UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Juliane Cristina Borba

Microdispositivo giratório de poliéster para
integração de preparo de amostra e reação de
amplificação para análises genéticas

São Carlos

2017

Juliane Cristina Borba

Microdispositivo giratório de poliéster para
integração de preparo de amostra e reação de
amplificação para análises genéticas

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade
de São Paulo, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Química
Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho.

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo
reservado na Biblioteca do IQSC - USP

São Carlos

2017

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais e meus irmãos
com todo meu amor.

Agradecimentos

Acredito que é nos agradecimentos que conseguimos imaginar um pouquinho de tudo o que quem escreveu a tese passou nos 4 ou 5 anos de doutorado. Mas eu sempre fico imaginando o que aquela pessoa passou até chegar ao doutorado. Seja por escolha ou por destino, o fim dessa jornada de 5 anos não se remete apenas aos 5 anos.

Por isso, eu não posso agradecer apenas pelos 5 anos de doutorado, mas pelos 12 anos de IQSC. Agradeço por cada pessoa que me incentivou, que me encorajou e também pelos que fizeram o contrário. Sem dúvida aprendi muito com cada uma delas. Quem termina este doutorado é resultado dessas pessoas e experiências vividas até aqui. Uma mistura de experiências pessoais e profissionais que não se separa, não na pós-graduação.

Eu agradeço a Deus pelas minhas escolhas, pelo destino, pelas oportunidades que deram e que não deram certo.

Agradeço aos meus pais. Meu pai Paulo (*in memoriam* e no meu coração) que pela sua simplicidade nunca imaginou uma filha Doutora. Ele estava feliz por eu ter me tornado uma química, para ele era suficiente e isso é o que eu mais amava nele, sempre fomos suficientes para ele acima de qualquer título. Minha mãe Margarete, meu exemplo de garra, força de vontade, superação, minha incentivadora e apaziguadora dos meus desesperos, dúvidas e indecisões. Eu nunca vou conseguir agradecê-los da forma como merecem, por isso essa simples homenagem na minha jornada até aqui. Amo vocês.

Aos meus irmãos. Rubi, não poderia ter tido uma melhor colega de república, amiga, irmã, conselheira quando eu pedia ou quando eu não pedia. E sim, o contrário é verdadeiro. Obrigada por tudo, você vivenciou esse doutorado como ninguém, me viu sorrir e chorar pelos melhores ou mais bobos motivos e sempre esteve ao meu lado, obrigada por tudo e amo você. Paulinho, sempre te bombardeando com notícias aos finais de semana, não consegui bolsa, consegui bolsa, vou morar um ano fora, talvez eu fique, talvez eu vá. Sempre ouviu com paciência e questionou como de costume, será que eu consegui te explicar minha tese? E além de tudo, participou ativamente dedicando seus domingos para fazer uma ideia doida virar realidade, na minha ignorância eletrônica questionando tanto como você costuma fazer, trocamos os papéis e deu certo. Terminei meu doutorado com menos dificuldade graças a sua

ajuda, você foi fundamental. Sem esquecer da sua família, nossa família, Renata e Duda. Obrigada por dividirem ele comigo aos domingos. Nunca vou esquecer! Amo muito vocês.

Minha sobrinha Dudinha, que desde que nasceu se tornou peça fundamental na minha vida. Te ver orgulhosa da titia e querendo aprender com a titia só me deu e me dá mais vontade de fazer mais e melhor. Te amo.

Thiago, meu melhor amigo que se tornou meu amor. Obrigada pela paciência, por topa discutir meus resultados na mesa do bar. Por me ouvir falar e falar dos meus *microchips* tantas vezes, perceber que eu não desligo e continuar ao meu lado mesmo assim. Obrigada por colaborar com suas ideias e por apoiar minhas ideias, obrigada pelas críticas! Parabéns por ter sobrevivido durante a escrita desta tese (risos). Você me ajudou a chegar até o final, mais do que imagina e mais do que eu agradeço. Obrigada também por dividir sua família comigo, que também entendeu e me apoiou durante todo esse tempo. Amo vocês.

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho, por ter me aceitado como aluna de iniciação científica, ter visto que eu sou uma chorona e ainda assim permitir que eu continuasse no seu laboratório até hoje. Obrigada pelos ensinamentos, pela orientação, pelas oportunidades e pelo suporte durante todos esses anos.

À Prof. Dra. Gabriela Duarte, obrigada pelas conversas que me incentivaram a retornar a microfluídica no doutorado. Obrigada pela confiança junto com o Professor Emanuel para dar continuidade a um trabalho tão importante. Obrigada pelas discussões e sugestões durante todos esses anos e principalmente nesse trabalho. Obrigada por me emprestar o sistema de IR-PCR e me ensinar com toda paciência a operá-lo, foi uma aventura rs. Obrigada pela sua amizade.

Aos meus amigos, são tantos para agradecer que tenho medo de ser injusta, vocês todos moram no meu coração.

Aos meus amigos do grupo BioMicS, ex e atuais alunos. Sem dúvida tenho muito que agradecer, pela convivência, pelas discussões, pela paciência, pelos momentos sérios e pelos momentos de diversão. Um obrigada especial aos que tiveram paciência e me apoiaram principalmente no final deste trabalho, quando eu mais precisei.

Meus amigos de Porto Ferreira, muitas vezes mesmo sem compreender muito a vida do pós-graduando me apoiaram, respeitaram e entenderam minha ausência, vocês sabem o quanto são fundamentais na minha vida.

Meus amigos de São Carlos. Muitos de vocês eu ganhei quando entrei para esse grupo, foi sem dúvida meu melhor presente e quero levá-los para sempre comigo, mesmo que fisicamente distantes. Foram tantos clubes da Lulu, pizzas, churrascos, campings, desabafos, risadas, histórias. Eu cresci muito com vocês e espero continuar. Obrigada pelo suporte pessoal e científico em todos esses anos, Fay, Karina, Dedo, Ju A, Camilo, Sheila, Maribel e Bia.

Os amigos que ganhei em Charlottesville, Felipe, Otilia, Jéssica e Nigi. Vocês fizeram total diferença no tempo em que estive nos EUA e com certeza foram indispensáveis para que eu tivesse um dos melhores anos da minha vida. Vocês alegraram e tornaram incríveis meus dias nesta cidade. Vocês moram no meu coração.

Às minhas sócias, a nossa colaboradora Fernanda e nossa start up, a Solve. Ela nasceu de uma amizade e espero que ela prospere. Com certeza já tem nos ensinado muito e mostrado o quanto somos capazes. Espero ler esse agradecimento em alguns anos e agradecer por ter assumido esse compromisso em uma hora tão conturbada para mim.

Meu amigo Alexandre, por possibilitar a realização das análises térmicas dos filmes.

Ao Instituto de Física de São Carlos - USP e aos técnicos Debora e Felipe, por possibilitarem e me ensinarem a utilizar os equipamentos de medida de ângulo de contato e perfilômetro, respectivamente.

Ao Prof. Dr. James P. Landers, por me receber em seu grupo na Universidade da Virginia nos Estados Unidos. Essa oportunidade me proporcionou um dos anos de maior aprendizado profissional e com certeza pessoal.

Também agradeço ao grupo do Prof. Landers por me receberem, pela troca nas reuniões de grupo e por colaborarem no meu desenvolvimento científico e no aperfeiçoamento do meu inglês. Em especial a Kimberly Jackson e Jacquelyn DuVall, com as quais tive oportunidade de trabalhar diretamente, e Qian Liu que se tornou minha amiga.

Ao Prof. Dr. Carlos Garcia da Universidade de Clemson - EUA, por me doar caixas de transparências 3M, impossíveis de serem encontradas no Brasil nos últimos anos, para que eu pudesse dar continuidade ao meu trabalho.

À Prof. Dra. Fernanda Canduri, por permitir que eu utilizasse seu laboratório, pelas dicas no exame de qualificação e pela atenção.

Ao Prof. Dr. Claudio Suazo da Universidade Federal de São Carlos e todo seu grupo de pesquisa, LATECC, por permitir que eu utilizasse o equipamento espectrofluorímetro de gota. Em especial ao Diogo por sempre se disponibilizar a estar no laboratório para que eu pudesse realizar as análises.

Aos funcionários do IQSC, da secretaria da Pós-graduação, setor de convênios, central de análises químicas (CAQUI), portaria e faxina, por toda ajuda e colaboração.

À empresa Terphane Brasil por me ceder mais de uma vez amostras de filmes de poliéster para que eu pudesse desenvolver esse trabalho.

À empresa *Adhesive Research* por me fornecer amostras de fita dupla-face para construção dos dispositivos.

À CAPES pela bolsa concedida para que eu pudesse desenvolver esse trabalho.

À FAPESP (processo: 2015/17145-7) que pela verba concedida no projeto regular permitiu com que eu tivesse materiais e reagentes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao INCTbio e ao CNPQ que pelo Programa Ciência Sem Fronteiras me concedeu a bolsa que permitiu com que eu pudesse usufruir da experiência de trabalhar em um laboratório no exterior.

E por último, mas não menos importante, obrigada ao meu Doutorado. Obrigada pelos momentos, experiências e sentimentos que só um doutorado pode proporcionar. Obrigada pela mistura de amor e ódio graças à euforia de um resultado lindo e a decepção de um resultado horrível, tivemos que aprender a lidar com isso. Obrigada por ter me deixado tratá-lo da forma mais profissional que eu pude e muitas vezes da forma mais maternal. Obrigada por me ensinar a relevar a falta de reconhecimento por parte de uma sociedade que insiste em perguntar quando vamos trabalhar, mesmo que nossa dedicação seja maior que 8h diárias, além dos finais de semana. Obrigada por me fazer entender que sou estudante sim e faço parte de um grupo de

estudantes que ainda tentam desenvolver ciência no Brasil, sinto cada vez mais orgulho disso, pois trabalhamos muito!!! E em contraste, obrigada pelos horários flexíveis que nos permitiu congressos e momentos enriquecedores e inesquecíveis.

É por tudo isso que meu lado maternal vai sempre te defender e lembrar com carinho dos melhores e piores momentos que passamos para chegar até aqui.

Obrigada.

Juliane Cristina Borba, 01 de agosto de 2017.

RESUMO

O uso da microfluídica na área de análises genéticas possibilita não apenas a diminuição de custos, mas também menor manipulação de amostras e reagentes e ainda maior portabilidade das análises. Com isso aumenta a possibilidade da sua utilização em locais remotos, sem a infraestrutura de um laboratório bem equipado. Dispositivos capazes de usar apenas a força centrífuga para movimentação de fluidos juntamente com a utilização de válvulas passivas para controle dos fluidos pode potencializar a sua utilização nos diagnósticos *Point-of-Care*. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um microdispositivo descartável de poliéster para análises genéticas, visando à extração e amplificação do DNA alvo, de forma rápida, barata, integrada e automatizada. Os resultados confirmam a viabilidade dos dispositivos poliéster-toner (PeT) e poliéster-fita dupla face (PeDF) automatizados de extração, obtendo por meio da extração dinâmica em fase sólida de amostras complexas, DNA com qualidade compatível à técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR). Esses resultados foram confirmados por meio da amplificação por PCR dos genes β -globina nas amostras de sangue e urina, e o gene *malB* nas amostras de *Escherichia coli*. Também foi confirmado a compatibilidade dos dispositivos de PeT para amplificação por PCR mediado por infravermelho (IV-PCR) do gene *malB* presente no DNA genômico de bactéria *E. coli*. Por fim, os dispositivos de extração e amplificação foram interligados para obtenção de um dispositivo integrado e automatizado formado pela combinação de dispositivos fabricados com diferentes filmes e métodos, PeT e PeDF. O controle de todas as soluções no interior dos dispositivos foi realizado por meio da força centrífuga combinada a válvulas passivas, sem qualquer necessidade de equipamento adicional. Portanto, podemos concluir que o dispositivo integrado PeDF – PeT possui grande potencial para aplicações em análises genéticas de forma mais barata, portátil e com menor manipulação das amostras pelo analista.

Palavras-chave: Microfluídica; Dispositivo microfluídico; Poliéster; Poliéster-Toner; Análises genéticas; Extração de DNA; Amplificação de DNA.

ABSTRACT

The development of microfluidics for genetic analysis allows not only cost reduction but also reduces sample and reagents handling, and increases the chances of a portable analysis. With this, increasing the possibility to use the techniques on remote places without the infrastructure of an equipped laboratory. Microdevices capable of using the centrifugal force in combination with passive valves to fluidic control can promote Point-of-Care analysis. The primary goal of this thesis was to associate these tools for the development of a disposable microdevice for genetic analysis, aiming faster, inexpensive, integrated and automated DNA extraction and amplification. The results confirmed the viability of PeT and PePSA automated microdevices, for DNA dynamic solid phase extraction, in providing high-quality DNA compatible to PCR analysis using complex samples. These results were confirmed by the β -globin PCR amplification using blood and urine samples, and the *malB* gene amplification in *Escherichia coli* samples. We have also verified the compatibility of the PeT microdevices with IR-PCR for *malB* gene amplification in genomic *E. coli* DNA. The extraction and amplification modules were interconnected to obtain an integrated and automated microdevice by the combination of devices made with different films and microfabrication methods, PeT and PePSA. The fluidic control in the devices was made using the centrifugal force combined to passive valves, with no requirement of any extra equipment. Therefore, we can conclude that the integrated PePSA – PeT microdevice has a great potential for cheaper and portable genetic analysis application, with less operator manipulation.

Keywords: Microfluidics; Microfluidic devices; Polyester; Polyester-toner; Genetic analysis; DNA extractions; DNA amplification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema simplificado das principais etapas da extração por dSPE em tubo utilizando micropartículas magnéticas de sílica.....	27
Figura 2 - Fluxograma de trabalho para produção dos dispositivos de PET, apresentando cada um dos equipamentos e substrato utilizados. A. Substratos utilizados para produção dos dispositivos, folhas de transparência e toner em impressora a laser; B. Software de desenho para desenvolvimento do <i>design</i> do dispositivo e cortadora a laser para fabricação das câmaras e canais no substrato; C. Laminadora para laminação das camadas do microdispositivo.....	33
Figura 3 – Esquema adaptado ^{136,143} das principais forças que agem sobre um <i>plug</i> de solução disposto em um dispositivo microfluídico controlado pelo movimento giratório. Na figura estão representados, F_E – Forças de Euler; F_c – Forças de Coriolis; e F_ω - Força Centrífuga.	37
Figura 4 - Linha do tempo do desenvolvimento do projeto de doutorado indicando onde foram realizadas as disciplinas e obtidos os respectivos dispositivos, os quais serão discutidos nesse trabalho.	49
Figura 5 – Foto do sistema de IV-PCR desenvolvido na Universidade da Virgínia – USA e utilizado no Instituto de Química de São Carlos - Brasil. (A) conversor analógico; (B) termopar; (C) lâmpada de tungstênio; (D) fonte de alimentação; (E) interface; (F) mini-ventilador; (G) computador/software utilizado para controle do sistema.	54
Figura 6 – Linha do tempo do desenvolvimento do microdispositivo integrado para análise molecular. Em bege, primeira fase desenvolvida na <i>University of Virginia (USA)</i> no laboratório do Professor Dr. James Peter Landers. Em azul, segunda fase desenvolvida no Instituto de Química de São Carlos. Em laranja, resultados obtidos na finalização da primeira (2014_2º) e da segunda fase (Defesa). E em verde resultados obtidos no decorrer da segunda fase (2014_2º – 2017_1º).	55
Figura 7 – Visualização explodida da última versão do microdispositivo PeT de extração automatizada de DNA apresentado neste trabalho. Filmes recobertos com toner estão representados em cinza escuro e filmes não recobertos em cinza translúcido. Canais e câmaras recortados em cortadora a laser na camada intermediária (preto). Retângulo preto nas faces internas das folhas inferior e superior (cinza claro) representam a válvula hidrofóbica de toner. Fita adesiva posicionada no respiro e sob o acesso da câmara de amostra estão representadas por um retângulo.	56
Figura 8 – Visualização explodida da última versão do microdispositivo PeT de amplificação de DNA apresentado nesse trabalho. Filmes recobertos com toner estão representadas em cinza escuro e filmes não recobertos em cinza translúcido. Canais e câmara recortados em cortadora a laser na camada intermediária (preto). Retângulo preto nas faces internas das folhas inferior e superior (cinza claro) representam a válvula hidrofóbica de toner.	57
Figura 9 – Visualização explodida da última versão do microdispositivo PeDF de extração automatizada de DNA apresentado nesse trabalho. Os filmes estão representados em cinza claro, enquanto as fitas dupla face estão representadas em azul translúcido. Canais e câmaras recortados em cortadora a laser nas camadas intermediárias compostas por duas fitas dupla face (ARcare 90106) intercaladas com um filme (cinza claro).	58

Figura 10 – Representação esquemática da construção da válvula de fita adesiva no dispositivo de PeT.....	59
Figura 11 – Representação esquemática da construção das válvulas passivas nos dispositivos PeT e PeDF, sendo elas (a) válvula capilar, dentro do retângulo amarelo; e (b) sifão, dentro do quadrado azul.	60
Figura 12 – Representação esquemática da construção da válvula de toner nos dispositivos PeT e PeDF, dentro do retângulo vinho.....	60
Figura 13 – Fluxograma das etapas do protocolo de liberação das soluções para o dispositivo de extração semiautomatizado. A caixa 1 representa a primeira solução que deve ser liberada pela ruptura da válvula 1 (V_1), seguida pela caixa 2 após o rompimento da válvula 2 (V_2). Ambas devem passar pela câmara central (3) e serem direcionadas para o descarte (4) com o rompimento da válvula 4 (V_4). Após a adição manual da solução de dessorção na câmara central (3) a solução deve ser direcionada para o coletor de amostra (5) após ruptura da válvula 5 (V_5).	62
Figura 14 – Fluxograma das etapas do protocolo de liberação das soluções para o dispositivo de extração automatizado. A caixa 1 representa a primeira solução que deve ser liberada pela ruptura da válvula V_1 , seguida pela caixa 2 após o rompimento da válvula V_2 . Ambas devem passar pela câmara central (3) e serem direcionadas para o descarte (4) com o rompimento da válvula V_4 . Em seguida, a câmara 5 deve liberar a solução pela ruptura da válvula V_5 também passando pela câmara central (3) e direcionada para o coletor de amostra (6) após ruptura da válvula V_6	63
Figura 15 – Esquema desenhado em AutoCAD® representativo do módulo de <i>mettering</i> utilizado no dispositivo integrado para análise molecular no qual os números estão representando (0) câmara central, (1) coletor de amostra e (2) câmara para separação de volumes (a). Fluxograma do experimento realizado para determinar a reprodutibilidade da separação da solução de amostra entre duas câmaras (b).....	65
Figura 16 – Foto de um modelo de dispositivo PeT de amplificação contendo duas câmaras. Câmara reacional (A) e câmara de referência (B) para inserção do termopar (C).....	66
Figura 17 – Fluxograma das etapas do protocolo de liberação das soluções para o dispositivo de amplificação. As caixas 1 e 2 representam as soluções que devem ser liberadas ao mesmo tempo pela ruptura das válvulas V_1 e V_2 para serem então misturadas na caixa 3, isso antes da caixa 4 romper V_4 . As válvulas V_3 e V_4 devem ser rompidas ao mesmo tempo para também serem misturadas na caixa 5 e seguirem para câmara de reação representada pela caixa 6.	68
Figura 18 – Fluxograma das etapas do protocolo de liberação das soluções para o dispositivo integrado para análise molecular. A caixa 1 representa a primeira solução que deve ser liberada pela ruptura da válvula V_1 , seguida pela caixa 2 após o rompimento da válvula V_2 . Ambas devem passar pela câmara central (3) e serem direcionadas para o descarte (4) com o rompimento da válvula V_4 . Em seguida, a câmara 5 deve liberar a solução pela ruptura da válvula V_5 também passando pela câmara central (3) e direcionada para o coletor de amostra (6) após ruptura da válvula V_6 . As caixas 7 e 8 representam as soluções que devem ser liberadas ao mesmo tempo pela ruptura das válvulas V_7 e V_8 para serem então misturadas na caixa 9, isso antes da caixa 10 romper V_{10} . As válvulas V_9 e V_{10} devem ser rompidas ao mesmo tempo para também serem misturadas na caixa 11 e seguirem para câmara de reação representada pela caixa 12.....	69

Figura 19 – Exemplo do resultado obtido com a utilização do perfilômetro para a medida de espessura (nm) do filme 3MCG6000 – B.....	78
Figura 20 – Média da espessura determinada para os diferentes filmes de poliéster por perfilometria (n = 3): (0) 3MCG6000 – A; (1) 3MCG6000 – B; (2) MARES; (3) Terphane e (4) 3MPP2200.....	79
Figura 21 – Imagem adquirida no momento da determinação do ângulo de contato da água com a superfície do filme 3MCG6000 – B (1) sem toner na superfície e (2) após a deposição de uma camada de toner.....	80
Figura 22 – Ângulo de contato determinados para os diferentes filmes sem e com a impressão de uma camada de toner na superfície (n = 4): (0) 3MCG6000 – A; (1) 3MCG6000 – B; (2) MARES; (3) Terphane e (4) 3MPP2200.....	81
Figura 23 – Curva TGA dos diferentes filmes de poliéster analisados a uma taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ em atmosfera de ar sintético – (1) 3MCG6000 – B, (2) MARES, (3) Terphane e (4) 3MPP2200.....	82
Figura 24 – Curva DSC dos diferentes filmes de poliéster – (1) 3MCG6000 – B, (2) MARES, (3) Terphane e (4) 3MPP2200.....	84
Figura 25 – Espectros FT-IR dos diferentes filmes de poliéster: 3MCG6000 – B (1), MARES (2), Terphane (3) e 3MPP2200 (4).....	85
Figura 26 – Espectro FTIR de um padrão de politeraftalato de etileno (PeT) obtido a partir do banco de dados SDBS. ¹⁸⁷	87
Figura 27 – Espectro de EDX da superfície do filme 3MCG6000 – B.....	88
Figura 28 - Composição elementar da superfície dos filmes estudados (n = 3) obtido por análise de EDX. MARES (1); 3MCG6000 – B (2); Terphane (3); 3MPP2200 (4).....	88
Figura 29 - Imagens de MEV com aumento de 10.000× para os filmes: 3MCG6000 – B (1), MARES (2), Terphane (3) e 3MPP2200 (4).....	89
Figura 30 – Sistemas rotativos <i>homemade</i> utilizados para controle dos fluidos durante a primeira fase do projeto desenvolvido na <i>University of Virginia-USA</i> . (a) Primeiro sistema, composto por um motor de passo, uma base de polimetilmetacrilato (PMMA) para fixação dos dispositivos e controles correspondente as chaves de liga e desliga; (b) Segundo sistema utilizado durante o estágio, composto por (A) Motor para rotação; (B) ímã fixo; (C) plataforma de PMMA para fixação dos ímãs; (D) Parafuso para ajuste da altura dos ímãs; (E) Disco microfluídico; (F) Motor de passo.....	91
Figura 31 – Sistema rotativo <i>spin coating</i> utilizado para controle dos fluidos durante a segunda fase do projeto desenvolvido no Instituto de Química de São Carlos (a). Base com 12 cm de diâmetro fabricada em PMMA (2 mm de espessura) para fixação dos dispositivos (b) com apoio para haste móvel (8 cm × 4 cm) com ímãs posicionados a 3,5 cm do centro da plataforma.	92
Figura 32 – Sistema rotativo <i>homemade</i> utilizado para controle dos fluidos durante a segunda fase do projeto desenvolvido no Instituto de Química de São Carlos. (a) Sistema composto por (A) eixo superior para alinhamento do suporte fabricado em PMMA; (B) câmera fixada na base superior com 12 cm de diâmetro fabricada em PMMA (2 mm de espessura); (C) base inferior para fixação do microdispositivo, 12 cm de diâmetro fabricada em PMMA (2 mm	

de espessura); (D) motor; (E) estrutura de madeira para fixação do motor com base inferior e superior fixadas por meio de parafusos e alinhadas; (F) fonte de alta tensão para controle do motor. (b) Foto aproximada da base inferior para fixação do dispositivo microfluídico: (C ₁) haste móvel (8 cm × 4 cm) fabricada em PMMA (2 mm de espessura) com ímãs posicionados a 3,5 cm do centro da plataforma; (C ₂) ímãs fixados na haste móvel.....	93
Figura 33 – Representação esquemática do funcionamento da válvula de fita adesiva. Funcionamento de forma ativa (a); funcionamento de forma passiva (b).....	97
Figura 34 – Representação esquemática do funcionamento da válvula capilar, sendo P_{ω} a pressão causada pela força centrífuga e P_s a pressão capilar induzida pela tensão superficial. Aumento da região da válvula representado com retângulo vermelho dando destaque para a região entre o canal e a interface de expansão.....	98
Figura 35 - Representação esquemática do funcionamento do sifão. Combinação da força centrífuga e capilaridade em superfícies hidrofílicas (a); adaptação do sifão para os filmes de poliéster utilizados (b).	99
Figura 36 – Representação esquemática do funcionamento da válvula hidrofóbica de toner (a) e foto das diferentes porcentagens de toner na escala de cinza impressas na superfície do filme(b).	100
Figura 37 – Comparação dos dispositivos de extração PeT semiautomatizado, com base nos desenhos desenvolvidos em AutoCAD®. Desenho da primeira versão do dispositivo PeT semiautomatizado desenvolvido na <i>University of Virginia</i> , sem identificação e dimensões das câmaras e canais, apenas para comparação visual com o dispositivo final utilizado para extração (1). Desenho do dispositivo final de PeT semiautomatizado para extração de DNA desenvolvido na Universidade da Virgínia, no qual estão identificados: (A) câmara da solução aquosa de lavagem 2, 6 μ L (14 mm × 1,69 mm); (a) válvula hidrofóbica de toner para controle da solução de lavagem A (3 mm × 2 mm; 100% escala de cinza); (B) câmaras para solução de lavagem 1, 4 μ L cada (6 mm × 3 mm); (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de lavagem 1 (250 μ m de largura); (C) câmara central, 6 μ L (raio maior 3.2 mm e raio menor 2.9 mm); (D) Câmara de descarte, 20 μ L total mas comporta até 22 μ L (6 mm × 5 mm); (d) válvulas de fita adesiva para controle da abertura e fechamento do descarte; (E) câmara para coleta de amostra, 6 μ L (4,8 mm de diâmetro) e (e) válvula de fita adesiva para fechamento e abertura do canal para amostra, todos com 272 μ m de profundidade. Figura do dispositivo otimizado e utilizado para extração de DNA (2).....	102
Figura 38 – Rotação e tempo determinados para ruptura de cada uma das válvulas utilizadas no dispositivo PeT de extração semiautomatizado. As válvulas foram indicadas de acordo com o desenho apresentado na Figura 37, no entanto, na ordem de ruptura. Sendo que (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de isopropanol; (d) válvulas de fita adesiva para controle da abertura e fechamento do descarte; (a) corresponde a válvula hidrofóbica de toner; e (e) válvula de fita adesiva para fechamento e abertura do canal para amostra.....	103
Figura 39 – Foto do dispositivo PeT utilizado para extração de DNA (a). Representação esquemática do protocolo de rotação e tempo otimizados com auxílio de corantes para dispositivo semiautomatizado (b), nos quais as setas representam a liberação das soluções (azul = isopropanol (B); vermelha = TE 0,1× (A); verde = GuHCl/amostra (C)) expostas a	

- determinada rotação (topo da figura) por determinado tempo (base da figura) e o símbolo “X” (roxo) representa o fechamento das válvulas (verde = válvula para câmara da amostra (e); vermelha = válvula para câmara do descarte (d)). 104
- Figura 40 – Fotos correspondentes à sequência realizada para avaliação da viabilidade do dispositivo PeT de extração semi automatizada na ausência do suporte para as válvulas de fita adesiva, “e” e “f” apresentadas no desenho da Figura 39. As fotos correspondes a: (A) dispositivo parado no momento da adição da primeira solução na câmara central, válvula (d) aberta e (e) fechada; (B) ruptura da válvula (d) e liberação da solução para câmara de descarte após 293 RPM – 120 segundos e 340 RPM – 15 segundos; (C) dispositivo parado no momento da adição da segunda solução na câmara central, válvulas (d) e (e) fechadas; (D) ruptura da válvula (e) e liberação da solução para a câmara de coleta de amostra após 1276 RPM por 15 segundos. 106
- Figura 41 – Dispositivo de extração desenvolvido em AutoCAD®, no qual estão identificados: (A) câmara da solução aquosa de lavagem 2, 10 µL (13 mm × 1,7 mm); (a) válvula hidrofóbica de toner para controle da solução de lavagem 2 (3 mm × 2 mm; 100% escala de cinza); (B) câmara para solução de lavagem 1, 9 µL (7,4 mm × 3 mm); (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de lavagem 1 (250 µm de largura); (C) câmara central, 8 µL (raio maior 6,4 mm e raio menor 4,2 mm); (D) Câmara de descarte, 27 µL total (7 mm × 5 mm; 6,4 mm × 5 mm); (d) válvula de sifão combinada a válvula capilar interligando câmara central e descarte; (E) câmara para coleta de amostra, 6 µL (4,5 mm de diâmetro); (e) válvula de fita adesiva para fechamento e abertura do canal para amostra; (F) câmara para solução de dessorção, 6 µL (8 mm × 1,7 mm); e (f) combinação de sifão e válvula capilar. 108
- Figura 42 – Rotação e tempo determinados para ruptura de cada uma das válvulas utilizadas no dispositivo PeT de extração automatizado (n = 6). As válvulas foram indicadas de acordo com o desenho apresentado na Figura 41, no entanto, na ordem de ruptura. Sendo que (b) é combinação sifão e válvula capilar; (d) sifão para controle da entrada do descarte; (a) válvula hidrofóbica de toner; (f) combinação de sifão e válvula capilar; e (e) válvula de fita adesiva para fechamento e abertura do canal para amostra..... 110
- Figura 43 – Foto do dispositivo otimizado e utilizado para extração de DNA (a). Representação esquemática do protocolo de rotação e tempo otimizados com auxílio de corantes para dispositivo PeT de extração automatizado, nos quais as setas representam a liberação das soluções (azul = isopropanol (B); amarela = TE 0,1×, lavagem (A); verde = GuHCl/amostra (C); vermelha = TE 0,1×, eluição (F)) expostas a determinada rotação (topo da figura) por determinado tempo (base da figura) e o símbolo “X” representa o fechamento da válvula de fita adesiva = válvula para câmara da amostra (e). 111
- Figura 44–Dispositivo final de PeDF automatizado para extração de DNA, no qual estão identificados: (A) câmara da solução aquosa de lavagem 2, 20 µL (11,6 mm × 1,9 mm) e (6 mm × 2,3 mm); (a) combinação de sifão e válvula capilar; (B) câmara para solução de lavagem 1, 9 µL (7,4 mm × 3 mm); (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de lavagem 1; (C) câmara central, 8 µL (raio maior, 6,4 mm e, raio menor, 3,2 mm); (D) Câmara de descarte, 27 µL total (7,7 mm × 5 mm; 7,2 mm × 5,5 mm); (d) válvulas de sifão combinadas a válvula capilar interligando câmara central e descarte; (E) câmara para coleta de amostra, 7,4 µL (4,8 mm de diâmetro); (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; (F) câmara para solução de dessorção, 6,15 µL (8 mm × 1.7 mm); (f) combinação sifão com válvula capilar; e (g) orifício para ventilação da câmara de amostra (3). 113

- Figura 45 – Rotação e tempo determinados para ruptura de cada uma das válvulas utilizadas no dispositivo PeDF de extração automatizado (n = 6). As válvulas foram indicadas de acordo com o desenho apresentado na Figura 44, no entanto, na ordem de ruptura. Sendo que, (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de isopropanol; (d) válvulas de sifão combinada a válvula capilar interligando câmara central e descarte; (a) combinação de sifão e válvula capilar; (f) combinação sifão com válvula capilar; (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; e (g) orifício para ventilação da câmara de amostra..... 114
- Figura 46 – Foto do dispositivo otimizado e utilizado para extração de DNA (a). Aumento da região de interligação entre as duas camadas de dispositivos (b). Representação esquemática do protocolo de rotação e tempo otimizados com auxílio de corantes para dispositivo PeDF de extração automatizado, nos quais as setas representam a liberação das soluções (azul = isopropanol (B); amarela = TE 0.1 x, lavagem (A); verde = GuHCl/amostra (C); vermelha = TE 0.1 x, eluição (F)) expostas a determinada rotação (topo da figura) por determinado tempo (base da figura); o pontilhado vermelho destaca o ponto de ligação entre os dois dispositivos (c). Para acompanhar o procedimento é necessário que sejam seguidas as setas na ordem azul, verde, amarela e vermelha, respectivamente..... 116
- Figura 47 – Desenho da versão final do dispositivo de amplificação, no qual estão identificados: (C) câmara central, 8 μ L (raio maior 6 mm e raio menor 2,0 mm); (E) câmara para coleta de amostra, 7,4 μ L (4,8 mm de diâmetro); (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; (G) câmara para *primers*, 0,5 μ L (1,7 mm de diâmetro); (g) canal de ligação entre câmara G e H; (H) câmara para mistura reacional, 2,5 μ L (3,4 mm de diâmetro); (h) válvula capilar; (i) sifão; (J) canal da câmara *metting* para câmara de reação; (K) câmara que antecede o dispositivo de amplificação; (k₁ e k₂) canais para mistura; (l) orifício para ventilação; (m) orifício de interligação com o terceiro plano do dispositivo; (m') orifício no terceiro plano para ligação com o segundo plano; (N) câmara para PCR (1,8 mm x 0,9 mm); (o) válvula hidrofóbica de toner (7 mm x 7,3 mm); (P) câmara de referência para controle da temperatura. 118
- Figura 48 – Rotação e tempo determinados para ruptura de cada uma das válvulas utilizadas no dispositivo PeDF - PeT, de amplificação automatizado (n = 6). As válvulas foram indicadas de acordo com o desenho apresentado na Figura 47, no entanto, na ordem de ruptura. Sendo que, (h) válvula capilar; (g) canal; (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; (i) sifão..... 119
- Figura 49 – Representação esquemática do protocolo de rotação e tempo otimizados com auxílio de corantes para dispositivo PeDF - PeT de amplificação automatizado, nos quais as setas representam a liberação das soluções (rosa = mistura reacional sem *primers*; preto = *primers*; vermelha = amostra; laranja = amostra + mistura reacional) expostas a determinada rotação (topo da figura) por determinado tempo (base da figura). 120
- Figura 50 – Desenho da versão final do dispositivo integrado de análise molecular, no qual estão identificados: (A) câmara da solução aquosa de lavagem 2, 10 μ L (17 mm x 1,9 mm) e 10 μ L (11,4 mm x 2,9 mm); (a) combinação de sifão e válvula capilar; (B) câmara para solução de lavagem 1, 9 μ L (8,8 mm x 3,5 mm); (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de lavagem 1; (C) câmara central, 8 μ L (raio maior 6 mm e raio menor 2,0 mm); (D) Câmara de descarte, 27 μ L total (7 mm x 6 mm; 7,5 mm x 6 mm); (d) válvulas de sifão combinada a válvula capilar interligando câmara central e descarte; (E) câmara para coleta de amostra, 7,4 μ L (4,8 mm de diâmetro); (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; (F) câmara para

solução de dessorção, 6.15 μL (9 mm $\times$ 1,9 mm); (f) combinação sifão com válvula capilar; e (G) câmara para *primers*, 0,5 μL (1,7 mm de diâmetro); (g) canal de ligação entre câmara G e H; (H) câmara para *mistura reacional*, 2,5 μL (3,4 mm de diâmetro); (h) válvula capilar; (i) sifão; (J) canal da câmara *mettering* para câmara de reação; (K) câmara que antecede o dispositivo de amplificação; (k_1 e k_2) canais para mistura; (l) orifício para ventilação; (m) orifício de interligação com o terceiro plano do dispositivo; (m') orifício no terceiro plano para ligação com o segundo plano; (N) câmara de reação (1,8 mm $\times$ 0,9 mm); (o) válvula hidrofóbica de toner (7 mm $\times$ 7,3 mm); (P) câmara de referência para controle da temperatura. 121

Figura 51 – Rotação e tempo determinados para ruptura de cada uma das válvulas utilizadas no dispositivo integrado PeDF- PeT de análise molecular ($n = 6$). As válvulas foram indicadas de acordo com o desenho apresentado na Figura 50, no entanto, na ordem de ruptura. Sendo que, (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de isopropanol; (d) válvulas de sifão combinada a válvula capilar interligando câmara central e descarte; (a) combinação de sifão e válvula capilar; (h) válvula capilar; (f) combinação sifão com válvula capilar; (g) canal; (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; (i) sifão. 122

Figura 52 – Foto do dispositivo otimizado e utilizado para extração de DNA (a). Representação esquemática do protocolo de rotação e tempo otimizados com auxílio de corantes para dispositivo PeT de extração automatizado, nos quais as setas representam a liberação das soluções (azul = isopropanol; amarela = TE 0,1 $\times$, lavagem; verde = GuHCl; vermelha = TE 0,1 $\times$, eluição; rosa = mistura reacional sem *primers*; preto = *primers*; laranja = amostra + mistura reacional) expostas a determinada rotação (topo da figura) por determinado tempo (base da figura) (b)..... 123

Figura 53 – Média da eficiência de extração ($n = 4$) comparando a utilização do dispositivo PeT semiautomatizado e dispositivo dSPE desenvolvido por Duarte *et al.*, (2011)⁴¹. Os valores de eficiência para os dois dispositivos não são significativamente diferentes, segundo teste Tukey (95%). 125

