplificação e ajuste da linha de base^[30,31].

O valor absoluto da linha de base (V_{DC}) foi então monitorado em um canal preenchido com solução tampão composta de MES/His 20 mmol L⁻¹, pH 6,1. Os sinais foram monitorados durante 60 s e os experimentos foram conduzidos em uma faixa de frequência variando de 100 a 900 kHz. A Figura 3.15A apresenta os valores do sinal da linha de base em função da frequência de trabalho para diferentes valores de amplitude (V_{pp}). Já a Figura 3.15B mostra os valores da linha de base em função da V_{pp} para várias frequências de trabalho.

Como observado na Figura 3.15A, o comportamento do sinal da linha de base em função da frequência apresenta uma curva no formato de uma gaussiana, onde há um valor de frequência em que o sinal da linha de base atinge um ponto máximo. Para a curva demonstrada na Figura 3.15A, com amplitude de 2 V_{pp} , a frequência que fornece os valores mais intensos é de aproximadamente 470 kHz. Com o aumento da amplitude, este ponto é deslocado para frequências inferiores.

Por outro lado, quando o sinal da linha de base é avaliado em função da amplitude (Figura 3.15B), uma dependência linear para diferentes frequências é observada para amplitudes inferiores a 4 V_{pp} . Para a frequência de 400 kHz, por exemplo, esta linearidade é observada até ~8 V_{pp} . Para frequências mais elevadas, esta linearidade é limitada para amplitudes inferiores. O perfil da resposta em função da frequência e da amplitude é uma característica específica de cada tipo de amplificador operacional utilizado. Como descrito na parte experimental, o amplificador utilizado neste trabalho foi o OPA 2604 (Texas Instruments). Os dados apresentados na Figura 3.15 mostram que para a amplitude de 10 V_{pp} , a frequência que propicia a resposta mais intensa é de 400 kHz. Estes resultados são similares aos dados apresentados para um sistema de CE convencional^[30,31].

Figura 3.15. Otimização dos parâmetros do detector oscilométrico. A Figura (a) apresenta o valor da linha de base em função da frequência de trabalho para diferentes amplitudes, enquanto a Figura (b) apresenta o valor da linha de base em função da amplitude para diferentes frequências. Condições: microcanal de PT preenchido com tampão MES/His 20 mmol L⁻¹, pH 6,1.

Para demonstrar a funcionalidade dos MSE de PT com eletrodos integrados para C⁴D, separações eletroforéticas foram realizadas utilizando-se o tampão MES/His 20 mmol L⁻¹, pH 6,1, como eletrólito. A amostra introduzida no microcanal foi composta de uma mistura equimolar de KCl, NaCl e LiCl, preparados em água. Os resultados analíticos obtidos com os MSE de PT apresentaram alguns fenômenos interessantes no início do desenvolvimento deste trabalho.

De maneira bastante sucinta, a repetibilidade na altura e na área dos sinais analíticos para uma série de injeções apresentou um desvio padrão relativo superior a 30%. Este fenômeno é atribuído a uma série de fatores, incluindo a magnitude reduzida do fluxo eletrosmótico (ver Capítulo 2) e, principalmente, a um efeito de pré-concentração da amostra no canal de injeção. Resultados similares foram obtidos pelo grupo do Prof. Claudimir L. do Lago, cujos dados foram apresentados no 13º Encontro Nacional de Química Analítica, realizado em Niterói-RJ. O problema não foi solucionado, porém, um procedimento alternativo foi encontrado para permitir a realização de um estudo analítico nestes microsistemas descartáveis. A condição encontrada foi a adição de uma etapa de limpeza dos

microcanais depois de cada injeção (ou análise). Desse modo, a mesma condição de amostragem foi obtida em todos os experimentos.

Com a adição desta etapa de limpeza, os estudos analíticos puderam ser realizados. Nesse procedimento alternativo, o desvio padrão relativo para uma série de 20 injeções consecutivas foi de aproximadamente 5%. A Figura 3.16A apresenta alguns eletroferogramas obtidos nos MSE de PT. Como observado na Figura 3.16A, picos bem resolvidos foram obtidos para os três cátions em menos que 90 s sob a aplicação de um campo elétrico de 250 V cm⁻¹. Embora a concentração dos cátions seja a mesma, a intensidade dos picos diminui na ordem K⁺ > Na⁺ > Li⁺. Este comportamento está relacionado com a condutividade iônica dos cátions, a qual diminui na mesma ordem que as intensidades observadas nos eletroferogramas^[9]. A eficiência de separação (*N*) obtida com os MSE de PT contendo eletrodos integrados variou de 7000 (K⁺ e Na⁺) a 13000 (Li⁺) pratos (por metro), na concentração de 25 μmol L⁻¹. Este valor foi calculado conforme a relação $N = 16 (t_m/w)^2$, onde *t_m* e *w* representam, respectivamente, o tempo de migração e a largura do pico na base. Para uma sequência de 10 eletroferogramas, os tempos de migração médios para K⁺, Na⁺, e Li⁺ foram 36 ± 1, 55 ± 2, and 72 ± 2 s, respectivamente.

A sensibilidade do sistema de detecção foi investigada sob as condições operacionais otimizadas, previamente determinadas (400 kHz, 10 V_{pp}). A resposta para K⁺, Na⁺ e Li⁺ foi linear em uma faixa de 25 a 100 μmol L⁻¹ com coeficientes de correlação iguais a 0,9985, 0,9976 e 0,9926, respectivamente. A sensibilidade, obtida a partir da inclinação da curva de calibração, foi igual a 9,6 (K⁺), 8,5 (Na⁺) e 3,5 (Li⁺) mV/μmol L⁻¹. As Figuras 3.16A e 3.16B mostram uma sequência de quatro eletroferogramas em diferentes níveis de concentração e as curvas analíticas obtidas, respectivamente. Os limites de detecção (LD) encontrados para K⁺, Na⁺ e Li⁺ foram de aproximadamente 3, 4 e 7 μmol L⁻¹, respectivamente, considerando-se a RSR igual a 3.

Figura 3.16. Exemplos de eletroferogramas mostrando: (a) a separação de cátions de alta mobilidade em diferentes níveis de concentração e: (b) as curvas analíticas obtidas com o sistema descartável. Tampão de corrida: MES/His 20 mmol L⁻¹, pH 6. Injeção: 1,0 kV/10 s. Separação: 250 V cm⁻¹. Detecção: 400 kHz, 10 V_{pp}.

3.3.3. Avaliação da geometria ideal para o sistema duplo

Como demonstrado no item 3.4.2, a C⁴D em microsistemas funciona, em sua forma mais tradicional, com dois eletrodos posicionados em direção oposta (orientação denominada anti-paralela). Para o sistema duplo, três geometrias diferentes foram avaliadas, como mencionado na parte experimental (ver Figura 3.11). Os eletrodos foram fabricados em filme de poliéster e integrados com microcanais de PT impressos com uma impressora laser.

Um dos principais objetivos da avaliação destas geometrias do sistema duplo foi investigar a existência de qualquer interferência elétrica de um dos dois detectores. Em outras palavras, procurou-se avaliar se o sinal capturado no primeiro eletrodo (detector) causava alguma perturbação no segundo eletrodo, ou vice-versa. Considerando-se que o sinal de excitação apresenta uma impedância relativamente baixa, o sinal senoidal foi aplicado por um único gerador de funções (GF) usando um, dois e até três eletrodos para promover a excitação da cela de detecção dupla. A Figura 3.17 apresenta algumas imagens dos microsistemas contendo eletrodos integrados para C⁴D dupla.

Figura 3.17. Imagens dos MSE de PT com eletrodos integrados fabricados em geometrias diferentes. As imagens A-D mostram os dispositivos montados de acordo com os desenhos dos eletrodos apresentados na Fig. 3.11 enquanto as imagens E e F mostram, em detalhe, o contato elétrico dos eletrodos de excitação.

As geometrias propostas foram fabricadas conforme descrito no item 3.2.1. Os canais foram projetados com largura de 150 μm enquanto a espessura foi definida pela camada de toner ($6 \pm 1 \mu\text{m}$). Para avaliar as diferentes geometrias, utilizou-se um sistema tampão tradicional para C⁴D constituído de uma mistura equimolar de MES/His 20 mmol L⁻¹, pH 6,1. Uma solução estoque de cloreto de lítio (10 mmol L⁻¹) foi preparada em água e posteriormente diluída no tampão MES/His 20 mM. Para avaliação das geometrias, zonas de amostra contendo Li⁺ na concentração de 0,5 mmol L⁻¹, diluída e tampão, foram eletrocineticamente introduzidas nos microcanais de PT, conforme procedimento descrito no item 3.3.4.

A injeção foi conduzida através da aplicação de +750 V, no canal de injeção, durante 10 s. A zona de amostra (ou volume) definida pela intersecção dos microcanais ($150 \times 150 \times 6 \times 10^{-18} \text{ m}^3 = 135 \text{ pL}$) foi transportada na direção dos eletrodos sob a aplicação de um campo elétrico de 300 V cm⁻¹. As Figuras 3.18A, 3.18B e 3.18C apresentam alguns resultados obtidos com geometrias contendo 3, 4 e 5 eletrodos, respectivamente. A detecção foi realizada a 400 kHz e 10 V_{pp} em todos os dispositivos.

Figura 3.18. Exemplos de eletroferogramas obtidos em microssistemas com C⁴D dupla, cuja geometria foi composta de (a) três, (b) quatro e (c) cinco eletrodos. Amostra: Li⁺ 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (preparada em tampão) Injeção: 750 V/10 s. Separação: 300 V cm^{-1} . Outras condições: ver Figura 3.16.

Analisando-se os eletroferogramas obtidos nas três geometrias diferentes, duas conclusões podem ser facilmente extraídas: (1) o sinal dos dois detectores apresenta intensidade similar na geometria contendo 3 e 5 eletrodos enquanto, que: (2) na geometria com quatro eletrodos, as respostas obtidas nos dois detectores apresentam intensidades diferentes. De maneira bastante qualitativa, pode-se tentar entender o comportamento dos eletrodos através do esquema do campo elétrico representado pelas linhas de campo geradas entre os eletrodos.

É preciso esclarecer que o sinal aplicado no eletrodo pelo gerador de funções foi representado por GF, enquanto que os sinais registrados nos dois eletrodos estão representados por S1 e S2. Os valores para o espaçamento entre os eletrodos, bem como a largura destes, foram mantidos em 750 μm . Em adição à essas informações, o eletrodo 1

encontra-se numa posição mais interna ao microcanal, ou seja, mais distante do reservatório onde é posicionado o eletrodo “terra” da eletroforese.

A Figura 3.19 mostra a representação das linhas do campo elétrico geradas ao se aplicar um sinal de excitação. Como pode ser visualizado no caso da geometria de 3 eletrodos (Figura 3.19A), aplicando-se um sinal ao eletrodo de excitação (GF), a distribuição das linhas de campo ocorre de forma simétrica nos dois eletrodos receptores. Isso justifica a similaridade dos resultados analíticos apresentados na Figura 3.18A. No caso da geometria contendo 4 eletrodos, observou-se que a intensidade dos picos é bastante diferente. A diferença observada varia por um fator de aproximadamente 2, sendo que o sinal 1, estando posicionado mais distante do eletrodo “terra” da eletroforese, é o mais intenso. Observando-se o desenho na Figura 3.19B, nota-se que o sinal 1 (S1) sofre influência do campo elétrico dos dois eletrodos de excitação, enquanto que o sinal 2 (S2) é afetado por apenas 1. Este fator explica a diferença dos sinais observados nos eletroferogramas.

Já a geometria com 5 eletrodos apresentou resultados bastante similares aos resultados da geometria com 3 eletrodos. Comparado com o caso anterior, a presença do quinto eletrodo (Fig. 3.19C) equaliza a distribuição do campo elétrico nos dois eletrodos receptores, ou seja, ambos os sinais (S1 e S2) sofrem a mesma influência provida pela excitação.

Para a seqüência do trabalho, a geometria contendo três eletrodos foi selecionada por apresentar resultados similares nos dois detectores (em termos de intensidade da reposta) e também pela simplicidade, quando comparada à geometria com cinco eletrodos.

Figura 3.19. Representação qualitativa das linhas de campo geradas nas geometrias contendo três (A), quatro (B) e cinco (C) eletrodos.

3.3.4. Microsistemas de PDMS/PET/PCI

Durante o desenvolvimento deste projeto, a bomba a vácuo do sistema de *sputtering* precisou ser trocada e, por esse motivo, o equipamento ficou inoperante por seis meses. Naquele período, o estágio do projeto visava à otimização das dimensões da cela de detecção (largura e espaçamento). Com o sistema parado, o uso de uma PCI com fonte metálica foi explorado para a confecção dos eletrodos para C⁴D, como descrito no item 3.3.3.2.

O perfil dos eletrodos obtidos está apresentado na Figura 3.20A. A largura dos eletrodos foi de 1 mm e o espaçamento entre eles foi de 0,75 mm. O perfil apresentado foi obtido em um perfilômetro digital (marca Dektak) no laboratório de microfabricação (LNLS). Para o perfil demonstrado, uma força de 0,15 N foi aplicada à ponta (agulha) do perfilômetro,

varrendo uma área de 5 mm. Como observado, a altura dos eletrodos foi de aproximadamente 12 μm . O valor da altura foi controlado através do tempo de corrosão química. O erro para a largura final dos eletrodos (considerando-se o valor projetado) foi inferior a 10%. Este parâmetro está relacionado com a dimensão utilizada (1 mm). Para valores inferiores a 500 μm o erro é maior, pois é influenciado pela resolução da impressora laser e também pela etapa de transferência térmica.

A Figura 3.20B apresenta uma micrografia óptica de uma placa contendo uma das configurações dos eletrodos projetada na PCI e um microssistema de PDMS integrado à superfície isolada. Os microcanais foram fabricados com largura de 150 μm e profundidade de 12 μm (ver Capítulo 2). A integração foi feita através do contato direto contra o filme de PET aderido termicamente sobre PCI, mantendo-se assim os eletrodos isolados do contato com os microcanais. Essa vedação dos canais de PDMS contra o filme de PET é chamada de vedação reversível e é vantajosa porque o chip (contendo os microcanais) pode ser substituído facilmente, desde que haja uma limpeza da superfície do PET entre as respectivas trocas.

Figura 3.20. Exemplos dos eletrodos obtidos em PCI. (A), perfil de dois eletrodos de Cu após corrosão com largura de 1 mm (cada) e espaçamento de 0,75 mm. (B) Micrografia mostrando um microssistema de PDMS/PET/PCI. Em (B), os números 1, 2, 3 e 4 indicam os reservatórios (ou furos) para soluções de amostra, tampão, descarte da amostra e descarte do tampão, respectivamente. Os furos foram feitos no PDMS com auxílio de um perfurador comercial[†].

[†] Comercialmente disponível como perfurador de couro.

3.3.4.1. Exemplo de sinais

O sistema híbrido de PDMS/PET foi avaliado a partir de análises eletroforéticas de cátions de alta mobilidade e os resultados estão descritos resumidamente a seguir. Uma solução estoque de K⁺, Na⁺ e Li⁺ foi preparada em água na concentração de 10 mmol L⁻¹ usando seus respectivos sais de cloreto. Para os primeiros experimentos, uma mistura na concentração de 500 μmol L⁻¹ foi utilizada para avaliar o comportamento do microsistema. A Figura 3.21A apresenta cinco eletroferogramas registrados em cinco microsistemas diferentes. Os valores para o tempo de migração do K⁺, Na⁺, Li⁺ e água nos diferentes chips foram 12,2 ± 0,1, 14,9 ± 0,1, 16,8 ± 0,1 e 28,4 ± 0,2 s, respectivamente. A repetibilidade obtida foi bastante satisfatória e similar aos microsistemas híbridos de PDMS/vidro avaliados durante o estágio de doutorado no exterior (ver Capítulo 2), principalmente considerando-se o alinhamento manual entre a PCI/PET e o PDMS contendo os canais. Como observado na Figura 3.21A, a separação dos três analitos e a detecção do pico da água foi obtida em aproximadamente 30 s.