Figura 54 – Eletroferograma obtido utilizando kit para separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, referente ao produto de amplificação do gene β -globina presente no DNA gênomico humano extraído por dSPE no dispositivo de PeT semiautomatizado em amostras de sangue. Nos eletroferogramas está destacado (*) o pico referente ao produto de amplificação do gene β -globina entre os marcadores de tamanho de 15 e 1500 pb. 126

Figura 55 – Foto do microdispositivo de extração não automatizado de poliéster (a) MARES e (b) 3M CG6000 “B” ao final da extração de DNA a partir de amostra de urina fortificada com padrão pré- purificado. 129

Figura 56 – Média da eficiência da extração de DNA a partir de amostras de urina fortificada com padrão pré-purificado ($n = 3$) em microdispositivo automatizado de poliéster de diferentes marcas e em tubo. 130

Figura 57 – Gel de agarose 1% de amostras de extração de DNA realizadas em tubo (a) e microdispositivo não automatizado 3MCG6000 – B (b), com quantidade inicial de DNA na amostra de 20 (1a - 8a; 1b - 9b) e 40 ng (9a - 16a; 11b - 19b). Frações da lavagem com isopropanol (1, 5, 9 e 13)a e (1, 4, 7, 11, 14 e 17)b. Frações de lavagem com TE 0.1X (2, 6, 10 e 14)a e (2, 5, 8, 12, 15 e 18)b. Frações após a primeira etapa de dessorção do DNA (3,

7, 11 e 15)a e (3, 6, 9, 13, 16 e 19)b. Frações após a segunda etapa de dessorção do DNA (4, 8, 12 e 16). Padrão de DNA genômico humano em TE 1X, 5 ng (17)a e (10)b.....	131
Figura 58 – Gel de agarose 1%. Amostras de padrão de DNA genômico humano em TE 1x coletadas de dentro da câmara 3M CG6000 “B” após 5 minutos em contato com o filme (1-6); Amostras provenientes da extração de DNA realizadas em câmara 3MCG6000 – B, amostra com quantidade inicial de 132 ng de padrão de DNA genômico humano em TE 1× (7 - 9; 10 - 12); Padrão de DNA genômico humano em TE 1×, 10 ng (13).....	132
Figura 59 – Análise do gel de agarose 1%, do produto de amplificação do gene β -globina de 380 pb (2 - 6), e aplicação direta de DNA genômico humano (7 - 9) presente em amostras retiradas dos dispositivos de poliéster. Marcador de tamanho 1 kb (1); controle negativo (2); controle positivo (3); amplificação do gene β -globina nas amostras após 5 minutos nas câmaras: 3M CG6000 – B (4), Terphane (5) e MARES (6); Aplicação direta das amostras retiradas das câmaras: Terphane (7), 3M CG6000 – B (8) e MARES (9).....	133
Figura 60 – Eletroferograma obtido utilizando kit para separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, referente ao produto de amplificação do gene β -globina presente no DNA genômico humano extraído por dSPE de amostras de sangue em dispositivo de PeDF automatizado. Nos eletroferogramas está destacado (*) o pico referente ao produto de amplificação do gene β -globina entre os marcadores 15 e 1500 pb. Reação de amplificação realizada em tubo.....	135
Figura 61 – Eletroferograma obtido utilizando kit para separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, referente ao produto de amplificação do gene β -globina presente no DNA genômico humano extraído por dSPE de amostras de urina fortificada, em dispositivo de PeDF automatizado. Nos eletroferogramas está destacado (*) o pico referente ao produto de amplificação do gene β -globina entre os marcadores 15 e 1500 pb. Reação de amplificação realizada em tubo.....	136
Figura 62 – Gel de agarose 1,5%. Produto de amplificação do gene <i>malB</i> presente no DNA extraído por dSPE de amostras de bactéria <i>E. coli</i> , em dispositivo PeDF de extração automatizado. As colunas correspondem ao (1) Padrão de tamanho 100 bp; (2) Controle positivo; (3) Chip 1; (4) Chip 2; (5) Chip 3; (6) Chip 4; (7) Controle negativo; (8) padrão de DNA genômico humano; (9) Padrão de tamanho 100 bp.....	137
Figura 63 – Eletroferogramas obtidos utilizando kit de separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, correspondente a análise dos produtos das reações de amplificação do gene <i>malB</i> (*) em amostras de <i>E. coli</i> por PCR em tubo e IV-PCR em microdispositivo PeT fabricado com o filme MARES. Protocolo de reação para a reação por PCR em tubo foi 95 °C – 3 min, 40 ciclos de 95 °C – 2 min, 59 °C – 1 min, 72 °C – 2 min, finalizando com 72 °C – 5 min. Protocolo de reação para reação por IV-PCR em microdispositivo PeT de amplificação fabricado com o filme MARES foi 95 °C – 30 s., 20 ciclos de 95 °C – 30 s., 59 °C – 15 s, 72 °C – 30 s, finalizando com 72 °C – 30 s (correspondente ao protocolo A na Tabela 3). Os eletroferogramas correspondem a: 1% de PEG 200 na mistura reacional, tubo 1(a) e microdispositivo 1 (b); 1,5% de PEG 200 na mistura reacional, tubo 2(a) e microdispositivo 2 (b); 2,5% de PEG 200 na mistura reacional, tubo 3(a) e microdispositivo 3 (b); 3,5% de PEG 200 na mistura reacional, tubo 4 (a) e microdispositivo 4 (b); 8% de PEG 200 na mistura reacional, tubo 5 (a) e microdispositivo 5 (b).....	139

Figura 64 – Eletroferogramas obtidos utilizando kit de separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, correspondente a análise dos produtos das reações de amplificação do gene *malB* (*) em amostras de *E. coli* por IV-PCR (a e b) em microdispositivo PeT fabricado com o filme MARES. Os protocolos utilizados foram (a) 95 °C – 60 s, 20 ciclos de 95 °C – 60 s, 59 °C – 30 s, 72 °C – 60 s, finalizando com 72 °C – 60 s (correspondente ao protocolo B na Tabela 3); (b) 95 °C – 120 s, 20 ciclos de 95 °C – 60 s, 59 °C – 30 s, 72 °C – 60 s, finalizando com 72 °C – 60 s (correspondente ao protocolo C na Tabela 3); (c) Produto da reação de amplificação do gene *malB* em amostras de *E. coli* por PCR em tubo, protocolo de aquecimento foi 95 °C – 3 min, 40 ciclos de 95 °C – 2 min, 59 °C – 1 min, 72 °C – 2 min, finalizando com 72 °C – 5 min..... 141

Figura 65 – Eletroferogramas obtidos utilizando kit de separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, correspondente a análise dos produtos das reações de amplificação do gene *malB* (*) em amostras de *E. coli* por PCR em tubo (a) e IV-PCR em microdispositivo PeT fabricado com o filme 3MPP2200 (b, c e d). Protocolo de reação para a reação por PCR em tubo foi 95 °C – 3 min, 40 ciclos de 95 °C – 2 min, 59 °C – 1 min, 72 °C – 2 min, finalizando com 72 °C – 5 min (a). O protocolo de aquecimento utilizado para os dispositivos PeT 3MPP2200 foi 95 °C – 120 s, 20 ciclos de 95 °C – 60 s, 59 °C – 30 s, 72 °C – 60 s, finalizando com 72 °C – 60 s (correspondente ao protocolo C na Tabela 3) (b, c e d). Dispositivo sem passivação estática (b); Dispositivo com passivação estática por BSA 0,6 mg mL⁻¹ (c); Dispositivo com passivação estática por PEG 2000. 142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene β -globina, tamanho do fragmento de 390 pb.....	75
Tabela 2 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>malB</i> , tamanho do fragmento de 204 pb.....	75
Tabela 3 - Protocolo de aquecimento para IV-PCR em dispositivo de PeT MARES e 3MPP2200 com as respectivas variações no tempo de cada etapa.....	77
Tabela 4 – Valores percentuais de compostos orgânicos e inorgânicos, T2 e T3, dos filmes de poliéster em atmosfera de ar sintético – (1) MARES, (2) 3MCG6000 – B, (3) 3MPP2200 e (4) Terphane.	83
Tabela 5– Dados obtidos por meio da análise DSC para os diferentes filmes de poliéster: entalpia de fusão (ΔH_m), temperatura de fusão (T_m) e cristalinidade. 3MCG6000 – B (1), MARES (2), Terphane (3) e 3MPP2200 (4).....	84
Tabela 6 – Bandas de FTIR características dos grupos funcionais dos componentes dos filmes analisados, conforme indicado na Figura 25 – 3MCG6000 – B (1), MARES (2), Terphane (3) e 3MPP2200 (4).	86
Tabela 7 – Concentração de DNA na amostra final de extração por dSPE em quatro microdispositivos PeT 3MCG6000 – B, partindo da mesma amostras de urina fortificada com diferentes quantidades iniciais de DNA.	128

LISTA DE ABRIVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

SDS – Dodesilsulfato de sódio

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

SPE – Extração em fase sólida (*solid phase extraction*)

dSPE – Extração dinâmica em fase sólida (*dynamic solid phase extraction*)

GuHCl – Hidrocloreto de guanidina

RT-PCR – Transcriptase reversa – Reação em cadeia da polimerase (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

IV-PCR – Reação em cadeia da polimerase – radiação infravermelha

STR – *Short Tandem Repeat*

pb – pares de bases

GuHCl – Hidrocloreto de guanidina

Tris – Tris[hidroximetil]aminometano

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

TE – 1 mol/L Tris / 0,1 mol/L EDTA

Taq – *Thermus aquaticus*

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

BSA – albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*)

PeT – Poliéster toner

PeDF – Poliéster dupla face

CGE – Eletroforese capilar em gel

PDMS – Polimetildimetilsiloxano

PMMA – Polimetilmetacrilato

PE – Poliéster

PC – Policarbonato

LOC – *Lab-on-a-chip*

TGA – Termogravimetria

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

FTIR – Espectroscopia de infravermelho

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

SUMÁRIO

1	Introdução	24
1.1	Análises genéticas.....	24
1.1.1	Etapas da análise genética	24
1.1.1.1	Lise Celular.....	24
1.1.1.2	Extração e purificação	25
1.1.1.3	Amplificação do DNA	28
1.1.1.4	Separação e identificação do <i>amplicon</i>	29
1.2	Materiais e tecnologias de microfabricação	30
1.3	Dispositivos microfluídicos para análise genética	34
1.4	Dispositivos controlados pela força centrífuga.....	36
1.4.1	Válvulas.....	38
1.4.1.1	Válvulas ativas	38
1.4.1.2	Válvulas passivas.....	39
1.4.1.2.1	Válvulas hidrofóbicas.....	39
1.4.1.2.2	Válvulas de sifão	40
1.4.1.2.3	Válvulas capilares	40
1.4.1.2.4	Válvula de fita adesiva	41
1.4.1.2.5	Válvulas passivas operando em modo aberta -fechada	42
1.4.2	Misturas em microcanais	43
1.4.3	Separação de volume pré-determinado.....	43
1.4.4	Dispositivos controlados pela força centrífuga para análise molecular	44
2	Objetivos	46
2.1	Geral	46
2.2	Específico	46
2.2.1	Caracterização dos materiais utilizados.....	46
2.2.2	Microdispositivo automatizado para extração de DNA	46
2.2.3	Otimização da reação de IV-PCR em microdispositivo de PeT	47
2.2.4	Acoplamento da extração e amplificação em microdispositivo de poliéster	47
3	Materiais e Métodos	48
3.1	Linha do tempo do desenvolvimento dos experimentos	48
3.2	Caracterização dos filmes de poliéster.....	49
3.2.1	Espessura dos filmes de poliéster por perfilometria	50
3.2.2	Ângulo de contato.....	50
3.2.3	Análises Térmicas.....	50
3.2.3.1	Termogravimetria (TGA)	50
3.2.3.2	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	51
3.2.4	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	51
3.2.5	Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	51
3.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	51
3.3	Plataforma rotativa e monitoramento do dispositivo	52
3.4	Termociclador com aquecimento por infravermelho (IV)	53
3.5	Microfabricação.....	54

3.5.1	Dispositivos.....	54
3.5.1.1	PeT.....	55
3.5.1.2	PeDF.....	57
3.5.2	Válvulas.....	59
3.6	Desenvolvimento e otimização dos dispositivos controlados pela força centrífuga	61
3.6.1	Dispositivo de extração.....	61
3.6.1.1	Dispositivo de extração PeT semiautomatizado.....	61
3.6.1.2	Dispositivo de extração automatizado.....	62
3.6.1.2.1	PeT e PeDF.....	62
3.6.2	Câmara de <i>mettering</i>	64
3.6.3	Dispositivo PeT para amplificação.....	66
3.6.4	Dispositivo integrado para análise molecular.....	69
3.7	Extração de DNA por dSPE em dispositivos de Poliéster.....	70
3.7.1	Protocolo de extração dSPE.....	70
3.7.1.1	Extração dispositivo semiautomatizado:.....	70
3.7.1.2	Extração dispositivo automatizado:.....	71
3.7.2	Preparo de amostras.....	72
3.7.2.1	Preparo de amostra de sangue.....	73
3.7.2.2	Preparo de amostra de urina com adição de DNA genômico humano.....	73
3.7.2.3	Preparo de amostra de bactéria – <i>Escherichia coli</i>	74
3.8	Quantificação de DNA.....	74
3.9	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	74
3.9.1	PCR convencional em Tubo.....	74
3.9.2	IV-PCR em dispositivos de PeT.....	76
3.9.2.1	DNA de bactéria – <i>Escherichia coli</i>	76
4	Resultados e Discussão.....	78
4.1	Caracterização dos filmes de poliéster.....	78
4.1.1	Espessura dos filmes de poliéster por perfilometria.....	78
4.1.2	Ângulo de contato.....	80
4.1.3	Análises Térmicas.....	82
4.1.3.1	Termogravimetria (TGA).....	82
4.1.3.2	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	83
4.1.3.3	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	85
4.1.4	Caracterização elementar da superfície por espectrometria de energia dispersa de raios – X (EDS ou EDX).....	87
4.1.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	89
4.2	Adaptação plataforma rotativa.....	90
4.3	Microfabricação.....	94
4.4	Desenvolvimento e otimização dos dispositivos controlados pela força centrífuga	96
4.4.1	Funcionamento das válvulas.....	96
4.4.1.1	Válvula de Fita Adesiva.....	96
4.4.1.2	Válvula capilar.....	98
4.4.1.3	Sifão.....	99
4.4.1.4	Válvula de toner.....	100

4.4.2	Dispositivos de extração.....	101
4.4.2.1	Dispositivo de extração PeT semiautomatizado.....	101
4.4.2.2	Dispositivo de extração automatizado.....	107
4.4.2.2.1	PeT.....	107
4.4.2.2.2	PeDF.....	112
4.4.3	Câmara de <i>mettering</i>	117
4.4.4	Dispositivo de amplificação	117
4.4.5	Dispositivo Integrado para análise molecular	121
4.5	Extração de DNA por dSPE em dispositivos de Poliéster	124
4.5.1	Dispositivo de PeT convencional × PeT semiautomatizado.....	124
4.5.2	Dispositivo de PeT automatizado.....	126
4.5.3	Dispositivo de PeDF automatizado.....	134
4.5.3.1	DNA Genômico humano em amostras de sangue.....	134
4.5.3.2	DNA Genômico humano em amostras de urina	135
4.5.3.3	DNA de bactéria – <i>Escherichia coli</i>	136
4.6	Amplificação de DNA por IV- PCR em dispositivos de PeT.....	137
4.6.1	DNA de bactéria – <i>Escherichia coli</i> K12.....	137
5	Conclusão	144
6	Referências bibliográficas.....	146

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANÁLISES GENÉTICAS

É cada vez mais amplo o uso da análise de DNA e RNA nas áreas biológicas e biomédicas. As aplicações são diversas, desde análises forenses¹⁻³ e diagnóstico de patógenos em alimentos,⁴⁻⁶ até diagnósticos clínicos de doenças infecciosas⁷⁻¹³ e doenças genéticas.¹⁴⁻¹⁷ Portanto, as técnicas de biologia molecular tem impacto cada vez maior nas áreas de segurança pública, segurança de alimentos e de saúde pública.

Diferentes fatores são responsáveis por tornar a análise de nucleotídeos tão relevante, os quais estão diretamente relacionados às especificidades de cada aplicação. De forma geral, ela possibilita análises mais rápidas, específicas, sensíveis, ideal para condições em que a quantidade de amostra é limitada e, ainda no caso da identificação de patógenos, permite diagnósticos precoces e mais precisos.^{2,7,12,18-22}

1.1.1 Etapas da análise genética

Basicamente, um método de análise de DNA compreende quatro etapas: *(i)* lise celular; *(ii)* extração e purificação do DNA; *(iii)* amplificação de um gene alvo (*amplicon*) do DNA extraído; e *(iv)* identificação do *amplicon* gerado.^{18,23}

1.1.1.1 Lise Celular

A etapa de lise é primordial no preparo de amostras nas quais o DNA alvo está contido no interior da célula, e não na forma de DNA circulante no meio. Para a lise celular é necessário que a parede celular seja rompida utilizando métodos que proporcionem total liberação do DNA/RNA para o meio, sem a sua degradação, o que pode ser realizado por meio de métodos físicos e/ou químicos.²³⁻²⁵ Dentre as diferentes estratégias que podem ser encontradas na literatura para os diversos tipos de amostras, é comum a combinação de métodos químicos e físicos. Para isso, são utilizadas soluções tamponantes ou agentes caotrópicos combinados a detergentes, capazes de romper a parede celular, como citrato de sódio, hidrócloro de guanidina, dodesilsulfato de sódio (SDS) e Triton X-100. Além do uso de enzimas, como a proteinase K, capaz de degradar

proteínas que possam agir como inibidores das etapas subsequentes ou degradar o ácido nucleico liberado. Ainda, as amostras podem ser submetidas ao aquecimento e etapas de centrifugação.²³⁻²⁶

Um fator importante em relação à etapa de lise é que grande parte dos reagentes utilizados, assim como os restos celulares são potenciais inibidores para a etapa de amplificação do DNA alvo. Por tanto, após a exposição do DNA alvo para o meio, é necessário que este seja capturado e purificado podendo assim dar-se continuidade às etapas subsequentes.

As dificuldades intrínsecas do procedimento de extração e purificação estão diretamente relacionadas ao tipo de amostra utilizada. Amostras muito complexas podem apresentar maior quantidade de inibidores para as etapas subsequentes. Por exemplo, amostras de cabelo, pele e osso, possuem melanina e colágeno³, respectivamente, os quais são potenciais inibidores de PCR. Outro exemplo importante é a presença de excesso de DNA que não seja o alvo da análise, como pode ocorrer quando utiliza-se amostras de sangue para diagnóstico de patógenos.²⁷ Além disso, dependendo da fonte das amostras é possível ter maior ou menor quantidade de DNA intacto ou degradado.^{1,3}

Assim, existem diferentes processos de extração e purificação do DNA, das quais podemos destacar dois grandes grupos, (i) a extração com solvente orgânico, a extração líquido-líquido; e (ii) extração utilizando suporte sólido (*solid phase extraction* - SPE).

1.1.1.2 Extração e purificação

A extração com solvente orgânico é uma metodologia clássica e muito utilizada na biologia molecular. No entanto, a utilização de solventes orgânicos para precipitação de DNA é muito trabalhosa devido a uma série de etapas de precipitação e lavagens, as quais potencializam os riscos de contaminação das amostras.^{23,28} Além disso, os solventes utilizados apresentam grande potencial de inibição *downstream* (etapas seguintes a extração e purificação), como a PCR.^{24,29-33} Por fim, devido a essas características é uma etapa difícil de ser miniaturizada e automatizada²³.

A extração em meio sólido (SPE) é uma das tecnologias mais utilizadas em kits para extração de DNA, tais como QIAamp DNA Stoll Mini kit (Qiagen), DNeasy Tissue kit (Qiagen), FastDNA SPIN kit (MPBio). Além disso, SPE é bastante utilizada na adaptação para dispositivos microfluídico,^{23,24,34-36} com a vantagem de reduzir o tempo de análise e

consumo de solventes.³⁵ Diferentes tecnologias têm sido desenvolvidas baseadas em SPE para extração de DNA. Dentre elas, destacam-se: (i) a metodologia baseada em troca iônica que consiste na interação de grupos carregados positivamente na superfície das partículas com grupos fosfatos presentes nos ácidos nucleicos carregados negativamente, na presença de baixa concentração salina. Contaminantes podem ser removidos com etapas de lavagens utilizando tampões com baixa e média concentração salina e por fim o DNA pode ser recuperado na presença de tampão com alta concentração;^{24,35,37} (ii) separação com partículas magnéticas funcionalizadas, a qual utiliza partículas magnéticas revestidas com anticorpo ou grupo funcional capaz de interagir com o DNA alvo. Após a interação do DNA com as partículas, essas são separadas dos componentes celulares e, conseqüentemente, dos inibidores presentes na amostra. Apesar do grande potencial, pode ser considerada uma metodologia cara^{23,38,39}, principalmente quando anticorpos são utilizados; (iii) adsorção do DNA em superfícies recobertas com sílica,^{23,24,29,30,33,34} a qual é derivada da extração dinâmica em fase sólida (dSPE).⁴⁰⁻⁴⁵ Esses métodos baseiam-se na adsorção do DNA na superfície da partícula recoberta com sílica em determinado pH e na presença de sais caotrópicos, como o hidrocloreto de guanidina (GuHCl).^{31,41,43,45-47} A interação entre o DNA e as partículas de sílica ocorre por meio da ligação de hidrogênio entre o DNA e a superfície da sílica desidratada, na presença do sal caotrópico.^{47,48} A dSPE também utiliza partículas revestidas com sílica e funcionam sob o mesmo princípio da SPE em sílica convencional. No entanto, são utilizadas partículas magnéticas que, nas mesmas condições caotrópicas e de pH, possibilitam o enovelamento e adsorção do DNA na sua superfície, quando sob agitação magnética.^{41,43,45} A grande vantagem da utilização da dSPE em comparação com a SPE convencional está no fato de que a SPE convencional utiliza uma coluna preenchida de micropartículas, a qual requer aplicação de pressão para que as soluções necessárias possam permear pelas partículas cumprindo com a suas respectivas funções.⁴⁵ Já a dSPE utiliza as partículas livres em solução, sendo que tanto a etapa de adsorção quanto a de dessorção ocorrem com as partículas sob agitação magnética.^{41-43,45} Em ambas, após etapas de lavagem com álcoois para precipitação do DNA e remoção de proteínas do meio, é realizada uma etapa de lavagem com solução tampão de baixa concentração salina. A última etapa de lavagem tem como objetivo a remoção de resíduos de GuHCl e álcool utilizados, assim como possíveis restos celulares, para obtenção do DNA purificado. Esta etapa tem grande importância durante a purificação

do DNA e é extremamente crítica na metodologia por dSPE. Isso porque na presença de tampão de baixa concentração salina ou água, o DNA desorve facilmente das partículas quando estas estão em movimento.^{41-43,45} Na Figura 1 é possível observar um esquema simplificado com as principais etapas da dSPE realizada em tubo.

Figura 1 - Esquema simplificado das principais etapas da extração por dSPE em tubo utilizando micropartículas magnéticas de sílica.

Fonte: autoria própria

A amostra lisada é adicionada ao tubo assim como a solução caotrópica, que no exemplo da Figura 1 corresponde ao GuHCl. Em seguida, representada na letra A, o conjunto é levado ao agitador magnético por tempo pré-determinado de acordo com a metodologia desenvolvida para que o DNA possa se enovelar e adsorver na superfície recoberta com sílica. A etapa B corresponde à lavagem com álcool seguida de solução tampão e descarte de ambas as soluções. Finalmente, é adicionada nova solução tampão e o conjunto novamente levado para agitação para dessorção do DNA das partículas e coleta da amostra purificada, representado na letra C.⁴⁵

É muito importante a combinação do método de lise celular ao método de extração capaz de proporcionar amostras com quantidade e qualidade adequadas para a etapa de amplificação.

Após esta etapa, a amostra obtida é utilizada para amplificação *in vitro* de um gene, ou seja, uma sequência específica capaz de permitir a identificação de uma mutação ou organismo alvo. Diferentes métodos de amplificação de DNA e RNA foram descritos na literatura,^{37,49,50} no entanto, o mais amplamente utilizado ainda é a reação em cadeia da polimerase, PCR (*polymerase chain reaction*)⁵¹.

1.1.1.3 Amplificação do DNA

A reação de PCR foi desenvolvida entre os anos de 1985 e 1987, sendo que o primeiro pesquisador a demonstrar a amplificação de um gene específico do DNA, a β -globina, foi Kary Mullis.^{52,53} Dentre os tipos mais comuns, temos a PCR convencional para amplificação de DNA simples e dupla fita⁵⁴⁻⁵⁶ e a RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) onde se utiliza RNA como alvo para a amplificação.^{8,27}

A composição da mistura reacional da PCR para amostras de DNA consiste basicamente de: (i) enzima termoestável (Taq - DNA polimerase); (ii) duas sequências de oligonucleotídeos (*forward* e *reverse*) iniciadores da reação, previamente desenhadas para uma determinada sequência presente no DNA alvo e conhecidos como *primers*; (iii) desoxirribonucleotídeos (dNTPs), composta por uma mistura de nucleotídeos; (iv) tampão de reação; e (v) $MgCl_2$.^{52,53,57,58}

Para amplificação do DNA dupla fita, o princípio básico da reação consiste na desnaturação da fita com o aumento da temperatura, seguido por ciclos de aquecimento e resfriamento, e por fim, a etapa de alongamento das fitas. O processo de aquecimento e resfriamento para reações convencionais em tubo e volumes em torno de 20 – 25 μ L, é possível com a utilização de um termociclador.^{52,53} Cada ciclo consiste em 3 etapas, a desnaturação, a hibridização e a extensão da fita. A etapa de desnaturação, assim como a pré-desnaturação, consiste na separação da dupla fita do DNA molde obtendo-se fitas simples, sob temperatura em torno de 94 °C. Com as fitas desnaturadas, é iniciada a segunda etapa, normalmente entre 40 – 60 °C, na qual ocorre o pareamento e ligação dos iniciadores em uma região específica das fitas simples de DNA. Na última etapa, normalmente em torno de 72 - 75 °C, a Taq-DNA polimerase propicia o pareamento e

ligação dos nucleotídeos livres, a partir dos iniciadores, às fitas de DNA molde.⁵² Em teoria, cada ciclo faz com que os produtos de PCR dobrem em número, portanto, ao final da reação a quantidade de produto de amplificação corresponde ao número inicial de DNA molde vezes dois elevado ao número de ciclos.^{3,52,53,58} A concentração final de cada um dos componentes da mistura reacional e as condições da reação, como tempo, temperatura e número de ciclos, devem ser otimizadas de acordo com a aplicação da PCR e a sequência do DNA alvo.⁵⁸

1.1.1.4 Separação e identificação do *amplicon*

Para que o gene amplificado, ou *amplicon*, possa ser identificado, é realizada a etapa de separação dos fragmentos de DNA presentes na amostra com base no tamanho molecular. A eletroforese é uma das técnicas mais utilizadas e baseia-se na migração de espécies carregadas em uma solução tampão sob aplicação de um campo elétrico.⁵⁹ Considerando que a carga global de uma fita de DNA é negativa,^{52,60} é necessário a utilização de um meio poroso, eletroforese em gel, o qual promove uma ação de peneiramento molecular que retarda a migração das fitas dependendo do tamanho do poro do polímero e do fragmento de DNA.⁶¹ Dentre os meios porosos mais utilizados estão a agarose,⁶¹⁻⁶³ poliacrilamida,⁵² hidroxipropilmetilcelulose,⁶⁴ hidroxietilcelulose⁴⁴ e hidroxipropilcelulose.⁴⁴

Quando aplicado o potencial elétrico os fragmentos de DNA carregados negativamente migram em direção ao polo positivo, sendo que fragmentos menores conseguem percorrer uma distância maior que fragmentos maiores no mesmo tempo sob as mesmas condições. Ao final da análise, a distância percorrida pelos fragmentos é comparada a um padrão de tamanho e, com isso, é possível identificar se houve ou não a amplificação do fragmento alvo de tamanho conhecido. A resolução entre os fragmentos de diferentes tamanhos tende a melhorar quando são utilizados géis com maior concentração.^{52,60,61} No geral, são utilizados intercaladores como brometo de etídeo,^{61,62} Syber green®,⁶¹ Syber Gold®⁶¹ e PicoGreen®⁴⁴ para permitir a visualização dos fragmentos.

Dentre as formas de utilização da técnica de eletroforese em gel temos a eletroforese em gel de agarose,^{60,61,63} eletroforese capilar em gel (CGE)^{62,65,66} e a eletroforese em gel em microcanais.^{64,67-69} Apesar do grande volume de solução tampão e matriz polimérica

utilizados, a eletroforese em gel de agarose ainda é uma das mais importantes técnicas para análises rotineiras de DNA.^{61,62} No entanto, a CGE também é muito utilizada devido ao seu maior poder de resolução, rapidez, automatização e facilidade de quantificação quando comparado ao gel de agarose.^{62,65,66} Junto com a CGE, a eletroforese em gel em microcanais ganha cada vez mais espaço, principalmente por proporcionar análises mais rápidas, menor consumo de reagentes, maior capacidade de amostras, maior praticidade e maior sensibilidade,^{44,64,68,70,71} no entanto, microdispositivos comerciais ainda apresentam alto custo.⁷⁰

Apesar de todas as vantagens obtidas com a utilização do diagnóstico molecular nas áreas biológicas e biomédicas, a implementação da tecnologia em laboratórios para o uso de rotina ainda é restrita devido ao seu alto custo. Como exemplo, a necessidade de termocicladores, equipamentos de alta tecnologia contribuem para a não implementação rotineira. Além disso, é necessário mão de obra especializada para maior confiabilidade nos resultados e menores chances de contaminação no desenvolvimento de um trabalho intensivo, relacionado às sucessivas etapas de transferências entre tubos e centrifugações.^{59,72}

São muitas as vantagens relacionadas à miniaturização, dentre elas, aumento da rapidez e eficiência das análises, diminuição do consumo de amostras e reagentes, grande potencial para multiplexação e paralelização.^{59,72-75} Portanto, a utilização da microfluídica, com suas inerentes vantagens relacionadas à miniaturização, para realização de análises genéticas pode auxiliar para que a técnica seja cada vez mais utilizada e possa impactar de forma positiva na qualidade de vida nos países em desenvolvimento.^{72,74}

1.2 MATERIAIS E TECNOLOGIAS DE MICROFABRICAÇÃO

A microfluídica utiliza canais e câmaras de geometrias variadas para a manipulação de pequenos volumes de líquidos ou gases, trabalhando abaixo da escala micro.⁷⁶ Para isso, diferentes materiais têm sido utilizados na fabricação deste dispositivos, os quais determinam a metodologia de fabricação a ser utilizada, podendo apresentar maior ou menor custo, diferentes graus de dificuldade e ainda melhores características para determinada aplicação.⁷⁶ Dentre os materiais utilizados, temos os dispositivos de vidro,^{45,77-84} polímeros como o polimetildimetilsiloxano (PDMS),^{77,81,85-87}

polimetilmetacrilato (PMMA),⁸⁷⁻⁸⁹ e ainda os dispositivos de poliéster (Pe)^{41-43,45,77,90-92} e dispositivos de papel.⁹³⁻⁹⁹

Os dispositivos de vidro possuem grande resistência ao ataque químico, possibilitando sua aplicação em aplicações que requerem o uso de ácidos fortes e outros agentes corrosivos,⁷⁶ além disso possui ótimas propriedades ópticas para diferentes aplicações.^{77,78,100} No entanto, a tecnologia mais utilizada para microfabricação destes dispositivos ainda é a fotolitografia combinada a processo de ataque químico, a qual requer o uso de salas limpas e tem como principal componente um polímero fotossensível, o fotorresiste,^{77-80,100} acarretando em uma das tecnologias mais caras.^{76,78} Ela dificulta a integração de componentes funcionais para o desenvolvimento de diferentes etapas no mesmo dispositivo, como no caso dos Lab-on-a-chip (LOC).⁷⁸ Contudo, ainda se realizam esforços para o desenvolvimento de novos protocolos de fabricação para os dispositivos de vidro.^{78,101}

Em relação aos dispositivos de PDMS, eles são fáceis de trabalhar, transparentes⁷⁷ e ainda possibilitam adaptação das suas propriedades mecânicas variando a proporção da mistura polímero e agente de cura.¹⁰² No entanto, têm pobre compatibilidade química, grande capacidade de adsorção de pequenas moléculas em sua estrutura, e tendem a inchar na presença de alguns solventes orgânicos, limitando sua utilização.^{77,100} Apesar de ter menor custo que os dispositivos de vidro, a tecnologia mais utilizada também requer uma sala limpa e utiliza a fotolitografia para fabricação dos moldes, o que pode ser considerada a etapa mais cara da microfabricação.^{102,103} Outras abordagens para fabricação dos moldes e consequentemente dos dispositivos de PDMS foram estudadas,^{103,104} no entanto, a melhor resolução e menor dimensão dos canais ainda é obtida por meio da fotolitografia.¹⁰²

A utilização dos polímeros como poli metil metacrilato (PMMA) e poli carbonato (PC) tem crescido cada vez mais na produção de microdispositivos devido à alta estabilidade mecânica e química e ainda transparência óptica.¹⁰⁵ Além disso, podem ser fabricados por meios diferentes, de acordo com a aplicação. Dentre elas temos a injeção¹⁰⁶ e a gravação em relevo,^{89,106,107} as quais requerem um molde para injeção do polímero ou compressão do polímero, respectivamente, ambas em altas temperaturas. O molde é o que determina a qualidade e resolução dos dispositivos obtidos para ambas as técnicas,¹⁰⁶ além disso, requer um alto investimento inicial, o que limita seu uso principalmente no campo da pesquisa.^{106,108} Outra técnica muito utilizada é o

microfresamento (*micromilling*), o qual cria estruturas em microescala por meio de um equipamento de corte e remoção do material remanescente.¹⁰⁶ No entanto, também é uma técnica cara, requer alto investimento inicial, grandes equipamentos e, conseqüentemente, grande infraestrutura e ainda pessoas com alta *expertise* para manipular os equipamentos.^{106,108} Uma das tecnologias mais acessíveis que tem sido bastante utilizada para produção de dispositivos de PMMA é a gravação ou corte a laser.^{105,109} Contudo, de forma geral técnicas mais bem estabelecidas são mais viáveis para produção em massa que para prototipagem de plataformas.⁷¹

Por outro lado, ao contrário das técnicas apresentadas até o momento, a fabricação dos dispositivos de papel e poliéster continua se destacando como processos de produção simples e baratas, o que aliados ao baixo custo da matéria prima proporcionam grande impacto no desenvolvimento de dispositivos de baixo custo.¹¹⁰⁻¹¹²

O papel como substrato para dispositivos microfluídicos ganhou grande destaque recentemente em trabalhos de Whitesides e colaboradores.⁹³⁻⁹⁶ Os autores demonstram as vantagens relacionadas ao uso de um substrato de baixo custo, excelente compatibilidade química e ainda que permite o desenvolvimento de dispositivos multi-análises com processo de produção simples e barata.^{93-97,110} A técnica de produção mais utilizada é a criação de barreiras hidrofóbicas por meio da impressão direta de cera seguida do aquecimento do dispositivo para penetração da cera derretida nos poros do papel e com isso possibilitar a criação de canais, reservatórios e câmaras.⁹³

A utilização dos filmes de poliéster com impressão a laser para produção de microdispositivos foi descrita pela primeira vez por Do Lago e colaboradores (2003).¹¹³ Desde então, a tecnologia tem se desenvolvido cada vez mais para produção de dispositivos de poliéster-toner (PeT) para diferentes aplicações biológicas.^{41-44,69,71,90,114} Para isso, nova metodologia de fabricação foi proposta por Duarte e colaboradores, (2011).⁴¹ Esta consiste na utilização de filmes de poliéster sem e com recobrimento de toner intercalados para formação de um sanduíche no qual são adicionadas as soluções necessárias para o desenvolvimento de determinado procedimento. Na Figura 2 é possível observar o fluxo de trabalho na produção dos dispositivos de PeT.

Figura 2 - Fluxograma de trabalho para produção dos dispositivos de PET, apresentando cada um dos equipamentos e substrato utilizados. A. Substratos utilizados para produção dos dispositivos, folhas de transparência e toner em impressora a laser; B. Software de desenho para desenvolvimento do *design* do dispositivo e cortadora a laser para fabricação das câmaras e canais no substrato; C. Laminadora para laminação das camadas do microdispositivo.

Fonte: autoria própria

Na etapa A da Figura 2, utilizando uma impressora a laser, camadas de toner são depositadas na superfície do filme, em ambos os lados. Os filmes recobertos com toner são utilizados como camada intermediária do dispositivo nos quais, utilizando uma cortadora a laser de CO₂, canais e câmaras são recortados de acordo com o *design* pré-desenvolvido em um *software* de desenho (etapa B). A base e o topo do dispositivo, que consistem no filme sem recobrimento de toner, também são recortados em cortadora a laser, sendo que no topo é necessário o recorte de orifícios para inserção das soluções e também para atuarem como ventilação das câmaras, como pode ser visto no dispositivo abaixo de B. Por fim, na etapa C, as camadas são alinhadas e laminadas em uma plastificadora de escritório, obtendo-se assim o dispositivo pronto.^{41,115} Ainda que seja necessário a utilização de uma cortadora a laser, a fabricação dos dispositivos de poliéster é simples, utiliza no geral equipamentos presentes em qualquer escritório ou

laboratório, tem como principal substrato filmes de transparência (atualmente em desuso), e ainda permitem a fabricação de dispositivos em diferentes conformações e combinações com outros materiais.^{98,116}

Trabalhos recentes têm demonstrado a utilização de fitas dupla face^{71,116} na produção de dispositivos microfluídicos. Na fabricação destes dispositivos a fita dupla face substitui o toner entre as camadas e funciona como cola e ao mesmo tempo define os canais após recortados com cortadora a laser,¹¹⁶ a custo de uma alteração na razão de aspecto dos canais.

Assim, a utilização de todas essas tecnologias tem possibilitado grande avanço no desenvolvimento de dispositivos capazes de realizar as diferentes etapas de um diagnóstico molecular de forma miniaturizada, como será abordado a seguir.

1.3 DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS PARA ANÁLISE GENÉTICA

Como já discutido, o preparo de amostra para análises genéticas é de extrema importância para o sucesso das etapas posteriores, sendo que a realização desta etapa em microdispositivos diminui principalmente o tempo das análises e riscos de contaminação.²⁸ No entanto, o maior desafio é o fato de ser um procedimento multi-etapas e que requer compatibilidade do dispositivo com diferentes classes de reagentes bioquímicos.²⁸ Portanto, como já mencionado, a tecnologia de extração mais utilizada em microdispositivos baseia-se no uso de meios sólidos (SPE), explorando suas variações e diferentes substratos na produção dos dispositivos.^{23,34,36,84,87} Dentre elas, muitos trabalhos utilizam o preenchimento com micropartículas, o que requer, no entanto, a utilização de bombas seringas para movimentação da amostra pelo meio.^{45,84} Com isso, a utilização de partículas sólidas livres em solução apresentam vantagens quando miniaturizada, como no caso da extração em fase sólida dinâmica (dSPE).⁴⁵ A utilização dos dispositivos de PeT e a metodologia de extração em fase sólida dinâmica para DNA^{41,42} e RNA⁴³ também demonstrou-se promissora, possibilitando a obtenção de amostras com qualidade e quantidade suficiente para a etapa de amplificação.

Diferentes trabalhos demonstraram a amplificação de DNA por PCR em microdispositivos de diferentes materiais.^{44,79,81,82,88,90,117-120} A reação nas microcâmaras conta com o aumento da velocidade de troca de calor inerente aos microcanais, conseqüentemente, diminuindo o tempo de cada um dos ciclos e, portanto,

proporcionando resultados mais rápidos quando comparado com as plataformas convencionais.^{28,59,72} No geral, em substituição aos termocicladores, têm sido utilizadas formas de aquecimento com e sem contato, como por exemplo a utilização de placas de aquecimento Peltier¹¹⁹ e radiação infravermelha (IV-PCR),^{41,82,90} respectivamente. A IR-PCR mediada por uma lâmpada foi descrita pela primeira vez pelo grupo do Dr. James P. Landers em 1998.¹²¹ Simplificadamente, utiliza uma lâmpada para o aquecimento, e um mini ventilador para o resfriamento. Ambos são controlados por um computador conectado a um termopar, o qual monitora e informa a temperatura dentro de uma câmara de referência, sendo esta utilizada para que seja evitada contaminação com amostra.^{41,88,90,121} Desde então, a IR-PCR tem sido utilizada em diferentes trabalhos, obtendo-se resultados satisfatórios com ciclos de menos de um minuto¹¹⁸ e possibilitando, por exemplo, a obtenção de um perfil completo de STR em menos de 40 minutos.⁸⁸ Trabalhos com dispositivos de PeT, utilizando lâmpadas de tungstênio e de halogênio, demonstraram eficiência de amplificação em torno de 80% relativo ao termociclador convencional, no entanto, com grande redução do número de ciclos e tempo de cada etapa.^{41,90}

Um fator que deve ser superado no desenvolvimento da PCR em microdispositivos é a adsorção das biomoléculas na superfície dos materiais, o que consequentemente altera a concentração final dos componentes da mistura reacional podendo prejudicar o resultado final da reação.²⁸ Com isso, etapas de passivação da superfícies podem ser usadas para os dispositivos fabricados com diferentes substratos, como a passivação dinâmica e a passivação estática.^{28,41,90,120,122,123} A passivação dinâmica ocorre com a incorporação de aditivos na mistura reacional, com isso aumentando a especificidade e rendimento da reação. Diferentes aditivos são utilizados como a proteína albumina sérica bovina (BSA) e o polímero polietilenoglicol (PEG).^{41,54,90,120} Já a passivação estática pode utilizar os mesmos aditivos, no entanto, esses não são adicionados na mistura reacional, mas sim direto nos canais ou câmaras dos dispositivos.¹²⁰ Utilizando a passivação dinâmica em dispositivos de PeT, Ouyang e colaboradores (2015)⁹⁰ demonstraram ser possível a amplificação do fragmento λ -*phage* DNA por PCR apenas na presença da PEG.⁹⁰

A separação por eletroforese em microdispositivos se beneficia da grande área superficial dos microcanais, possibilitando maior sensibilidade na detecção de fragmentos de DNA. Ainda, permite a separação dos fragmentos, utilizando menor

quantidade de amostras e reagentes sob aplicação de menor potencial elétrico que as técnicas convencionais e ainda em menor tempo.^{59,71} A utilização de dispositivos de baixo custo de PeT já foi descrita no trabalho de Duarte e colaboradores (2012),⁴⁴ no qual foi possível a separação de fragmentos com resolução média, em termos de pares de bases (pb), de 56 pb calculado para separação de um padrão de 100 pb.⁴⁴

Alguns dispositivos são capazes de integrar duas ou mais etapas,^{83,85,86,96,99,124-129} porém, apesar da integração, os dispositivos ainda são pouco automatizados e, no geral, requerem a utilização de um sistema externo para controle dos fluidos dentro das câmaras, como bombas seringas.^{86,124-126,128,129} Esse sistema externo, além de encarecer o procedimento ainda impede o desenvolvimento de plataformas *point-of-care*.¹³⁰ Outros trabalhos têm utilizado protocolos de amplificação diferentes para produção de dispositivos totalmente integrados de baixo custo, como os dispositivos de papel.^{96,131} No entanto, esses dispositivos ainda requerem extensiva manipulação do operador em sucessivas etapas de pipetagem e manipulação do dispositivo, aumentando os riscos de contaminação das análises.^{96,131}

Com isso, para que as vantagens da microfluídica sejam totalmente usufruídas, é necessário que o dispositivo desenvolvido permita portabilidade, integração e automação das análises.¹³² Isto pode ser alcançado com a utilização dos dispositivos centrífugos, também conhecidos como *Lab-on-a-disc*.¹³³⁻¹⁴¹

1.4 DISPOSITIVOS CONTROLADOS PELA FORÇA CENTRÍFUGA

A denominação *Lab-on-a-disc* decorre do fato de que grande parte destes dispositivos são construídos no formato de um disco, como CDs e DVDs.^{135,136,138,140}

A utilização desta tecnologia em dispositivos de diagnóstico se beneficia de uma série de vantagens, facilitando a automatização e portabilidade. Estes dispositivos permitem o transporte de diferentes soluções ao mesmo tempo e, consequentemente, possibilita o desenvolvimento de multi-análises.¹³⁵⁻¹³⁸ Além disso, pode ser realizada com baixo custo, de forma fácil e ideal para aplicações *point-of-care*, graças aos avanços na tecnologia.¹³⁵

O funcionamento deste tipo de dispositivo, basicamente consiste em manipulá-lo de forma que na medida em que é rotacionado, o fluido é empurrado no sentido contrário ao centro de rotação, podendo assim ser transportado entre diferentes câmaras por

meio de microcanais. Isso acontece devido à força centrífuga que age como uma bomba capaz de empurrar a solução. Além dela, podem agir sob o fluido, o efeito de Coriolis,¹⁴² capaz de direcionar o fluido em determinada direção, e a força de Euler, a qual pode ser utilizada para misturas.^{135,138,140} Um fator importante é que quanto mais distante do centro de rotação, maior é a pressão de bombeamento sentida pelo fluido, de acordo com a Equação 1.¹⁴³

$$P_{\omega} = \rho \omega^2 r \Delta r$$

Equação 1

P_{ω} é a pressão de bombeamento gerada pela força centrífuga, ρ é a densidade do fluido, ω é a velocidade angular, r a distância do *plug* do fluido até o centro de rotação e Δr é tamanho do *plug* do fluido.¹⁴³ Na Figura 3 ilustra-se um esquema adaptado^{136,143} das principais forças que agem sobre um *plug* de fluido disposto em um dispositivo controlado pela força centrífuga.

Figura 3 – Esquema adaptado^{136,143} das principais forças que agem sobre um *plug* de solução disposto em um dispositivo microfluídico controlado pelo movimento giratório. Na figura estão representados, F_E – Forças de Euler; F_c – Forças de Coriolis; e F_{ω} - Força Centrífuga.

Fonte: adaptado de Ducreé, J. *et al.* (2007)¹³⁶ e Madou, M. *et al.* (2006).¹⁴³

Na literatura é possível encontrar de forma mais detalhada as principais equações que regem o movimento e velocidade dos fluidos dentro dos microcanais nestes dispositivos, desenvolvidas com base na combinação da equação de *Navier-Stokes* e uma série de considerações.^{133,136,138,139}

Diferentes operações podem ser realizadas nos dispositivos controlados pela força centrífuga, sendo que a instrumentação pode ser bem simplificada. O bombeamento

centrífugo é realizado utilizando apenas um motor passível de ter sua rotação controlada, o qual, por meio da sua rotação, movimenta os fluidos dentro dos dispositivos no sentido radial, afastando-se do centro de rotação. Como demonstrado acima, a vazão dos fluidos dentro dos microcanais é dependente da velocidade de rotação, dimensão dos canais, posição da câmara e viscosidade do fluido. Outras funções são possibilitadas de acordo com os recursos microfluídico utilizados, sendo que algumas delas foram abordadas neste trabalho. Dentre eles, a liberação sincronizada dos fluidos por meio da utilização de válvulas,^{135,136,138-140,144} a capacidade de promover a mistura efetivas das soluções,^{135,138-140,144} e ainda a capacidade de separar volumes específicos de solução entre duas ou mais câmaras.^{135,136,139,140,144}

1.4.1 Válvulas

A utilização das válvulas é crucial para liberação controlada dos fluidos, ou seja, para que eles cheguem ao seu destino no momento requerido. Existem vários tipos de válvulas passíveis de serem utilizadas nos dispositivos controlados pela força centrífuga, as quais podem ser divididas em dois grandes grupos: as válvulas ativas^{135,137,138,144,145} e válvulas passivas.^{135,136,138}

Para escolha das válvulas é muito importante que seja considerado a simplicidade e custo da fabricação e funcionamento, além de outros fatores como, rapidez, compatibilidade química e bioquímica com o procedimento a ser realizado, e pequeno volume morto.¹³⁹

1.4.1.1 Válvulas ativas

As válvulas ativas requerem um mecanismo externo adicional, e normalmente independem ou dependem apenas parcialmente da velocidade angular a qual o dispositivo é submetido, além de, normalmente apresentarem metodologias de fabricação mais complicadas.^{135,139}

Elas podem ser controladas por um mecanismo de pressão externa, como no caso de algumas válvulas pneumáticas e eletromecânicas.¹⁴⁴ Válvulas controladas pelo aquecimento ou resfriamento também foram muito utilizadas.¹⁴⁶ Amasia e colaboradores (2012)¹⁴⁵ demonstraram uma válvula baseada no congelamento de uma

solução dentro de canais que interligam diferentes câmaras e assim interrompem o fluxo do fluido. Outra metodologia muito utilizada é a ativação das válvulas utilizando um laser. Como no caso das microválvulas de partículas de óxido de ferro embebidas em cera irradiadas a laser (LIFM).¹⁴⁷ De forma simplificada, a cera contendo partículas metálicas é irradiada, com o aquecimento a cera derrete e permite que determinado fluido siga seu percurso, operando no modo fechado-aberto. Outra forma utilizada é o modo aberto-fechado, em que a cera fica localizada em uma região adjacente ao canal de passagem. Com o aquecimento a cera é derretida, na forma líquida ela se desloca ao canal de passagem dos fluidos e quando resfriada volta a ficar rígida, interrompendo a passagem.

Devido à maior complexidade das válvulas ativas, buscam-se por alternativas como as válvulas passivas.

1.4.1.2 Válvulas passivas

Ao contrário das válvulas ativas, as válvulas passivas são mais simples, não requerem intervenção externa e, conseqüentemente, possuem menor custo, além disso, são dependentes da velocidade angular do dispositivo.^{135,136,139,140} Portanto, o rompimento ou momento de quebra da válvula passiva tem ligação com a pressão exercida na válvula de acordo com a rotação, também conhecida como *burst pressure*.⁹¹

Dentre as válvulas passivas destacam-se as válvulas hidrofóbicas,^{91,135,136,139,140,148} válvulas de sifão,^{135,136,139,140} válvula capilar,^{135,136,139,140} válvula de fita adesiva operando em modo fechado – aberto⁴² e válvulas passivas operando em modo aberto – fechado.^{142,149}

1.4.1.2.1 Válvulas hidrofóbicas

As válvulas hidrofóbicas baseiam-se em duas abordagens, a modificação da superfície do substrato com material hidrofóbico^{91,148} e o estreitamento de um canal,¹⁵⁰ ambas relacionadas com o aumento da tensão superficial induzida na solução.

No caso da utilização de materiais hidrofóbicos, como a utilização do teflon¹⁴⁸ e de toner de impressoras a laser,⁹¹ se faz necessário outras abordagens. Contudo, a utilização do toner ganha destaque principalmente pela facilidade e baixo custo da fabricação. Ouyang e colaboradores (2013),⁹¹ descrevem uma metodologia simples e

barata, a qual utiliza a impressão de um retângulo de toner na superfície do substrato do dispositivo com diferentes porcentagens na escala cinza. A medida que o retângulo possui menor quantidade de toner, a superfície torna-se menos hidrofóbica e mais fácil a válvula pode ser ultrapassada. A variação da distância em relação ao centro de rotação combinada às diferentes porcentagens de toner permite que a válvula seja utilizada em uma faixa de rotação ampla. No entanto, até o momento, o uso dessa estratégia foi aplicada apenas em dispositivos de poliéster-toner.^{44,119}

1.4.1.2.2 Válvulas de sifão

O princípio de funcionamento de um sifão consiste na solução ultrapassar a extremidade curva mais alta do canal que compõe o sifão, também conhecida como crista.^{135,136,139,140,151} Uma utilização comum deste tipo de válvula é em dispositivos microfabricados com substrato hidrofílico, no qual câmaras são interligadas por meio de um sifão. O dispositivo é rotacionado até o momento em que os meniscos dentro da primeira câmara e dentro do canal do sifão se encontram na mesma posição. Neste momento, força centrífuga e capilaridade se igualam. Quando a rotação é cessada, a força capilar se sobressai e a solução sobe até a crista e começa a ultrapassá-la. O dispositivo pode ser rotacionado novamente para auxiliar com que toda a solução saia da primeira câmara e do canal do sifão e chegue até a próxima câmara, posicionada abaixo da primeira.^{135,136,139,140,151} Siergrist e colaboradores (2010)¹⁵¹ descrevem a utilização de uma sequência de sifões combinados às válvulas capilares em um dispositivo de policarbonato (PC), no qual foi necessária a modificação da superfície com o tratamento de plasma devido à hidrofobicidade do substrato.

1.4.1.2.3 Válvulas capilares

Seu princípio de funcionamento baseia-se no balanço entre a pressão da capilaridade induzida pela expansão abrupta de um canal e a pressão centrífuga induzida pela rotação do dispositivo.^{135,136,139,140,151,152} À medida que a solução percorre o canal, o menisco possui formato côncavo até atingir a interface canal/válvula. Quando a pressão gerada pela força centrífuga aumenta, o formato do menisco se transforma em convexo, apresentando um ângulo de contato crítico de avanço. Neste momento, a válvula se

rompe permitindo que a solução prossiga no sentido das paredes da válvula, uma vez que a barreira de pressão gerada pela capilaridade foi ultrapassada pela pressão gerada pela força centrífuga.¹⁵²⁻¹⁵⁴

Vários autores têm trabalhado no desenvolvimento de modelos que expliquem o funcionamento das válvulas capilares. Leu e Chang (2004),¹⁵⁴ desenvolveram um modelo baseado em um menisco 3-D para prever o comportamento das válvulas fabricadas em um dispositivo de policarbonato (PC). Segundo os autores, o modelo foi satisfatório em prever as pressões de barreira para as válvulas capilares em um microseparador de amostras. Glière e Delattre (2006),¹⁵³ desenvolveram um modelo para caracterizar as válvulas capilares baseados no fato de que, em geral, os dispositivos microfluídicos possuem geometria plana e não circular. Além disso, demonstraram um modelo de válvula capilar com expansão não apenas ao longo do canal, mas também na sua profundidade. Cho e colaboradores (2007)¹⁵² comparam a teoria do funcionamento das válvulas capilares com o uso prático em dispositivos de PDMS, utilizando apenas as dimensões das válvulas e propriedades de molhabilidade da combinação fluido/substrato. O modelo desenvolvido demonstrou-se coerente com o observado experimentalmente, com exceção para canais muito estreitos.

1.4.1.2.4 Válvula de fita adesiva

As válvulas de fita adesiva foram introduzidas no trabalho de Lounsbury e colaboradores (2013),⁸² os quais utilizaram um dispositivo de PMMA integrado controlado por bombas seringas, para análise de DNA em amostras de cotonete bucal forense. No entanto, o modo de funcionamento da válvula utilizada no seu trabalho consistiu no modo aberto-fechado. Esse requer a intervenção do operador com um objeto pontiagudo para impedir que a solução passe pela válvula. Contudo, no trabalho de Jackson e colaboradores (2016),⁴² a válvula foi utilizada com uma abordagem diferente, no sentido fechada-aberta, de forma com que a válvula não requeira intervenção do operador.

A construção da válvula passiva de fita adesiva, modo fechado-aberto, consiste na introdução de uma barreira no canal pelo qual se pretende controlar a solução. Nessa barreira é fixada uma fita adesiva, impedindo com que a solução ultrapasse e encontre a continuidade do canal. Essa barreira só é ultrapassada quando a pressão causada pela

força centrífuga é grande suficiente para que a solução desloque a fita adesiva para cima, podendo continuar o seu percurso. Portanto, consiste em uma válvula mecânica, baseada na barreira física proporcionada pela fita,⁴² e o fino ajuste entre a pressão centrífuga e as forças adesivas da cola da fita, o que pode ser uma etapa limitante na repetibilidade dos dispositivos.

1.4.1.3Válvulas passivas operando em modo aberto –fechado

A grande dificuldade de uso das válvulas passivas consiste em operá-las no modo aberto - fechado. Isso porque, de forma geral, as válvulas passivas discutidas até o momento consistem em válvulas irreversíveis. Ou seja, uma vez ultrapassadas, não reestabelecem sua função original. Alguns trabalhos utilizaram válvulas consideradas passivas, no entanto, como no caso das válvulas de fita adesiva, ainda é necessário a intervenção do operador.^{42,117}

Portanto, buscam-se alternativas para obtenção de válvulas passivas capazes de operar em ambos os modos, ainda que o seu uso não seja reversível, porém sem a necessidade de nenhuma intervenção.

Nesse sentido, Kim e colaboradores (2008)¹⁴² demonstraram que é possível impedir a entrada de um segundo líquido em determinada câmara, consequentemente fechar essa câmara, se houver a formação de um *plug* de ar entre essas duas soluções. Isso só é possível quando as rotações utilizadas proporcionam uma taxa de compreensão negligenciável ao *plug* de ar aprisionado e, por isso, a segunda solução é direcionada para uma câmara vazia.

Al-Faqheri e colaboradores (2015)¹⁴⁹ demonstraram e caracterizaram a utilização de uma válvula líquida passiva (PLV). Os autores demonstraram que diferentes parâmetros podem ser ajustados para total controle da válvula, dentre eles, altura do líquido, densidade e a posição da ventilação da câmara em relação ao centro de rotação.

Maiores detalhes sobre as válvulas passivas utilizadas neste trabalho serão apresentados no item 5.4.

1.4.2 Misturas em microcanais

De forma geral, a movimentação laminar de fluidos prevalece dentro dos microcanais,¹³⁸ no entanto, para diferentes operações é necessária a mistura efetiva destes fluidos.^{135,139} Da mesma forma que as válvulas, a mistura pode ser realizada utilizando ações passivas ou ativas, sendo que as ativas requerem *hardware* adicional¹³⁵, o que nos leva a priorizar os procedimentos passivos. Nos dispositivos controlados pela força centrífuga é possível promover a mistura utilizando as pseudoforças inerentes do movimento rotacional, Coriolis e Euler, e a mistura por difusão.^{135,136,138,140}

Alguns trabalhos utilizam a variação da frequência de rotação causada pela aceleração e desaceleração combinada à geometria do canal e volume da câmara final para conseguir uma mistura. Esta abordagem é conhecida como modo de agitação^{136,148} e se baseia na indução da pseudoforça de Euler, resultando na inversão dos líquidos e, consequentemente, mistura da solução em uma câmara final.¹³⁹ Ren e Leung (2013), observaram que o aumento da taxa de aceleração/desaceleração promove o aumento da mistura.¹⁵⁵

Outra forma simples de se promover misturas é com a modificação dos canais lineares para canais no formato de serpentinas.^{117,135,139} Segundo Kong e colaboradores (2016),¹³⁵ a combinação da força de Coriolis desenvolvida durante a rotação com a geometria do canal, induz a mistura por meio do movimento caótico. No dispositivo desenvolvido por Cox e colaboradores (2016),¹¹⁷ o misturador de serpentina foi utilizado para otimizar a mistura da amostra com a mistura reacional para PCR, o que demonstrou-se eficiente, uma vez que a reação de amplificação foi desenvolvida com sucesso.

1.4.3 Separação de volume pré-determinado

As metodologias de análises biológicas requerem o controle rigoroso dos volumes das soluções e amostras utilizadas nos diferentes procedimentos.^{135,140}

Quando esses procedimentos são realizados em escala convencional, são utilizadas micropipetas volumétricas para a transferência dos volumes requeridos entre os diferentes tubos. Contudo, nos dispositivos microfluídicos é necessário que esta etapa

também possa ser realizada sem a intervenção do operador, de forma integrada e automatizada.

Para suprir essa necessidade, a literatura relata o uso de válvulas centrífugo-pneumáticas, que consistem em um canal principal interligando canais menores a câmaras finais, todos com as mesmas dimensões. Essas câmaras estão totalmente seladas, ou seja, sem qualquer ventilação. À medida que os dispositivos são rotacionados e a solução chega ao canal principal, o aumento da rotação permite com que ela preencha todos os canais menores que dão acesso às câmaras finais. Para que essa solução chegue até a respectiva câmara final, a rotação é elevada ao ponto em que ultrapasse a pressão gerada pelo *plug* de ar aprisionado dentro da câmara. No momento em que a solução começa a entrar na câmara final, o ar sai na forma de bolhas pelo canal que agora está apenas parcialmente preenchido.¹⁵⁶

Outra forma de conseguir a separação de um volume específico de solução é a utilização de câmaras de medição, as quais podemos chamar de *metterings*, com capacidade volumétrica menor do que o volume que ele receberá vindo de uma câmara anterior. Na câmara de *mettering*, é posicionado de forma estratégica um canal de escape para coleta do volume excedente para uma terceira câmara, sendo que ambos podem ser utilizados, volume restante na câmara de *mettering* e volume coletado na terceira câmara.¹³⁶

1.4.4 Dispositivos controlados pela força centrífuga para análise molecular

A combinação da força centrífuga gerada pelas plataformas de rotação com a possibilidade do desenvolvimento de diferentes funções nos dispositivos microfluídicos tem aberto portas para o uso destes dispositivos na área de diagnóstico.

Muitos trabalhos apresentam separadamente cada uma das etapas de uma análise molecular. Zhang e colaboradores (2013),¹⁵⁰ desenvolveram um dispositivo de extração em fase sólida, utilizando como substrato o PDMS. O dispositivo utiliza a força centrífuga principalmente para bombear a solução pelas micropartículas empacotadas dentro do dispositivo. Outros trabalhos desenvolveram dispositivos de extração controlados pela força centrífuga utilizando como substrato PC^{157,158} e o PMMA.¹⁵⁹ Já Amasia e colaboradores (2012),¹⁴⁵ demonstraram um dispositivo fabricado a partir de PC no qual foi possível a amplificação do gene *Bacillus anthracis*.

No entanto, com base no que foi apresentado até o momento, estes dispositivos apresentam uma série de características indesejadas. Dentre elas, podemos destacar a possibilidade de adsorção de biomoléculas no substrato, no caso de dispositivos de PDMS²⁸. Também é relevante o alto custo de matéria prima e tecnologia de microfabricação dos dispositivos e válvulas, principalmente quando comparado aos dispositivos de PeT já descritos na literatura.^{42,71,119}

Além disso, as plataformas controladas pela força centrífuga objetivam dispositivos integrados e automatizados, com menor risco de contaminação. Alguns trabalhos já demonstraram que é possível atingir tais características com os dispositivos, como no trabalho de Czilwik e colaboradores (2015).¹⁴⁸ Eles demonstraram a extração de DNA de bactérias patogênicas e amplificação do gene *gyrB* em um único dispositivo. O dispositivo foi fabricado utilizando como substrato folhas do polímero de olefina cíclica (COP) e ainda válvulas hidrofóbicas modificadas com solução de Teflon™ AF (Amorphous Fluoropolymer solution). Além do movimento de partículas magnéticas pelas câmaras do dispositivo utilizando um conjunto de ímãs.¹⁴⁸

Cox e colaboradores (2016),¹¹⁷ desenvolveram um dispositivo integrado de PMMA para análise de DNA proveniente de um cotonete bucal forense. No entanto, o dispositivo utiliza um kit comercial para obtenção do DNA e ainda válvulas mecânicas para controle dos fluidos. De forma geral, as válvulas mecânicas, ainda que passivas, apresentam maior dificuldade na microfabricação. Além disso, neste caso, as válvulas de PDMS possuem maior chance de adsorção de biomoléculas.^{28,91,160}

Outro trabalho recente foi desenvolvido por Stumpf e colaboradores (2016),¹⁶¹ no qual utilizando um dispositivo híbrido de PMMA e PDMS, desenvolveu todas as etapas de uma análise genética para detecção do vírus Influenza A H3N3. Apesar de automatizado, isso só foi possível com a integração de pacotes selados contendo os reagentes dentro das câmaras do dispositivo, os quais se rompem após determinada rotação. Além disso, utiliza ímãs para movimentar as micropartículas magnéticas utilizadas na etapa de extração entre as diferentes câmaras.

Portanto, quando comparamos os substratos, metodologia de fabricação e válvulas utilizadas nestes dispositivos com as possibilidades que o avanço da tecnologia de dispositivos de poliéster pode proporcionar, observamos que ainda é possível o desenvolvimento de dispositivos com menor custo e maior facilidade de manipulação.

Infelizmente, de uma perspectiva prática e comercial, diagnósticos microfluídicos ainda não proporcionam grande impacto na saúde da população ao redor do mundo.¹⁶²

Com isso, ainda é grande o potencial de crescimento e desenvolvimento de tecnologias microfluídicas de baixo custo controladas pela força centrífuga e aplicadas na área de diagnóstico, principalmente pensando em dispositivos capazes de melhorar a qualidade de vida em regiões subdesenvolvidas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de uma plataforma descartável de poliéster, integrada e automatizada, para análises genéticas. O trabalho visou o desenvolvimento de dispositivos controlados pela força centrífuga utilizando válvulas passivas. Portanto, módulos individuais de extração e amplificação de DNA foram desenvolvidos e por fim combinado para obtenção de um dispositivo integrado e automatizado.

2.2 ESPECÍFICO

2.2.1 Caracterização dos materiais utilizados

- Caracterização dos filmes de poliéster, transparência e filmes para embalagens com as técnicas de caracterização de polímeros^{163,164} disponíveis.

2.2.2 Microdispositivo automatizado para extração de DNA

- Desenvolvimento do *design* do microdispositivo utilizando softwares de desenho, Corel Draw e AutoCAD®;
- Otimização do *design* do dispositivo, utilizando válvulas passivas para controle das soluções;
- Otimização do protocolo de rotação e tempo de rotação, para liberação sequencial das soluções nas etapas da extração;

- Aplicação do dispositivo na extração de DNA proveniente de amostra de fluidos biológicos: sangue e urina;
- Quantificação do DNA – análise da eficiência de extração;
- Amplificação do DNA por PCR em tubo para confirmação da qualidade do DNA extraído com o dispositivo automatizado.
- Separação do DNA para confirmação da etapa de PCR por eletroforese em microchip utilizando o Bioanalyzer e/ou eletroforese em gel de agarose.

2.2.3 Otimização da reação de IV-PCR em microdispositivo de PeT

- Desenho da câmara de reação e câmara referência com volumes necessários para reação de amplificação e acompanhamento da temperatura, respectivamente;
- Desenho de *primers* específicos para PCR, utilizando como modelo a bactéria *E. coli*;
- Otimização da reação de amplificação em microdispositivo; Confirmação da amplificação pelos métodos de separação de DNA por eletroforese em microchip (Bioanalyzer);
- Comparação da PCR em tubo com IV-PCR no dispositivo de PeT;
- Separação do DNA para confirmação da etapa de PCR e IV-PCR por eletroforese em microchip utilizando o Bioanalyzer.

2.2.4 Acoplamento da extração e amplificação em microdispositivo de poliéster

- Otimização do *design* do dispositivo, utilizando válvulas passivas para controle das soluções necessárias na etapa de extração e amplificação;
- Otimização do protocolo de rotação e tempo de rotação, para liberação sequencial das soluções necessárias na extração, assim como movimentação do DNA dessorvido para câmara reacional e mistura reacional para reação de amplificação;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LINHA DO TEMPO DO DESENVOLVIMENTO DOS EXPERIMENTOS

A parte experimental deste trabalho foi realizado em duas etapas. A primeira etapa foi realizada na *University of Virginia – UVA (USA)*, no laboratório do professor Dr. James Peter Landers, no período de julho de 2013 a junho de 2014. Durante o estágio, foram desenvolvidos dois dispositivos de extração de poliéster-toner (PeT) utilizando válvulas passivas combinadas a válvulas de fita adesiva: (i) um dispositivo de extração semi-automatizado; e (ii) um dispositivo de extração automatizado, o qual deu origem ao artigo intitulado *DNA Purification using dynamics solid-phase extraction on a rotationally-driven polyethylene-terephthalate microdevice*.⁴² Em relação a primeira fase de experimentos, nessa tese serão apresentados apenas os resultados obtidos com o dispositivo PeT semi-automatizado de extração.

A segunda etapa foi realizada no Instituto de Química de São Carlos – USP (Brasil), no laboratório do professor Dr. Emanuel Carrilho, no período de agosto de 2014 a julho de 2017. Durante essa fase, novos filmes foram testados para fabricação dos dispositivos de PeT e poliéster dupla face (PeDF). Além disso, buscou-se a substituição das válvulas de fita adesiva por válvulas passivas. Ainda, o desenvolvimento de um dispositivo integrado, formado pela integração de dispositivos de PeDF e PeT.

Na Figura 4, temos em ordem cronológica os dispositivos finais desenvolvidos, os quais serão discutidos nesse trabalho.

Figura 4 - Linha do tempo do desenvolvimento do projeto de doutorado indicando onde foram realizadas as disciplinas e obtidos os respectivos dispositivos, os quais serão discutidos nesse trabalho.

Foto autoria própria

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE POLIÉSTER

Durante o desenvolvimento do dispositivo foram testados diferentes filmes para produção de dispositivo de Poliéster-toner (PeT) e Poliéster-fita dupla face (PeDF). Dentre eles, 3MPP2500, 3MCG5000, 3MCG6000 (duas caixas de lotes diferentes), LaserFolien, MARES, 3MPP2200, e filmes de poliéster para embalagem como Novasilk e Terphane. Foi observado que mesmo utilizando o mesmo *design* (com as dimensões adaptadas para filmes com diferentes espessuras) e as mesmas soluções, o comportamento dos dispositivos em relação a rotação e tempo de quebra das válvulas apresentaram variações de acordo com o filme utilizado. Isso está diretamente relacionado as características da superfície dos filmes e por isso foi realizada a caracterização dos mesmos. No entanto, serão apresentadas apenas as caracterizações dos filmes com os quais foi possível dar continuidade ao trabalho devido principalmente a quantidade do filme disponível.

Todas as caracterizações foram realizadas na segunda fase do projeto, no Brasil. O filme 3MPP2500 (*Film Source Inc., Maryland, Heights, MO*) foi utilizado durante a primeira fase do desenvolvimento do dispositivo, durante estágio na Universidade da Virginia – USA porém, este não foi caracterizado. Devido a indisponibilidade do filme 3MCG6000 - A não foi possível realizar todas as caracterizações deste filme, sendo determinadas apenas a espessura e ângulo de contato. Com os demais filmes foram

realizadas todas as caracterizações, dentre eles, 3MCG6000 - B, MARES, Terphane e 3MPP2200.

3.2.1 Espessura dos filmes de poliéster por perfilometria

A espessura dos filmes foi determinada utilizando um perfilômetro Detak 150 – Veeco, disponível no Instituto de Física de São Carlos – USP. Também foram determinados a altura dos canais após laminação para os dispositivos de PeT e PeDF, o que será melhor discutido na seção de microfabricação.

3.2.2 Ângulo de contato

Foram determinados os ângulos de contato da superfície dos filmes assim como da superfície do filme recoberta com uma camada de toner, com o objetivo de avaliar a possibilidade de utilizá-lo como válvula hidrofóbica.⁹¹

As medidas foram determinadas pelo método da gota sésil, utilizando um equipamento composto por uma seringa e câmara dispostas a 90° uma da outra. As imagens foram analisadas em software CAM 2008, disponíveis no Instituto de Física de São Carlos – USP. O ângulo de contato é definido como o ângulo entre a tangente da interface líquido-ar e a tangente da interface sólido - líquido. Para cada medida foram utilizados 2 µL de água à 25 °C, as medidas foram realizadas em triplicata para cada filme.

3.2.3 Análises Térmicas

Com o objetivo de identificar a composição dos filmes utilizados, foram realizadas as seguintes análises:

3.2.3.1 Termogravimetria (TGA)

A estabilidade térmica dos filmes foi avaliada por meio de análises termogravimétricas (TGA), em um equipamento de análises térmicas TA Q500 (TA

Instruments, EUA). As amostras (4 mg) foram aquecidas de 25 até 600 °C em um fluxo de ar de 60 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

3.2.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As medidas de DSC dos filmes de poliéster foram realizadas em um equipamento DSC Q-100 (*TA Instruments*, EUA). As amostras foram aquecidas primeiro até 220 °C a uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹ e depois mantidas isotermicamente por um minuto em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foram resfriadas a uma taxa de 10 °C min⁻¹. Foram determinadas as temperaturas de *melting* (T_m) e entalpia de fusão (ΔH_m).

3.2.4 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Foram realizadas análises espectroscópicas de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), com equipamento modelo *Spectrometer Spectrum – 1000* da marca Perkin Elmer FT-IR. A resolução da análise foi de 2 cm⁻¹ e fez-se varredura de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹.

3.2.5 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As análises de EDS foram realizadas na Central Analítica (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos – USP, em um equipamento *EDX LINK ANALTTICAL, (Isis System Series 300)*, acoplado a um Microscópio Eletrônico ZEISS LEO 440 (Cambridge, Inglaterra). Utilizou-se padrão de Co para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, *dead time* de 30%, corrente de 2,82 A e sonda de 2,5 nA. A área da amostra analisada foi de 320 × 320 μm.

3.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A obtenção das imagens por microscopia, foi realizada na Central Analítica (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos, em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, Inglaterra) com detector OXFORD (modelo 7060), operando com feixe de elétrons de 15 kV, corrente de 2,82 A e I sonda de 200 pA. Para isso, as amostras foram recortadas dos

filmes e recobertas com 6 nm de ouro em um metalizador *Coating System BAL-TEC MED 020* (BAL-TEC, Luxemburgo) e mantidas em dessecador até o momento de análise. Condições de metalização: pressão na câmara = $2,00 \times 10^{-2}$ mbar; corrente = 60 mA; taxa de deposição 0,60 nm s⁻¹.

3.3 PLATAFORMA ROTATIVA E MONITORAMENTO DO DISPOSITIVO

Como explicado anteriormente, o projeto foi realizado em duas etapas, a primeira na *University of Virginia – USA*. Nessa etapa foram utilizados dois sistemas rotativos *homemade* para controle dos fluidos e uma câmera de alta velocidade (*MotionBLITZ EoSens mini 1-1; Mikrotron, San Diego, CA*) acoplada a um estroboscópio (Nova-strobe PBL; *Monarch Instrument, Amherst, NH*) para monitorar o movimento dos fluidos no dispositivo em tempo real.⁴² Ambos utilizando um microcontrolador interfaceado com o computador no qual é definido a rotação utilizando o software LabVIEW®.

Na segunda etapa do trabalho, no Instituto de Química de São Carlos – USP, inicialmente foi utilizado um equipamento para produção de filmes finos (*spin coating* – WS-400BZ-6NPP/LITE – Laurell Technologies Corporation - EUA) para controle do movimento dos fluidos. O controle da rotação e tempo estabelecido no display do equipamento. Nele foi adaptado um suporte fabricado em PMMA para fixação do dispositivo, porém sem monitoramento da movimentação dos fluidos.

No entanto, o monitoramento dos fluidos é essencial para o desenvolvimento do *design* do dispositivo e ainda otimização da rotação e tempo do procedimento de movimentação dos fluidos. Por isso, uma plataforma *homemade* foi desenvolvida utilizando um motor e uma fonte de tensão *Minipa – DC Power Supply MPL-1303* para controle do motor por meio da aplicação de voltagem variável. A rotação correspondente a cada voltagem aplicada foi determinada utilizando um tacômetro a laser digital (*Digital Tachometer – DT-2234C+*). O motor foi fixado em uma base de madeira ligada a uma base superior por meio de quatro parafusos, sendo que a base superior conta com um eixo para alinhamento e fixação do suporte de PMMA. O suporte de PMMA conta com uma base inferior para fixação do dispositivo microfluídico e uma superior para o acoplamento de uma Mini câmera espiã adquirida no Mercado Livre (ASUS, 630x480 30FPS), permitindo com que o dispositivo microfluídico fosse monitorado durante o procedimento de rotação. As duas bases seguem conectadas por

meio de dois retângulos dispostos na lateral das bases. O controle do tempo foi realizado por um cronômetro. Todas as peças em PMMA foram projetadas no software AutoCAD® e cortadas em uma cortadora a Laser de CO₂ – 50 W (*VersaLaser 350, Universal Laser Systems*).