Os limites de detecção obtidos neste sistema híbrido variaram entre 20-30 μmol L⁻¹. Comparado com os chips de PT, os limites obtidos nesse sistema (PDMS/PET) foram aproximadamente 10 × superiores aos valores obtidos nos dispositivos de PT. Essa perda na sensibilidade deve-se basicamente à espessura do filme de PET (~250 μm). Como demonstrado por Kubán e Hauser^[15], o aumento da espessura da camada isolante pode reduzir a sensibilidade em até 75%, variando-se de 125 a 400 μm, por exemplo.

Os microsistemas fabricados em PDMS/PET também apresentaram uma alta mobilidade eletrosmótica, cuja magnitude foi monitorada em função do marcador neutro, a água. Como observado nos eletroferogramas da Figura 3.21A, um sinal negativo é obtido em aproximadamente 30 s. Esse sinal refere-se à uma zona de amostra de baixa condutividade. Como os analitos foram preparados em água, esse pico é atribuído à zona de água e pode ser

usado como marcador do fluxo eletrosmótico. O tempo de migração do *plug* da água foi monitorado durante 50 injeções consecutivas e os valores da mobilidade eletrosmótica, μ_{eo} , estão apresentadas na Figura 3.21B. O tempo de migração da água foi de $28,2 \pm 0,2$ s e a magnitude do EOF, durante 50 injeções consecutivas, foi de $4,2 \pm 0,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A magnitude do EOF foi calculada como demonstrado no Capítulo 2.

Figura 3.21. Exemplo de eletroferogramas registrados em cinco microssistemas diferentes fabricados em PDMS/PET (A) e magnitude/estabilidade da mobilidade eletrosmótica, μ_{eo} , gerada nestes dispositivos. Tampão: MES/His 20 mmol L⁻¹, pH 6,1. Injeção: 750 V/8 s; separação: 250 V cm⁻¹. Detecção: 300 kHz, 5 V_{pp}. Comprimento total do microcanal: 5 cm, comprimento efetivo: 3,5 cm.

3.3.4.2. Avaliação das dimensões da cela de detecção

Como demonstrado no item anterior, os microssistemas fabricados em PDMS/PET/PCI apresentaram excelente repetibilidade entre as diferentes injeções, e também em relação aos diferentes *chips*. Por esse motivo, este tipo de microssistema foi utilizado na avaliação das dimensões dos eletrodos (largura e espaçamento). A resposta do detector condutométrico depende de um grande número de variáveis, tais como: largura do eletrodo, espaçamento (ou *gap*) inter-eletrodos, distância dos eletrodos em relação ao microcanal, forma de onda aplicada (sinal de excitação), frequência de operação, amplitude do sinal aplicado e do tipo de eletrólito utilizado.

Dos fatores mencionados, a distância dos eletrodos ao microcanal é fixa, pois é delimitada pela espessura da camada isolante (filme de PET). A forma de onda aplicada é a senoidal e esta se mantém constante. A amplitude do sinal também foi mantida em 5 V_{pp} e o eletrólito utilizado foi constituído de MES/His 20 mmol L⁻¹, pH 6,0. Dessa maneira, a otimização das condições ideais foi realizada apenas em função das dimensões dos eletrodos (largura e espaçamento) e da frequência de operação.

Inicialmente, a resposta do detector foi avaliada através de uma otimização univariada. A largura dos eletrodos foi mantida constante em 1 mm (dimensão mais comumente utilizada neste tipo de detecção em microssistemas). Assim, variou-se o espaçamento inter-eletrodos de 0,5 a 2 mm, em incrementos de 0,5 mm. Para investigar o efeito da geometria, uma amostra contendo 500 µmol L⁻¹ de K⁺ foi introduzida eletrocineticamente nos microcanais, conforme descrito no item 3.3.4. A configuração do dispositivo foi similar àquela descrita no Capítulo 2. A resposta do detector (intensidade do sinal) foi avaliada para diferentes valores de frequência (150 – 600 kHz) e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.22A. Embora o sistema de detecção dupla tenha sido utilizado, apenas o sinal de um dos detectores

foi monitorado, uma vez que a intensidade dos dois detectores é similar para a configuração de três eletrodos.

As curvas na Figura 3.22A mostram que, para valores de frequência maiores que 400 kHz, a intensidade do sinal é significativamente reduzida. Além disso, a intensidade do sinal nessa região (≥ 400 kHz) é bastante similar para os vários valores de espaçamento utilizados. Analisando-se os dados para os valores de frequência inferiores a 400 kHz, pode-se concluir que há uma correlação para a resposta em função do aumento do espaçamento.

Embora o aumento do sinal seja proporcional ao aumento do espaçamento entre os eletrodos (até 2 mm), o uso de eletrodos mais espaçados provoca um aumento na largura do pico (quando o sistema é usado como detector em eletroforese ou cromatografia), ou seja, há uma perda na eficiência da separação analítica. Conforme apresentado na Figura 3.22B, quanto maior o espaçamento maior é a largura do pico registrado e conseqüentemente, menor a eficiência. A pergunta em questão nesse momento é qual o ponto que deve ser escolhido como ideal: aquele que usa o espaçamento de 2 mm fornecendo os resultados com maior intensidade ou usando espaçamento de 0,5 mm, que fornece os resultados com maior eficiência analítica? Diante desse compromisso, optou-se por escolher o espaçamento de 1,5 mm, pois a resposta analítica não é a mais intensa, mas também não é a que fornece pior eficiência.

Figura 3.22. Intensidade do sinal analítico (A) de uma amostra contendo K⁺ 0,5 mM e largura do pico à meia altura (B) em função do espaçamento entre os eletrodos no duplo-sistema de detecção. Largura dos eletrodos: 1 mm. Detecção: onda senoidal com amplitude igual a 5 V_{pp}. Outras condições: ver Figura 3.21.

Uma vez selecionado o espaçamento de 1,5 mm como ideal, fez-se o mesmo estudo para a largura dos eletrodos. Usando-se o espaçamento mencionado, a largura foi variada de 0,75 até 2 mm. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.23A. Da mesma forma que para os dados em função do espaçamento, a resposta em função da frequência para vários valores de largura também mostra que a intensidade do sinal é reduzida para frequências maiores que 350 kHz. Para valores de 150 a 300 kHz, a intensidade da resposta aumenta com o aumento da largura (exceto para o ponto a 300 kHz) devido ao acoplamento capacitivo. Assim como observado para o efeito do espaçamento, o uso de eletrodos mais largos também tem como consequência um aumento na largura do sinal analítico obtido (Fig. 3.23A).

É extremamente importante mencionar que os dados foram interpretados de acordo com a intensidade do sinal. O mais apropriado, como antecipado no item 3.4.2, seria avaliar a relação sinal-ruído (S/R). Para mostrar que o nível de ruído e, conseqüentemente, a relação S/R não segue a mesma tendência, os dados referentes aos dois parâmetros foram quantificados e estão apresentados na Figura 3.24A (ruído) e 3.24B (S/R). Os valores mostrados na Figura 3.24 foram registrados para eletrodos com largura de 1 mm e espaçamento variável de 0,5 a 2 mm, como indicado na legenda da Figura 3.24.

Figura 3.23. Intensidade do sinal analítico (A) e largura do pico (B) em função da largura dos eletrodos no duplo-sistema de detecção. Espaçamento inter-eletrodos: 1,5 mm. Detecção: onda senoidal com amplitude igual a 5 V_{pp}. Outras condições: ver Figura 3.21.