3.4 TERMOCICLADOR COM AQUECIMENTO POR INFRAVERMELHO (IV)

Para o desenvolvimento da PCR nos dispositivos microfluídicos, utilizou-se um sistema *home-made* desenvolvido no laboratório do Prof. James P. Landers,^{41,165} na *University of Virginia*. Para controle do sistema é utilizado um programa de LabVIEW que permite, por meio de um termopar inserido em uma câmara de referência, variar a potência da lâmpada de IV para que possam ser atingidas as temperaturas do ciclo de aquecimento da PCR.

Na Figura 5 temos uma foto do sistema completo de IV-PCR utilizado nesse trabalho, no Instituto de Química de São Carlos.

Figura 5 – Foto do sistema de IV-PCR desenvolvido na Universidade da Virgínia – USA e utilizado no Instituto de Química de São Carlos - Brasil. (A) conversor analógico; (B) termopar; (C) lâmpada de tungstênio; (D) fonte de alimentação; (E) interface; (F) mini-ventilador; (G) computador/software utilizado para controle do sistema.

Fonte: autoria própria

3.5 MICROFABRICAÇÃO

3.5.1 Dispositivos

Foram utilizadas duas estratégias de microfabricação para obtenção dos dispositivos de Poliéster-Toner (PeT) e Poliéster-Fita dupla face (PeDF).

Na Figura 6 temos uma linha do tempo destacando quando e onde foi realizado o desenvolvimento de cada dispositivo, e ainda quais os filmes utilizados.

Figura 6 – Linha do tempo do desenvolvimento do microdispositivo integrado para análise molecular. Em bege, primeira fase desenvolvida na *University of Virginia (USA)* no laboratório do Professor Dr. James Peter Landers. Em azul, segunda fase desenvolvida no Instituto de Química de São Carlos. Em laranja, resultados obtidos na finalização da primeira (2014_2º) e da segunda fase (Defesa). E em verde resultados obtidos no decorrer da segunda fase (2014_2º – 2017_1º).

Fonte: autoria própria

3.5.1.1PeT

A fabricação dos dispositivos de PeT foi realizada segundo Duarte et al. (2011),⁴¹ com o design modificado.

Na primeira fase durante o estágio na *University of Virginia – USA*, no laboratório do Professor Dr. James P. Landers foi utilizado o filme 3MPP2500 (*Film Source Inc., Maryland, Heights, MO*). Já na segunda fase, no Instituto de Química de São Carlos – USP no laboratório do Professor Dr. Emanuel Carrilho, foram utilizados os filmes 3MCG6000 (duas caixas distintas denominadas A e B), MARES e 3MPP2200. Também foi utilizada uma impressora convencional de escritório (HP LaserJet 1200 series), toner, cortadora a laser CO₂ – 50W (VersaLaser 350, Universal Laser Systems) e uma plastificadora de escritório (Gazela® - 400W).

O microdispositivo de extração foi composto por quatro camadas de poliéster como pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 – Visualização explodida da última versão do microdispositivo PeT de extração automatizada de DNA apresentado neste trabalho. Filmes recobertos com toner estão representados em cinza escuro e filmes não recobertos em cinza translúcido. Canais e câmaras recortados em cortadora a laser na camada intermediária (preto). Retângulo preto nas faces internas das folhas inferior e superior (cinza claro) representam a válvula hidrofóbica de toner. Fita adesiva posicionada no respiro e sob o acesso da câmara de amostra estão representadas por um retângulo.

Fonte: autoria própria

Dentre as quatro camadas, duas camadas intermediárias foram recobertas homogeneamente com 3 camadas de toner em cada um dos lados. Em seguida, a geometria dos canais previamente desenhadas utilizando o software AutoCAD® 2014 foram criados com a cortadora a laser.

A base e topo do dispositivo foram compostas por folhas de poliéster nas quais orifícios de acesso aos canais foram recortados com o auxílio da cortadora a laser. Quando necessária a presença das válvulas hidrofóbicas de toner, estas foram impressas na superfície do filme antes do corte do dispositivo.⁹¹ Já o dispositivo de amplificação foi composto por 5 camadas de poliéster como pode ser visto na Figura 8.

Figura 8 – Visualização explodida da última versão do microdispositivo PeT de amplificação de DNA apresentado nesse trabalho. Filmes recobertos com toner estão representados em cinza escuro e filmes não recobertos em cinza translúcido. Canais e câmara recortados em cortadora a laser na camada intermediária (preto). Retângulo preto nas faces internas das folhas inferior e superior (cinza claro) representam a válvula hidrofóbica de toner.

Fonte: autoria própria

Dentre as camadas, três filmes recobertos com toner em ambos os lados, camadas intermediárias representadas pelo cinza escuro, nas quais a geometria foi recortada com o auxílio de uma cortadora a laser. Uma válvula de toner foi impressa na base e no topo de uma das extremidades do dispositivo para dificultar com que a solução subisse por capilaridade pelo canal fino até atingir a orifício de ventilação.

Para finalização dos dispositivos, extração e amplificação, as partes foram fixadas com fita adesiva e o dispositivo laminado. Para isso foi colocado entre duas folhas metálicas finas, duas de alumínio e papel, em uma plastificadora de escritório. Utilizando um perfilômetro foi determinada a altura da camada intermediária que define a altura das câmaras e canais

3.5.1.2PEDF

Para fabricação dos microdispositivos de PeDF foram utilizados os filmes Terphane como base e topo do dispositivo, e 3MCG6000 – B como camada intermediária. Uma fita dupla face sensível a pressão (*ARcare 90106; Adhesives Research Inc, Glen Rock, PA*) foi utilizada como substituto do toner. As estruturas desenhadas em software AutoCAD®

foram fabricadas na camada intermediária utilizando uma cortadora a laser CO₂ – 50W (*VersaLaser 350, Universal Laser Systems*).

Os dispositivos em um único plano de PeDF possuem um total de 5 camadas, sendo dois filmes como base e topo e um filme como camada intermediária, o qual possui uma fita dupla face em cada um dos lados. Além disso, é possível acoplar outros dispositivos de PeDF, utilizando o topo do plano 1 como base do plano 2. Consequentemente, obtém-se um dispositivo com 4 camadas adicionais ao primeiro plano, 3 intermediárias e 1 topo, como ilustrado na Figura 9.

Figura 9 – Visualização explodida da última versão do microdispositivo PeDF de extração automatizada de DNA apresentado nesse trabalho. Os filmes estão representados em cinza claro, enquanto as fitas dupla face estão representadas em azul translúcido. Canais e câmaras recortados em cortadora a laser nas camadas intermediárias compostas por duas fitas dupla face (ARcare 90106) intercaladas com um filme (cinza claro).

Fonte: autoria própria

As partes do dispositivo foram alinhadas e laminadas a frio, utilizando a pressão dos dedos e um régua para fixação das camadas com as fitas adesivas dupla face.

Variações na construção e *design* dos dispositivos serão apresentadas no item 4.4.

3.5.2 Válvulas

As válvulas utilizadas nos microdispositivos foram as válvulas de fita adesiva e válvulas passivas de toner, capilar e sifão. Para construção de todas as válvulas, é necessário o desenho de uma estrutura específica interligando câmaras e canais no design do dispositivo, utilizando o software AutoCAD®.

Para a fabricação da válvula de fita adesiva^{42,82} é utilizado uma cortadora a laser e fita adesiva. Na camada intermediária do dispositivo é recortado um canal com uma obstrução, separando-o em dois canais. Além disso, no topo do dispositivo é feito uma abertura no filme na mesma direção da obstrução, na qual é colocada uma fita adesiva, como pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 – Representação esquemática da construção da válvula de fita adesiva no dispositivo de PeT.

Fonte: autoria própria

Para as válvulas capilares^{153,154,166,167} e para o sifão^{133,151,168} também é utilizada a cortadora a laser para recortar as estruturas na câmara intermediária dos dispositivos, como pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 – Representação esquemática da construção das válvulas passivas nos dispositivos PeT e PeDF, sendo elas (a) válvula capilar, dentro do retângulo amarelo; e (b) sifão, dentro do quadrado azul.

Fonte: autoria própria

Já a fabricação da válvula de toner,⁹¹ é realizada com a impressão de um retângulo na superfície dos filmes que compõem a base e o topo do dispositivo, utilizando uma impressora convencional de escritório. Todas as válvulas de toner apresentadas nesse trabalho foram impressas na escala cinza de 100%. Na Figura 12 podemos observar uma representação esquemática da válvula hidrofóbica de toner.

Figura 12 – Representação esquemática da construção da válvula de toner nos dispositivos PeT e PeDF, dentro do retângulo vinho.

Fonte: autoria própria

O funcionamento de todas as válvulas utilizadas nesse trabalho será discutido no item 5.

3.6 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS CONTROLADOS PELA FORÇA CENTRÍFUGA

O desenvolvimento dos dispositivos controlados por força centrífuga consiste na combinação de câmaras interligadas a válvulas por microcanais. Estas câmaras requerem geometria necessária para comportar o volume de solução requerido em cada etapa do procedimento. Já as válvulas, devem ser capazes de impedir com que estas soluções se movimentem até que determinada rotação seja atingida.

A determinação da melhor composição de câmaras e válvulas para os dispositivos apresentados nesse trabalho foi realizada de forma empírica baseando-se na literatura. No entanto, teve-se a preocupação em utilizar o máximo de válvulas passíveis, com o objetivo de se obter um dispositivo integrado, automatizado e que necessite da menor quantidade de equipamentos acessórios.

A determinação empírica foi realizada com base nas imagens e vídeos obtidos para cada procedimento de rotação. Concomitante a determinação do melhor *design* do dispositivo, foram determinadas rotação e tempo de ruptura das válvulas para liberação das soluções na ordem requerida por cada procedimento.

3.6.1 Dispositivo de extração

3.6.1.1 Dispositivo de extração PeT semiautomatizado

O dispositivo de extração PeT semiautomatizado foi desenvolvido durante o estágio realizado na *University of Virginia - USA*. Como já descrito acima, foi fabricado utilizando o filme de transparência substituto do filme 3MCGPP2500. Esse dispositivo consiste na automatização da etapa de lavagem do procedimento de extração por dSPE, sendo que a solução utilizada para dessorção do DNA das micropartículas foi colocada manualmente. Na Figura 13 é possível visualizar o fluxograma do protocolo de liberação das soluções necessárias para a realização da etapa de lavagem automatizada.

Figura 13 – Fluxograma das etapas do protocolo de liberação das soluções para o dispositivo de extração semiautomatizado. A caixa 1 representa a primeira solução que deve ser liberada pela ruptura da válvula 1 (V_1), seguida pela caixa 2 após o rompimento da válvula 2 (V_2). Ambas devem passar pela câmara central (3) e serem direcionadas para o descarte (4) com o rompimento da válvula 4 (V_4). Após a adição manual da solução de dessorção na câmara central (3) a solução deve ser direcionada para o coletor de amostra (5) após ruptura da válvula 5 (V_5).

Fonte: autoria própria

Nesse dispositivo é importante que a válvula V_4 se rompa apenas quando V_1 se romper, seguida por V_2 . No momento em que for adicionado manualmente a solução de dessorção na câmara central, V_4 deve estar fechada enquanto que V_5 deve ser aberta para que a amostra possa ser coletada.

No item 5.4.1.1 será discutido de forma mais aprofundada as válvulas utilizadas e o procedimento para que fosse possível esse controle das soluções.

3.6.1.2 Dispositivo de extração automatizado

3.6.1.2.1 PeT e PeDF

Como descrito anteriormente, esse dispositivo foi desenvolvido na segunda fase, no Instituto de Química de São Carlos – USP utilizando na fabricação dos microdispositivos de PeT os filmes 3MCG6000 (duas caixas diferentes A e B) e MARES, e microdispositivos de PeDF os filmes Terphane e 3MCG6000 - B, além da fita dupla face.

Nesse caso, a movimentação das soluções utilizadas na etapa de lavagem e dessorção foi automatizada. Como pode ser visto na Figura 14, houve a necessidade de um aumento na complexidade do dispositivo como a adição de mais válvulas.

Figura 14 – Fluxograma das etapas do protocolo de liberação das soluções para o dispositivo de extração automatizado. A caixa 1 representa a primeira solução que deve ser liberada pela ruptura da válvula V_1 , seguida pela caixa 2 após o rompimento da válvula V_2 . Ambas devem passar pela câmara central (3) e serem direcionadas para o descarte (4) com o rompimento da válvula V_4 . Em seguida, a câmara 5 deve liberar a solução pela ruptura da válvula V_5 também passando pela câmara central (3) e direcionada para o coletor de amostra (6) após ruptura da válvula V_6 .

Fonte: autoria própria

Neste caso, as válvulas V_5 e V_6 devem permanecer fechadas até que as soluções das câmaras 1 e 2 passem pela câmara 3 e chegue até a câmara 4 com a ruptura das válvulas V_1 , V_2 e V_4 , respectivamente. Em seguida, a válvula V_4 deve ser fechada para que a solução da câmara 5 passa pela câmara central (3) após ruptura da válvula V_5 e por fim, em uma rotação superior essa solução chegue ao coletor de amostra com a ruptura de V_6 .

O protocolo acima se aplica para ambos os dispositivos, PeT e PeDF. A combinação de válvulas e modificações entre os dispositivos serão discutidas de forma aprofundada no item 5.4.1.2.

3.6.2 CÂMARA DE *METTERING*

O objetivo do trabalho é um dispositivo integrado, portanto, é necessário que os volumes utilizados das soluções nas etapas de preparo de amostra sejam compatíveis com a etapa de amplificação, por exemplo. No entanto, durante o procedimento de extração por dSPE é necessária a utilização de um volume de solução de dessorção suficiente para que todas as micropartículas contendo DNA adsorvido, fiquem encobertas. Para isso, de acordo com o *design* do dispositivo e o volume de micropartículas previamente otimizado, foi necessária a utilização em torno de 6,2 μL .

Reações de amplificação por PCR em tubo normalmente são realizadas com volume final de 20 – 25 μL , no entanto, o objetivo é que esse volume seja reduzido em microdispositivos. Portanto, determinou-se um volume de reação de amplificação final de 5 μL . Contudo, considerando que o volume de solução de dessorção é maior que o volume total utilizado para reação de amplificação, é necessário que a amostra dessorvida seja aliquoteada. Ou seja, apenas parte dela seja direcionada para a câmara de reação, o que de acordo com os experimentos e concentração das soluções que compõe a mistura reacional, ficou-se determinado um volume de 2 μL de amostra.

Portanto, a câmara coletora de amostra foi modificada com canal de saída na posição em que 2 μL do total de 6,2 μL de amostra dessorvida fosse direcionada para a câmara de reação. Foram fabricados 6 dispositivos como o representado pelo desenho em AutoCAD na Figura 15a e testados para determinar a reprodutibilidade do volume aliquoteado.

Figura 15 – Esquema desenhado em AutoCAD® representativo do módulo de *mettering* utilizado no dispositivo integrado para análise molecular no qual os números estão representando (0) câmara central, (1) coletor de amostra e (2) câmara para separação de volumes (a). Fluxograma do experimento realizado para determinar a reprodutibilidade da separação da solução de amostra entre duas câmaras (b).

(a)

(b)

Fonte: autoria própria

Os dispositivos sem solução foram pesados. Um volume de 6,2 µL de Tris-EDTA foi pipetado dentro da câmara principal e novamente o dispositivo foi pesado. O dispositivo foi rotacionado para que as soluções fossem separadas nas respectivas câmaras e em seguida a solução da câmara de amostra, câmara 1, foi retirada do dispositivo com auxílio de uma seringa. O dispositivo foi novamente pesado. O procedimento pode ser observado no fluxograma apresentado na Figura 15b.

Utilizando as massas dos dispositivos sem e com solução (Eq. 2a e 2b) combinadas a Equação 2c e considerando a densidade da solução de Tris-EDTA igual a da água (1 g/cm³) foi possível determinar: (i) volume de solução adicionada no dispositivo; (ii) volume de solução aliqotada e retirada do dispositivo; e (iii) volume de solução que permaneceu no dispositivo.

$$M2 (g) - M1 (g) = \text{Massa da solução colocada no dispositivo (g)} \quad \text{Equação 2a}$$

$$M2 (g) - M4 (g) = \text{Massa da solução retirada do dispositivo (g)} \quad \text{Equação 2b}$$

$$\text{Volume (mL)} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{Densidade (g/mL)}} \quad \text{Equação 2c}$$

3.6.3 Dispositivo PeT para amplificação

O dispositivo de amplificação foi desenvolvido com base no trabalho de Ouyang et al., (2015).⁹⁰ Como descrito no item 4.3.1, o dispositivo é composto por 5 camadas, sendo elas 3 intermediárias, uma base e um topo.

Para desenvolvimento do *design* do dispositivo teve que ser levado em conta três fatores importantes. O primeiro fator é que a PCR a ser desenvolvida no dispositivo é a IV-PCR, ou seja, aquecimento mediado por infravermelho. O sistema utilizado necessita que um termopar seja disposto no interior do dispositivo para que a temperatura possa ser controlada. Por isso, são necessárias duas câmaras, uma câmara reacional (A) e uma câmara de referência (B) para inserção do termopar tipo T (AWG 40) (C), como pode ser visto na Figura 16.

Figura 16 – Foto de um modelo de dispositivo PeT de amplificação contendo duas câmaras. Câmara reacional (A) e câmara de referência (B) para inserção do termopar (C).

Fonte: autoria própria

Outro fator importante é que a amostra e mistura reacional devem chegar até a câmara reacional do dispositivo por meio da rotação. Ou seja, ao fim do procedimento de extração a amostra é direcionada para câmara de coleta, da qual é separado 2 μ L e direcionado para a câmara de reação, sem intervenção do operador, apenas “empurrada” pela força centrífuga resultante da rotação e controlada pelas válvulas presentes no dispositivo. Ao mesmo tempo em que a amostra chega na câmara de reação, as soluções que compõem a mistura reacional também devem chegar, sendo controladas da mesma forma. Por tanto, o sentido em que as soluções se movimentam é sempre em direção oposta ao centro de rotação. Com isso, é necessário que o canal de ventilação da câmara de reação não seja posicionado de forma alinhada a câmara reacional, ou a solução sairia pelo orifício de ventilação oposto ao orifício de entrada das soluções (Figura 16). O mesmo não é necessário na câmara de referência, pois a solução só é colocada após o dispositivo ser retirado da plataforma de rotação.

Por último, o dispositivo de amplificação deve ser acoplado ao dispositivo de extração, e para isso foi necessário que o orifício de entrada da solução para chegar até a câmara reacional fosse posicionado na parte inferior do dispositivo. A movimentação das soluções, amostra, *primers* e *mistura reacional* também devem ser controladas. Isso porque todas devem ser misturadas antes do momento de chegar até a câmara reacional e só assim a reação pode ser iniciada. Na Figura 17 é possível observar o fluxograma referente a ordem em que as soluções devem ser liberadas.

Figura 17 – Fluxograma das etapas do protocolo de liberação das soluções para o dispositivo de amplificação. As caixas 1 e 2 representam as soluções que devem ser liberadas ao mesmo tempo pela ruptura das válvulas V_1 e V_2 para serem então misturadas na caixa 3, isso antes da caixa 4 romper V_4 . As válvulas V_3 e V_4 devem ser rompidas ao mesmo tempo para também serem misturadas na caixa 5 e seguirem para câmara de reação representada pela caixa 6.

Fonte: autoria própria

O ponto importante é que as válvulas V_1 e V_2 sejam rompidas de forma com que as soluções se misturem no decorrer do dispositivo até atingir o patamar em que as soluções da câmara 1 e 2 misturadas se encontrem com a amostra após a V_4 se romper. Esse encontro deve ocorrer de forma que novamente, *primers*, mistura reacional e amostra se misturem antes de chegar até a câmara de reação.

Foram testados dois filmes para produção dos dispositivos de amplificação, dentre eles: MARES e 3MPP2200.

3.6.4 Dispositivo integrado para análise molecular

Após o desenvolvimento e otimização de cada dispositivo separadamente todos os módulos foram combinados e adaptados para o melhor funcionamento de forma integrada.

Na Figura 18 é possível observar o fluxograma do funcionamento do dispositivo integrado, levando em conta a ordem em que as válvulas devem ser rompidas para que as soluções sejam liberadas apenas no momento em que são requeridas.

Figura 18 – Fluxograma das etapas do protocolo de liberação das soluções para o dispositivo integrado para análise molecular. A caixa 1 representa a primeira solução que deve ser liberada pela ruptura da válvula V_1 , seguida pela caixa 2 após o rompimento da válvula V_2 . Ambas devem passar pela câmara central (3) e serem direcionadas para o descarte (4) com o rompimento da válvula V_4 . Em seguida, a câmara 5 deve liberar a solução pela ruptura da válvula V_5 também passando pela câmara central (3) e direcionada para o coletor de amostra (6) após ruptura da válvula V_6 . As caixas 7 e 8 representam as soluções que devem ser liberadas ao mesmo tempo pela ruptura das válvulas V_7 e V_8 para serem então misturadas na caixa 9, isso antes da caixa 10 romper V_{10} . As válvulas V_9 e V_{10} devem ser rompidas ao mesmo tempo para também serem misturadas na caixa 11 e seguirem para câmara de reação representada pela caixa 12.

Fonte: autoria própria

O dispositivo integrado requer o controle de 5 diferentes soluções, tornando necessária a utilização de 9 diferentes pontos de controle, com a utilização de diferentes válvulas e/ou mecanismos para que a liberação seja em sincronia com as etapas a serem desenvolvidas no dispositivo para análise molecular. A ordem de liberação está em acordo com o número das válvulas, dando destaque a necessidade do módulo de *mettering*, o qual torna-se necessário para separar o volume de solução adequado para uma reação de amplificação por PCR de 5 µL, como foi explicado no item 4.5.2.

É possível observar o aumento da complexidade do dispositivo integrado ao combinar mais câmaras e mais válvulas referentes aos módulos individuais. E para isso foi necessária a construção de um dispositivo tridimensional formado pela combinação dos dispositivos de PeT e PeDF, consequentemente utilizando os diferentes filmes, 3MCG6000, Terphane e 3MPP2200.

3.7 EXTRAÇÃO DE DNA POR dSPE EM DISPOSITIVOS DE POLIÉSTER

3.7.1 Protocolo de extração dSPE

O procedimento de extração por dSPE foi previamente descrito no trabalho de Duarte e colaboradores.⁴⁵ Foi necessário que o procedimento fosse modificado entre os dispositivos semiautomatizados e automatizados, como descrito a seguir. As rotações e tempo de rotação utilizados serão discutidos para cada dispositivo separadamente no item 5.4.

3.7.1.1 Extração dispositivo semiautomatizado:

a) *Preparo do dispositivo:*

1. Adição das soluções de lavagem nas respectivas câmaras
 - 1.1 – 6 µL de solução 0,1 × Tris-EDTA (TE)
 - 1.2 – 4 µL de isopropanol 80%, total de 8 µL (IPA)
2. Adição na câmara central
 - 2.1 – 3 µL de micropartículas magnéticas (óxido férrico recoberto com sílica - Magnesil®, Promega) em hidrocloreto de guanidina (GuHCl) 3 mol L⁻¹

2.2 – 2 μL de amostra lisada (0,6 μL de sangue)

2.3 – 3 μL de hidrocloreto de guanidina (GuHCl) 3 mol L^{-1}

b) Movimentação das partículas magnéticas para etapa de extração do DNA

Nessa etapa o dispositivo foi colocado sobre um agitador magnético, operando em velocidade máxima concomitante com a movimentação de um ímã no topo do dispositivo para auxiliar na movimentação para extração mais eficiente, por cinco minutos.

c) Lavagem

O microdispositivo foi transferido para plataforma rotativa e a mesma rotacionada nas rotações determinadas durante a otimização do método para etapa de lavagem.

d) Dessorção

Para dessorção do DNA envolvido nas partículas magnéticas, o microdispositivo foi colocado novamente sobre um agitador magnético. Em seguida, adicionado manualmente 6 μL de solução 0,1 $\times$ Tris-EDTA (TE) e o mesmo foi operado em velocidade máxima concomitante com a movimentação de um ímã no topo do dispositivo para auxiliar na movimentação para dessorção mais eficiente, por cinco minutos.

Em seguida, o dispositivo foi transferido novamente para a plataforma rotativa e para então movimentação da solução para câmara de amostra.

e) Coleta

Por fim a amostra foi coletada em apenas uma fração de 6 μL para quantificação do DNA eluído e análise por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tubo e retirada do dispositivo com auxílio de uma seringa.

3.7.1.2 Extração dispositivo PeT automatizado:

Abaixo o procedimento modificado para o dispositivo PeT automatizado, dando destaque para os itens *a.2* e *d*.

a) Preparo do dispositivo:

1. Adição das soluções de lavagem nas respectivas câmaras

1.1 – 10 μL de solução 0,1 $\times$ Tris-EDTA (TE)

1.2 – 9 μL de isopropanol 80% (IPA)

2. Adição da solução de dessorção

- 2.1 – 6,2 μL de solução 0,1 $\times$ TE
3. Adição na câmara central
- 3.1 – 3 μL de micropartículas magnéticas (ferro recoberto com sílica - Magnesil®, Promega) em GuHCl 3 mol L^{-1}
- 3.2 – 2 μL de amostra
- 3.3 – 3 μL de hidrocloreto de guanidina (GuHCl) 3 mol L^{-1}

b) Movimentação das partículas magnéticas para etapa de extração do DNA

Mesmo procedimento realizado para o dispositivo semiautomatizado.

c) Lavagem

Mesmo procedimento realizado para o dispositivo semiautomatizado.

d) Dessorção

Para dessorção, o dispositivo continuou a ser rotacionado de acordo com o protocolo de rotação previamente determinado. Com isso a solução de dessorção foi automaticamente direcionada para câmara central. Para dessorção do DNA envolvido nas partículas magnéticas, o microdispositivo foi colocado novamente sobre um agitador magnético, em seguida, adicionado manualmente 6 μL de solução 0,1 $\times$ Tris-EDTA (TE) e o mesmo foi operado em velocidade máxima concomitante com a movimentação de um ímã no topo do dispositivo para auxiliar na movimentação para dessorção mais eficiente.

Em seguida, o dispositivo foi transferido novamente para a plataforma rotativa e para então movimentação da solução para câmara de amostra, por cinco minutos.

e) Coleta

Por fim a amostra foi coletada em apenas uma fração de 6 μL para quantificação do DNA eluído e análise por reação em cadeia da polimerase (PCR), e retirada do dispositivo com auxílio de uma seringa.

A diferença do protocolo de extração entre os dispositivos PeT automatizado e PeDF automatizado foi o aumento no volume da solução de lavagem e dessorção, 20 μL e 6,2 μL , respectivamente.

3.7.2 Preparo de amostras

O dispositivo desenvolvido tem o objetivo de ser aplicado para análises genéticas em diferentes fluidos biológicos, como sangue e urina. Por esse motivo, os

dispositivos de extração foram utilizados para extração de DNA genômico humano em amostras de sangue (PeT semiautomatizado, PeDF automatizado), em amostras de urina e de bactéria *Escherichia coli* (PeT automatizado).

3.7.2.1 Preparo de amostra de sangue

As amostras de sangue utilizadas foram doadas pelo Hospital da Universidade da Virgínia. A quantidade de DNA presente em cada amostra foi calculada com base na quantidade de células brancas presentes, informação fornecida pelo hospital, considerando que cada célula branca possui 6,25 pg de DNA.

As amostras foram previamente lisadas misturando-se 6 μL de sangue, 5 μL de proteinase K (20 mg mL^{-1}) e 9 μL de GuHCl 8 mol L^{-1} pH 7,6 + 1% Triton X-100. Em seguida, a mistura foi agitada em vórtex e incubadas em termomixer a 56 °C por 10 min. Para a extração foi utilizada 2 μL da solução lisada, na qual 0,6 μL da solução corresponde ao volume de sangue, considerando-se o volume total de solução de lise.

3.7.2.2 Preparo de amostra de urina com adição de DNA genômico humano

Alguns autores¹⁶⁹⁻¹⁷⁴ sugerem que determinados tipos de câncer, como câncer de mama¹⁷⁵ e de bexiga,^{171,174} possuem grande potencial de serem diagnosticados por meio do DNA livre nos fluidos biológicos, dentre eles a urina. Por isso, a amostra da primeira urina da manhã foi coletada e utilizada como controle. As amostras foram analisadas após a quantificação de DNA livre na amostra, a qual foi negativo para todos os casos. Em seguida, as amostras controle foram fortificadas com quantidade conhecida de padrão de DNA genômico humano para concentração final de 0,6 ng μL^{-1} e 2 μL foi utilizado para extração no dispositivo. O objetivo com estas amostras foi mimetizar baixíssimas quantidades de DNA livre em amostras de urina, visando a utilização da metodologia como potencial diagnóstico para pacientes com câncer de bexiga,^{174,176-178} por exemplo.

3.7.2.3 Preparo de amostra de bactéria – *Escherichia coli*

As amostras de bactéria *E. coli* K12 utilizadas foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) no laboratório BioMicS, por 24 h em temperatura 37 °C. Após quantificação das amostras quanto às unidades formadoras de colônias (UFC), a amostra foi diluída sequencialmente até a obtenção de 30 UFC mL⁻¹ na amostra final.

Para lise das amostras, 1 mL da bactéria foi centrifugado por 13.000 RPM durante 2 min, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram lisados. Para isso, foi utilizada a mesma solução de lise das amostras de sangue, adicionado 50 µL de proteinase K (20 mg mL⁻¹) e 90 µL de GuHCl 8 mol L⁻¹ pH 7,6 + 1% Triton X-100, para volume final total de 140 µL. As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas a 56 °C por 10 min. Assim como para as demais amostras, em cada extração foi utilizada 2 µL da solução lisada.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A técnica utilizada para quantificação do DNA extraído nos dispositivos foi a espectrometria de fluorescência, utilizando um espectrofluorímetro de gota NanoDrop 3300 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Foi realizado o ensaio do PicoGreen para DNA dupla fita, de acordo com o protocolo do fabricante.¹⁷⁹ Foi utilizado 2 µL da amostra, seguidos da adição de 8 µL de solução 0,1 × TE. Em seguida, foi adicionado 10 µL de PicoGreen (0,5%) e realizadas as medidas de fluorescência no espectrofluorímetro. Uma curva analítica utilizando DNA genômico humano pré-purificado foi preparada para a comparação de fluorescência com as amostras.

Por meio da equação 3 foi possível a quantificação da eficiência de extração.

$$\% \text{ de eficiência} = \frac{\text{Quantidade de DNA final na amostra (ng)} \times 100\%}{\text{Quantidade de DNA inicial na amostra (ng)}} \quad \text{Equação 3}$$

3.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

3.9.1 PCR convencional em Tubo

Para amplificação do DNA e assim confirmação da qualidade do DNA extraído nos dispositivos, foi realizada a metodologia de PCR em tubo utilizando um termociclador da

Bio-Rad MyCycler.

Para reação de amplificação do gene β -globina nas amostras de sangue e urina fortificadas com padrão de DNA humano, foi utilizado a sequência de *primers* apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene β -globina, tamanho do fragmento de 390 pb.

Primer	Sequência (390 pb)
<i>Forward</i> (β_1)	5'– AGCCAGGGCTGGGCATAAAAGTCA – 3'
<i>Reverse</i> (β_2)	5'– ACAGCATCAGGAGTGGACAGATCCC – 3'

Fonte: autoria própria

A mistura reacional para amplificação do gene β -globina foi preparada com a seguinte composição: 1× de tampão para PCR; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM dNTPs; 0,4 pM de cada *primer* (β_1 e β_2); 0,125 unidades μL^{-1} da *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase Sinapse Inc.; e 0,24 mg mL^{-1} de albumina sérica bovina (BSA).

O protocolo de aquecimento foi: 95 °C por 2 min (desnaturação inicial), 30 ciclos de 95 °C por 30 s (desnaturação), 68 °C por 30 s (hibridização) e 72 °C por 2 min (extensão ou polimerização).

Já para reação de amplificação do gene *malB* nas amostras de DNA extraídas da bactéria foi utilizado a sequência de *primers* apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados para amplificação do gene *malB*, tamanho do fragmento de 204 pb.

Primer	Sequência (204 pb)
<i>Forward</i> (F_1)	5'– GCCATCTCCTGATGACGC – 3'
<i>Reverse</i> (F_2)	5'– ATTTACCGCAGCCAGACG – 3'

Fonte: autoria própria

Para o gene *malB*, a mistura reacional foi preparada com a seguinte composição: 1× de tampão para PCR; 3 mM de $MgCl_2$; 0,4 mM dNTPs; 0,3 μM de cada *primer* (F_1 e F_2); 0,15 unidades μL^{-1} da *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase Sinapse Inc.; e 0,5 mg mL^{-1} de albumina sérica bovina (BSA).

O protocolo de aquecimento foi: 95 °C por 3 min (desnaturação inicial), 40 ciclos de 95 °C por 2 min (desnaturação), 59 °C por 1 min (hibridização) e 72 °C por 2 min (extensão ou polimerização), finalizando com uma pós-extensão de 5 min a 72 °C.

Os produtos de PCR foram analisados pelo *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Waldbrom, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante e/ou por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o corante para detecção de ácidos nucleicos, *Blue Green Loading dye* (Prolab).

3.9.2 IV-PCR em dispositivos de PeT

Todas as reações por IV-PCR foram realizadas no volume final de 5 µL, com concentração final de DNA na mistura reacional de 2 ng µL⁻¹. Para comparação, a reação de PCR também foi realizada em tubo com a mesma mistura reacional e mesmo volume final.

3.9.2.1 DNA de bactéria – *Escherichia coli*

Foi realizada a otimização da metodologia de amplificação de DNA por IV-PCR em dispositivos de PeT amplificando o fragmento de 240 pb do gene *malB* presente nas bactérias *E. coli* K12. A sequência dos *primers* utilizados é a mesma que apresentada na Tabela 2, no entanto, foram testados diferentes protocolos de aquecimento.

Para realização das reações de amplificação no dispositivo de PeT é necessário que a mistura reacional seja modificada, sendo acrescentado o polímero polietilenoglicol 200 (PEG), para minimizar a adsorção da enzima na superfície do dispositivo.⁹ Portanto, utilizando a mesma composição da mistura reacional descrita no item 3.9.1, foram testadas a adição de diferentes quantidades de PEG para composição final de 1.5%, 2.5%, 3.5%, 8% e 12%, em tubo e nos dispositivos de PeT fabricados com filme MARES. Além disso, os dispositivos testados foram passivados previamente com BSA na concentração de 0,6 mg mL⁻¹. Para isso, a solução de BSA foi colocada dentro do canal do dispositivo e deixada secar a temperatura ambiente.

Já para os dispositivos de PeT fabricados com o filme 3MPP2200, foram testados dois tipos de passivação. A passivação somente com BSA 0,6 mg mL⁻¹ e a passivação da superfície do filme somente com PEG 200, ambas utilizando na mistura reacional 8% de

PEG. O procedimento de passivação com BSA foi a mesma aplicada para os dispositivos de PeT fabricados com o filme MARES. Já a passivação com PEG 200, foi realizada com a adição da solução concentrada de PEG 200 dentro do canal e também deixada secar à temperatura ambiente. Ao final das 24 h, a solução concentrada foi retirada de dentro do canal e o dispositivo estava pronto para uso.

Na Tabela 3, é possível observar o protocolo de aquecimento e as variações de tempo testadas para os dispositivos fabricados com MARES e 3MPP2200.

Tabela 3 - Protocolo de aquecimento para IV-PCR em dispositivo de PeT MARES e 3MPP2200 com as respectivas variações no tempo de cada etapa.

Tipo de Filme	Temperatura (°C)	Pré Desnaturação	Desnaturação	Hibridização	Extensão	Pós Extensão
		95	95	59	72	72
PeT MARES	<i>Tempo (s)</i>	30	30	15	30	30
(A)	<i>Número de ciclos</i>	20				
PeT MARES	<i>Tempo (s)</i>	60	60	30	60	60
(B)	<i>Número de ciclos</i>	20				
PeT MARES e 3MPP2200	<i>Tempo (s)</i>	120	60	30	60	60
(C)	<i>Número de ciclos</i>	20				

Fonte: autoria própria

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE POLIÉSTER

4.1.1 Espessura dos filmes de poliéster por perfilometria

Para o desenvolvimento do *design* do dispositivo é importante conhecer a espessura dos filmes e consequentemente a altura das câmaras após o dispositivo pronto. Para isso, foi utilizado um perfilômetro o qual possibilita a obtenção de um gráfico com o perfil do filme, como pode ser observado na Figura 19.

Figura 19 – Exemplo do resultado obtido com a utilização do perfilômetro para a medida de espessura (nm) do filme 3MCG6000 – B.

Fonte: autoria própria

Os resultados de perfilometria para os diferentes filmes estão apresentados na Figura 20.

Figura 20 – Média da espessura determinada para os diferentes filmes de poliéster por perfilometria (n = 3): (0) 3MCG6000 – A; (1) 3MCG6000 – B; (2) MARES; (3) Terphane e (4) 3MPP2200.

Fonte: autoria própria

É possível observar que dentre os filmes, 3MCG6000 – B (1) apresenta maior espessura em relação aos demais, inclusive em relação ao mesmo filme da caixa A, seguido por MARES, 3MPP2200 e Terphane, respectivamente.

A espessura do filme é importante principalmente para composição da camada intermediária, relevante assim para a definição dos volumes das câmaras. Por isso, a utilização do filme Terphane como camada intermediária do dispositivo foi descartada. Isso porque seriam necessários vários filmes para proporcionar altura suficiente para movimentação das partículas utilizadas durante o procedimento de extração por dSPE dentro da câmara de extração. Além disso, utilizando filmes muito finos como camada intermediária, seria necessário que as câmaras fossem dimensionadas com uma geometria maior para comportar os volumes das soluções necessários, o que pode levar a uma maior deformação quando utilizado o processo de laminação a quente.

Não foram realizados testes para verificar a deformabilidade do material, entretanto, qualitativamente foi possível observar que quanto menor a espessura, mais flexível o filme. Consequentemente, maiores chances de deformação durante a etapa de laminação a quente para produção dos dispositivos de PeT, levando a maior variação do volume das câmaras entre dispositivos.

Portanto, diferentes dispositivos, PeT e PeDF, foram fabricados utilizando como camada intermediária apenas os filmes MARES e 3MCG6000 e 3MPP2200.

4.1.2 Ângulo de contato

Como descrito no procedimento experimental, para determinar o ângulo de contato da superfície dos filmes e da superfície recoberta com uma camada de toner, é necessário analisar a imagem da gota e determinar o ângulo de contato entre a tangente da interface líquido-ar e a tangente da interface sólido – líquido como pode ser observado no exemplo apresentado na Figura 21.

Figura 21 – Imagem adquirida no momento da determinação do ângulo de contato da água com a superfície do filme 3MCG6000 – B (1) sem toner na superfície e (2) após a deposição de uma camada de toner.

Fonte: autoria própria

Quando uma superfície apresenta ângulo de contato superior a 90°, a mesma pode ser considerada hidrofóbica, nesse caso uma gota de água, por exemplo, não molha o material. Abaixo deste valor a superfície passa a ser mais hidrofílica, sendo que quanto mais próximo de zero mais hidrofílica pode ser considerada a superfície.^{164,180,181}

Com base na análise das imagens obtidas, foi possível a determinação do ângulo de contato para todos os filmes utilizados, sem e com recobrimento de toner, como pode ser observado na Figura 22.

Figura 22 – Ângulo de contato determinados para os diferentes filmes sem e com a impressão de uma camada de toner na superfície (n = 4): (0) 3MCG6000 – A; (1) 3MCG6000 – B; (2) MARES; (3) Terphane e (4) 3MPP2200.

Fonte: autoria própria

Dentre os filmes, 3MPP2200 (4) apresenta o menor ângulo de contato em relação aos demais, seguido por 3MCG6000 – B (1), MARES (2), 3MCG6000 – A (0) e Terphane (3), respectivamente. Nenhum dos filmes apresentou ângulo de contato maior que 90°, no entanto, podemos considerar que o filme 3MPP2200 é mais hidrofílico que os demais e consequentemente facilita a movimentação de soluções aquosas dentro dos microcanais quando comparadas aos filmes mais hidrofóbicos.

Segundo o fabricante, o filme 3MPP2200 possui um recobrimento para melhor adesão do toner,¹⁸² o que apesar de não descrito, de acordo com a literatura pode conter dióxido de silício (SiO₂),¹⁸³ o que explicaria a menor hidrofobicidade. De acordo com o fabricante, o filme 3MCG6000 é uma transparência que pode ser utilizada para impressora a laser (face sem recobrimento) e impressora jato de tinta (face com recobrimento)¹⁸⁴. No entanto, a face com recobrimento não foi utilizada durante os experimentos, principalmente por essa se apresentar solúvel quando em contato com a água. Além disso, assim como a espessura, é importante ressaltar a diferença do ângulo de contato dos filmes provenientes de duas caixas distintas de 3MCG6000. Não foram encontradas evidências na literatura ou por meio do contato com os fabricantes sobre qualquer recobrimento nos filmes MARES e Terphane.

Todos os filmes foram compatíveis com a impressão de uma camada de 100% na escala cinza de toner, utilizando uma impressora a laser. Além disso, todos

demonstraram aumento na hidrofobicidade do filme após o recobrimento, variando entre 60,5° e 116,9° para os filmes 3MPP2200 e Terphane, respectivamente. Com isso, confirmamos que caso seja necessário, é possível a utilização de válvulas de toner nos dispositivos fabricados com todos os diferentes filmes. É importante lembrar que, quanto maior a hidrofobicidade da superfície, maior a rotação necessária para que uma solução aquosa ultrapasse a válvula, o que pode ser obtido por meio da variação da porcentagem de toner em relação a escala de cinza.⁹¹

4.1.3 Análises Térmicas

Diferentes informações podem ser obtidas pelas análises de TGA e DSC. No entanto, com o objetivo de caracterizar a composição dos filmes utilizados nesse trabalho, foram extraídas apenas as informações mais relevantes.

4.1.3.1 Termogravimetria (TGA)

Por meio da análise dos resultados obtidos por TGA (Fig. 23), foi possível determinar a temperatura de início (T_i) e fim da degradação (T_f), assim como as porcentagens de material orgânico e inorgânico de cada filme, como pode ser visto na Tabela 4.

Figura 23 – Curva TGA dos diferentes filmes de poliéster analisados a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ em atmosfera de ar sintético – (1) 3MCG6000 – B, (2) MARES, (3) Terphane e (4) 3MPP2200.

Fonte: autoria própria

Tabela 4 – Valores percentuais de compostos orgânicos e inorgânicos, T_i e T_f , dos filmes de poliéster em atmosfera de ar sintético – (1) MARES, (2) 3MCG6000 – B, (3) 3MPP2200 e (4) Terphane.

Filme	Material Orgânico (%)	Material Inorgânico (%)	T_i (°C)	T_f (°C)
1	98,81	0,34	390,04	558,71
2	99,59	0,16	385,36	568,07
3	98,67	0,92	395,45	553,88
4	98,80	0,40	399,37	547,03

Fonte: autoria própria

Com base nos resultados, é possível observar que a variação da % de material orgânico e inorgânico entre os diferentes filmes é muito pequena. É importante ressaltar que essa diferença pode estar relacionada apenas ao método de preparo do polímero, e não à presença de outros polímeros.¹⁸⁵ Além disso, para todos os filmes foi observado que a variação de massa dá-se início acima de 250 °C, possibilitando identificar a estabilidade térmica dos filmes nestas condições de análise.

4.1.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Durante o aquecimento, foi possível observar apenas um evento endotérmico nas curvas de DSC para os filmes estudados, como mostrado na Figura 24.

Figura 24 – Curva DSC dos diferentes filmes de poliéster – (1) 3MCG6000 – B, (2) MARES, (3) Terphane e (4) 3MPP2200.

Fonte: autoria própria

A partir das curvas de DSC, obteve-se o valor da variação de calor envolvida no processo de fusão, entalpia de fusão (ΔH_m), e temperatura de fusão (T_m), como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5– Dados obtidos por meio da análise DSC para os diferentes filmes de poliéster: entalpia de fusão (ΔH_m) e temperatura de fusão (T_m). 3MCG6000 – B (1), MARES (2), Terphane (3) e 3MPP2200 (4).

Filmes	ΔH_m (J g ⁻¹)	T_m (°C)
1	26,04	256,80
2	22,90	251,91
3	28,57	255,66
4	28,56	253,02

Fonte: autoria própria

Os valores de ΔH_m entre os filmes são muito próximos, variando de 22 até 28 J g⁻¹, assim como a variação entre as temperaturas de fusão. Dentre os diferentes poliéster existentes, o T_m determinado para cada filme analisado está próximo ao descrito na literatura para filmes de politereftalato de etileno, 279 °C.¹⁶⁴ Com isso, levantando mais uma evidência de que os filmes utilizados nesse trabalho são majoritariamente

compostos por poliésteres.

4.1.3.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Ainda com o objetivo de identificar os filmes utilizados, os mesmos foram estudados por infravermelho médio. Na Figura 25 é possível observar as bandas características para cada filme estudo.

Figura 25 – Espectros FT-IR dos diferentes filmes de poliéster: 3MCG6000 – B (1), MARES (2), Terphane (3) e 3MPP2200 (4).

Fonte: autoria própria

Na Tabela 6 é possível verificar o comprimento de onda correspondente as principais bandas observadas nos espectros e a qual ligação estas podem ser relacionadas.

Tabela 6 – Bandas de FTIR características dos grupos funcionais dos componentes dos filmes analisados, conforme indicado na Figura 25 – 3MCG6000 – B (1), MARES (2), Terphane (3) e 3MPP2200 (4).

Bandas	Atribuições ¹⁸⁶	Amostras			
		Número de onda (cm ⁻¹)			
		1	2	3	4
a'	C-H alongamento aromático	2997,12	-	-	-
a	- CH ₃ e - CH ₂	2947,46	2966,27	2967,01	2964,01
b	estiramento C=O éster	1723,39	1715,11	1715,86	1714,36
c	estiramento C (O) - O éster	1235,11*	1244,14	1244,89	1243,39
d	indicativas de substituição no anel aromático: 1,3-substituição região do esqueleto do anel são	1097,42*	1095,92	1095,93	1097,11
e	indicativas de padrão de substituição: 1,4 -substituição 1. 770 - 735 benzeno orto substituído 2. 710:690 benzeno mono substituído	1015,42	1019,18	1017,68	1018,43
f	3. 730 associado com grupos carbonilas como substituintes no anel aromático	719,75	722,01	719,00	719,75

Bandas de menor intensidade em relação as demais amostras (*).

Fonte: autoria própria

A primeira observação importante é que todos os quatro filmes apresentam espectros muito parecidos. A diferença mais clara foi observada no espectro da amostra 1 em relação aos demais. Na região de 3000 cm⁻¹, com o aparecimento de uma pequena banda em 2997,12 antes da banda 2947,46 cm⁻¹. Além disso, entre 1500 cm⁻¹ e 1000 cm⁻¹ onde não há uma separação muito clara entre as bandas 1235,11 e 1097,42 cm⁻¹ as quais assim como a banda 1015,42 cm⁻¹ são de intensidade muito menor quando comparadas aos outros filmes.

Ainda, é possível observar que os espectros obtidos para os diferentes filmes são coerentes com o espectro de um padrão de PeT, como mostrado na Figura 26.

Figura 26 – Espectro FTIR de um padrão de politeraftalato de etileno (PeT) obtido a partir do banco de dados SDBS.¹⁸⁷

Fonte: Spectral database for organic compounds (SDBS).¹⁸⁷

4.1.4 Caracterização elemental da superfície por espectrometria de energia dispersa de raios – X (EDS ou EDX)

Segundo He, F. Y. e colaboradores (2005),¹⁸³ por meio das análises de raios X foi possível determinar 0,59% de sílica elemental (calculado na forma de SiO₂) na superfície do poliéster. Com isso, buscamos caracterizar a superfície do filme na tentativa de identificar a composição elemental da superfície. Para isso, as primeiras análises foram realizadas por meio do EDX e na Figura 27 podemos observar um exemplo do resultado obtido para o filme 3M CG6000.

Figura 27 – Espectro de EDX da superfície do filme 3MCG6000 – B.

Fonte: autoria própria

Na Figura 28 é possível observar que a única diferença entre os filmes é a porcentagem de carbono e oxigênio, não sendo possível identificar qualquer indício da presença de sílica (SiO_2), o que poderia explicar a diferença da hidrofobicidade entre os filmes.

Figura 28 - Composição elemental da superfície dos filmes estudados ($n = 3$) obtido por análise de EDX. MARES (1); 3MCG6000 – B (2); Terphane (3); 3MPP2200 (4).

Fonte: autoria própria

Portanto, é importante destacar que os resultados obtidos por EDX são obtidos a partir de alguns micrômetros no interior da amostra, não podendo ser considerada representativa da superfície.¹⁸⁸ Por isso, para melhor caracterização e possível

identificação da composição da superfície dos filmes a técnica mais recomendada seria XPS (espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X), a qual não foi possível ser realizada até o momento da escrita dessa tese.

4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 29 são apresentados exemplos das micrografias obtidas pela análise por MEV das superfícies dos diferentes filmes utilizados.

Figura 29 - Imagens de MEV com aumento de 10.000× para os filmes: 3MCG6000 – B (1), MARES (2), Terphane (3) e 3MPP2200 (4).

Fonte: autoria própria

Com base nas imagens, é possível observar que todos os filmes apresentam uma superfície irregular e não homogênea. No entanto, fica claro pelas imagens que os filmes 1 e 2 correspondentes as transparências 3MCG6000 – B e MARES, apresentam

superfície mais irregular que 3 e 4, filme Terphane e transparência 3MPP2200, respectivamente.

Ainda que até o momento as formas de caracterização utilizadas não possibilitaram identificar claramente a fonte da diferença de hidrofobicidade dos filmes, as imagens acima nos proporcionam um indicativo. Isso porque, segundo o modelo de Wenzel, a rugosidade de uma superfície em escala micro ou nanométrica pode acentuar sua característica para mais hidrofílica ou mais hidrofóbica, dependendo da característica original da superfície. Com base nos resultados anteriores, os filmes utilizados são filmes de PeT, que apresentam ângulo de contato em torno de 43° , segundo a literatura.¹⁶⁴ Ainda de acordo com os resultados, os filmes que apresentam a superfície mais irregular apresenta maior hidrofobicidade. Isso, porém, ainda não explica a baixa hidrofiliabilidade do filme 3MPP2200, a qual mais uma vez, pode estar relacionada a presença de SiO_2 .¹⁸³

Uma melhor caracterização da superfície dos filmes em relação a topografia pode ser obtida por meio da técnica de microscopia de força atômica (AFM).¹⁸⁸

4.2 ADAPTAÇÃO DA PLATAFORMA ROTATIVA

A movimentação das soluções dentro dos dispositivos é impulsionada pela força centrífuga gerada com o auxílio de um sistema de rotação.^{133,136,143} Este fenômeno combinado ao *design* do dispositivo possibilita o movimento das soluções sem a influência do operador, bastando a programação das rotações.

Além disso, na etapa de extração de DNA utilizada nesse trabalho, a dSPE, é necessário o controle de micropartículas de sílica magnética no interior dos dispositivos. Em determinado momento é necessário que as micropartículas fiquem paradas enquanto os fluidos são movimentados no interior do dispositivo, o que é possibilitado devido ao uso de ímãs fixos. Em outro momento, é necessário o movimento das micropartículas, o que pode ser realizado em um agitador magnético e/ou na própria plataforma (Figura 30. b).

Na Figura 30, é possível observar os dois sistemas utilizados durante o estágio na *University of Virginia – USA*.

Figura 30 – Sistemas rotativos *homemade* utilizados para controle dos fluidos durante a primeira fase do projeto desenvolvido na *University of Virginia-USA*. (a) Primeiro sistema, composto por um motor de passo, uma base de polimetilmetacrilato (PMMA) para fixação dos dispositivos e controles correspondente as chaves de liga e desliga; (b) Segundo sistema utilizado durante o estágio, composto por (A) Motor para rotação; (B) ímã fixo; (C) plataforma de PMMA para fixação dos ímãs; (D) Parafuso para ajuste da altura dos ímãs; (E) Disco microfluídico; (F) Motor de passo.

Fonte: autoria própria

A maior diferença entre os dois sistemas é que em (a) temos apenas um suporte com dois ímãs fixados na posição correspondente as câmaras que comportam as partículas magnéticas. Esse, no momento da rotação do dispositivo e movimentação dos fluidos, é fixado na parte superior do dispositivo e assim impede com que as micropartículas se movimentem. No momento em que é necessário a movimentação das partículas, esse é retirado e o dispositivo é levado para um agitador magnético.

Já em (b), os ímãs estão fixados em uma base de PMMA giratória, controlada por um motor, o que permite sua movimentação em sincronia com o dispositivo impedindo que as partículas se movimentem enquanto os fluidos passam por ela. Ao mesmo tempo que torna desnecessária a utilização do agitador magnético, uma vez que a movimentação das partículas dentro do dispositivo é realizada com o dispositivo parado e a base de PMMA em movimento sincronizado nas direções horária e anti-horária.

Os resultados apresentados nesse trabalho em relação a etapa desenvolvida na Universidade da Virgínia, foram realizados no sistema apresentado na Figura 30.a.

Na segunda fase do projeto realizado no Instituto de Química de São Carlos – USP, foi utilizado um sistema *spin coating* adaptado com uma base fabricada em PMMA para

fixação do dispositivo e haste móvel para reposicionamento dos ímãs, como pode ser observado na Figura 31.

Figura 31 – Sistema rotativo *spin coating* utilizado para controle dos fluidos durante a segunda fase do projeto desenvolvido no Instituto de Química de São Carlos (a). Base com 12 cm de diâmetro fabricada em PMMA (2 mm de espessura) para fixação dos dispositivos (b) com apoio para haste móvel (8 cm × 4 cm) com ímãs posicionados a 3,5 cm do centro da plataforma.

Fonte: autoria própria.

A utilização do sistema de *spin coating* foi possível pois o sistema permite criar uma programação de rotação e tempo com alta reprodutibilidade, uma vez que o equipamento possui controle preciso destes parâmetros. Consequentemente, expõe os microdispositivos sempre sob as mesmas rotações pré-estabelecidas, garantindo maior reprodutibilidade entre os experimentos. No entanto, neste equipamento não foi possível acompanhar a movimentação (visualização) dos fluidos dentro do dispositivo devido a ausência de um sistema de aquisição de imagem. Com isso, dificultando o desenvolvimento e otimização do dispositivo.

A plataforma utilizada para fixação do dispositivo (Figura 31b) e apoio dos ímãs foi fabricada em PMMA a partir de um modelo feito em AutoCAD®. A haste móvel permite que os ímãs sejam posicionados sobre a câmara central do dispositivo e assim mantenha as micropartículas imóveis durante a movimentação dos fluidos no momento da rotação. A haste também permite que os ímãs possam ser reposicionados para longe da câmara central, deixando as micropartículas livres no momento em que estas devem ser movimentadas durante o procedimento de extração por dSPE, quando o dispositivo é levado ao agitador magnético.

Devido à dificuldade em acompanhar visualmente o movimento dos fluidos dentro do dispositivo, foi desenvolvida uma nova plataforma de rotação (Figura 32).

Figura 32 – Sistema rotativo *homemade* utilizado para controle dos fluidos durante a segunda fase do projeto desenvolvido no Instituto de Química de São Carlos. (a) Sistema composto por (A) eixo superior para alinhamento do suporte fabricado em PMMA; (B) câmera fixada na base superior com 12 cm de diâmetro fabricada em PMMA (2 mm de espessura); (C) base inferior para fixação do microdispositivo, 12 cm de diâmetro fabricada em PMMA (2 mm de espessura); (D) motor; (E) estrutura de madeira para fixação do motor com base inferior e superior fixadas por meio de parafusos e alinhadas; (F) fonte de alta tensão para controle do motor. (b) Foto aproximada da base inferior para fixação do dispositivo microfluídico: (C₁) haste móvel (8 cm × 4 cm) fabricada em PMMA (2 mm de espessura) com ímãs posicionados a 3,5 cm do centro da plataforma; (C₂) ímãs fixados na haste móvel.

Fonte: autoria própria.

A principal diferença da nova plataforma de rotação em relação ao equipamento de *spin coating* adaptado é que agora é possível o monitoramento do dispositivo enquanto esse é rotacionado. E isso só possível devido a presença de uma micro câmera (B) fixada na base superior. Esta é rotacionada junto com o dispositivo, uma vez que está ligada a base inferior por meio das hastes laterais de PMMA. Foi necessária a utilização de um eixo na base de madeira superior, para que todo o suporte de PMMA fosse rotacionado em sincronia e de forma alinhada em relação ao eixo do motor.

O vídeo possibilita a determinação da rotação e tempo em que as soluções se movimentaram dentro do dispositivo, permitindo a otimização destes parâmetros e do design do dispositivo de forma mais rápida em relação a plataforma de rotação anterior (*spin coating*).

Em relação ao sistema utilizado durante a primeira fase do projeto, na *University of Virginia – USA*, as plataformas utilizadas no Brasil ainda não possibilitam a movimentação das micropartículas sem a necessidade do agitador magnético. No entanto, isso não atrapalhou a obtenção do dispositivo final com controle total das soluções no interior do dispositivo.

4.3 MICROFABRICAÇÃO

Dentre as principais diferenças entre os dispositivos de PeT e PeDF podemos destacar:

- a) Substituição do toner dos dispositivos de PeT pela fita dupla face nos dispositivos PeDF:

Nos dispositivos de PeT, o toner deve ser impresso em ambos os lados dos filmes da camada intermediária. Nesse caso, o toner é utilizado como uma cola, com o objetivo de fixar as diferentes camadas após a laminação. Já nos dispositivos de PeDF, o toner é substituído pela fita dupla face. Nessa nova configuração, é a fita dupla face que exerce o papel de cola entre as diferentes camadas dos filmes. A fita dupla face deve ser fixada em ambos os lados do filme da camada intermediária antes do corte da estrutura desenhada em AutoCAD®.

- b) Laminação:

Para construção dos dispositivos de PeT, é necessária uma etapa de laminação a quente. Durante este processo é necessário que o dispositivo seja disposto entre uma folha de alumínio e uma folha de papel, para melhor distribuição do calor. No entanto, além disso, devido ao tamanho das câmaras do dispositivo, também foi necessário adicionar uma chapa metálica fina na etapa de laminação. Isso porque foi observado que

as câmaras quando laminadas apenas entre o alumínio e o papel ficavam abauladas, levando a uma grande variação dos seus volumes. Já no caso dos dispositivos de PeDF, não há necessidade da etapa de laminação a quente, sendo que as partes são fixadas apenas por meio da pressão exercida pelos dedos e em seguida, com o auxílio de uma régua, garantindo que o dispositivo fique totalmente selado.

c) Altura da camada intermediária:

Outra diferença importante entre os dispositivos de PeT e PeDF consiste na altura das câmaras e canais. Nos dispositivos de PeT, a altura das câmaras e canais é limitada pela quantidade de filmes da camada intermediária somando a altura das camadas de toner depositadas na superfície destes filmes. Já nos dispositivos de PeDF, o limitante consiste na quantidade de filmes intercalados com fita dupla face. Por esse motivo, o filme Terphane, com menor espessura não foi utilizado como camada intermediária nos dispositivos de extração automatizado, mas sim o filme 3MCG6000 – B.

A altura foi determinada utilizando um perfilômetro, sendo que os dispositivos PeT com 2 camadas intermediárias fabricados com filmes 3MCG6000 – B possuem altura das câmaras de 321 μm , enquanto que os dispositivos com MARES de 215 μm . Já os dispositivos fabricados com 3MPP2200 e 3 camadas intermediárias possuem altura de 363, enquanto que os dispositivos PeDF utilizando como camada intermediária os filmes 3MCG6000 – B intercalados a duas fitas dupla face tem altura de 318 μm . A diferença entre as alturas principalmente entre os dispositivos de PeT 3MCG6000 – B e PeDF não parecem muito significativas. No entanto, mesmo essa pequena diferença, 42 μm , afeta o movimento dos fluidos e consequentemente requer adaptação da dimensão dos canais e câmaras para cada filme utilizado.

d) Flexibilidade e resistência mecânica do dispositivo:

Não foram realizadas análises para avaliar a flexibilidade ou a resistência mecânica dos dispositivos de PeT comparados aos de PeDF. No entanto, foi possível observar que os dispositivos de PeT são mais sensíveis a choque ou movimentos bruscos que os dispositivos de PeDF, levando a delaminação dos mesmos.

Além disso, é importante destacar o motivo da necessidade em trabalhar com os dispositivos de PeDF. No decorrer do trabalho foi necessária a substituição dos filmes 3MCG6000 e MARES, o que será melhor explicado no item 4.5.2, tendo sido escolhido um filme para embalagens, Terphane. No entanto, esse não tem como finalidade a impressão, e por isso não foi obtido resultados satisfatórios na construção de dispositivos PeT com esse filme. Ainda que seja possível a impressão de uma camada de toner nesses filmes, mais camadas são necessárias para que o mesmo possa construir a camada intermediária do dispositivo. No entanto, ao fim da laminação esse se soltava facilmente, inviabilizando seu uso. O mesmo aconteceu quando utilizado outros filmes recobertos com toner como camada intermediária e o filme Terphane apenas como base e topo. Portanto, concluímos a necessidade da substituição do toner pela fita dupla face quando utilizado o filme Terphane ou outro filme com finalidade diferente das transparências.

Características mais específicas do design de cada dispositivo, como geometria e volume, serão discutidas no item 4.4.

4.4 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS CONTROLADOS PELA FORÇA CENTRÍFUGA

4.4.1 Funcionamento das válvulas

As diferentes válvulas utilizadas nesse trabalho apresentam características específicas, as quais determinam seu funcionamento, assim como a faixa de rotação na qual a válvula permanece fechada antes de ser ultrapassada pela solução.

Como discutido na introdução, a combinação das válvulas assim como a distância da válvula em relação ao centro de rotação permite com que uma faixa maior de rotação possa ser explorada. Consequentemente, permitindo que mais etapas de movimentação das solução no interior dos dispositivos possa ser controlada.

4.4.1.1Válvula de Fita Adesiva

As válvulas de fita adesiva foram utilizadas nos dispositivos para controle das soluções mais distantes do centro de rotação. Isso porque, podem suportar maiores

rotações que as demais válvulas passivas exploradas nesse trabalho e além disso, pode ser considerada bifuncional. Sua bifuncionalidade permite que ela funcione como uma válvula passiva convencional, quando permanece fechada e a partir de uma determinada rotação se abre para que a solução seja liberada. Outra forma de funcionamento é que esta esteja aberta em um primeiro momento, podendo ser fechada apenas quando necessário.

Na Figura 33 é possível observar as duas formas de funcionamento da válvula de fita adesiva.

Figura 33 – Representação esquemática do funcionamento da válvula de fita adesiva. Funcionamento de forma ativa (a); funcionamento de forma passiva (b).

Fonte: autoria própria

Na Figura 33.a, forma ativa de funcionamento, podemos observar que em um primeiro momento a fita adesiva está posicionada na superfície do topo do dispositivo, permitindo com que a solução passe por um espaço entre a camada intermediária e a fita. Ao final do procedimento, a fita é pressionada com o auxílio de um objeto pontiagudo para que ela feche totalmente essa abertura, impedindo que a próxima solução passe pelo canal. Esta forma de utilização das válvulas de fita adesiva, apesar de não ser passiva e requerer intervenção do operador, demonstrou-se muito simples de ser utilizada.

Já na Figura 33.b, forma passiva de funcionamento, é possível observar que na fabricação do dispositivo a válvula é fechada também utilizando um objeto pontiagudo. Com isso, impede que a solução confinada na câmara, a qual a válvula está ligada, passe para próxima câmara. Isso até que determinada rotação seja atingida proporcionando

pressão suficiente para que a válvula seja rompida, liberando o espaço entre camada intermediária e topo do dispositivo permitindo que a solução se movimente pelo canal.

A válvula de fita adesiva utilizada dos dois modos demonstrou-se compatível com o objetivo do trabalho, em controlar as soluções mais distante do centro de rotação e ainda trabalhar no modo aberto em um primeiro momento e fechada no segundo. No entanto, durante os experimentos observou-se que a marca da fita adesiva utilizada proporciona variações no comportamento da válvula em relação a rotação máxima que a mesma suporta.⁴² Ainda, foi observado que mesmo utilizando a mesma fita adesiva que a utilizada nos dispositivos de PeT, o funcionamento das válvulas de fita adesiva nos dispositivos de PeDF não foi satisfatório. O mal funcionamento dessa válvula permite vazamentos e com isso, a falta de controle das soluções dentro do microdispositivo. Contudo, ainda que ela tenha sido utilizada em um primeiro momento, neste trabalho buscou-se substituí-la por outras estratégias.

4.4.1.2Válvula capilar

As válvulas capilares são consideradas válvulas passivas, uma vez que utiliza apenas a geometria do canal/características da superfície do filme para controle das soluções, não necessitando da intervenção do operador. Na Figura 34 é possível observar um esquema do funcionamento da válvula capilar nos dispositivos.

Figura 34 – Representação esquemática do funcionamento da válvula capilar, sendo P_{ω} a pressão causada pela força centrífuga e P_s a pressão capilar induzida pela tensão superficial. Aumento da região da válvula representado com retângulo vermelho dando destaque para a região entre o canal e a interface de expansão.

Fonte: autoria própria

Como pode ser visto na Figura 34, a solução confinada dentro de uma câmara passa a percorrer um canal até atingir uma seção transversal com uma expansão abrupta. Com isso, sofre a diminuição da força capilar e aumento da tensão superficial. Consequentemente, esse aumento da tensão superficial funciona como uma barreira fazendo com que o líquido pare. À medida que a pressão induzida pela força centrífuga ($P\omega$) aumenta ultrapassando a pressão causada pela tensão superficial (P_s), o fluido segue seu curso sentido oposto ao centro de rotação.^{75,136,140,189}

4.4.1.3 Sifão

Na Figura 35 é possível observar um esquema representando o funcionamento de uma válvula de sifão, e a modificação realizada para os nossos dispositivos.

Figura 35 - Representação esquemática do funcionamento do sifão. Combinação da força centrífuga e capilaridade em superfícies hidrofílicas (a); adaptação do sifão para os filmes de poliéster utilizados (b).

Fonte: autoria própria

No primeiro caso (a), a medida que o dispositivo é submetido a rotação, a pressão ($P\omega$) promovida na solução presente na câmara permite com que ela entre no canal. Ao cessar a rotação, a solução percorre o canal no sentido da curvatura superior do sifão por capilaridade, podendo chegar até a próxima câmara. No entanto, os filmes utilizados possuem menor hidrofilicidade (item 4.1.2) e por isso os sifões utilizados foram adaptados e construídos com sua curvatura superior abaixo do início da câmara ao qual está ligado. Isso porque, em superfícies menos hidrofílicas, a solução não consegue subir longas distâncias apenas por capilaridade. O sifão é ultrapassado pela solução

apenas com a pressão exercida pela rotação, uma vez que o menisco da solução presente na câmara está acima da curvatura superior do sifão.^{75,136,189}

4.4.1.4 Válvula de toner

As válvulas de toner utilizadas foram todas fabricadas na tonalidade máxima na escala de cinza. Para que com isso, fosse possível ser explorada a máxima rotação de quebra da válvula. Na Figura 36, observamos um esquema representativo das válvulas de toner utilizadas nos dispositivos.

Figura 36 – Representação esquemática do funcionamento da válvula hidrofóbica de toner (a) e foto das diferentes porcentagens de toner na escala de cinza impressas na superfície do filme (b).

Fonte: autoria própria

O funcionamento da válvula de toner baseia-se na sua hidrofobicidade, característica determinada pela sua composição.⁹¹ Portanto, quando a solução aquosa presente na câmara entra em contato com a válvula impressa na superfície do filme, essa impede com que a solução percorra o canal para próxima câmara, devido ao aumento do ângulo de contato da solução com a superfície recoberta por toner. Para que a solução possa ultrapassar a válvula, é necessário que a pressão (P_{ω}) gerada pela força centrífuga ultrapasse a resistência causada pela válvula.

4.4.2 Dispositivos de extração

4.4.2.1 Dispositivo de extração PeT semiautomatizado

Como descrito anteriormente, esse dispositivo foi desenvolvido durante o estágio realizado na *University of Virginia - USA*. O processo de *design* do microdispositivo consistiu no teste das válvulas separadamente até o acoplamento das diferentes válvulas em um único dispositivo, com a utilização de corantes, até o primeiro protótipo apto a realização da extração de DNA.

Nas Figuras 37a e 37b temos o desenho e foto, respectivamente, do dispositivo desenvolvido e utilizado para obtenção dos resultados que serão apresentados a seguir.

Figura 37 – Comparação dos dispositivos de extração PeT semiautomatizado, com base nos desenhos desenvolvidos em AutoCAD®. Desenho da primeira versão do dispositivo PeT semiautomatizado desenvolvido na *University of Virginia*, sem identificação e dimensões das câmaras e canais, apenas para comparação visual com o dispositivo final utilizado para extração (1). Desenho do dispositivo final de PeT semiautomatizado para extração de DNA desenvolvido na Universidade da Virgínia, no qual estão identificados: (A) câmara da solução aquosa de lavagem 2, 6 μL (14 mm $\times$ 1,69 mm); (a) válvula hidrofóbica de toner para controle da solução de lavagem A (3 mm $\times$ 2 mm; 100% escala de cinza); (B) câmaras para solução de lavagem 1, 4 μL cada (6 mm $\times$ 3 mm); (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de lavagem 1 (250 μm de largura); (C) câmara central, 6 μL (raio maior 3.2 mm e raio menor 2.9 mm); (D) Câmara de descarte, 20 μL total mas comporta até 22 μL (6 mm $\times$ 5 mm); (d) válvulas de fita adesiva para controle da abertura e fechamento do descarte; (E) câmara para coleta de amostra, 6 μL (4,8 mm de diâmetro) e (e) válvula de fita adesiva para fechamento e abertura do canal para amostra, todos com 272 μm de profundidade. Figura do dispositivo otimizado e utilizado para extração de DNA (2).

(1)

(2)

Fonte: autoria própria

É possível observar que a mudança mais marcante em relação ao primeiro protótipo funcional do dispositivo de extração semiautomatizado e o dispositivo final, com o qual foram realizadas extrações de DNA, está nas válvulas inferiores (e) e (d). Esta mudança foi necessária porque quanto maior a distância do centro de rotação maior a pressão sentida pelas válvulas e por isso mais forte esta tem que ser para conseguir com que as soluções que já ultrapassaram as válvulas (a e b) superiores fiquem paradas dentro da câmara principal (C).^{136,143,189} Além disso, as válvulas de toner, uma vez molhadas pela solução não se comportam da mesma forma. Com isso, não cumprem o papel de

bloquear a entrada da solução de dessorção no descarte (D) quando o dispositivo é rotacionado para direcioná-la para câmara de coleta (E).

Os testes realizados visaram a observar individualmente a viabilidade das válvulas e por fim a viabilidade da operação conjunta, determinando, então, a rotação e o tempo necessário para que a solução ultrapassasse cada válvula de acordo com o fluxograma apresentado no item 3.6.1.1. Figura 13.

Na Figura 38, podemos observar a rotação e tempo necessários para ruptura de cada uma das válvulas quando combinadas no dispositivo, indicadas de acordo com o desenho da Figura 38.

Figura 38 – Rotação e tempo determinados para ruptura de cada uma das válvulas utilizadas no dispositivo PeT de extração semiautomatizado. As válvulas foram indicadas de acordo com o desenho apresentado na Figura 37, no entanto, na ordem de ruptura. Sendo que (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de isopropanol; (d) válvulas de fita adesiva para controle da abertura e fechamento do descarte; (a) corresponde a válvula hidrofóbica de toner; e (e) válvula de fita adesiva para fechamento e abertura do canal para amostra.

Fonte: autoria própria

Em ordem, de acordo com a necessidade do procedimento, o rompimento das válvulas aconteceu com o aumento da rotação, a qual variou entre 293 e 1276 RPM, com um tempo total do procedimento de rotação de 3 minutos.

Na Figura 39 é possível observar os resultados obtidos com o design desenvolvido e procedimento de rotação realizado de acordo com o apresentado acima. Além disso, pode ser observado na Figura 39a que além do sanduíche composto por duas camadas intermediárias, base e topo, o dispositivo ainda contém um suporte para que possam ser fixadas as fitas adesivas para as válvulas de saída do descarte (e) e câmara da amostra

(d). Para fabricação do suporte foi desenvolvido um desenho no software AutoCAD® e recortado com a cortadora a laser em um filme recoberto com 3 camadas de toner em apenas uma das faces. Após o dispositivo montado e laminado, o suporte foi fixado com fita adesiva sob o dispositivo, com a face recoberta com toner para baixo, ou seja, em contato com o topo do dispositivo. Em seguida, a combinação dispositivo mais suporte foi novamente laminada para obtenção do dispositivo visualizado na Figura 39b.

Figura 39 – Foto do dispositivo PeT utilizado para extração de DNA (a). Representação esquemática do protocolo de rotação e tempo otimizados com auxílio de corantes para dispositivo semiautomatizado (b), nos quais as setas representam a liberação das soluções (azul = isopropanol (B); vermelha = TE 0,1× (A); verde = GuHCl/amostra (C)) expostas a determinada rotação (topo da figura) por determinado tempo (base da figura) e o símbolo “X” (roxo) representa o fechamento das válvulas (verde = válvula para câmara da amostra (e); vermelha = válvula para câmara do descarte (d)).

(a)

(b)

Fonte: autoria própria

Acompanhando as setas azul, verde e vermelha, na Figura 39, é possível observar que a primeira etapa com o dispositivo ainda imóvel (0 RPM) é realizado o preenchimento das câmaras A, B e C e fechamento da válvula de fita adesiva (e) para câmara de amostra E. A válvula de fita adesiva não pode ser considerada uma válvula passiva, uma vez que requer intervenção do operador. No entanto, seu funcionamento é bem simples, necessitando apenas que a fita seja pressionada sob a superfície do dispositivo com auxílio de objeto pontiagudo, como uma tampa ou ponta de uma caneta.

Em seguida, o dispositivo foi rotacionado a 293 RPM durante 120 segundos para que todo o isopropanol representado pela solução azul (B) passasse pelo sifão e válvula capilar (b) entrando na câmara principal (C). Nessa etapa, válvula adesiva para amostra (e) foi mantida fechada (após ser pressionada na superfície do dispositivo) e válvula para descarte mantida aberta (d) (posicionada na superfície do suporte). Devida a baixa tensão superficial e capilaridade das soluções alcoólicas, não foi possível a utilização apenas da válvula capilar como barreira para a solução de isopropanol, necessitando do sifão o qual auxiliou com que a solução permanecesse na câmara durante os primeiros 5 minutos, necessários na etapa de extração. Além disso, o *plugue* de ar aprisionado entre câmara B e câmara C auxilia com que o isopropanol permaneça dentro da câmara até o momento da rotação.