Como observado na Figura 3.24, o nível de ruído capturado é aleatório e não pode ser atribuído apenas como ruído “químico” do sistema de medida, o qual deveria ter um comportamento similar às curvas apresentadas nas Figuras 3.22 e 3.23. Como discutido no item 3.4.2, o ruído detectado é resultado da somatória das contribuições da parte mecânica, química e elétrica do sistema de C⁴D. Dentre as contribuições individuais, o nível de ruído é alterado com um ajuste simples do potenciômetro, o qual ainda passa por um estágio de amplificação antes de ser enviado para a interface de aquisição. Este aspecto afeta diretamente a relação S/R (Fig. 3.24B), a qual segue uma tendência nítida de queda com o aumento da frequência. Por esse motivo, apenas os dados relacionados à intensidade serão abordados adiante. O ruído foi estatisticamente calculado como sendo igual a duas vezes o valor do desvio padrão ponto-a-ponto da linha de base ($R = 2\sigma$).

Os resultados apresentados neste tópico não são muito conclusivos a respeito da otimização das dimensões da cela de detecção, uma vez que os efeitos das variáveis foram considerados individualmente, desprezando as possíveis interações entre os fatores investigados. Por esse motivo, optou-se pela otimização multivariada com o auxílio de um planejamento experimental.

Figura 3.24. Nível de ruído (A) e razão sinal/ruído (B) em função da frequência de operação em geometrias contendo eletrodos com largura de 1 mm e espaçamento entre 0,5 e 2,0 mm. Outras condições: ver Figura 3.21.

3.3.4.3. Planejamento experimental

Devido às incongruências observadas na otimização univariada, realizou-se um planejamento de experimentos usando as variáveis com níveis pré-estabelecidos no item 3.3.6. De acordo com o planejamento, os eletrodos foram projetados com o devido cuidado nas etapas de fabricação de modo a garantir a mesma espessura de metal em todos os dispositivos (após a corrosão química da camada de Cu). Os canais, fabricados em PDMS, foram posicionados sempre na mesma posição, mantendo a distância de 25 mm entre o eletrodo de excitação e o ponto de injeção. Os experimentos eletroforéticos foram realizados sob as mesmas condições descritas no item anterior. Assim como nos testes anteriores, uma solução contendo K^+ 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi utilizada para avaliação dos parâmetros experimentais.

A partir dos resultados eletroforéticos, montou-se uma planilha contendo os valores das variáveis e os resultados para a intensidade do sinal registrado e para a largura do pico medida à meia altura em todos os experimentos. Ao invés de usar o valor médio obtido para cada um dos nove ensaios planejados, optou-se por analisar os dados de um conjunto de três injeções visando à minimização de qualquer problema associado à injeção eletrocinética. Por esse motivo, a matriz elaborada pelo planejamento contém um total de 27 experimentos.

A Tabela 3.2 apresenta a matriz completa dos experimentos realizados, incluindo as variáveis e as respostas analíticas (intensidade e largura do pico) obtidas para cada ensaio. Os níveis das variáveis foram substituídos pelos intervalos pré-estabelecidos.

Tabela 3.2. Matriz completa para o planejamento experimental realizado contendo as respostas analíticas de cada ensaio.

Ensaio	Fatores (F)			Respostas	
	F1*	F2**	F3***	Intensidade (V)	Largura (s)
1	1	1	100	0,3125	2,7
2	1	1	100	0,3244	2,3
3	1	1	100	0,3273	2,4
4	2	1	100	0,5522	2,9
5	2	1	100	0,5941	2,7
6	2	1	100	0,5518	2,9
7	1	2	100	0,2440	2,3
8	1	2	100	0,1951	1,9
9	1	2	100	0,2321	2
10	2	2	100	0,6923	2,2
11	2	2	100	0,6816	2,1
12	2	2	100	0,5937	2,1
13	1	1	500	0,0746	2,4
14	1	1	500	0,1061	2
15	1	1	500	0,0914	2,2
16	2	1	500	0,0720	3,6
17	2	1	500	0,0653	3,1
18	2	1	500	0,0617	3,8
19	1	2	500	0,1572	4,3
20	1	2	500	0,1634	4
21	1	2	500	0,1228	4,2
22	2	2	500	0,0642	1,4
23	2	2	500	0,0601	1,3
24	2	2	500	0,0510	1,3
25	1,5	1,5	300	0,2087	1,9
26	1,5	1,5	300	0,2509	2,3
27	1,5	1,5	300	0,2822	2,2

* F1 = largura (mm)

** F2 = gap (mm)

*** F3 = frequência (kHz)

Os dados apresentados na Tabela 3.2 foram importados e analisados no *software* STATISTICA versão 6.0. A Figura 3.25 apresenta as superfícies de resposta do detector em função das variáveis 1 (largura) e 2 (*gap* ou espaçamento) fixando os valores de frequência (variável 3) em 100 (A), 300 (B) e 500 kHz (C). Assim como observado para a análise univariada, as repostas mais intensas foram obtidas para eletrodos mais largos nas frequências de 100 (Fig. 3.25A) e 300 kHz (Fig. 3.25B). Comparando a resposta em função dos valores de frequência, notou-se uma redução na inclinação da curva de resposta com o aumento da frequência de 100 (Fig. 3.25A) para 300 kHz (Fig. 3.25B). No entanto, na frequência de 500 kHz (Fig. 3.25C) o sinal é substancialmente reduzido (observar escala do eixo z) e a mesma tendência das frequências de 100 e 300 kHz não foi observada. A mudança na inclinação e, principalmente, a inversão do vértice da curva de resposta confirmam que a frequência tem um efeito significativo na resposta do detector.

Figura 3.25. Superfícies de resposta do detector em função da largura e do *gap* (espaçamento) entre os eletrodos. As curvas (A), (B) e (C) foram obtidas para valores de frequência iguais a 100, 300 e 500 kHz, respectivamente. As escalas de cores das superfícies estão apresentadas ao lado direito de cada gráfico.

Se a frequência influencia diretamente a resposta do detector, a mesma tendência não foi observada para o espaçamento entre os eletrodos. Como demonstrado na Figura 3.26, não houve nenhuma diferença significativa para a superfície de resposta em função das variáveis 1 (largura) e 3 (frequência) para valores de espaçamento iguais a 1,0 (Fig. 3.26A), 1,5 (Fig. 3.26B) e 2,0 mm (Fig. 3.26C). Como pode ser visto na Figura 3.26, todas as superfícies de resposta apresentam a mesma inclinação, o que é um indicativo que o aumento do espaçamento não provoca alterações na intensidade do sinal analítico. Em outras palavras, pode-se adiantar que a variável 2 (*gap*) não tem influência significativa na resposta.

Figura 3.26. Superfícies de resposta do detector em função da largura e da frequência de operação. As curvas (A), (B) e (C) foram obtidas para valores de espaçamento entre os eletrodos a 1, 1,5 e 2,0 mm, respectivamente. As escalas de cores das superfícies de resposta estão apresentadas ao lado direito de cada Figura.

Assim como as demais variáveis, o efeito da largura também foi analisado nos resultados obtidos a partir do planejamento experimental. A Figura 3.27 apresenta as superfícies de resposta em função da frequência e do espaçamento, para eletrodos com largura de 1,0 (Fig. 3.27A), 1,5 (Fig. 3.27B) e 2,0 mm (Fig. 3.27C). Como observado, todas as curvas apresentam o mesmo comportamento, ou seja, independentemente do valor do *gap*, os sinais mais intensos são obtidos em valores frequência mais baixos. A única diferença entre as superfícies de resposta da Figura 3.27 está na inclinação da curva, a qual aumenta proporcionalmente ao aumento da largura do eletrodo.

Figura 3.27. Superfícies de resposta do detector em função do espaçamento entre os eletrodos e da frequência de operação. As curvas (A), (B) e (C) foram obtidas para eletrodos com largura igual a 1,0, 1,5 e 2,0 mm, respectivamente. As escalas de cores das superfícies de resposta estão apresentadas ao lado direito de cada Figura.

A contribuição dos efeitos de cada um dos fatores investigados foi avaliada através da análise de variâncias no *software* STATISTICA. Aplicando-se testes de significância, como o teste F e o teste p , pôde-se concluir que, para um intervalo de confiança de 95%, a largura do eletrodo (variável 1), a frequência de trabalho (variável 3) e a interação entre ambas (1by3) são os fatores que apresentaram efeito significativo para a intensidade da resposta do sistema de C⁴D. Estes efeitos foram calculados pelo *software* estatístico através de um modelo matemático quadrático, o qual apresentou um coeficiente de correlação igual a 0,9669. O resultado dos testes de significância está apresentado, na Figura 3.28, através do diagrama de Pareto. No diagrama mostrado, a linha tracejada indica a região do limite de confiança de 95%.

De acordo com os resultados descritos neste tópico, o uso de eletrodos mais largos permite a obtenção das respostas com sinais de maior intensidade. A dimensão de 2 mm foi escolhida como a largura dos eletrodos para os ensaios biomoleculares, os quais serão descritos no Capítulo 4.

Figura 3.28. Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis na intensidade do sinal analítico registrado no sistema de C⁴D.

Assim como a intensidade da resposta analítica, a eficiência de separação é outro parâmetro que é substancialmente afetado pelas dimensões dos eletrodos. Embora o foco deste trabalho tenha visado à otimização da cela de detecção para os ensaios biomoleculares, a determinação das dimensões ideais para uma geometria que permita separações com alta eficiência também é desejável.

De modo a investigar os fatores que afetam a eficiência, os dados obtidos a partir do planejamento experimental também foram analisados, no *software* STATISTICA, por meio de superfícies de resposta. O parâmetro avaliado como resposta foi a largura do pico à meia altura, com a unidade dada em segundos. Como a eficiência é inversamente proporcional à largura dos picos, as respostas com menor intensidade indicam os pontos de maior número de pratos. Os valores obtidos para os experimentos realizados foram apresentados na Tabela 3.2. Ao contrário da avaliação da intensidade, a análise das superfícies de resposta obtidas não é muito trivial.

Como observado na Figura 3.29, os três fatores influenciam na largura do sinal analítico obtido. Como pode ser visualizado na Figura 3.29A, para uma frequência de 100 kHz, os sinais mais largos (menor eficiência) foram obtidos em eletrodos com largura de 2 mm e espaçamento de 1 mm. Na mesma frequência, os picos mais estreitos foram obtidos com eletrodos de largura e espaçamento de 1 mm. Nas frequências de 300 (Fig. 3.29B) e 500 kHz (Fig. 3.29C), o aumento do espaçamento provoca um aumento na largura do pico. Na prática, esse alargamento do pico pode ser atribuído aos efeitos difusionais e à contribuição da geometria do detector. As superfícies de resposta em função da frequência *versus* largura ou frequência *versus* espaçamento também foram avaliadas, mas como não apresentaram resultados conclusivos não serão apresentadas neste trabalho.

Assim como na avaliação dos parâmetros sobre a intensidade do sinal, testes de significância (teste F e teste p) foram realizados no *software* STATISTICA, e os resultados

mostraram que a interação entre a largura e o espaçamento entre os eletrodos é o único efeito significativo (em um intervalo de confiança de 95%) sobre a largura do pico. Os resultados dos testes de significância estão apresentados no diagrama de Pareto o qual está inserido na Figura 3.30. Como mencionado anteriormente, a linha tracejada indica o limite de confiança de 95%.

A teoria a respeito do planejamento experimental, da modelagem das superfícies de resposta, bem como sobre os testes de significância ou análise de variâncias pode ser encontrada em várias referências^[33,36,37].

Figura 3.29. Superfícies de resposta para a largura do pico (K^+) em função da largura e do *gap* (espaçamento) entre os eletrodos. As curvas (A), (B) e (C) foram obtidas para valores de frequência iguais a 100, 300 e 500 kHz, respectivamente. As escalas de cores das superfícies de resposta estão apresentadas ao lado direito de cada Figura.

Figura 3.30. Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis sobre a largura do pico detectado.

3.3.4.4. Influência da amplitude do sinal de excitação

Como mencionado no item 4.5, a amplitude do sinal de excitação é uma das variáveis que influenciam significativamente na resposta do detector oscilométrico. Neste tipo de detecção, os eletrodos receptores (no caso da detecção dupla) registram uma corrente decorrente da aplicação de uma onda senoidal ao eletrodo de excitação. A corrente que flui pela cela de detecção é proporcional à amplitude do sinal aplicado^[15,34,35]. Dessa maneira, o valor absoluto da linha de base ($-V_{dc}$) e a altura do pico também dependem da amplitude do sinal de excitação^[34,35]. A Figura 3.31 mostra os resultados dos valores da linha de base em função da amplitude do sinal aplicado. Os resultados estão apresentados para as frequências estabelecidas na matriz do planejamento experimental (100, 300 e 500 kHz) e também para a frequência de 900 kHz. Adicionalmente, cada gráfico da Figura 3.31 contém os dados obtidos para as cinco configurações de eletrodos avaliadas no planejamento experimental.

Como pode ser observado em todos os valores de frequência, o valor de V_{dc} comporta-se linearmente em amplitudes baixas. Para a frequência de 100 kHz, todos os protótipos apresentam uma dependência linear até 5 V_{pp} . A partir desse valor, a inclinação da curva foi

ligeiramente diminuída. Para os demais valores de frequência, a linearidade é reduzida à faixa de 1 a 3 V_{pp}. Em valores de amplitude superiores a 3V_{pp} (em B, C e D) observou-se uma estabilização da resposta de V_{dc} em função da amplitude. Este perfil de resposta é resultado da saturação do detector em relação às variações de amplitude do sinal de excitação.

Este comportamento é dependente do tipo de amplificador operacional (OPA, *operational amplifier*) utilizado no circuito eletrônico do detector e pode afetar sensivelmente os níveis de detectabilidade do sistema oscilométrico^[34,35]. Neste trabalho usou-se o OPA 2604 (Texas Instruments) e os resultados descritos estão coerentes com os resultados obtidos em capilares de sílica fundida^[30,34], cuja eletrônica é similar à empregada neste trabalho. Por esse motivo, a frequência de operação e a amplitude do sinal de excitação precisam ser cuidadosamente avaliados.

Figura 3.31. Resposta da linha de base do detector (V_{dc}) em função da amplitude do sinal de excitação em valores de frequência iguais a (A) 100, (B) 300, (C) 500 e (D) 900 kHz. Cada gráfico contém os valores obtidos para cada uma das geometrias avaliadas, conforme estabelecido no planejamento experimental.

3.4. CONCLUSÕES

Com a finalização deste Capítulo algumas conclusões podem ser extraídas, em termos da eletrônica envolvida, do software de controle e aquisição de dados, dos microssistemas integrados, da geometria do sistema duplo e também do planejamento experimental.

Sistema de detecção: Os protótipos do detector oscilométrico, com eletrônica desenvolvida por Fracassi da Silva e do Lago^[2,30,31], apresentaram uma excelente robustez e simplicidade instrumental. O primeiro protótipo, constituído de um detector simples, corroborou com a implementação de novas tecnologias para a fabricação de microcanais em vidro^[25] e integração de eletrodos em filmes de poliéster^[32]. Para o detector duplo (segundo protótipo), a geometria composta de três eletrodos mostrou-se a mais adequada para os ensaios biomoleculares, os quais serão discutidos no próximo Capítulo. Nesta nova modalidade, os dois eletrodos de registro do sinal são excitados por apenas um eletrodo, espaçado simetricamente.

Software de aquisição: O *software* de aquisição de dados desenvolvido neste trabalho mostrou-se simples e robusto. Estas características vantajosas permitiram a expansão do uso deste *software* para todos os sistemas de detecção implementados em microssistemas no grupo de pesquisa.