Para que a solução presente na câmara principal (C) fosse direcionada para o descarte (D), a válvula de fita adesiva para amostra (e) foi mantida fechada e para o descarte aberta (d). O dispositivo foi rotacionado em 340 RPM durante 10 segundos, quando a solução da câmara C começa a ultrapassar a válvula. A rotação de 340 RPM é mantida por mais 30 segundos (total de 40 segundos nessa rotação), rotação e tempo suficientes para que a solução de TE ultrapasse a barreira hidrofóbica proporcionada pela válvula de toner.

Esta etapa é muito importante para o procedimento de extração, uma vez que a passagem do álcool deve precipitar o DNA enovelado nas micropartículas magnéticas e solubilizar as proteínas presentes no lisado²³. Além disso, a lavagem com TE, deve ser suficiente para a retirada total dos resíduos que podem vir a atrapalhar a etapa de dessorção e a etapa de amplificação do DNA. Dentre os resíduos, pode-se ter solução de lise, amostra e ainda um possível resíduo do isopropanol da lavagem anterior.²³ Assim, garantindo a eficiência e qualidade do DNA extraído para as etapas posteriores.²³

Após a lavagem, a fita adesiva presente na válvula para câmara de descarte (d) foi trocada e a nova fita fixada com o auxílio de uma pinça, fechando as saídas para o canal. Foi adicionado solução de dessorção, TE (verde) na câmara principal (C), e o microdispositivo rotacionado em 1276 RPM durante 15 segundos, com isso a solução desloca a fita adesiva presente na válvula (e) entre a câmara central (C) e câmara da amostra (E) como esperado, podendo assim ser coletada.

Após a otimização do procedimento de rotação do dispositivo, iniciou-se os testes de extração de DNA de sangue humano, com o objetivo de verificar a eficiência da etapa de lavagem. Uma vez que essa etapa é crítica para obtenção de bom rendimento e qualidade da amostra obtida.

No entanto, no decorrer das extrações foi possível observar que o suporte para válvula de fita adesiva dificultava a manipulação das micropartículas durante as etapas de enovelamento e dessorção do DNA porque as micropartículas se encontravam apreendidas embaixo do suporte da válvula de fita adesiva impedindo com que fossem movimentadas dentro da câmara principal. Por solucionar esse problema, alguns testes foram realizados para verificar a viabilidade das válvulas de fita adesiva sem a utilização do suporte, o que pode ser observado na Figura 40.

Figura 40 – Fotos correspondentes à sequência realizada para avaliação da viabilidade do dispositivo PeT de extração semi automatizada na ausência do suporte para as válvulas de fita adesiva, “e” e “f” apresentadas no desenho da Figura 39. As fotos correspondes a: (A) dispositivo parado no momento da adição da primeira solução na câmara central, válvula (d) aberta e (e) fechada; (B) ruptura da válvula (d) e liberação da solução para câmara de descarte após 293 RPM – 120 segundos e 340 RPM – 15 segundos; (C) dispositivo parado no momento da adição da segunda solução na câmara central, válvulas (d) e (e) fechadas; (D) ruptura da válvula (e) e liberação da solução para a câmara de coleta de amostra após 1276 RPM por 15 segundos.

Fonte: autoria própria

Comparando os métodos de rotação dos dois dispositivos apresentados, verifica-se que não houve variação entre as rotações necessárias para movimento da solução para descarte e câmara de amostra, quando na ausência do suporte da válvula. Confirmando a viabilidade da utilização do dispositivo sem o suporte. Ainda que não se tenha comparado a eficiência de extração do dispositivo com e sem o suporte das válvulas de fita adesiva, foi possível observar maior facilidade na movimentação das micropartículas durante as etapas realizadas no novo dispositivo.

O filme utilizado foi um filme substituto a transparência 3MPP2500, e os dispositivos foram utilizados para extração semi-automatizada de DNA genômico humano em amostras de sangue.

4.4.2.2 Dispositivo de extração automatizado

4.4.2.2.1 PeT

Na segunda fase do projeto, o qual foi desenvolvido no Instituto de Química de São Carlos – USP, foi dada início a total automatização do dispositivo utilizando o equipamento de *spin coating* como plataforma rotativa (Figura 31a). De acordo com o fluxograma apresentado na Figura 14 no item 3.6.1.2.1, para total automatização, é necessário que seja adicionado uma câmara para solução de dessorção. E ainda, que essa solução seja automaticamente direcionada para câmara central e em seguida, para câmara de amostra. Além disso, houve uma preocupação em modificar a válvula de fita adesiva para o descarte na parte inferior do dispositivo, diminuindo a necessidade de intervenção do operador.

Na Figura 41, apresentamos a versão final do microdispositivo de extração automatizado.

Figura 41 – Dispositivo de extração desenvolvido em AutoCAD®, no qual estão identificados: (A) câmara da solução aquosa de lavagem 2, 10 μL (13 mm $\times$ 1,7 mm); (a) válvula hidrofóbica de toner para controle da solução de lavagem 2 (3 mm $\times$ 2 mm; 100% escala de cinza); (B) câmara para solução de lavagem 1, 9 μL (7,4 mm $\times$ 3 mm); (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de lavagem 1 (250 μm de largura); (C) câmara central, 8 μL (raio maior 6,4 mm e raio menor 4,2 mm); (D) Câmara de descarte, 27 μL total (7 mm $\times$ 5 mm; 6,4 mm $\times$ 5 mm); (d) válvula de sifão combinada a válvula capilar interligando câmara central e descarte; (E) câmara para coleta de amostra, 6 μL (4,5 mm de diâmetro); (e) válvula de fita adesiva para fechamento e abertura do canal para amostra; (F) câmara para solução de dessorção, 6 μL (8 mm $\times$ 1,7 mm); e (f) combinação de sifão e válvula capilar.

Fonte: autoria própria

Entre o dispositivo final desenvolvido nos EUA, (1), e o primeiro dispositivo desenvolvido no Brasil, (2), a maior diferença foi a adição da câmara para solução de dessorção, representada em azul. Após a primeira versão do dispositivo (1), outros foram desenvolvidos até chegar a penúltima versão (3), como uma série de modificações, as quais foram mantidas no dispositivo final (4). No dispositivo final podemos ver indicado cada uma das câmaras e válvulas, assim como as modificações realizadas no decorrer do desenvolvimento.

No dispositivo final, ao contrário das versões anteriores, temos apenas uma câmara, (B), para um volume total de isopropanol (9 μL). Além disso, a composição das válvulas em (f) foi simplificada e agora conta apenas com um sifão e uma válvula capilar, diminuindo a resistência da solução em chegar até a câmara central.

A câmara da solução aquosa de lavagem (A) foi posicionada mais próximo ao centro de rotação em relação aos dispositivos anteriores, conseqüentemente menor a pressão sentida por essa válvula e por isso maior RPM é necessário para que ela seja ultrapassada pela solução⁹¹. Adicionalmente, agora (A) comporta um volume total para lavagem de 10 μ L, maior que o dispositivo dos testes anteriores.

Podemos destacar que a modificação mais importante está na substituição da válvula de fita adesiva entre a câmara central (C) e o descarte (D). Essa válvula tem grande importância, pois deve permanecer aberta para que as soluções das câmaras A e B possam ser direcionadas para o descarte, e por fim ser fechada para que a solução da câmara F permaneça na câmara central (C). As válvulas hidrofóbicas e capilar não são válvulas reversíveis, ou seja, uma vez que tenham sido rompidas em determinada rotação, não é possível que elas voltem a interromper a passagem de alguma solução que chegue até ela em rotação elevada.^{42,91}

A válvula de fita adesiva foi substituída por um sifão (d) e, pouco abaixo, uma estrutura na forma de um funil, que impede com que a solução do descarte retorne por capilaridade para câmara central (C) quando a rotação é cessada.

Quando a solução da câmara F chega até a câmara central, o descarte está cheio. Neste momento existe uma coluna de solução acima da entrada do canal (d) que liga as câmaras C e D. Ao mesmo tempo, forma-se um *plugue* de ar aprisionado entre as duas câmaras, separando solução no descarte e solução na câmara central. À medida que o sistema é rotacionado, o *plugue* de ar impede que a solução presente na câmara central entre no descarte, como descrito por Kim J. e colaboradores (2008).¹⁴² A condição crítica para que isso aconteça está relacionada ao tamanho da solução (altura do líquido) dentro da câmara do descarte em relação ao canal de entrada.¹⁴² Por esse motivo, foram testadas diferentes alturas da entrada do canal (d) na câmara do descarte. Utilizando uma altura de 4 mm foi possível determinar que o canal de entrada na câmara do descarte em uma altura de 4 mm é suficiente para que uma coluna de solução seja formada impedindo a entrada da solução F na rotação e tempo testados. Este protocolo apresentou 100% de aproveitamento nos testes de rotação.

O protocolo de rotação e tempo determinado para esse dispositivo está apresentado na Figura 42, sendo que nele apresentamos a rotação e tempo necessários para ruptura de cada uma das válvulas, indicadas de acordo com as letras respectivas ao desenho da Figura 42.

Figura 42 – Rotação e tempo determinados para ruptura de cada uma das válvulas utilizadas no dispositivo PeT de extração automatizado (n = 6). As válvulas foram indicadas de acordo com o desenho apresentado na Figura 41, no entanto, na ordem de ruptura. Sendo que (b) é combinação sifão e válvula capilar; (d) sifão para controle da entrada do descarte; (a) válvula hidrofóbica de toner; (f) combinação de sifão e válvula capilar; e (e) válvula de fita adesiva para fechamento e abertura do canal para amostra.

Fonte: autoria própria

Assim como para o chip anterior, nesta figura a ordem das válvulas estão apresentadas de acordo com a ordem em que foram rompidas pelas soluções, b, d, a, f, e.

É importante ressaltar que esses experimentos foram realizados utilizando o sistema de *spin coating* como adaptação da plataforma rotativa. Por isso, como já discutido anteriormente, não foi possível visualizar a movimentação das soluções dentro dos dispositivos durante o procedimento de rotação. Por isso, foi necessário que o sistema fosse parado entre cada uma destas etapas de rotação para observação da posição da solução. Por fim, determinou-se que as válvulas (a) e (f) só foram rompidas após uma combinação de duas etapas de rotação. A rotação de trabalho deste dispositivo ficou entre 295 e 1000 RPM, sendo que o tempo total do protocolo de rotação foi de 3 minutos e 45 segundos.

Após a otimização do dispositivo e do protocolo de rotação e tempo, o procedimento de rotação foi realizado com interrupção apenas após a solução da câmara F chegar até a câmara central pelo rompimento da válvula (f). O procedimento final determinado pode ser observado na Figura 43, assim como a foto do dispositivo utilizado.

Figura 43 – Foto do dispositivo otimizado e utilizado para extração de DNA (a). Representação esquemática do protocolo de rotação e tempo otimizados com auxílio de corantes para dispositivo PeT de extração automatizado, nos quais as setas representam a liberação das soluções (azul = isopropanol (B); amarela = TE 0,1×, lavagem (A); verde = GuHCl/amostra (C); vermelha = TE 0,1×, eluição (F)) expostas a determinada rotação (topo da figura) por determinado tempo (base da figura) e o símbolo “X” representa o fechamento da válvula de fita adesiva = válvula para câmara da amostra (e).

(a)

(b)

Fonte: autoria própria

Seguindo as setas na ordem azul, verde, amarela e vermelha é possível observar a ordem em que as soluções foram liberadas.

Após 120 segundos em 295 RPM, a solução de isopropanol representada em azul ultrapassa o sifão e a barreira criada pelo *plugue* de ar formado entre a câmara (azul) e câmara central (verde). Sem que o dispositivo seja parado, a rotação é aumentada para 450 RPM por 40 segundos, momento em que toda a solução da câmara central vai para o descarte. Por fim, após 15 segundos sendo rotacionado a 500 RPM e mais 15 segundos em 600 RPM, a solução da câmara amarela passa pela câmara central seguindo para o

descarte, que nesse momento se encontra cheio. Por fim, antes que a rotação seja cessada, o dispositivo é rotacionado por 15 segundos a 700 RPM e 5 segundos a 650 RPM, para que a solução da câmara vermelha possa ser direcionada para câmara central e o sistema é parado. Por fim, o dispositivo volta a ser rotacionado, agora a 1000 RPM por 15 segundos e a solução vermelha presente na câmara central é deslocada para câmara de coleta de amostra, ultrapassando a válvula de fita adesiva.

O filme utilizado para obtenção do dispositivo final foi a primeira caixa de 3MCG6000 – 1, e por fim, esse dispositivo foi utilizado para extração de DNA genômico humano em amostras de urina fortificadas com padrão de DNA.

Com o fim dos filmes da primeira caixa de 3MCG6000 – 1, foi dada continuidade nos experimentos com os filmes 3MCG6000 – B e MARES, filmes disponíveis no momento. Foram realizadas apenas adaptações em relação as dimensões dos canais e câmaras para cada filme, as quais não serão apresentadas aqui, uma vez que não foi possível a utilização destes filmes na etapa biológica, o que será explicado no item 4.5.2. Com isso, foi necessária a substituição destes filmes e por isso, na sequência, será apresentado o novo dispositivo desenvolvido, agora não mais PeT mas PeDF.

4.4.2.2.2 PeDF

Para o desenvolvimento dos dispositivos de PeDF foi utilizado o filme Terphane como base e topo, e o filme 3MCG6000 – B como camada intermediária entre duas fitas dupla face, como na configuração descrita no item 3.5.1.2.

A mudança na microfabricação com a substituição do toner pela fita dupla face, levou ao redimensionamento do dispositivo, uma vez que nesta nova configuração, a altura das câmaras e canais é maior. Além disso, no decorrer dos experimentos, observou-se que a válvula de fita adesiva utilizada entre a câmara central e câmara de amostra não apresentou a mesma taxa de sucesso que quando utilizada no dispositivo PeT de extração automatizada. Assim, a válvula de fita adesiva entre a câmara central e câmara de amostra foi substituída, como pode ser visto na Figura 44.

Figura 44–Dispositivo final de PeDF automatizado para extração de DNA, no qual estão identificados: (A) câmara da solução aquosa de lavagem 2, 20 μL (11,6 mm $\times$ 1,9 mm) e (6 mm $\times$ 2,3 mm); (a) combinação de sifão e válvula capilar; (B) câmara para solução de lavagem 1, 9 μL (7,4 mm $\times$ 3 mm); (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de lavagem 1; (C) câmara central, 8 μL (raio maior, 6,4 mm e, raio menor, 3,2 mm); (D) Câmara de descarte, 27 μL total (7,7 mm $\times$ 5 mm; 7,2 mm $\times$ 5,5 mm); (d) válvulas de sifão combinadas a válvula capilar interligando câmara central e descarte; (E) câmara para coleta de amostra, 7,4 μL (4,8 mm de diâmetro); (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; (F) câmara para solução de dessorção, 6,15 μL (8 mm $\times$ 1,7 mm); (f) combinação sifão com válvula capilar; e (g) orifício para ventilação da câmara de amostra (3).

Fonte: autoria própria

Dentre as modificações realizadas nesse dispositivo PeDF (3) em relação aos anteriores (1) e (2), podemos destacar a adição de mais uma câmara (A), consequentemente, possibilitando o aumento do volume da solução comportada por estas câmaras. Outra modificação importante está no canal de entrada das câmaras A, B e F até a câmara central, as quais foram todas centralizadas para um único canal ao topo da câmara central. Com isso, é possível garantir que toda a câmara entre em contato com a solução que sai de cada uma destas câmaras independentes, além de diminuir a possibilidade de formação de bolhas causadas pelos canais laterais. Além disso, os canais que ligam as câmaras F e A até esse canal central, foram reduzidos para a largura de uma linha, consequentemente, a largura mínima do laser, que fica em torno de 196 μm .

Por último a modificação da válvula de entrada na câmara de amostra, a qual foi substituída por um sifão combinado a uma válvula capilar (e). Isso aliado a pressão contrária causada por um *plugue* de ar aprisionado dentro da câmara de amostra, a qual durante todo o procedimento permanece com o orifício de ventilação fechado (g). Ainda é possível observar que o dispositivo já não é composto por apenas duas dimensões, a câmara de coleta (E) está localizada em outro plano, o que será melhor explicado abaixo.

Na Figura 45, podemos observar o protocolo de rotação e tempo otimizados para esse dispositivo, sendo que as válvulas estão indicadas de acordo com o desenho da Figura 44.

Figura 45 – Rotação e tempo determinados para ruptura de cada uma das válvulas utilizadas no dispositivo PeDF de extração automatizado (n = 6). As válvulas foram indicadas de acordo com o desenho apresentado na Figura 44, no entanto, na ordem de ruptura. Sendo que, (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de isopropanol; (d) válvulas de sifão combinada a válvula capilar interligando câmara central e descarte; (a) combinação de sifão e válvula capilar; (f) combinação sifão com válvula capilar; (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; e (g) orifício para ventilação da câmara de amostra.

Fonte: autoria própria

Os experimentos descritos aqui foram realizados utilizando o novo sistema de rotação (Figura 32) e não mais o sistema de *spin coating*. Por isso, foi possível observar o comportamento das soluções dentro do dispositivo com o incremento da rotação sem a necessidade de interromper o procedimento. O novo procedimento trabalha em uma faixa de rotação maior que o dispositivo anterior, entre 350 e 2000 rpm, para a primeira e última válvula, respectivamente. Além disso, o tempo total do procedimento de rotação

fica em 2 min e 15 s, quase um minuto a menos que o dispositivo anterior.

Na Figura 46a é possível observar a foto do dispositivo final de PeT utilizado, assim como um aumento da região de ligação entre os dois planos do dispositivo, Figura 46b. Na Figura 46c, o protocolo de movimentação das soluções de acordo com a ordem de ruptura das válvulas.

Figura 46 – Foto do dispositivo otimizado e utilizado para extração de DNA (a). Aumento da região de interligação entre as duas camadas de dispositivos (b). Representação esquemática do protocolo de rotação e tempo otimizados com auxílio de corantes para dispositivo PeDF de extração automatizada, nos quais as setas representam a liberação das soluções (azul = isopropanol (B); amarela = TE 0.1 x, lavagem (A); verde = GuHCl/amostra (C); vermelha = TE 0.1 x, eluição (F)) expostas a determinada rotação (topo da figura) por determinado tempo (base da figura); o pontilhado vermelho destaca o ponto de ligação entre os dois dispositivos (c). Para acompanhar o procedimento é necessário que sejam seguidas as setas na ordem azul, verde, amarela e vermelha, respectivamente.

Fonte: autoria própria

Quando rotacionado a 350 RPM, a primeira solução representada em azul passa pelo sifão e válvula capilar depois de 40 s para chegar até a câmara central, sendo que toda a solução é liberada após 60 s, seta azul. Durante esse procedimento de rotação, após 60 s, a solução presente na câmara central passa pelo sifão em direção ao descarte, representado pela seta verde. A rotação é incrementada para 970 RPM, quando a

solução presente na câmara amarela é direcionada para câmara central após 15 s e imediatamente direcionada para o lixo. A rotação é novamente incrementada para 1180 RPM por 30 s, para que a solução vermelha possa chegar até a câmara central, e a rotação é interrompida. Em seguida, o dispositivo é novamente rotacionado em 2000 RPM durante 30 s, e a solução vermelha presente na câmara central rompe a válvula sendo direcionada para câmara de amostra, podendo então ser coletada com uma seringa.

4.4.3 Câmara de *mettering*

Durante todo o desenvolvimento do dispositivo de extração automatizado, trabalhou-se com volume de dessorção em torno de 6 μL . Porém, pensando em trabalhar com o menor volume de reação para IV-PCR, não é possível utilizar todo o volume de amostra obtida na câmara central. Com isso, houve a necessidade de aliquotar a amostra, ou seja, separar um determinado volume para câmara da reação mantendo o restante em outra câmara.

Para isso, foi acoplado ao dispositivo de extração um módulo chamado *mettering*, o qual possui a capacidade em separar 2 μL do total de 6,2 adicionados na câmara principal.

O volume adicionado na câmara de 6,32 μL foi determinado experimentalmente, sendo que o adicionado com base no volume da pipeta utilizada foi de 6,2 μL . Portanto, o volume determinado experimentalmente é 1,9% maior que o teórico, diferença que pode ter sido causada por erro durante a operação da pipeta, erro da balança e/ou má calibração da pipeta.

O desvio do volume coletado na câmara 1 entre os dispositivos foi em torno de 5%, variando entre 2,2 e 2,4 μL . Já o desvio em relação ao volume de solução que permaneceu dentro do dispositivo foi de 3%. Considerou-se esse desvio aceitável levando em conta a dificuldade em relação ao pequeno volume a ser aliquotado, 2 μL .

4.4.4 Dispositivo de amplificação

O dispositivo de amplificação consiste em uma câmara reacional e uma câmara de referência, como foi apresentado no item 3.6.3, Figura 16. No entanto, para que ele possa

ser integrado ao dispositivo de extração, é necessário que as demais soluções, necessárias para compor a mistura reacional da PCR, também sejam acopladas ao dispositivo. Por isso, foi desenvolvido o dispositivo apresentado na Figura 47, utilizando os filmes Terphane, 3MCG6000-B e 3MPP2200, na fabricação de um dispositivo formado por PeDF e PeT.

Figura 47 – Desenho da versão final do dispositivo de amplificação, no qual estão identificados: (C) câmara central, 8 μL (raio maior 6 mm e raio menor 2,0 mm); (E) câmara para coleta de amostra, 7,4 μL (4,8 mm de diâmetro); (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; (G) câmara para *primers*, 0,5 μL (1,7 mm de diâmetro); (g) canal de ligação entre câmara G e H; (H) câmara para mistura reacional, 2,5 μL (3,4 mm de diâmetro); (h) válvula capilar; (i) sifão; (J) canal da câmara *mettering* para câmara de reação; (K) câmara que antecede o dispositivo de amplificação; (k_1 e k_2) canais para mistura; (l) orifício para ventilação; (m) orifício de interligação com o terceiro plano do dispositivo; (m') orifício no terceiro plano para ligação com o segundo plano; (N) câmara para PCR (1,8 mm $\times$ 0,9 mm); (o) válvula hidrofóbica de toner (7 mm $\times$ 7,3 mm); (P) câmara de referência para controle da temperatura.

Fonte: autoria própria

Dentre as modificações, uma câmara para mistura reacional foi adicionada no primeiro plano do dispositivo (H), assim com uma válvula capilar (h) para controlar essa solução e a solução dos *primers*, que será colocada separadamente em uma outra câmara (G) no segundo plano do dispositivo e são interligadas por um canal (g). É possível observar que o segundo plano foi todo modificado, contando com uma câmara de

mettering (E) para amostras (discutida no item 4.4.3), válvulas de sifão (i) para controle da chegada da *master mix* e *primers* e ainda canais não lineares (k_1 e k_2) para promover a mistura destas soluções.

Ainda no segundo plano do dispositivo, a câmara K, que exerce uma pressão contrária a todo o sistema enquanto a ventilação (I) permanece fechada, aumentando a resistência para que as soluções cheguem a câmara reacional no dispositivo de amplificação.

O ponto de ligação entre o segundo plano do dispositivo (PeDF) e o terceiro (PeT) é representado na letra m e m', respectivamente. Esse ponto de ligação é fixado com o auxílio de uma fita dupla face fixada na superfície do segundo plano e nas costas do terceiro. Não foi observado vazamento nesse ponto durante os experimentos e os dispositivos também não se soltaram. No terceiro plano ainda temos a câmara reacional representada por N, a válvula de toner por o e a câmara de referência por P.

Na Figura 48 apresentamos o protocolo de rotação do dispositivo de amplificação.

Figura 48 – Rotação e tempo determinados para ruptura de cada uma das válvulas utilizadas no dispositivo PeDF - PeT, de amplificação automatizado ($n = 6$). As válvulas foram indicadas de acordo com o desenho apresentado na Figura 47, no entanto, na ordem de ruptura. Sendo que, (h) válvula capilar; (g) canal; (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; (i) sifão.

Fonte: autoria própria

O sistema de rotação utilizado foi o descrito no item 4.2 (Figura 32), sendo que a melhor combinação de rotação determinada para esse dispositivo está dentro da faixa de rotação otimizada para o dispositivo de extração automatizado, 970 e 2000 RPM. O

tempo total do procedimento de rotação nesse dispositivo é de 45 s. Podemos observar na Figura 49, o movimento das soluções no dispositivo de acordo com o protocolo de rotação e tempo otimizados.

Figura 49 – Representação esquemática do protocolo de rotação e tempo otimizados com auxílio de corantes para dispositivo PeDF - PeT de amplificação automatizado, nos quais as setas representam a liberação das soluções (rosa = mistura reacional sem *primers*; preto = *primers*; vermelha = amostra; laranja = amostra + mistura reacional) expostas a determinada rotação (topo da figura) por determinado tempo (base da figura).

Fonte: autoria própria

Após 15 s sendo rotacionado a 970 RPM, a solução rosa ultrapassa a válvula capilar chegando no canal do sifão. Um incremento na rotação para 2000 RPM por 30 s permite que a solução preta seja liberada para o sifão onde já se encontra a solução rosa, nos primeiros 15 s. Por fim, a solução vermelha chega até a câmara de *metting* enquanto outra parte é aliqüotada e direcionada para câmara de reação (laranja), ao mesmo tempo em que a solução aprisionada no sifão é direcionada para câmara reacional (preta).

Nesse ponto, o dispositivo é retirado da plataforma e levado para o sistema de PCR-IV. Alguns pontos importantes em relação ao design do dispositivo que está relacionado ao aquecimento durante a PCR, serão discutidos no item 4.6.

4.4.5 Dispositivo Integrado para análise molecular

Por fim, com todos os módulos otimizados, foi dado início a integração do dispositivo. Isso só foi possível com o acoplamento de três planos diferentes, formando um dispositivo obtido por meio de duas tecnologias distintas de microfabricação, utilizando diferentes filmes e, conseqüentemente, com três planos diferentes interligados. Na Figura 50 é possível observar os três diferentes planos sendo que os dois primeiros são dispositivos de PeDF e o último PeT.

Figura 50 – Desenho da versão final do dispositivo integrado de análise molecular, no qual estão identificados: (A) câmara da solução aquosa de lavagem 2, 10 μL (17 mm $\times$ 1,9 mm) e 10 μL (11,4 mm $\times$ 2,9 mm); (a) combinação de sifão e válvula capilar; (B) câmara para solução de lavagem 1, 9 μL (8,8 mm $\times$ 3,5 mm); (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de lavagem 1; (C) câmara central, 8 μL (raio maior 6 mm e raio menor 2,0 mm); (D) Câmara de descarte, 27 μL total (7 mm $\times$ 6 mm; 7,5 mm $\times$ 6 mm); (d) válvulas de sifão combinada a válvula capilar interligando câmara central e descarte; (E) câmara para coleta de amostra, 7,4 μL (4,8 mm de diâmetro); (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; (F) câmara para solução de dessorção, 6.15 μL (9 mm $\times$ 1,9 mm); (f) combinação sifão com válvula capilar; e (G) câmara para *primers*, 0,5 μL (1,7 mm de diâmetro); (g) canal de ligação entre câmara G e H; (H) câmara para *mistura reacional*, 2,5 μL (3,4 mm de diâmetro); (h) válvula capilar; (i) sifão; (J) canal da câmara *mettering* para câmara de reação; (K) câmara que antecede o dispositivo de amplificação; (k_1 e k_2) canais para mistura; (L) orifício para ventilação; (m) orifício de interligação com o terceiro plano do dispositivo; (m') orifício no terceiro plano para ligação com o segundo plano; (N) câmara de reação (1,8 mm $\times$ 0,9 mm); (o) válvula hidrofóbica de toner (7 mm $\times$ 7,3 mm); (P) câmara de referência para controle da temperatura.

Fonte: autoria própria

É possível observar que não houve mais modificações no dispositivo final em relação a combinação do dispositivo automatizado de extração e do dispositivo de amplificação. O protocolo otimizado de rotação e tempo referente a combinação dos três planos do dispositivo pode ser observado na Figura 51.

Figura 51 – Rotação e tempo determinados para ruptura de cada uma das válvulas utilizadas no dispositivo integrado PeDF- PeT de análise molecular (n = 6). As válvulas foram indicadas de acordo com o desenho apresentado na Figura 50, no entanto, na ordem de ruptura. Sendo que, (b) sifão e válvula capilar para controle da liberação da solução de isopropanol; (d) válvulas de sifão combinada a válvula capilar interligando câmara central e descarte; (a) combinação de sifão e válvula capilar; (h) válvula capilar; (f) combinação sifão com válvula capilar; (g) canal; (e) combinação de sifão e válvula capilar para fechamento e abertura do canal para amostra; (i) sifão.

Fonte: autoria própria

Como no último dispositivo, esses experimentos também foram realizados utilizando o último sistema de rotação desenvolvido (Figura 32). A faixa de rotação de trabalho continua entre 350 e 2000 RPM e o tempo do procedimento de rotação também foi o mesmo que para o dispositivo de extração automatizado. Podemos observar uma foto do dispositivo integrado na Figura 52.a, assim como o movimento das soluções seguindo o protocolo de rotação e tempo otimizado (Figura 52.b).

Figura 52 – Foto do dispositivo otimizado e utilizado para extração de DNA (a). Representação esquemática do protocolo de rotação e tempo otimizados com auxílio de corantes para dispositivo PeT de extração automatizado, nos quais as setas representam a liberação das soluções (azul = isopropanol; amarela = TE 0,1×, lavagem; verde = GuHCl; vermelha = TE 0,1×, eluição; rosa = mistura reacional sem *primers*; preto = *primers*; laranja = amostra + mistura reacional) expostas a determinada rotação (topo da figura) por determinado tempo (base da figura) (b).

(a)

(b)

Fonte: autoria própria

Neste momento, há um aumento na complexidade do movimento das soluções. Por isso, é importante acompanhar as setas na ordem, azul, verde, amarela, vermelha, rosa, preta, roxa e laranja.

A primeira etapa do movimento das soluções é muito parecida com o dispositivo PeDF de extração automatizado. A primeira solução azul só chega até a câmara central quando o dispositivo é rotacionado a 350 RPM por 60 s (seta azul). No entanto, só é direcionada para o descarte após 5 min sendo rotacionado a 970 RPM (seta verde), sendo que mantido nesta rotação por mais 10 min, permite com que a solução amarela rompa a válvula, chegue a câmara central e seja direcionada para o descarte. Ainda durante este procedimento de rotação, a solução rosa ultrapassa a válvula capilar chegando no canal do sifão. Um incremento para 1180 RPM por 30 s permite que a solução vermelha chegue até a câmara central. A rotação é interrompida, o orifício de ventilação é liberado e o dispositivo volta a ser rotacionado a 2000 RPM por um período total de 30 s. Nos quinze primeiros segundos, a solução preta é liberada para o sifão onde já se encontra a solução rosa. Por fim, a solução vermelha chega até a câmara de *mettering* enquanto outra parte é aliquoteada e direcionada para câmara reacional (laranja), ao mesmo tempo em que a solução aprisionada no sifão é direcionada para câmara reacional (preta).

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA POR DSPE EM DISPOSITIVOS DE POLIÉSTER

4.5.1 Dispositivo de PeT convencional × PeT semiautomatizado

Com o dispositivo de PeT semiautomatizado desenvolvido na primeira fase do doutorado, durante o estágio na *University of Virginia*, foram realizadas extrações de DNA em amostras de sangue as quais foram avaliadas quanto à quantidade de DNA obtido e qualidade do DNA para a etapa de amplificação do gene β -globina por PCR. Ao contrário do trabalho de Duarte *et al.*, (2011),⁴¹ no qual foi avaliado um perfil de dessorção, pois foram coletadas várias frações de 2 μ L cada, no dispositivo de PeT semiautomatizado apenas uma fração foi coletada. Desta forma, o objetivo do dispositivo integrado é que a primeira fração eluída seja automaticamente direcionada para câmara de amplificação e após este procedimento o dispositivo seja descartado, não sendo realizadas outras eluições.

Na Figura 53 é possível observar a eficiência da extração na primeira fração de dessorção no dispositivo com lavagem semiautomatizada comparando com os resultados obtidos utilizando dispositivo desenvolvido por Duarte *et al.*, (2011).⁴¹

Figura 53 – Média da eficiência de extração (n = 4) comparando a utilização do dispositivo PeT semiautomatizado e dispositivo dSPE desenvolvido por Duarte *et al.*, (2011)⁴¹. Os valores de eficiência para os dois dispositivos não são significativamente diferentes, segundo teste Tukey (95%).

Fonte: autoria própria

É importante ressaltar que o volume da primeira fração utilizando o dispositivo semiautomatizado é de 6 μL enquanto que para o dispositivo manual⁴¹ é de 2 μL . A eficiência obtida, considerando os 6 μL , utilizando o microdispositivo semiautomatizado foi equivalente ao obtido com o dispositivo desenvolvido por Duarte *et al.*, (2011).⁴¹ Na utilização do dispositivo de Duarte *et al.*, (2011)⁴¹ há grandes chances de perda de amostra principalmente nas etapas de adição da amostra dentro do canal e coleta do DNA dessorvido. Isso porque esses procedimentos devem ser realizados de forma que a adição de amostra ou solução de dessorção em uma extremidade seja realizada simultaneamente a retirada do mesmo volume na extremidade oposta, solução de GuHCl ou DNA dessorvido, respectivamente. Isso para que toda amostra entre no canal sem transbordar no orifício de entrada assim como todo o DNA dessorvido seja coletado sem se espalhar no orifício de saída. No entanto, o desvio entre as eficiências de extração nesse dispositivo foi menor que o observado no dispositivo semiautomatizado, $\pm 2,8$ e $\pm 6,8$ respectivamente.

Uma possível explicação para o maior desvio observado no dispositivo semiautomatizado pode estar relacionada ao fato de que durante a etapa de dessorção do DNA, foi observado que as *micropartículas* ficaram aprisionadas abaixo do suporte da válvula de fita adesiva entre a câmara principal e a câmara de coleta do descarte. Com isso, parte das partículas nas quais moléculas de DNA estavam enoveladas, não foram

agitadas corretamente e com isso a dessorção foi menos eficiente. Essa hipótese pode ser comprovada devido ao fato de que o descarte obtido também foi analisado para quantificação de DNA, no entanto, apresentou quantidades menores que 1 ng de DNA, equivalente ao observado para a amostra com maior eficiência.

Nesta etapa foi importante observar que a lavagem realizada de forma automatizada não afetou negativamente os resultados da eficiência de extração quando comparado com o dispositivo com lavagem manual. Ou seja, a passagem das soluções de lavagem pela câmara central onde as micropartículas estão localizadas não removeu a maior parte do DNA adsorvido para o descarte, o qual foi recuperado no momento da dessorção.

Para avaliação da eficiência da lavagem no dispositivo semiautomatizado, as amostras foram utilizadas para amplificação do DNA genômico humano proveniente de amostras de sangue. Na Figura 54 é possível observar os resultados obtidos no equipamento de separação de ácido nucleicos, Bioanalyzer.

Figura 54 – Eletroferograma obtido utilizando kit para separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, referente ao produto de amplificação do gene β -globina presente no DNA genômico humano extraído por dSPE no dispositivo de PeT semiautomatizado em amostras de sangue. Nos eletroferogramas está destacado (*) o pico referente ao produto de amplificação do gene β -globina entre os marcadores de tamanho de 15 e 1500 pb.

Fonte: autoria própria

É possível observar que houve a amplificação do gene na amostra de DNA extraída no microdispositivo. Confirmando a efetividade da lavagem automatizada, uma vez que

essa foi suficiente para proporcionar a qualidade da amostra requerida pela técnica de amplificação.

4.5.2 Dispositivo de PeT automatizado

Para confirmar o funcionamento do dispositivo PeT de extração automatizado, foi realizada a extração de DNA genômico humano em amostras de urina fortificada e as amostras quantificadas por fluorescência.

As amostras utilizadas continham quantidade inicial de 1,2 ng de DNA, sendo que segundo os resultados obtidos foi recuperado em torno de 0,34 ng em apenas uma etapa de dessorção com 6,2 μ L de Tris-EDTA. A eficiência obtida para as extrações por dSPE no dispositivo PeT automatizado foi menor que os resultados obtidos em experimentos realizados de forma similar em tubo, $28 \pm 4,5\%$ contra $38 \pm 15,2\%$ em tubo. No entanto, é possível observar que o desvio entre a eficiência obtida em diferentes extrações em tubo foi muito maior que no dispositivo automatizado.

Ainda que a eficiência de extração seja baixa quando comparada com o resultado encontrado em outros trabalhos de extração dinâmica em fase sólida, vale ressaltar que esse valor corresponde a coleta de apenas uma fração após os 5 minutos de dessorção do DNA das micropartículas.

Após a obtenção destes resultados foi necessária a utilização dos filmes de uma nova caixa de transparência 3M CG 6000, essa identificada como “B”, isso porque acabaram os filmes da primeira caixa, “A”. Portanto, o protocolo de rotação no novo dispositivo foi otimizado e foram realizados testes para extração de DNA de amostras contendo 20 e 1,25 ng de DNA. Porém, todas as extrações realizadas neste dispositivo foram ineficientes, apresentando valores de fluorescência próximo de zero, devido às baixas concentrações obtidas na amostra final, como pode ser visto na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentração de DNA na amostra final de extração por dSPE em quatro microdispositivos PeT 3MCG6000 – 2, partindo da mesma amostras de urina fortificada com diferentes quantidades iniciais de DNA.