Microssistemas integrados: Os processos alternativos utilizados na confecção dos microssistemas integrados não estavam diretamente correlacionados aos objetivos iniciais. No entanto, a integração de eletrodos planares em microssistemas se fez necessário de modo a garantir a repetibilidade da montagem da cela de detecção. Os sistemas de PT com eletrodos integrados e os dispositivos híbridos de PDMS/PET/PCI mostraram-se vantajosos sobre os sistemas convencionais (considerando-se o tempo de fabricação e o custo final de cada

dispositivo), uma vez que requerem instrumentação simples e de fácil acesso para sua fabricação.

Planejamento experimental: A aplicação de um planejamento experimental foi fundamental para observar os efeitos das interações entre as variáveis na resposta analítica. Como demonstrado neste trabalho, esta ferramenta estatística é bastante simples e deveria ser explorada com maior frequência em pesquisas na área de Química Analítica. Para os estudos biomoleculares, que serão descritos a seguir, o planejamento experimental foi essencial para se obter as condições ideais visando a maximização da intensidade do sinal analítico. Os resultados obtidos com as superfícies de resposta serão compilados com os dados de simulação computacional (não apresentados) para publicação em um periódico da área de Eletroanalítica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ZEMANN, A. J.; SCHNELL, E.; VOLGGER, D.; BONN, G. K. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 563-567, 1998.
- [2] DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C.L. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4339-4343, 1998.
- [3] GUIJT, R. M.; BALTUSSEN, E.; VAN DER STEEN, G.; FRANK, J.; BILLIET, H. A. H.; SCHALKHAMMER, T.; LAUGERE, F.; VELLEKOOP, M. J.; BERTHOLD, A.; SARRO, P. M.; van DEDEM, G. W. K. Capillary electrophoresis with on-chip four-electrode capacitively coupled conductivity detection for application in bioanalysis. **Electrophoresis**, v. 22, n. 12, p. 2537-2541, 2001.
- [4] PUMERA, M. Contactless conductivity detection for microfluidics: designs and applications. **Talanta**, v. 74, n. 3, p. 358-364, 2007.
- [5] KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, n. 1, p. 15-29, 2008.
- [6] VANDAVEER, W. R.; PASAS-FARMER, S. A.; FISCHER, D. J.; FRANKENFELD, C. N.; LUNTE, S. M. Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3528-3549, 2004.
- [7] GUIJT, R. M.; EVENHUIS, C. J.; MACKA, M.; HADDAD, P. R. Conductivity for conventional and miniaturized capillary electrophoresis systems. **Electrophoresis**, v. 25, n. 23-24, p. 4032-4057, 2004.
- [8] LAUGERE, F.; GUIJT, R. M.; BASTEMEIJER, J.; van der STEEN, G.; BERTHOLD, A.; BALTUSSEN, E.; SARRO, P.; van DEDEM, G. W. K.; VELLEKOOP, M. J.; BOSSCHE, A. On-chip contactless four electrode conductivity detection for capillary electrophoresis devices. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 306-312, 2003.
- [9] LICHTENBERG, J.; ROOIJ, N. F.; VERPOORTE, E. A microchip electrophoresis system with integrated in-plane electrodes for contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 23, n. 21, p. 3769-3780, 2002.
- [10] PUMERA, M.; WANG, J.; OPEKAR, F.; JELÍNEK, I.; FELDMAN, J.; LÖWE, H.; HARDT, S. Contactless conductivity detector for microchip capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 9, p. 1968-1971, 2002.
- [11] WANG, J.; PUMERA, M.; COLLINS, G.; OPEKAR, F.; JELÍNEK, I. A chip-based capillary electrophoresis-contactless conductivity microsystem for fast measurements of low-explosive ionic components. **Analyst**, v. 127, n. 6, p. 719-723, 2002.
- [12] WANG, J.; CHEN, G.; MUCK, A. Movable contactless-conductivity detector for microchip capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4475-4479, 2003.
- [13] TANYANYIWA, J.; HAUSER, P. C. High-voltage capacitively coupled contactless conductivity detection for microchip capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 24, p. 6378-6385, 2002.
- [14] TANYANYIWA, J.; ABAD-VILLAR, E. M.; FERNANDÉZ-ABEDUL, T.; COSTA-GARCÍA, A.; HOFFMANN, W.; GUBER, A. E.; HERRMANN, D.; GERLACH, A.; GOTTSCHLICH, N.; HAUSER, P. C. High-voltage contactless conductivity-detection for lab-on-chip devices using external electrodes on the holder. **Analyst**, v. 128, n. 8, p. 1019-1023, 2003.

- [15] KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. Effects of the cell geometry and operating parameters on the performance of an external contactless conductivity detector for microchip electrophoresis. **Lab on a Chip**, v. 5, n. 4, p. 407-415, 2005.
- [16] ABAD-VILLAR, E. M.; TANYANYIWA, J.; FERNANDÉZ-ABEDUL, T.; COSTA-GARCÍA, A.; HAUSER, P. C. Detection of human immunoglobulin in microchip and conventional capillary electrophoresis with contactless conductivity measurements. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 1282-1288, 2004.
- [17] TANYANYIWA, J.; ABAD-VILLAR, E. M.; HAUSER, P. C. Contactless conductivity detection of selected organic ions in on-chip electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 6, p. 903-908, 2004.
- [18] TANYANYIWA, J.; HAUSER, P. C. Capillary and microchip electrophoresis of basic drugs with contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 25, n. 17, p. 3010-3016, 2004.
- [19] ABAD-VILLAR, E. M.; KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. Detection of biochemical species on electrophoresis chips with an external contactless conductivity detector. **Electrophoresis**, v. 26, n. 19, p. 3609-3614, 2005.
- [20] LAW, W. S.; KUBÁŇ, P.; ZHAO, J. H.; LI, S. F. Y.; HAUSER, P. C. Determination of vitamin C and preservatives in beverages by conventional capillary electrophoresis and microchip electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 26, n. 24, p. 4648-4655, 2005.
- [21] GONG, X. Y.; HAUSER, P. C. Enantiomeric separation of underivatized small amines in conventional and on-chip capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 27, n. 21, p. 4375-4382, 2006.
- [22] TÚMA, P.; SAMCOVÁ, E.; OPEKAR, F.; JURKA, V.; STULÍK, K. Determination of 1-methylhistidine and 3-methylhistidine by capillary and chip electrophoresis with contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 28, n. 13, p. 2174-2180, 2007.
- [23] DO LAGO, C. L.; DA SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA, J. A. F. A dry process for production of microfluidic devices based on the lamination of laser-printed polyester films. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3853-3858, 2003.
- [24] DO LAGO, C. L.; NEVES, C. A.; DE JESUS, D. P.; DA SILVA, H. D. T.; BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA, J. A. F. Microfluidic devices obtained by thermal toner transferring on glass substrate. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3825-3831, 2004.
- [25] COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L.; CARRILHO. A toner-mediated lithographic technology for rapid prototyping of glass microchannels. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 7, p. 931-934, 2007.
- [26] NEVES, Carlos Antonio. **Desenvolvimento de instrumentação para eletroforese capilar de zona e isotacoforese capilar em microdispositivos de toner-poliéster**. 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- [27] LEE, C. Y.; CHEN, C. M.; CHANG, G. L.; LIN, C. H.; FU, L. M. Fabrication and characterization of semicircular detection electrodes for contactless conductivity detector – CE microchips. **Electrophoresis**, v. 27, n. 24, p. 5043-5050, 2006.
- [28] SCHUCHERT-SHI, A.; KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. Monitoring of enzymatic reactions using conventional and on-chip capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 28, n. 24, p. 4690-4696, 2007.