3MCG 6000 – 2	Quantidade de DNA inicial (ng)	Concentração final (ng/μL)
<i>Chip 1a</i>	20	Fluorescência = zero*
<i>Chip 2a</i>	20	0,07
<i>Chip 1b</i>	1,25	Fluorescência = zero*
<i>Chip 2b</i>	1,25	

* não foi possível quantificar as amostras em relação a curva de calibração uma vez que o resultado obtido para fluorescência foi igual a zero.

Fonte: autoria própria

Devido à ineficiência das extrações utilizando o dispositivo 3M CG 6000 da “2”, buscou-se descobrir e solucionar o problema, uma vez que a etapa de microfluídica já estava solucionada. Para isso, foram levantadas algumas hipóteses as quais serão discutidas abaixo.

- *Hipóteses, viabilidade e alternativas.*

Após observado que a extração utilizando o dispositivo fabricado de poliéster 3MCG6000 – B não apresentou resultados satisfatórios como observado pelos filmes da caixa 1, foram levantadas algumas hipóteses. Dentre elas a perda de DNA na etapa de lavagem e perda do DNA por adsorção na superfície do filme. Para confirmar essas hipóteses, avaliar a viabilidade de uso do filme 3M CG6000 – B em dispositivos para análise molecular e identificar possíveis substitutos para esse filme foram realizados os passos descritos nos itens A, B e C, utilizando amostras com quantidade final de 20 e 40 ng de DNA.

A. Falha na etapa de lavagem – dSPE em microdispositivo não automatizado⁴¹

Uma das hipóteses levantadas para explicar a ineficiência da extração com os dispositivos de poliéster 3MCG6000 – B foi a ineficiência da etapa de lavagem. Essa etapa é crucial, tanto para que não se remova o DNA adsorvido na superfície do filme, quanto para que toda a GuHCl e isopropanol sejam removidos.^{23,41,45,190} A presença de ambos dificulta a dessorção do DNA e levam a inibição da reação de amplificação.^{23,34}.

Para verificar essa hipótese foram realizadas extrações utilizando os dispositivos fabricados como descrito no trabalho de Duarte et al., (2011)⁴¹ com os filme 3MCG6000 – B e MARES. A amostra utilizada para esse teste foi uma solução de padrão de DNA genômico humano na concentração de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, sendo adicionado no dispositivo um total de 20 ng, contido em 2 μL de amostra.

Na Figura 55 temos as fotos dos dispositivos MARES (a) e 3MCG6000 – 2 (b) ao final da extração.

Figura 55 – Foto do microdispositivo de extração não automatizado de poliéster (a) MARES e (b) 3M CG6000 “B” ao final da extração de DNA a partir de amostra de urina fortificada com padrão pré- purificado.

Fonte: autoria própria

Para os dispositivos MARES, foi observado que durante a etapa de dessorção do DNA o movimento das micropartículas dentro do canal foi dificultado, isso porque as partículas grudaram na superfície do filme. Na Figura 56, é possível observar que todo o canal ficou recoberto como se fosse pintado pelas micropartículas ao final da extração em (a). O mesmo não foi observado para a extração nos dispositivos fabricados com poliéster 3MCG6000 – B (b) nos quais as partículas ao final do procedimento ainda permaneciam livres em solução.

As soluções finais obtidas no processo de extração foram quantificadas por fluorescência e comparadas com a extração da mesma amostra realizada em tubo. No entanto, mais uma vez os resultados de extração foram ineficientes, como pode ser observado no Figura 56.

Figura 56 – Média da eficiência da extração de DNA a partir de amostras de urina fortificada com padrão pré-purificado (n = 3) em microdispositivo automatizado de poliéster de diferentes marcas e em tubo.

Fonte: autoria própria

Com base nos resultados da eficiência de extração e nas observações realizadas durante e ao final do experimento, podemos concluir que a etapa de lavagem não foi responsável pelos baixos resultados de eficiência no dispositivo automatizado. Isso por que o mesmo aconteceu no dispositivo não automatizado, no qual o procedimento já é bem estabelecido.⁴¹ Além disso, a eficiência na extração realizada em tubo com as mesmas soluções e amostra utilizadas em chip apresentou eficiência coerente com os resultados anteriores, descartando problemas com as soluções. Ainda em relação as extrações nos dispositivos, a baixa eficiência observada para microdispositivos fabricados com poliéster MARES possivelmente tem relação com a dificuldade em movimentar as micropartículas durante a etapa de dessorção. Visto que a movimentação nesta etapa é crucial para obtenção de alta eficiência na extração.^{41,45}

Outra forma escolhida para verificar a presença de DNA nas amostras obtidas nas extrações em microdispositivo não automatizado 3MCG6000 – B e nas extrações em tubo, foi a aplicação direta da amostra no gel de agarose 1%. Devido à dificuldade na movimentação das micropartículas observada para os dispositivos MARES, os mesmos não foram utilizados nestes testes.

Na Figura 57, é possível observar uma foto do gel para extrações realizadas em tubo (a) e em microdispositivo não automatizado 3MCG6000 – B (b), respectivamente.

Figura 57 – Gel de agarose 1% de amostras de extração de DNA realizadas em tubo (a) e microdispositivo não automatizado 3MCG6000 – B (b), com quantidade inicial de DNA na amostra de 20 (1a - 8a; 1b - 9b) e 40 ng (9a - 16a; 11b - 19b). Frações da lavagem com isopropanol (1, 5, 9 e 13)a e (1, 4, 7, 11, 14 e 17)b. Frações de lavagem com TE 0.1X (2, 6, 10 e 14)a e (2, 5, 8, 12, 15 e 18)b. Frações após a primeira etapa de dessorção do DNA (3, 7, 11 e 15)a e (3, 6, 9, 13, 16 e 19)b. Frações após a segunda etapa de dessorção do DNA (4, 8, 12 e 16). Padrão de DNA genômico humano em TE 1X, 5 ng (17)a e (10)b.

Fonte: autoria própria

Pelos resultados dos géis é possível verificar que a primeira fração de amostra em tubo, tanto para amostras com quantidade inicial de DNA de 20 ng como para 40 ng, apresentam quantidade de DNA suficiente para ser observado no gel. No entanto, o mesmo não acontece com as extrações realizadas no microdispositivo 3M CG6000 – B, como se nenhum DNA tivesse sido dessorvido das micropartículas.

B. Adsorção de DNA na superfície do filme

Outra possibilidade levantada foi de que o DNA obtido ao final da extração não pudesse ser quantificado na solução recuperada por estar adsorvido na superfície do filme. Para verificar tal hipótese, foram preparadas amostras contendo 132 ng de padrão de DNA genômico em TE 0,1× e foram realizados dois testes. O primeiro consistiu na extração em dispositivo não automatizado fabricado com o filme 3MCG6000 – B. Com esse experimento esperava-se que ao extrapolar para uma quantidade muito alta de

DNA inicial, ainda que houvesse perda para o descarte e/ou que esse fosse adsorvido na superfície do filme, ainda seria possível quantificar o DNA restante. O segundo teste consistiu em adicionar apenas a amostra dentro da câmara e esperar 5 minutos para retirá-la, possibilitando com que ela ficasse em contato com a superfície do filme pelo tempo correspondente da extração. Com isso, esperava-se observar uma diminuição na quantidade de DNA, caso ocorresse a adsorção na superfície do filme.

Aplicando estas amostras no gel acompanhado de um padrão de concentração conhecida, seria possível quantificar as bandas e verificar a perda de DNA. No entanto, como pode ser observado na Figura 58, nenhuma das amostras coletadas de dentro do dispositivo 3MCG6000 – B após os 5 minutos apresentaram bandas (1 - 6), assim como nenhuma banda foi observada para as amostras extraídas (7 - 12). Sendo possível visualizar apenas a banda referente ao padrão de DNA (10 ng) em TE 0,1×.

Figura 58 – Gel de agarose 1%. Amostras de padrão de DNA genômico humano em TE 1x coletadas de dentro da câmara 3M CG6000 “B” após 5 minutos em contato com o filme (1-6); Amostras provenientes da extração de DNA realizadas em câmara 3MCG6000 – B, amostra com quantidade inicial de 132 ng de padrão de DNA genômico humano em TE 1× (7 - 9; 10 - 12); Padrão de DNA genômico humano em TE 1×, 10 ng (13).

Fonte: autoria própria.

C. Inibição da reação de amplificação (PCR)

Ainda que não tenha sido possível quantificar por nenhuma das técnicas utilizadas, o DNA extraído e DNA presente na solução que ficou em contato com os dispositivos fabricados com poliéster 3MCG6000 – B, esperava-se que o DNA presente nas soluções testadas fosse passível de amplificação por PCR.

Para isso, 250 ng de padrão de DNA genômico humano em TE 0,1× (10 µL - 25 ng/µL) foi adicionado nas câmaras dos dispositivos fabricado com os diferentes filmes, 3MCG6000 – B, MARES e Terphane. A solução foi coletada após 5 minutos, parte foi utilizada para reação de amplificação e parte foi aplicada diretamente no gel de agarose

1%. Na Figura 59 é possível observar os resultados obtidos para ambos os testes.

Figura 59 – Análise do gel de agarose 1%, do produto de amplificação do gene β -globina de 380 pb (2 - 6), e aplicação direta de DNA genômico humano (7 - 9) presente em amostras retiradas dos dispositivos de poliéster. Marcador de tamanho 1 kb (1); controle negativo (2); controle positivo (3); amplificação do gene β -globina nas amostras após 5 minutos nas câmaras: 3M CG6000 – B (4), Terphane (5) e MARES (6); Aplicação direta das amostras retiradas das câmaras: Terphane (7), 3M CG6000 – B (8) e MARES (9).

Fonte: autoria própria

Podemos observar que a PCR funcionou tanto para o controle positivo (3) como para as amostras obtidas dos dispositivos fabricados com Terphane (5) e MARES (6). No entanto, representada pelo asterisco (4), o mesmo não foi observado para os dispositivos fabricados com o filme 3MCG6000 – B, confirmando a inibição da reação de amplificação. As canaletas 7 – 9, que correspondem à aplicação direta da amostra de DNA genômico retirado da câmara do dispositivo Terphane e MARES apresentaram claramente a presença de DNA na amostra. No entanto, como já observado em experimentos anteriores, o dispositivo 3MCG6000 – B não permite a visualização do DNA, canaleta 8.

Com base nos resultados observados nesta etapa do trabalho, constatou-se que não era possível a utilização dos filmes 3MCG6000 e MARES para fabricação do dispositivo de extração. Já o filme Terphane, apesar de não possibilitar a microfabricação de dispositivos de PeT, demonstrou-se compatível com a metodologia de extração. Por isso, os dispositivos de PeT foram substituídos pelos dispositivos de PeDF.

4.5.3 Dispositivo de PeDF automatizado

Uma vez otimizado o protocolo de rotação do dispositivo automatizado de PeDF foram realizadas extrações de DNA de diferentes fluidos biológicos. Dentre eles amostras de sangue, urina e meio de cultura de bactéria. Abaixo apresentamos os resultados obtidos em relação a eficiência de extração e qualidade do DNA extraído.

Uma das principais diferenças no protocolo de extração nesse dispositivo em relação ao PeT automatizado foi o aumento do volume de lavagem com TE 0,1×, que era de 10 µL e passou para 20 µL. Esse aumento possibilitou melhor controle das soluções dentro do dispositivo e ainda pode proporcionar melhor lavagem das partículas.

4.5.3.1 DNA Genômico humano em amostras de sangue

A amostra de sangue lisado continha em torno de 30 ng de DNA, o que pode ser determinado com base na quantidade de células brancas presentes na amostra original. Foi possível a recuperação de aproximadamente 10 ng do DNA inicial, proporcionando uma eficiência de $32,3 \pm 1\%$ ($n = 3$).

A porcentagem de eficiência de extração em amostras de sangue obtida com o dispositivo PeDF automatizado foi superior ao obtido com o dispositivo PeT semiautomatizado, descrito neste trabalho. Confirmando que o aumento do volume de solução de lavagem TE 0,1× não acarretou maior remoção do DNA para o descarte.

No entanto, a eficiência ainda é abaixo daquela obtida por Duarte et al. (2011)⁴¹ utilizando um dispositivo não automatizado. No dispositivo de PeT não automatizado, Duarte et al. (2011)⁴¹ obteve uma eficiência em torno de $69,7 \pm 5,7\%$, considerando duas frações eluídas, em um total de 4 µL. Esse valor é superior ao obtido com o dispositivo PeDF automatizado, com eficiência de $32 \pm 1\%$ em uma única fração de 6,2 µL. A menor porcentagem de eficiência em relação ao trabalho de Duarte e colaboradores⁴¹ pode estar relacionada com a etapa de dessorção do DNA das micropartículas de sílica magnética. Na qual, a agitação mais eficiente está diretamente relacionada a quantidade de DNA recuperado.^{34,41,45}

Ainda que a eficiência do dispositivo automatizado tenha sido menor que o não automatizado, a concentração obtida em uma única fração foi de $1,62 \pm 0,03 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, suficiente para reação de amplificação por PCR, como pode ser observado na Figura 60.

Figura 60 – Eletroferograma obtido utilizando kit para separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, referente ao produto de amplificação do gene β -globina presente no DNA genômico humano extraído por dSPE de amostras de sangue em dispositivo de PeDF automatizado. Nos eletroferogramas está destacado (*) o pico referente ao produto de amplificação do gene β -globina entre os marcadores 15 e 1500 pb. Reação de amplificação realizada em tubo.

Fonte: autoria própria

Além de ter sido obtido em quantidade suficiente, a amplificação do fragmento do gene β -globina confirma a qualidade do DNA extraído. Consequentemente, o dispositivo é passível de ser utilizado para extração de DNA em amostras de sangue para aplicações de análises genéticas, como diagnóstico molecular.

4.5.3.2 DNA Genômico humano em amostras de urina

Para avaliação da utilização do dispositivo de extração PeDF automatizado foram utilizadas amostras de urina fortificadas com padrão de DNA genômico humano.

Como já demonstrado com o dispositivo automatizado de PeT, foi possível a extração de uma quantidade expressiva de DNA livre na urina, partindo de amostras com concentrações em torno de $0,6 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, obtendo-se eficiência de extração em torno de $26 \pm 5\%$.

Assim como para o DNA obtido das amostras de sangue, o DNA obtido das amostras de urina também foi utilizado na reação de PCR em tubo para amplificação do gene β -globina, como pode ser observado na Figura 61.

Figura 61 – Eletroferograma obtido utilizando kit para separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, referente ao produto de amplificação do gene β -globina presente no DNA gênomico humano extraído por dSPE de amostras de urina fortificada, em dispositivo de PeDF automatizado. Nos eletroferogramas está destacado (*) o pico referente ao produto de amplificação do gene β -globina entre os marcadores 15 e 1500 pb. Reação de amplificação realizada em tubo.

Fonte: autoria própria

Mais uma vez, a extração se mostrou eficiente no sentido de proporcionar amostra com qualidade suficiente para utilização nas etapas posteriores de um procedimento de análises genéticas, como a PCR.

4.5.3.3 DNA de bactéria – *Escherichia coli*

Por fim, o dispositivo foi utilizado para extração de DNA de bactéria, em amostras contendo aproximadamente 2×10^6 UFC μL^{-1} , o equivalente a 20 ng de DNA. Foi obtido 6 μL de amostra com aproximadamente 10 ng de DNA total, proporcionando uma eficiência de extração em torno de $53 \pm 0,94\%$.

A quantidade e qualidade de DNA obtida utilizando o dispositivo de extração PeDF automatizado, foi adequada para amplificação do gene *malB* por PCR em tubo, como pode ser visto na Figura 62.

Figura 62 – Gel de agarose 1,5%. Produto de amplificação do gene *malB* presente no DNA extraído por dSPE de amostras de bactéria *E. coli*, em dispositivo PeDF de extração automatizado. As colunas correspondem ao (1) Padrão de tamanho 100 bp; (2) Controle positivo; (3) Chip 1; (4) Chip 2; (5) Chip 3; (6) Chip 4; (7) Controle negativo; (8) padrão de DNA genômico humano; (9) Padrão de tamanho 100 bp.

Fonte: autoria própria

No gel de agarose é possível observar a amplificação do fragmento de 204 pb presente no gene *malB* para todas as 4 amostras obtidas das extrações realizadas no dispositivo de extração PeDF automatizado, demonstradas nas colunas 3, 4, 5 e 6.

Por fim, podemos concluir que o dispositivo PeDF de extração automatizado é capaz de proporcionar amostras de DNA com qualidade e em quantidade suficientes para o desenvolvimento das etapas de amplificação do DNA por PCR, a qual é muito susceptível a interferentes,^{54,191-193} utilizando diferentes fontes de amostras biológicas.

4.6 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR IV- PCR EM DISPOSITIVOS DE PET

Como descrito no procedimento experimental, dois filmes foram testados para fabricação do dispositivo de amplificação, MARES e 3MPP2200. Como modelo para PCR no dispositivo de amplificação, foi utilizada amostras de DNA de *E. coli*.

4.6.1 DNA de bactéria – *Escherichia coli* K12

É comum a incorporação de aditivos nas mistura reacional para reação de PCR com o objetivo de aumentar a especificidade e rendimento da reação.⁵⁴ No entanto, quando a

reação é realizada em microdispositivos, sabe-se que esses aditivos tornam-se indispensáveis. Isso por que, os canais microfluídicos apresentam uma grande área superficial e possibilitam grande adsorção das biomoléculas na sua superfície, o que pode dificultar a amplificação alvo, devido a menor disponibilidade dos reagentes e amostra.¹²⁰

Foram utilizadas duas metodologias de passivação nos dispositivos de PeT de amplificação fabricados com o filme MARES. A passivação prévia com a adição de BSA⁹⁰ no canal do dispositivo e a dinâmica com adição de BSA^{41,90} e PEG 200 na mistura reacional.

Para isso, foram testadas diferentes porcentagens de PEG 200 na mistura reacional, comparando os resultados em tubo e no microdispositivo de amplificação PeT fabricado com o filme MARES. Com isso, o objetivo era determinar possível inibição da reação,¹²⁰ e ainda a melhor concentração de PEG para realização da PCR no dispositivo de PeT.

Na Figura 63 é possível observar que a reação realizada no tubo não foi inibida até 8% de PEG 200 na mistura reacional, no entanto, nos dispositivos não foi observada a amplificação do alvo em nenhuma das concentrações de PEG utilizadas.

Figura 63 – Eletroferogramas obtidos utilizando kit de separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, correspondente a análise dos produtos das reações de amplificação do gene *malB* (*) em amostras de *E. coli* por PCR em tubo e IV-PCR em microdispositivo PeT fabricado com o filme MARES. Protocolo de reação para a reação por PCR em tubo foi 95 °C – 3 min, 40 ciclos de 95 °C – 2 min, 59 °C – 1 min, 72 °C – 2 min, finalizando com 72 °C – 5 min. Protocolo de reação para reação por IV-PCR em microdispositivo PeT de amplificação fabricado com o filme MARES foi 95 °C – 30 s., 20 ciclos de 95 °C – 30 s., 59 °C – 15 s, 72 °C – 30 s, finalizando com 72 °C – 30 s (correspondente ao protocolo A na Tabela 3). Os eletroferogramas correspondem a: 1% de PEG 200 na mistura reacional, tubo 1(a) e microdispositivo 1 (b); 1,5% de PEG 200 na mistura reacional, tubo 2(a) e microdispositivo 2 (b); 2,5% de PEG 200 na mistura reacional, tubo 3(a) e microdispositivo 3 (b); 3,5% de PEG 200 na mistura reacional, tubo 4 (a) e microdispositivo 4 (b); 8% de PEG 200 na mistura reacional, tubo 5 (a) e microdispositivo 5 (b).

1 (a)

1 (b)

2 (a)

2 (b)

3 (a)

3 (b)

4 (a)

4 (b)

5 (a)

5 (b)

Fonte: autoria própria.

Uma vez determinado que nenhuma das porcentagens de PEG utilizadas causaram inibição da reação em tubo, a quantidade de 8% na mistura reacional foi escolhida para dar continuidade aos experimentos em microdispositivo, ainda que não tenha sido observada produto de amplificação nos testes realizados.

Com isso, o protocolo de aquecimento foi modificado e os tempos em cada temperatura foram aumentados. Novos testes foram realizados utilizando a metodologia de passivação prévia com BSA, e com BSA e 8% de PEG nos dispositivos PeT de amplificação fabricados com o filme MARES, como pode ser observado na Figura 64.

Figura 64 – Eletroferogramas obtidos utilizando kit de separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, correspondente a análise dos produtos das reações de amplificação do gene *malB* (*) em amostras de *E. coli* por IV-PCR (a e b) em microdispositivo PeT fabricado com o filme MARES. Os protocolos utilizados foram (a) 95 °C – 60 s, 20 ciclos de 95 °C – 60 s, 59 °C – 30 s, 72 °C – 60 s, finalizando com 72 °C – 60 s (correspondente ao protocolo B na Tabela 3); (b) 95 °C – 120 s, 20 ciclos de 95 °C – 60 s, 59 °C – 30 s, 72 °C – 60 s, finalizando com 72 °C – 60 s (correspondente ao protocolo C na Tabela 3); (c) Produto da reação de amplificação do gene *malB* em amostras de *E. coli* por PCR em tubo, protocolo de aquecimento foi 95 °C – 3 min, 40 ciclos de 95 °C – 2 min, 59 °C – 1 min, 72 °C – 2 min, finalizando com 72 °C – 5 min.

Fonte: autoria própria

Mesmo com a modificação do protocolo de aquecimento, não foi possível a amplificação do gene *malB* nos dispositivos de PeT, ainda que tenha ocorrido a amplificação em tubo.

Uma das grandes dificuldades em realizar a reação de PCR dentro de dispositivos é o surgimento de bolhas devido as temperaturas utilizadas, o que explicaria a falha das reações apresentadas. No entanto, todos os resultados apresentados são referentes a amplificação em microdispositivo de PeT os quais não continham bolhas durante a reação.

Tendo disponível uma nova caixa de transparência, a 3MPP2200, novos testes foram realizados com os dispositivos PeT fabricados com esse filme. Para esses testes, foi utilizado o último protocolo de aquecimento (C na Tabela 3) e a mesma mistura reacional. No entanto, além da passivação dinâmica com BSA e 8% de PEG, também foram avaliadas a passivação prévia com BSA ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) e com PEG (200). Na Figura 65 é possível observar que os resultados da amplificação por IV-PCR nos dispositivos PeT fabricados com 3MPP2200.

Figura 65 – Eletroferogramas obtidos utilizando kit de separação de fragmentos entre 25 e 1000 pb no equipamento Bioanalyzer, correspondente a análise dos produtos das reações de amplificação do gene *malB* (*) em amostras de *E. coli* por PCR em tubo (a) e IV-PCR em microdispositivo PeT fabricado com o filme 3MPP2200 (b, c e d). Protocolo de reação para a reação por PCR em tubo foi $95^\circ\text{C} - 3 \text{ min}$, 40 ciclos de $95^\circ\text{C} - 2 \text{ min}$, $59^\circ\text{C} - 1 \text{ min}$, $72^\circ\text{C} - 2 \text{ min}$, finalizando com $72^\circ\text{C} - 5 \text{ min}$ (a). O protocolo de aquecimento utilizado para os dispositivos PeT 3MPP2200 foi $95^\circ\text{C} - 120 \text{ s}$, 20 ciclos de $95^\circ\text{C} - 60 \text{ s}$, $59^\circ\text{C} - 30 \text{ s}$, $72^\circ\text{C} - 60 \text{ s}$, finalizando com $72^\circ\text{C} - 60 \text{ s}$ (correspondente ao protocolo C na Tabela 3) (b, c e d). Dispositivo sem passivação estática (b); Dispositivo com passivação estática por BSA $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ (c); Dispositivo com passivação estática por PEG 2000.

Fonte: autoria própria

Podemos observar que a utilização do filme 3MPP2200 na fabricação dos dispositivos foi positiva, no sentido de que mesmo o dispositivo sem passivação possibilitou a amplificação do DNA. Além disso, podemos concluir que a passivação prévia com PEG 200 proporcionou melhores resultados para a reação de amplificação que a passivação prévia com BSA.

Ainda, outra importante diferença entre a amplificação nas diferentes plataformas é o tempo gasto na reação, as quais ficam em torno de 3 h e 40 min para a reação em tubo e 53 min para reação no dispositivo. Consequentemente, os resultados obtidos com o dispositivo são obtidos de forma muito mais rápida que em tubo.

Por tanto, conclui-se que a utilização do filme MARES na fabricação do dispositivo de amplificação deve ser descartada, enquanto que o filme 3MPP2200 passivado com PEG 200 apresenta grande potencial.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Já se sabe que dispositivos de poliéster possui grande potencial para o desenvolvimento de plataformas descartáveis para análises biológicas.^{41,42,44,45,90,117,119} No entanto, fica claro a necessidade em padronizar o filme utilizado, uma vez que de acordo com os resultados apresentados, alguns filmes podem não ser compatíveis com determinados procedimentos, como o observado para o filme MARES E 3MCG6000 em relação ao procedimento de extração. Além disso, diferentes filmes apresentam claramente características de superfície específicas, as quais podem alterar por exemplo sua hidrofobicidade, caracterizada pelo ângulo de contato.

Uma segunda conclusão é que a substituição do toner pela fita dupla face sensível a pressão demonstrou-se adequada para microfabricação dos dispositivos. Esses dispositivos são compatíveis com amostras biológicas, visto os resultados equivalentes de eficiência de extração quando comparados aos dispositivos de PeT. E ainda, a fita dupla face sensível a pressão descarta a necessidade da laminação a quente e possibilita a utilização de outros filmes que não filmes de transparência, os quais estão cada vez mais difíceis de serem encontrados no mercado. Portanto, a utilização da fita dupla face sensível a pressão possibilita a utilização de uma metodologia de microfabricação simples e de baixo custo mesmo para fabricação de dispositivos de maior complexidade, ou seja, microdispositivos com múltiplas camadas interligadas.

Foi possível a obtenção de dispositivos de extração e amplificação controlados pela força centrífuga utilizando apenas válvulas passivas, sem a necessidade de qualquer equipamento adicional e ainda possibilitando uma microfabricação simples. E os resultados de extração e amplificação de DNA de diferentes amostras obtidos utilizando os respectivos módulos, demonstraram-se coerentes com o observado em outros trabalhos. Além disso, possibilitaram a obtenção de amostras com quantidade e qualidade de DNA compatível com análises genéticas. Esses resultados evidenciam a real importância da microfluídica, a qual se mostrou compatível com análises convencionais, no entanto proporcionou a diminuição do consumo de amostra, reagentes e por fim tempo, visto que o protocolo completo de extração é realizado no tempo máximo de 12 minutos e 15 segundos.

Por fim, o dispositivo integrado de extração e amplificação pode ser totalmente automatizado, e com o controle dos fluidos realizado utilizando apenas válvulas

passivas. Essa característica o difere da grande maioria dos dispositivos integrados de análise molecular já descritos na literatura. Além disso, o tempo total para análise completa, preparo de amostra e amplificação de DNA com a movimentação das soluções de forma integrada e automatizada foi realizado em 1 hora e 10 min. Aproximadamente metade do tempo utilizado por metodologias convencionais de extração e amplificação de DNA.

Como perspectivas futuras, ainda fica o desafio em realizar o preparo de amostra seguido da amplificação de um fragmento do DNA no dispositivo PeDF – PeT de análise genética integrado. Ainda, sabe-se da necessidade em integrar a etapa de detecção do fragmento amplificado. Por fim, devido aos avanços relacionados as tecnologias de microfabricação de baixo custo, vemos a possibilidade da utilização do *design* desenvolvido neste trabalho para fabricação de dispositivos em impressora 3D.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NILSSON, M.; GRÅNEMO, J.; BUŠ, M. M.; HAVSJÖ, M.; Allen, M. Comparison of DNA polymerases for improved forensic analysis of challenging samples. **Forensic Science International: Genetics**. v. 24, p. 55–59, 2016.
2. SAUER, E.; REINKE, A. K.; COURTS, C. Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR. **Forensic Science International: Genetics**. v. 22, p. 89–99, 2016.
3. JOHNSON, B. M.; KEMP, B. M. Rescue PCR: Reagent-rich PCR recipe improves amplification of degraded DNA extracts. **Journal of Archaeological Science: Reports**. v. 11, p. 683–694, 2017.
4. ABOUELNAGA, M.; LAMAS, A.; GUARDDON, M.; OSMAN, M.; MIRANDA, M. J.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.M. Assessment of food safety using a new real-time PCR assay for detection and quantification of virulence factors of enterococci in food samples. **Journal of Applied Microbiology**. v. 121, p. 1745–1754, 2016.
5. DE MEDICI, D.; KUČHTA, T.; KNUTSSON, R.; ANGELOV, A.; AYTUCCHIO, B.; BARBANERA, M.; DIAZ-AMIGO, C.; FIORE, A.; KUDIRKIENE, E.; HOHL, A.; HORVATEK TOMIC, D.; GOTCHEVA, V.; POPPING, B.; PRUKNER-RADOVCIC, E.; SCARAMAGLIA, S.; SIEKEL, P.; TO, K. A.; WAGNER, M. Rapid Methods for Quality Assurance of Foods: the Next Decade with Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Food Monitoring. **Food Analysis Methods**. v. 8, p. 255–271, 2014.
6. MANGAL, M.; BANSAL, S.; SHARMA, S. K.; GUPTA, R. K. Molecular Detection of Foodborne Pathogens: A Rapid and Accurate Answer to Food Safety. **Food Science and Nutrition** v. 56, p. 1568–1584, 2016.
7. DEVONSHIRE, A. S.; O'SULLIVAN, D. M.; HONEYBORNE, I.; JONES, G.; KARZMARCYK, M.; PAVŠIČ, J. GUTTERIDGE, A.; MILAVEC, M.; MENDOZA, P.; SCHIMMEL, H.; BARNARD, M.; HEYDENRYCH, A.; NDUSILO, N.; WALLIS, C. L.; PILLAY, K.; BARRY, T.; REDDINGTON,; RICHTER, E.; MOZIOĞLU, E.; AKYÜREK, S.; YALÇINKAYA, B.; AKGOZ, M.; ŽEL, J.; FOY, C. A.; MCHUGH, T. D.; HUGGETT, J. F. The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**. v. 16, p. 366, 2016.
8. CHERPILLOD, P.; SCHIBLER, M.; VIEILLE, G.; CORDEY, S.; MAMIN, A.; VETTER, P.; KAISER, L. Ebola virus disease diagnosis by real-time RT-PCR: A comparative study of 11 different procedures. **Journal of Clinical Virology**. v. 77, p. 9–14, 2016.
9. MILLON, L.; HERBRECHT, R.; GRENOUILLET, F.; MORIO, F.; ALANIO, A.; LETSCHER-BRU,

V.; CASSAING, S.; CHOUAKI, T.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; POIRIER, P.; TOUBAS, D.; AUGEREAU, O.; ROCCHI, S.; GARCIA-HERMOSO, D.; BRETAGNE, S. . Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). **Clinical Microbiology and Infection**. v. 22, p. 1 - 30, 2016. In press.

10. ERICKSON, B. R. SEALY, T. K.; FLIETSTRA, T.; MORGAN, L.; KARGBO, B.; MATT-LEBBY, V. E.; GIBBONS, A.; CHAKRABARTI, A.K.; GRAZIANO, J.; PRESSER, L.; FLINT, M.; BIRD, B. H.; BROEN, S.; KLENA, J. D.; BLAU, D. M.; BRAULT, A. C.; BELSER, J. A.; SALZER, J. S.; SCHUH, A. J.; LO, M.; ZIVCEC, M.; PRIESTLEY, R. A.; PYLE, M.; GOODMAN, C.; BEARDEN, S.; AMMAN, B. R.; BASILE, A.; BERGERON, E.; BOWEN, M.; DODD, K. A.; FREEMAN, M. M. MCMULLAN, L. K.; PADDOCK, C. D.; RUSSELL, B. J.; SANCHEZ, A. J.; TOWNER, J. S.; WANG, D.; ZEMTSOVA, G. E.; STODDARD, R. A.; TURNSEK, M.; GUERRERO, L. W.; EMERY, S. L.; STOVALL, J.; KAINULAINEN, M. H.; PERNICIARO, J. L.; MIJATOVIC-RUSTEMPASIC, S.; SHAKIROVA, G.; WINTER, J.; SEXTON, C.; LIU, F.; SLATER, K.; ANDERSON, R.; ANDERSEN, L.; CHIANG, C. F.; TZENG, W. P.; CROWE, S. J.; MAENNER, M. J.; SPIROPOULOU, C. F.; NICHOL, S. T.; STRÖHER, U. Ebola Virus Disease Diagnostics, Sierra Leone: Analysis of Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Values for Clinical Blood and Oral Swab Specimens. **Journal of Infectious Diseases**. v. 214, p. S258–S262, 2016.
11. LEHRNBECHER, T.; ROBINSON, P. D.; FISHER, B. T.; CASTAGNOLA, E.; GROLL, A. H.; STEINBACH, W. J.; ZAOUTIS, T. E.; NEGERI, Z. F.; BEYENE, J.; PHILIPS, B.; SUNG, L. Galactomannan, β -D-Glucan, and Polymerase Chain Reaction-Based Assays for the Diagnosis of Invasive Fungal Disease in Pediatric Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 63, p. 1340–1348, 2016.
12. NARDI JÚNIOR, G.; MEGID, J.; MATHIAS, L. A.; PAULIN, L.; VICENTE, A. F.; CORTEZ, A.; LISTONI, F. J. P.; LARA, G. H. B.; MOTTA, R. G.; CHACUR, M. G. N.; MONTEIRO, F. M.; RIBEIRO, M. G. Performance of microbiological, serological, molecular, and modified seminal plasma methods in the diagnosis of *Brucella abortus* in semen and serum of bovine bulls. **Biologicals**. v. 48, p. 6–9, 2017.
13. BARZON, L.; PACENTI, M.; BERTO, A.; SINIGAGLIA, A.; FRANCHIN, E.; LAVEZZO, E.; BRUGNARO, P.; PALÙ, G. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. **Euro Surveill**. v. 21, p. 1–5, 2016.
14. SCOTT, W. K.; PERICAK-VANCE, M. A.; HAINES, J. L. Genetic analysis of complex diseases. **Science** . v. 275, p. 1327–1330, 1997.
15. MANEG, D.; SPONSEL, J.; MÜLLER, I.; LOHR, B.; PENDERS, J.; MDLENER, K.; HUNFELD, K. Advantages and limitations of direct PCR amplification of bacterial 16S-rDNA from resected heart tissue or swabs followed by direct sequencing for diagnosing infective endocarditis: A retrospective analysis in the routine clinical setting. **Biomed Research International**. v. 2016, p. 1 - 10, 2016.

16. PEREZ, E. A.; PUSZTAI, L.; VAN DE VIJVER, M. Improving patient care through molecular diagnostics. **Seminars in Oncology**. v. 31, p. 14–20, 2004.
17. RISCH, N.; MERIKANGAS, K.; RISCH, N.; MERIKANGAS, K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**. v. 273, p. 1516–1517, 1996.
18. TSONGALIS, G. J.; SILVERMAN, L. M. Molecular diagnostics: A historical perspective. **Clinica Chimica Acta**. v. 369, p. 188–192, 2006.
19. LAURI, A.; MARIANI, P. O. Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. **Genes Nutrition** v. 4, p. 1–12, 2009.
20. TANG, Y.-W.; PROCOP, G. W.; PERSING, D. H. Molecular diagnostics of infectious diseases. **Clinical Chemistry**. v. 43, p. 2021 - 2038, 1997.
21. ANANTHA, R. V.; SALVADORI, M. I.; HUSSEIN, M. H.; MERRITT, N. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 4, p. 337–348, 2004.
22. NOLTE, F. S. Case Studies in Cost Effectiveness of Molecular Diagnostics for Infectious Diseases: Pulmonary Tuberculosis, Enteroviral Meningitis, and BK Virus Nephropathy. **Medical Microbiology**. v. 43, p. 1463 - 1467, 2006.
23. RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A. SPE and purification of DNA using magnetic particles. **Journal of Separation Science**. v. 36, p. 2472–2485, 2013.
24. KIM, J.; JOHNSON, M.; HILL, P.; GALE, B. K. Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification. **Integrative Biology**. v. 1, p. 574 - 586, 2009.
25. NAN, L.; JIANG, Z.; WEI, X. Emerging microfluidic devices for cell lysis: a review. **Lab Chip**. v. 14, p. 1060, 2014.
26. HOLM, C.; WAGNER, D. W. M.; FANGMAN, W. L.; BOTSTEIN, D. A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. **Gene**. v. 42, p. 169–173, 1986.
27. XU, M.; ARKU, B.; JARTTI, T.; KOSKINEN, J.; PELTOLA, V.; HEDMAN, K.; SÖDERLUND-VENNERMO, M. Comparative diagnosis of human bocavirus 1 respiratory infection by mRNA RT-PCR, DNA quantitative PCR and serology. **Infectious Diseases Society of America**. v. 215, p. 1551–1557, 2017.
28. WU, J.; KODZIUS, R.; CAO, W.; WEN, W. Extraction, amplification and detection of DNA in microfluidic chip-based assays. **Microchim Acta**. v. 181, p. 1611–1631, 2014.