- [29] DING, Y.; GARCIA, C. D.; ROGERS, K. R. Poly(dimethylsiloxane) microchip electrophoresis with contactless conductivity detection for measurement of chemical warfare agent degradation products. **Analytical Letters**, v. 41, n. 2, p. 335-350, 2008.
- [30] DA SILVA, J. A. F.; GUZZMAN, N.; DO LAGO, C. L. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis - Hardware improvements and optimization of the input-signal amplitude and frequency. **Journal of Chromatography A**, v. 942, n. 1-2, p. 249-258, 2002.
- [31] DA SILVA, José Alberto Fracassi. **Deteção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocínética**. 2001. 178 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- [32] COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E. Fabrication and integration of planar electrodes for contactless conductivity detection on polyester-toner electrophoresis microchips. **Electrophoresis**, v. 29, n. 11, p. 2260-2265, 2008.
- [33] BARROS NETO, B.; SCARMINIO I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 3. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2007. 480 p.
- [34] BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA, J. A. F.; BLANES, L.; DO LAGO, C. L. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1207-1214, 2005.
- [35] BRITO-NETO, J. G.; DA SILVA, J. A. F.; BLANES, L.; DO LAGO, C. L. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1198-1206, 2005.
- [36] JOHNSON, R. A.; BHATTACHARYYA, G. K. **Statistics principles and methods**. 4. ed. New York: John Wiley, 2001. 723 p.
- [37] BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley, 1987. 669 p.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

5.1. CONCLUSÕES GERAIS

Com os resultados descritos neste trabalho, pode-se concluir que a miniaturização é uma tendência em todas as ramificações científicas referentes à Química Analítica. Embora os microssistemas eletroforéticos encontrem-se em um estágio de desenvolvimento mais avançado, mostrou-se nesse trabalho que superfícies biossensoras podem ser incorporadas em sistemas microfluídicos. Além disso, com o estudo dos aspectos fundamentais que cada substrato apresenta para aplicação em microfluídica, mostrou-se que eletrodos podem ser fabricados e integrados com microcanais em um único dispositivo a partir de processos simples e economicamente viáveis.

Com essa integração, a transdução do sinal resultante à alteração de uma propriedade físico-química da superfície do sensor pode ser monitorada com um detector condutométrico sem contato. Em outras palavras, os resultados descritos neste trabalho demonstram o verdadeiro estado da arte da ciência da miniaturização, onde etapas desenvolvidas normalmente em escala macroscópica podem ser integradas em um único microssistema, explorando todas as vantagens que a miniaturização oferece.

Além da miniaturização de sistemas analíticos, a utilização do método de detecção condutométrica sem contato é outra tendência em expansão plena. A implementação de um sistema de detecção dupla permitiu discriminar a resposta analítica referente às interações biomoleculares através deste sistema universal. A otimização das dimensões dos eletrodos de detecção usando ferramentas quimiométricas permitiu a obtenção de um limite de detecção de 75 nmol L^{-1} para a interação entre avidina e biotina. No entanto, os processos relacionados à química de superfície bem como o modelo matemático utilizado para extrair os valores das constantes de associação, equilíbrio e dissociação são os pontos que precisam ser melhorados no sistema desenvolvido. Estes ajustes pontuais conferirão maior aplicabilidade à essa nova ferramenta analítica para monitoramento de interações biomoleculares.

Assim como os microssistemas, a evolução instrumental tem possibilidade a implementação de eletrodos em substratos microfluídicos usando processos convencionais e alternativos. Todos estes aspectos fazem parte da linha de pesquisa que o autor pretende não só dar continuidade mas, principalmente, contribuir para a expansão e a consolidação desta ramificação científica no país.

Como observado no grande volume de informações, esta tese pode ser classificada como um trabalho multidisciplinar, o qual envolveu aspectos relacionados à Química Inorgânica, Físico-Química, Química de Materiais, Engenharia de Automação, Eletrônica e Química Analítica. A realização deste trabalho não seria viabilizada sem as colaborações estabelecidas com grupos de pesquisa nacionais e internacionais.

5.2. PERSPECTIVAS

As perspectivas desta nova linha de pesquisa vislumbram à inserção desta técnica no campo de análises de diagnósticos clínicos, setor que tem um mercado abrangente. Adicionalmente, como mencionado no prefácio, com a redução do escalonamento, vários canais podem ser fabricados em paralelos, permitindo a obtenção de informações múltiplas em um curto intervalo de tempo. Os dois tópicos mencionados, estão inseridos dentro do projeto de pós-doutorado que o autor desenvolverá a partir de novembro de 2008. Especificamente, o projeto visará a construção de um multi-detector oscilométrico para detecção de doenças negligenciadas, como a doença de Chagas e a leishmaniose, e o monitoramento dos níveis de ácido úrico e glicose em amostras de soro sanguíneo. Além disso, esta técnica será aplicada para a detecção de células neoplásicas, em um projeto de mestrado do grupo BioMicS, que está sendo idealizado para início no primeiro semestre de 2009.

Apêndices

APÊNDICE A – Espectros de fluorescência dos materiais utilizados na fabricação de microssistemas analíticos

A Figura S1 apresenta os espectros de fluorescência de cada material utilizado na confecção dos microssistemas analíticos. Para a obtenção dos espectros, a emissão foi realizada à 442 nm, mesmo comprimento de onda do laser de He-Cd utilizado nos experimentos descritos no Capítulo 2.

A Figura S1 contém três espectros sobrepostos para cada material, os quais equivalem a três dispositivos diferentes.

Figura S1. Espectros de fluorescência dos materiais utilizados para fabricação de microssistemas.

APÊNDICE B – Circuitos do detector condutométrico sem contato

Figura S2. Circuito do detector oscilométrico – Módulo 1. Adaptado da ref. 31, Capítulo 3.

Figura S3. Circuito do detector oscilométrico – Módulo 2. Adaptado da ref. 31, Capítulo 3, com alterações.

APÊNDICE C – Documentação do *software* de controle e aquisição de dados do detector oscilométrico duplo

O diagrama de blocos do *software* Dual_C4Dchip_versão_2.5_BioM.vi está demonstrado a seguir, em duas figuras.

Figura S4. Representação do diagrama de blocos do *software* para controle eletrocinético e aquisição de dados do C⁴D (parte 1).

APÊNDICE C – Documentação do *software* de controle e aquisição de dados do detector oscilométrico duplo (continuação)

Figura S5. Representação do diagrama de blocos do *software* para controle eletrocinético e aquisição de dados do C⁴D (parte 2).

APÊNDICE D – Documentação do *software* de controle e aquisição de dados do sistema de BIA-C4D

O diagrama de blocos do *software* BIA_C4Dchip_versão_2_BioM.vi está demonstrado a seguir, em duas páginas.

Figura S6. Representação do diagrama de blocos do *software* para do sistema de BIA-C⁴D (parte 1).

APÊNDICE D – Documentação do *software* de controle e aquisição de dados do sistema de BIA-C4D (continuação) **Figura S7.** Representação do diagrama de blocos do *software* para do sistema de BIA-C⁴D (parte 2).

APÊNDICE E – Sistema para controle das válvulas

Figura S8. Circuito eletrônico para controle das válvulas.

APÊNDICE E – Sistema para controle das válvulas

Figura S9. Sistema ilustrativo das duas faces da placa contendo o circuito construído para controle das válvulas solenóides implementadas na etapa de bombeamento hidrodinâmico.

APÊNDICE F – Calibração das bombas usando seringas de 1, 3 e 5 mL

A vazão do fluxo das bombas seringas foi calibrada a partir de um método gravimétrico. Nesta metodologia, tubos ependorfes foram usados para coletar o volume de água despejado pela bomba. Os tubos foram pesados antes e depois dos experimentos. Dessa maneira, considerando a densidade da água igual a 1 mg mL^{-1} (temperatura ambiente), o volume foi calculado pela diferença entre os valores obtidos nas etapas de pesagem. Os experimentos foram realizados similarmente para seringas de 1, 3 e 5 mL. Os gráficos estão apresentados nas Figuras abaixo.

Figura S10. Curvas de calibração para a vazão do fluxo gerado nas bombas seringas.

APÊNDICE G – Espectros de XPS dos eletrodos isolados e silanizados

As Figuras S11 mostra o espectro completo de XPS obtido para a superfície contendo somente SiO_2 , destacando na parte superior os picos do $\text{Si}2s$ (108 eV), $\text{Si}2p$ (159 eV) e $\text{C}1s$ (290 eV). A Figura S12 apresenta os espectros de XPS obtidos antes (A) e depois (B) da reação com APTES.

Figura S11. Espectro completo da fotoemissão por raios-X da camada de SiO_2 depositado sobre substrato de vidro *via* PECVD.

Figura S12. Espectros de XPS registrados em uma superfície de SiO_2 antes (A) e depois (B) de ser funcionalizada com 3-amino-propil-trietóxi-silano (APTES).

APÊNDICE H – Espectros de impedância dos eletrodos modificados

Figura S13. Espectros de impedância do eletrodo sem a camada de SiO_2 (A), com a camada de SiO_2 (B), com a camada de SiO_2 silanizada (C) e com a superfície funcionalizada com biotina (D) representados como gráficos de Bode. Eletrólito: tampão fosfato 20 mM, pH 7,0.

APÊNDICE I – Perfil do molde e do canal moldado em PDMS

A Figura S6 exibe um perfil do molde definido em SU-8 (A) e o perfil do microcanal moldado em PDMS. O molde foi projetado com largura de $500\text{ }\mu\text{m}$ e altura de $60\text{ }\mu\text{m}$. O perfil apresentado na Figura S6(B) apresenta alguns defeitos na parede do canal. No entanto, essas irregularidades são atribuídas ao contato da agulha (ou ponta) do perfilômetro com a parede do canal. Nesse caso, como o PDMS é elastomérico, o contato da agulha durante o deslocamento provoca uma distorção resultando em um perfil quase semi-circular. O perfil visualizado na Figura S6(B) foi obtido com a aplicação de uma força igual a 1 mg cm^{-2} na agulha. Apesar das irregularidades na parede do canal, a Figura S13 mostra que a profundidade do canal obtido por moldagem apresenta dimensões similares à altura do molde definido em SU-8.

Figura S14. Perfil do molde fabricado em SU-8 (A) e da micro-estrutura replicada em PDMS (B).

SÚMULA CURRICULAR

1. INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome Completo: Wendell Karlos Tomazelli Coltro

Endereço eletrônico: wendellcoltro@gmail.com

Naturalidade: Loanda – PR

Data de Nascimento: 23/09/1979

Filiação: Antonio Carlos Coltro e Lucimar Tomazelli Coltro

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Doutorado em Ciências (Química Analítica)	Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo	2004 - 2008
Estágio de Doutorado no Exterior (Doutorado <i>Sandwich</i>)	The University of Kansas	2006
Mestrado em Ciências (Química Analítica)	Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo	2002 - 2004
Bacharelado em Química	Universidade Estadual de Maringá	1998 - 2002

3. PRÊMIOS

- 1. Academic Travel Awards** – LabAutomation 2006 Conference, Association for Laboratory Automation (ALA). Palm Springs (EUA), 2006.
- 2. Prêmio de melhor pôster** – Simpósio da Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos (SP), 2005.
- 3. Academic Travel Awards** - LabFusion 2004 Conference, Association for Laboratory Automation (ALA). Boston (EUA), 2004.
- 4. Prêmio de melhor pôster** – 9th Latin-American Symposium of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology (LACE). México, 2003.

4. CAPÍTULO DE LIVRO

- Coltro, W.K.T. and Carrilho, E.; **Low-Cost Technologies for Microfluidic Applications**, In: Landers, J.P. (Ed.), **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**, 3^{ed.}, CRC Press, New York 2007, pp. 1169-1184.

5. PATENTE COM REGISTRO

1. Coltro, W.K.T.; da Silva, J.A.F.; Carrilho, E. **Microdispositivo multicamada, processo de preparação de microdispositivo multicamada**, P.I. 0.703.025-8, 2007.

6. ARTIGOS PUBLICADOS

1. Coltro, W.K.T.; Lunte, S.M.; Carrilho, E. **Comparison of the analytical performance of electrophoresis microchannels fabricated in poly(dimethylsiloxane), glass, and polyester-toner**. Electrophoresis, v. 29, n. 24, doi: 10.1002/elps.200700897, 2008.
2. Coltro, W.K.T.; da Silva, J.A.F.; Carrilho, E. **Fabrication and integration of planar electrodes for contactless conductivity detection on polyester-toner electrophoresis microchips**. Electrophoresis, v. 29, n. 11, p. 2260-2265, 2008.
3. Da Silva, J.A.F.; Coltro, W.K.T.; Carrilho, E.; Tavares, M.F.M. **Terminologia para as técnicas de eletromigração em capilares**. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.
4. Piccin, E.; Coltro, W.K.T.; da Silva, J.A.F.; Claro-Neto, S.; Mazo, L.H.; Carrilho, E. **Polyurethane from biosource as a new material for fabrication of microfluidic devices by rapid prototyping**. Journal of Chromatography A, v. 1173, n. 1-2, p. 151-158, 2007.
5. Coltro, W.K.T.; Piccin, E.; Carrilho, E.; de Jesus, D.P.; da Silva, J.A.F.; Silva, H.D.T.; do Lago, C. L. **Microsistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações**. Química Nova, v. 30, n. 8, p. 1986-2000, 2007.
6. Coltro, W.K.T.; Piccin, E.; da Silva, J.A.F.; do Lago, C.L.; Carrilho, E. **A toner-mediated lithographic technology for rapid prototyping of glass microchannels**. Lab on a Chip, v. 7, n. 7, p. 931-934, 2007.
7. Coltro, W.K.T.; Ferreira, M.M.C.; Macedo, F.A.; Oliveira, C.C.; Matsushita, M. **Correlation of animal diet and fatty acid content in young goat meat by gas chromatography and chemometrics**. Meat Science, v. 71, n. 2, p. 358-363, 2005
8. He, F.; Yuan, J.; Coltro, W.K.T.; Carrilho, E.; Xia, X. **Electrokinetic control of fluid in plastified printed poly(ethylene terephthalate)-toner microchip**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 382, n. 1, p. 192-197, 2005.
9. Coltro, W.K.T.; da Silva, J.A.F.; Silva, H.D.T.; Richter, E.M.; Furlan, R.; Angnes, L.; Mazo, L.H.; do Lago, C.L.; Carrilho, E. **Electrophoresis microchip fabricated by direct-printing process with end-channel amperometric detection**. Electrophoresis, v. 25, n. 21-22, p. 3832-3839, 2004.
10. Tarley, C.R.T.; Coltro, W.K.T.; Matsushita, M.; Souza, N.E. **Characteristic levels of some heavy metals from brazilian canned sardines (sardinella brasiliensis)**. Journal of Food Composition and Analysis, v. 14, n. 6, p. 611-617, 2001.

7. ARTIGOS SUBMETIDOS/PREPARAÇÃO

1. Coltro, W.K.T.; da Silva, J.A.F.; Carrilho, E. **Real-time monitoring of biomolecular interactions with dual contactless conductivity detection on microfluidic devices.**
3. Coltro, W.K.T.; Brito-Neto, J.G.A.; da Silva, J.A.F.; Neves, C.A.; do Lago, C.L.; Carrilho, E. **Experimental and theoretical studies of the detection cell effects on the sensitivity of the contactless conductivity detector in microchips.**
3. Coltro, W.K.T.; da Silva, J.A.F.; Carrilho, E. **Detecção condutométrica sem contato em microssistemas analíticos.**
4. Vázquez, M.; Frankesfeld, C.; Coltro, W.K.T.; Carrilho, E.; Diamond, D.; Lunte, S.M.; **Contactless conductivity and amperometric detection on hybrid PDMS/glass electrophoresis microchips.**