29. PSIFIDI, A.; DOVAS, C. I.; BANOS, G. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. **Molecular and Cellular Probes**. v. 24, p. 93 - 98, 2010.
30. SMERKOVA, K.; DOSTALOVA, S.; VACULOVICOVA, M.; KYNICKY, J.; TRNKOVA, L.; KRALIF, M.; ADAM, V.; HUBALEK, J.; PROVAZNIK, I.; KIZEK, R. Investigation of interaction between magnetic silica particles and lambda phage DNA fragment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 86, p. 65 - 72, 2013.
31. PRAMANICK, D.; FORSTOVÁ, J.; PIVEC, L. 4M Guanidine hydrochloride applied to the isolation of DNA from different sources. **FEBS Letters**. v. 62, p. 81–84, 1976.
32. MCCABE, E. R. B.; HUANG, S.-Z.; SELTZER, W. K.; LAW, M. L. D N A microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening. **Human Genetics**. v. 75, p. 213–216, 1987.
33. VILTROP, T.; KRJUTSKOV, K.; PALTA, P.; METSPALU, A. Comparison of DNA extraction methods for multiplex polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**. v. 398, p. 260–262, 2010.
34. PRICE, C. W.; LESLIE, D. C.; LANDERS, J. P. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. **Lab on a Chip**. v. 9, p. 2484–94, 2009.
35. NACHAM, O., CLARK, K. D.; ANDERSON, J. L. Extraction and Purification of DNA from Complex Biological Sample Matrices Using Solid-Phase Microextraction Coupled with Real-Time PCR. **Analitical Chemistry**. v. 88, p. 7813–7820, 2016.
36. SU, W.; GAO, X.; JIANG, L.; QIN, J. Microfluidic platform towards point-of-care diagnostics in infectious diseases. **Jornal of Chromatography. A**. v. 1377, p. 13–26, 2015.
37. KIVLEHAN, F.; MAVRÉ, F., TALINI, L.; LIMOGES, B.; MARCHAL, D. Real-time electrochemical monitoring of isothermal helicase-dependent amplification of nucleic acids. **Analyst**. v. 136, p. 3635 - 3642, 2011.
38. FUENTES, M.; MATEO, C.; RODRIGUEZ, A.; CASQUEIRO, M.; TERCERO, J. C.; RIESE, H.R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Detecting minimal traces of DNA using DNA covalently attached to superparamagnetic nanoparticles and direct PCR-ELISA. **Biosensors Bioelectronics**. v. 21, p. 1574–1580, 2006.
39. CHO, Y.-K.; LEE, J.-G.; PARK, J.-M.; LEE, B.-S.; LEE, Y.; KO, C. One-step pathogen specific DNA extraction from whole blood on a centrifugal microfluidic device. **Lab on a Chip**. v. 7, p. 565–573, 2007.

40. DUARTE, G. R. M. **Análises Genéticas em Sistemas Microfabricados**. ANO. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
41. DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; AUGUSTINE, B. H.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. Dynamic solid phase DNA extraction and PCR amplification in polyester-toner based microchip. **Analytical Chemistry**. v. 83, p. 5182–5189, 2011.
42. JACKSON, K. R. R.; BORBA, J. C.; MEIJA, M.; MILLS, D. L.; HAVERSTICK, D. M.; OLSON, K. E.; ARANDA, R.; GARNER, G. T.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. DNA purification using dynamic solid-phase extraction on a rotationally-driven polyethylene-terephthalate microdevice. **Analytica Chimica Acta**. v. 937, p. 1–10, 2016.
43. GIMENEZ, T. D.; BAILÃO, A. M.; SOARES, C. M. A.; FIACCADORI, F. S.; SOUZA, M. B. L. D.; DUARTE, G. R. M. Dynamic Solid-Phase RNA Extraction from a Biological Sample in a Polyester-Toner Based Microchip. **Analytical Methods**. v. 9, p. 2116–2121, 2017.
44. DUARTE, G. R. M.; COLTRO, W. K. T.; BORBA, J. C.; PRICE, C. W.; LANDERS, J. P.; CARRILHO, E. Disposable polyester-toner electrophoresis microchips for DNA analysis. **Analyst**. v. 137, p. 2692–8, 2012.
45. DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; LITTLEWOOD, J. L.; HAVERSTICK, D. M.; FERRANCE, J. P.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. Characterization of dynamic solid phase DNA extraction from blood with magnetically controlled silica beads. **Analyst**. v. 135, p. 531–537, 2010.
46. HUANG, P. C. Effect of Guanidinium Ion on DNA Denaturation and Renaturation. *Biochem. Biophys.* **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 33, p. 384–390, 1968.
47. KATEVATIS, C.; FAN, A.; KLAPPERICH, C. M. Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. **PLoS One**. v. 12, p. 1 - 14, 2017.
48. MELZAK, K. A.; SHERWOOD, C. S.; TURNER, R. F. B.; HAYNER, C. A. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 181, p. 635–644, 1996.
49. HUANG, S.; DO, J.; MAHALANABIS, M.; FAN, A.; ZHAO, L.; JEPEAL, L.; SINGH, S. K.; KLAPPERICH, C. M. Low Cost Extraction and Isothermal Amplification of DNA for Infectious Diarrhea Diagnosis. **PLoS One**. v. 8, p. 1–10, 2013.
50. WALKER, G. T.; NADEU, J. G.; LINN, C. P. A DNA probe assay using strand displacement amplification (SDA) and filtration to separate reacted and unreacted detector probes. **Molecular and Cellular Probes**. v. 9, p. 399–403, 1995.

51. CHANG, C.-M.; CHANG, W.-H.; WANG, C.-H.; WANG, J.-H.; MAI, J. D.; LEE, G.-B. Nucleic acid amplification using microfluidic systems. **Lab on a Chip**. v. 13, p. 1225–1242, 2013.
52. DANIEL, B.; VIEIRA, P.; HISTÓRICO, B. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. Aula 1 -PCR: Princípios e tipos de Reação. Disponível em: <www.etall.hpg.com.br> Acesso em: 1 de junho de 2017)
53. MULLIS, K.; FALLONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biology**. v. 51, p. 263–273, 1986.
54. KENNETH H. ROUX. Optimization and Troubleshooting in PCR. **Cold Spring Harb Protocols**. v. 4, p. 1–6, 2009.
55. FORTINA, P.; SURREY, S.; KRICKA, L. J. Molecular diagnostics: Hurdles for clinical implementation. **Trends in Molecular Medicine**. v. 8, p. 264–266, 2002.
56. KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p. 1–9, 2017.
57. AL-SOUD, W. A.; RÅDSTRÖM, P.; ABU AL-SOUD, W.; RÅ DSTR, P. M. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, p. 485–493, 2001.
58. VALONER, M. A. A.; GUIMARÃES, R. L.; BRANDÃO, L. A. C.; DE SOUZA, P. R. E.; CARVALHO, A. A. T.; CROVELA, S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 40, p. 1–11, 2009.
59. LIEN, K.-Y., LEE, G.-B. Miniaturization of molecular biological techniques for gene assay. **Analyst**. v. 135, p. 1499–1518, 2010.
60. SERWER, P. Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. **Electrophoresis**. v. 4, p. 375–382, 1983.
61. LEE, P. Y.; COSTUMBRADO, J.; HSU, C.-Y.; KIM, Y. H. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. **Journal of Visualized Experiments**. v. 62, p. 1–5, 2012.
62. LI, J.; YANG, Y.; MAO, Z.; HUANG, W.; QIU, T.; WU, Q. Enhanced Resolution of DNA Separation Using Agarose Gel Electrophoresis Doped with Graphene Oxide. **Nanoscale Research Letter**. v. 11, p. 404, 2016.

63. VOGELSTEIN, B.; GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.** v. 76, p. 615–619, 1979.
64. XU, F.; JABASINI, M.; BABA, Y. DNA separation by microchip electrophoresis using low-viscosity hydroxypropylmethylcellulose-50 solutions enhanced by polyhydroxy compounds. **Electrophoresis**, v. 23, p. 3608–3614, 2002.
65. HEIGER, D. N.; COHEN, A. S.; KARGER, B. L. Separation of DNA restriction fragments by high performance capillary electrophoresis with low and zero crosslinked polyacrylamide using continuous and pulsed electric fields. **Journal of Chromatography A**. v. 516, p. 33–48, 1990.
66. LIAN, D. S.; ZHAO, S. J. Highly sensitive analysis of nucleic acids using capillary gel electrophoresis with ultraviolet detection based on the combination of matrix field-amplified and head-column field-amplified stacking injection. **Journal of Chromatography B**. v. 978–979, p. 29–42, 2015.
67. JANG, Y.-C.; JHA, S. K.; CHAND, R.; ISLAM, K.; KIM, Y.-S. Capillary electrophoresis microchip for direct amperometric detection of DNA fragments. **Electrophoresis**. v. 32, p. 913–919, 2011.
68. CASTRO, E. R.; MANZ, A. Present state of microchip electrophoresis: State of the art and routine applications. **Journal of Chromatography A**. v. 1382, p. 66–85, 2015.
69. THOMPSON, B. L.; BIRCH, C.; NELSON, D. A.; LI, J.; DUVAL, J. A.; ROUX, D. L.; TSUEI, A.-C.; MILLS, D.; ROOT, B.; LANDERS, J. A centrifugal microfluidic device with integrated gold leaf electrodes for the electrophoretic separation of DNA. **Lab on a Chip**. v. 16, p. 4569 – 4580, 2016.
70. CHIM, W.; LI, P. C. H. Repeated capillary electrophoresis separations conducted on a commercial DNA chip. **Analytical Methods**. v. 4, p. 864, 2012.
71. BIRCH, C.; DUVAL, J. A.; ROUX, D. L.; THOMPSON, B. L.; TSUEI, A.-C.; LI, J.; MILLS, D. L.; LANDERS, J. P.; ROOT, B. E. Rapid Fabrication of Electrophoretic Microfluidic Devices from Polyester, Adhesives and Gold Leaf. **Micromachines**. v. 8, p. 17, 2017.
72. FOUDEH, A. M.; FATANAT DIDAR, T.; VERES, T.; TABRIZIAN, M. Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics. **Lab on a Chip**. v. 12, p. 3249–3266, 2012.
73. WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**. v. 442, p. 368–373, 2006.

74. WU, J.; KODZIUS, R.; CAO, W.; WEN, W. Extraction, amplification and detection of DNA in microfluidic chip-based assays. **Microchim Acta**. v. 181, p. 1611–1631, 2014.
75. MARK, D.; HAEBERLE, S.; ROTH, G.; VON STETTENZ, Ab. F.; ZENGERLEZ, R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. **Chemical Society Reviews**. v. 39, p. 1153–1182, 2010.
76. MATINEZ-DUARTE, R.; TEIXIDOR, G. T.; MUKHERJEE, P. P.; KANG, Q.; MADOU, M. J. Perspectives of Micro and Nanofabrication of Carbon for Electrochemical and Microfluidic Applications. In: **Microfluidics and Microfabrication**. New York: Chakraborty, S., 2010, v. 1, p. 357.
77. COLTRO, W. K. T.; LUNTE, S. M.; CARRILHO, E. Comparison of the analytical performance of electrophoresis microchannels fabricated in PDMS, glass, and polyester-toner. **Electrophoresis**. v. 29, p. 4928–4937, 2008.
78. LIMA, R. S.; LEÃO, P. A. G. C.; PIAZZETTA, M. H. O.; MONTEIRO, A. M.; SHIROMA, L. Y.; GOBBI, A. L.; CARRILHO, E. Sacrificial adhesive bonding: a powerful method for fabrication of glass microchips. **Scientific Reports**. v. 5, p. 13276, 2015.
79. CHENG, J.; SHOFFNER, M. A.; HVICHIA, G. E.; KRICKA, L. J.; WILDING, P. Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips. **Nucleic Acids Research**. v. 24, p. 380–385, 1996.
80. TANAKA, Y. Electric actuating valves incorporated into an all glass- based microchip exploiting the flexibility of ultra thin glass. **RSC Advances**. v. 3, p. 10213 - 10220, 2013.
81. TRINH, K. T. L.; WU, W.; LEE, N. Y. Planar poly(dimethylsiloxane) (PDMS)-glass hybrid microdevice for a flow-through polymerase chain reaction (PCR) employing a single heater assisted by an intermediate metal alloy layer for temperature gradient formation. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 190, p. 177–184, 2014.
82. LOUNSBURY, J. A.; KARLSSON, A.; MIRANIAN, D. C.; CRONK, S. M.; NELSON, D. A.; LI, J.; HAVERSTICK, D. M.; KINNON, P.; SAUL, D. J.; LANDERS., J. P. From sample to PCR product in under 45 minutes: a polymeric integrated microdevice for clinical and forensic DNA analysis. **Lab on a Chip**. v. 13, p. 1384–1393, 2013.
83. KIM, Y. T.; LEE, D.; HEO, H. Y.; SIM, J. E.; WOO, K. M.; KIM, D. H.; IM, S. G.; SEO, T. S. Total integrated slidable and valveless solid phase extraction-polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microdevice for mini Y chromosome short tandem repeat genotyping. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 78, p. 489–496, 2016.
84. WU, Q.; BIENVENUE, J. M.; BENJAMIN, J. H.; KWOK, Y. C.; GIORDANO, B. C.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P.; FERRANCE, J. P. Microchip-based macroporous silica sol-gel monolith for efficient isolation of DNA from clinical samples. **Analytical Chemistry**. v. 78, p. 5704–5710, 2006.

85. OBLATH, E. A.; HENLEY, W. H.; ALARIE, J. P.; RAMSEY, J. M. A microfluidic chip integrating DNA extraction and real-time PCR for the detection of bacteria in saliva. **Lab on a Chip**. v. 13, p. 1325, 2013.
86. TIAN, Q. MU, Y.; XU, Y.; SONG, Q.; YU, B.; MA, C.; JIN, W.; JIN, Q. An integrated microfluidic system for bovine DNA purification and digital PCR detection. **Analytical Biochemistry**. v. 491, p. 55–57, 2015.
87. HWANG, K.-Y.; KIM, J.-H.; SUH, K.-Y.; KO, J. S.; HUH, N. Low-cost polymer microfluidic device for on-chip extraction of bacterial DNA. **Sensors Actuators B: Chemical**. v. 155, p. 422–429, 2010.
88. LOUNSBURY, J. A.; LANDERS, J. P. Ultrafast amplification of DNA on plastic microdevices for forensic short tandem repeat analysis. **Journal of Forensic Sciences**. v. 58, p. 866–874, 2013.
89. HUANG, S.; HE, Q.; HU, X.; CHEN, H. Fabrication of micro pneumatic valves with double-layer elastic poly(dimethylsiloxane) membranes in rigid poly(methyl methacrylate) microfluidic chips. **Journal of Micromechanics and Microengineering**. v. 22, p. 1–8, 2012.
90. OUYANG, Y.; DUARTE, G. R. M.; POE, B. L.; RIEHL, P. S.; SANTOS, F. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. A disposable laser print-cut-laminate polyester microchip for multiplexed PCR via infra-red-mediated thermal control. **Analytica Chimica Acta**. v. 901, p. 59–67, 2015.
91. OUYANG, Y.; WANG, S.; LI, J.; RIEHL, P. S.; BEGLEY, M.; LANDERS, J. P. Rapid patterning of 'tunable' hydrophobic valves on disposable microchips by laser printer lithography. **Lab on a Chip**. v. 13, p. 1762–1771, 2013.
92. GABRIEL, E. F. M.; DO LAGO, C. L.; GOBBI, A. L.; CARRILHO, E.; COLTRO, W. K. T. Characterization of microchip electrophoresis devices fabricated by direct-printing process with colored toner. **Electrophoresis**. v. 34, p. 2169–2176, 2013.
93. CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**. v. 81, p. 7091–7095, 2009.
94. MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; BUTTE, M. J.; WHITESIDES, G. M. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie - International Edition**. v. 46, p. 1318–1320, 2007.
95. MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS III, 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, P. 3699–3707, 2008.
96. CONNELLY, J. T.; ROLLAND, J. P.; WHITESIDES, G. M. ' Paper Machine ' for Molecular Diagnostics. **Analytical Chemistry**. v. 87, p. 7595–7601, 2015.
 97. DE SOUZA, F. R., ALVES, G. L.; COLTRO, W. K. T. Capillary-driven toner-based microfluidic devices for clinical diagnostics with colorimetric detection. **Analytical Chemistry**. v. 84, p. 9002 - 9007, 2012.
 98. GLAVAN, A. C.; NIU, J.; CHEN, Z.; GÜDER, F.; MIN, CHENG, C.-M.; LIU, D.; WHITESIDES, G. M. Analytical Devices Based on Direct Synthesis of DNA on Paper. **Analytical Chemistry**. v. 88, p. 725–731, 2016.
 99. BYRNES, S. A.; BISHOP, J. D.; LAFLEUR, L.; BUSER, J. R.; LUTZ, B.; YAGER, P. One-step purification and concentration of DNA in porous membranes for point-of-care applications. **Lab on a Chip**. v. 15, p. 2647–2659, 2015.
 100. SOLLIER, E.; MURRAY, C.; MAODDI, P.; DI CARLO, D. Rapid prototyping polymers for microfluidic devices and high pressure injections. **Lab on a Chip**. v. 11, p. 3752, 2011.
 101. 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, p 3825–3831, 2004.
 102. FRIEND, J.; YEO, L. Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane. **Biomicrofluidics**. v. 4, p 1–5, 2010.
 103. THOMAS, M. S. MILLARE, B.; CLIFT, J. M.; BAO, D.; HONG, C.; VULLEV, V. I. Print-and-peel fabrication for microfluidics: What's in it for biomedical applications? **Annals of Biomedical Engineering**. v. 38 , p. 21 - 32, 2010.
 104. THOMPSON, C. S.; ABATE, A. R. Adhesive-based bonding technique for PDMS microfluidic devices. **Lab on a Chip**. v. 13, p. 632–635, 2013.
 105. FÍ, E.; GABRIEL, M.; KARLOS, W., COLTRO, T.; GARCIA, C. D. Fast and versatile fabrication of PMMA microchip electrophoretic devices by laser engraving. **Electrophoresis**. v. 35, p. 2325–2332, 2014.
 106. GUCKENBERGER, D. J.; GROOT, T. E. De; WAN, A. M. D.; BEEBE, D. J.; YOUNG, E. W. K. Micromilling: A Method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. **Lab on a Chip**. v. 15, p. 2364–2378, 2015.
 107. LEE, G.-B.; Chen, S. H.; Huang, G.-R.; LIN, Y.-H.; SUNG, W.-C. Microfabricated plastic chips by hot embossing methods and their applications for DNA separation and detection. **Sensors Actuators B: Chemical**. v. 75, p. 142–148, 2001.

108. MISHRA, P. K.; PATIL, S. B.; PARDESHI, S. S.; KAJALE, S. R. Mechanical Micromanufacturing: An Overview. In: **Microfluidics and Microfabrication**. New York: Chakraborty, S., 2010. v.1, p. 357.
109. RODRIGUES, R. O.; LIMA, R.; GOMES, H. T.; SILVA, A. M. T. Polymer microfluidic devices: an overview of fabrication methods. **U. Porto Journal of Engineering**. v. 1, p. 67–79, 2015.
110. COLTRO, W. K. T.; DE JESUS, D. P.; DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L.; CARRILHO, E. Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. **Electrophoresis**. v. 31, p. 2487–2498, 2010.
111. COLTRO, W. K. T.; CHENG, C. M.; CARRILHO, E.; DE JESUS, D. P. Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications. **Electrophoresis**, v. 35, p. 2309–2324, 2014.
112. FAUSTINO, V.; CATARINO, S. O.; LIMA, R.; MINAS, G. Biomedical microfluidic devices by using low-cost fabrication techniques: A review. **Journal Biomechanics**. v. 49, p. 2280–2292, 2016.
113. 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, p. 3853–3858, 2003.
114. THOMPSON, B. L.; GILBERT, R. J.; MEJIA, M.; SHUKLA, N.; HAVERSTICK, D. M.; GARNER, G.; LANDERS, J. P. Hematocrit analysis through the use of an inexpensive centrifugal polyester-toner device with finger-to-chip blood loading capability. **Analytica Chimica Acta**. v. 924, p. 1–8, 2016.
115. THOMPSON, B. L.; OUYANG, Y.; DUARTE, G. R. M.; CARRILHO, E.; KRAUSS, S.; LANDERS, J. P. Inexpensive, rapid prototyping of microfluidic devices using overhead transparencies and a laser print, cut and laminate fabrication method. **Nature Protocols**, v. 10, p. 875–886, 2015.
116. YUEN, P. K.; GORAL, V. N. Low-cost rapid prototyping of flexible microfluidic devices using a desktop digital craft cutter. **Lab on a Chip**. v. 10, p. 384–387, 2010.
117. COX, J. O.; DECARMEN, T. S.; OUYANG, Y.; STRACHAN, B.; SLOANE, H.; CONNON, C.; GIBSON, K.; JACKSON, K.; LANDERS, J. P.; CRUZ, T. D. A novel, integrated forensic microdevice on a rotation-driven platform: Buccal swab to STR product in less than two hours. **Electrophoresis**. v.37, p. 3046–3058, 2016.
118. YU, Y.; LI, B.; BAKER, C. A.; ZHANG, X.; ROPER, M. G. Quantitative polymerase chain reaction using infrared heating on a microfluidic chip. **Analytical Chemistry**. v. 43, p. 513–518, 2012.

119. DUVAL, J. A.; ROUZ, D. L.; TSUEI, A.-C.; THOMPSON, B. L.; BIRCH, C.; LI, J.; NELSON, D. A.; MILLS, D. L.; EWING, M. M.; MCLARE, R. S.; STORTS, D. R.; ROOT, B. E.; LANDERS, J. P. A rotationally-driven polyethylene terephthalate microdevice with integrated reagent mixing for multiplexed PCR amplification of DNA. **Analytical Methods**. v. 8, p. 7331–7340, 2016.
120. LOU, X. J.; PANARO, N. J.; WILDING, P.; FORTINA, P.; KRICKA, L. J. Increased amplification efficiency of microchip-based PCR by dynamic surface passivation. **Biotechniques**. v. 36, p. 248–251, 2004.
121. ODA, R. P.; STRAUSBAUCH, M. A.; HUHMER, A. F. R.; BORSON, N.; JURRENS, S. R.; CRAIGHEAD, J.; WETTSTEIN, P. J.; ECKLOFF, B.; KLINE, B.; LANDERS, J. P. Infrared-Mediated Thermocycling for Ultrafast Polymerase Chain Reaction Amplification of DNA. **Analytical Chemistry**. v. 70, p. 4361–4368, 1998.
122. CHEN, L.; MANZ, A.; DAY, P. J. R. Total nucleic acid analysis integrated on microfluidic devices. **Lab on a Chip**. v. 7, p. 1413 - 1423, 2007.
123. LANDERS, J. P. Molecular diagnostics on electrophoretic microchips. **Analytical Chemistry**. v. 75, p. 2919–27, 2003.
124. OHLSSON, P. EVANDER, M.; PETERSSON, K.; MELLHAMMAR, L.; LEHMUSVOURI, A.; KARHUNEN, U.; SOIKKELI, M.; SEPPÄ, T.; TUUNAINEN, E.; SPANGAR, A.; LODE, PP.-V.; RANTAKOKKO-JALAVA, K.; OTTO, G.; SCHEDING, S.; SOUKKA, T.; WITTFORTH, S.; LAURELL, T. Integrated Acoustic Separation, Enrichment, and Microchip Polymerase Chain Reaction Detection of Bacteria from Blood for Rapid Sepsis Diagnostics. **Analytical Chemistry**. v. 88, p. 9403–9411, 2016.
125. 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 Academic Sciences of the U. S. A.** v. 103, p. 19272–19277, 2006.
126. HAGAN, K. A.; REEDY, C. R.; BIENVENUE, J. M.; DEWALD, A. H.; LANDERS, J. P. A valveless microfluidic device for integrated solid phase extraction and polymerase chain reaction for short tandem repeat (STR) analysis. **Analyst**. v. 136, p. 1928–1937, 2011.
127. LIU, R. H.; YANG, J.; LENIGK, R.; BONANNO, J.; GRODZINSKI, P. Self-Contained, Fully Integrated Biochip for Sample Preparation, Polymerase Chain Reaction Amplification, and DNA Microarray Detection. **Analytical Chemistry**. v. 76, p. 1824–1831, 2004.
128. 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, p. 601–10, 2006.
129. TIAN, Q.; YU, B.; MU, Y.; XU, Y.; MA, C.; SHANG, T.; JIN, W.; JIN, Q. An integrated temporary negative pressure assisted microfluidic chip for DNA isolation and digital PCR detection. **RSC Advances**. v. 5, p. 81889–81896, 2015.
 130. NAYAK, S.; BLUMENFELD, N. R.; LAKSANASOPIN, T.; SIA, S. K. Point-of-Care Diagnostics: Recent Developments in a Connected Age. **Analytical Chemistry**. v. 89, p. 102 - 123, 2016.
 131. ROHRMAN, B. A.; RICHARDS-KORTUM, R. R. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA. **Lab on a Chip**. v. 12, p. 3082, 2012.
 132. CHAKRABORTY, S. **Microfluidics And Microfabrication**. New York: Springer, 2010. 357 p.
 133. DUCRÉE, J. Centrifugal Microfluidics Synonyms. In: **Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics**. New York: Springer , 2008. v. , p. 1–27.
 134. HASEGAWA, H., TESHIMA, T., ONOE, H. & TAKEUCHI, S. Centrifugal microfluidic system for multistep assay using small amount of various samples. **Sensors Actuators B: Chemical**. v. 195, p. 281–286, 2014.
 135. KONG, L. X.; PEREBIKOVSKY, A.; MOEBIUS, J.; KULINSKY, L.; MADOU, M. Lab-on-a-CD: A Fully Integrated Molecular Diagnostic System. **Journal of Laboratory. Automation**. v. 21, p. 323–355, 2016.
 136. DUCRÉE, J.; HAEBERLE, S.; LUTZ, S.; PAUSCH, S.; VON STETTEN, F.; ZENGERLE, R. The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform. **Journal of Micromechanics and Microengineering**. v. 17, p. S103–S115, 2007.
 137. CHO, Y.-K. Centrifugal Microfluidics. In: **Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics**. v. 203, p. 234–245, 2008.
 138. SMITH, S.; MAGER, D.; PEREBIKOVSKY, A.; SHAMLOO, E.; KINAHAN, D.; CD-based microfluidics for primary care in extreme point-of-care settings. **Micromachines**. v. 7, p. 32, 2016.
 139. STROHMEIER, O.; KELLER, M.; SCHWEMMER, F.; SEHNLE, S.; MARK, D.; VON STETTEN, F.; ZENGERLE, R.; PAUST, N. Centrifugal microfluidic platforms: advanced unit operations and applications. **Chemical Society Reviews**. v. 44, p. 6187–6229, 2015.
 140. TANG, M.; WANG, G.; KONG, S. K.; HO, H. P. A review of biomedical centrifugal microfluidic platforms. **Micromachines**. v. 7, p. 29, 2016.

141. MICHAEL, I. J.; KIM, T. H.; SUNKARA, V.; CHO, Y. K. Challenges and opportunities of centrifugal microfluidics for extreme point-of-care testing. **Micromachines**. v. 7, p. 1–14, 2016.
142. KIM, J.; KIDO, H.; RANGEL, R. H.; MADOU, M. J. Passive flow switching valves on a centrifugal microfluidic platform. **Sensors Actuators: B Chemical**. v. 128, p. 613 - 621, 2008.
143. MADOU, M.; ZOVAL, J.; JIA, G.; KIDO, H.; KIM, J.; KIM, N. Lab on a CD. **Annual Review of Biomedical Engineering**. v. 8, p. 601–28, 2006.
144. CLIME, L.; BRASSARD, D.; GEISLER, M.; VERES, T. Lab on a Chip Active pneumatic control of centrifugal microfluidic flows for lab-on-a-chip applications. **Lab on a Chip**. v. 15, p. 601 - 628, 2015.
145. AMASIA, M.; COZZENS, M.; MADOU, M. J. Centrifugal microfluidic platform for rapid PCR amplification using integrated thermoelectric heating and ice-valving. **Sensors Actuators: B: Chemist**. v. 161, p.1191–1197, 2012.
146. CHIA, B. T.; YANG, X. Y.; CHENG, M. Y.; LIN, C. W.; YANG, Y. J. An electromagnetically-driven microfluidic platform with indirect-heating thermo-pneumatic valves. **Biochip Journal**. v. 5, p. 97–105, 2011.
147. PARK, J.-M.; CHO, Y.-K.; LEE, B.-S.; LEE, J.-G.; KO, C. Multifunctional microvalves control by optical illumination on nanoheaters and its application in centrifugal microfluidic devices. **Lab on a Chip**. v. 7, p. 557–64, 2007.
148. CZILWIK, G.; MESSINGER, T.; STROHMEIER, O.; WADLE, S.; VON STETTEN, F.; PAUST, N.; ROTH, G.; ZENGERLE, R.; SAARINEN, P.; NIITTYMÄKI, J.; MCALLISTER, K.; SHEILS, O.; O'LEARY, J.; MARK, D. Lab on a Chip Rapid and fully automated bacterial pathogen detection on a centrifugal-microfluidic LabDisk using highly sensitive nested PCR with integrated sample preparation. **Lab on a Chip**. v. 15, p. 3749–3759, 2015.
149. AL-FAQHERI, W.; IBRAHIM, F.; THIO, T. H. G.; BAHARI, N.; AROF, H.; ROTHAN, H. A.; YUSOF, R.; MADOU, M. Development of a passive liquid valve (PLV) utilizing a pressure equilibrium phenomenon on the centrifugal microfluidic platform. **Sensors**. v. 15, p. 4658–4676, 2015.
150. ZHANG, H.; TRAN, H. H.; CHUNG, B. H.; LEE, N. Y. Solid-phase based on-chip DNA purification through a valve-free stepwise injection of multiple reagents employing centrifugal force combined with a hydrophobic capillary barrier pressure. **Analyst**. v. 138, p. 1750 - 1757, 2013.
151. SIEGRIST, J. GORKIN, R.; CLIME, L.; ROY, W.; PEYTAVI, R.; KIDO, H.; BERGERON, M.;

- VERES, T.; MADOU, M. Serial siphon valving for centrifugal microfluidic platforms. **Microfluid Nanofluid.** v.9, p. 55-63, 2010.
152. CHO, H.; KIM, H. Y.; KANG, J. Y.; KIM, T. S. How the capillary burst microvalve works. **Journal of Colloid and Interface Science.** v. 306, p. 379 - 385, 2007.
 153. GLIÈRE, A.; DELATTRE, C. Modeling and fabrication of capillary stop valves for planar microfluidic systems. **Sensors and Actuators A.** v. 130 - 131, p. 601 - 609, 2006.
 154. LEU, T. S.; CHANG, P. Y. Pressure barrier of capillary stop valves in micro sample separators. **Sensors and Actuators A: Physical.** v. 115, p. 508 - 515, 2004.
 155. REN, Y.; LEUNG, W. W.-F. Numerical and experimental investigation on flow and mixing in batch-mode centrifugal microfluidics. **International Journal of Heat and Mass Transfer.** v. 60, p. 95-104, 2013.
 156. SCHWEMMER, F.; HUTZENLAUB, T.; BUSELMEIER, D.; PAUST, N.; VON, STETTEN, F.; MARK, D.; ZENGERLE, R.; KOSSE, D. Centrifugo-pneumatic multi-liquid aliquoting – parallel aliquoting and combination of multiple liquids in centrifugal microfluidics. **Lab on a Chip.** v. 15, p. 3250-3258, 2015.
 157. JUNG, J. H.; PARK, B. H.; CHOI, Y. K.; SEO, T. S. A microbead-incorporated centrifugal sample pretreatment microdevice. **Lab on a Chip.** v. 13, p. 3383 - 3388, 2013.
 158. CHO, Y. K.; LEE, J.-G.; PARK, J.-M.; LEE, B.-S.; LEE, Y.; KO, C. One-step pathogen specific DNA extraction from Whole Blood on a Centrifugal Microfluidic device. **Lab on a Chip.** v. 7, p. 565-573, 2007.
 159. KINAHAN, D. J.; MANGWANYA, F.; GARVEY, R.; CHUNG, D. W. Y.; LIPINSKI, A.; JULIUS, L. A. N.; KING, D.; MOHAMMADI, M.; MISHRA, R.; AL-OFI, M.; MIYAZAKI, C.; DUCRÉE, J. Automation of Silica Bead-based Nucleic Acid Extraction on a Centrifugal Lab-on-a-Disc Platform. **Journal of Physics Conference Series.** v. 757, p. 12013, 2016.
 160. HITZBLECK, M.; DELAMARCHE, E. Advanced capillary soft valves for flow control in self-driven microfluidics. **Micromachines.** v. 4, p. 1-8, 2013.
 161. STUMPF, F.; SCHWEMMER, F.; HUTZENLAUB, T.; BAUMANN, D.; STROHMEIER, O.; DINGEMANNS, G.; SIMONS, G.; SAGER, C.; PLOBNER, L.; VON, STETTEN, F.; ZENGERLE, R.; MARK, D. Lab on a Chip LabDisk with complete reagent prestorage for sample-to-answer nucleic acid based detection of respiratory pathogens verified with influenza A H3N2 virus. **Lab on a Chip.** v. 16, p. 199-207, 2016.
 162. YANG, S.; DEVOE, D. L. Microfluidic diagnostics: fabrication and manipulation protocols.

In: *Microfluidic Diagnostics Methods and Protocols*. New York, Springer, 2013. 525f.

163. CANEVAROLO, J.; SEBASTIÃO, V. Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo: Artiber Editora Ltda. 2004. 435f.
164. VAN KREVELEN, D. W.; NIJENHUIS, K. **Properties of Polymers**. Oxford: Elsevier, 2002. 1031f.
165. HUHMER, A. F. R.; LANDERS, J. P. Noncontact infrared-mediated thermocycling for effective polymerase chain reaction amplification of DNA in nanoliter volumes. **Analytical Chemistry**. v. 72, p. 5507–5512, 2000.
166. SILVA, G.; LEAL, N.; SEMIAO, V. Critical pressure for capillary valves in a Lab-on-a-Disk: CFD and flow visualization. **Computers and Structures**. v. 88, p. 1300 - 1309, 2010.
167. YMBERN, O.; SORIA, E.; CATALAN, V.; ALONSO, J. Design and Fabrication of Centrifugal Microfluidic Platforms Based on Capillary Force Valves for Analytical Applications. In: Ibersensor, 9., 2010. Lisbon, Lisboa. **Anais...** Lisbon: Ibersensor, 2010.p. IB-79.
168. ZEHNLE, S., Rombach, M., Von Stetten, F., Zengerle, R. & Paust, N. MICROFLUIDIC CENTRIFUGO-PNEUMATIC SIPHON ENABLES FAST BLOOD PLASMA EXTRACTION WITH HIGH YIELD AND PURITY.
169. SHAPIRO, B.; CHAKRABARTY, M.; COHN, E. M.; LEON, S. A. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. **American Cancer Society**. v. 11, p. 2116–2120, 1983.
170. FONTANA NICOLETTI, N.; GRIVICICH, I.; SIMON, D. Ácidos nucléicos circulantes no sangue como biomarcadores de câncer gástrico Circulating nucleic acids in blood as biomarkers of gastric cancer. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 43, p. 67–71, 2011.
171. HOQUE, M. O.; BEGUM, S.; TOPALOGLU, O.; CHATTERJEE, A.; ROSENBAUM, E.; CRIEKINGE, W. V.; WESTRA, W. J.; SCHOENBERG, M.; ZAHURAK, M.; GOODMAN, S. N.; SIDRANSKY, D. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. **Journal of the National Cancer Institute**. v. , p. , 2006.
172. JAHR, S.; HENTZE, H.; ENGLISCH, S.; HARDT, D.; FACKELMAYER, F. O.; HESCH, R.-D.; KNIPPERS, R. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients : Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients : Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necr. **Cancer ResEARCH**. v. 61, p. 1659–1665, 2001.

173. LEE, T. H.; MONTALVO, L.; CHREBTOW, V.; BUSCH, M. P. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. **Transfusion**. v. 41, p. 276–282, 2001.
174. UTTING, M.; WERNER, W.; DAHSE, R.; SCHUBERT, J.; JUNKER, K. Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. **Clinical Cancer Research**. v. 8, p. 35 - 40, 2002.
175. BRYZGUNOVA, O. E.; SKVORTSOVA, T.E.; KOLESNIKOVA, E. V.; STARIKOV, A. V.; RYKOVA, E. Y.; VLASSOV, V. V.; LAKTIONOV, P. P. Isolation and comparative study of cell-free nucleic acids from human urine. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075., 2006, New York. **Anais...** New York: New York Academy of Sciences, 2006. p. 334 - 340.
176. CHEN, Y.; CHEM, C.-L.; CHEN, H.-W.; CHUNG, T.; WU, C.-C.; CHEN, C.-D.; HSU, C.-W.; CHEN, M.-C.; TSUI, K.-H.; CHANG, P.-L.; CHANG, Y. S.; YU, J. S. Discovery of Novel Bladder Cancer Biomarkers by Comparative Urine Proteomics Using iTRAQ Technology. **Journal of Proteome Research**. v. 9, p. 5803–5815, 2010.
177. ZANCAN, M. FRANCESCHINI, R.; MIMMO, C.; VIANELLO, M.; DI TONNO, F.; MAZZARIOL, C.; MALOSSINI, G.; GION, M. URO-SCIENCE Free DNA in Urine: A New Marker for Bladder Cancer? Preliminary Data Urological Survey. **The Journal of Urological Survey**. v. 175, p. 787, 2006.
178. YU, J.; ZHU, T.; WANG, Z.; ZHANG, H.; QIAN, Z.; XU, H.; GAO, B.; WANG, W.; GU, L.; MENG, J.; WANG, J.; FENG, X.; LI, Y.; YAO, X.; ZHU, J. A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 13, p. 7296 - 7304, 2007.
179. PicoGreen® Assay for dsDNA. Thermo Fisher Scientific - NanoDrop products. Disponível em: < <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PicoGreen-dsDNA-protocol.pdf>>. Acesso em 07 de junho de 2017.
180. PINTO, G. V. V.; ABREU, C. A. M.; KNOECHELMANN, A.; ALMEIDA, Y. M. B. Caracterização Físico-Química da Superfície de Filmes de Poli(Tereftalato de Etileno). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. p. 184 - 188, 1999.
181. GODDARD, J. M.; HOTCHKISS, J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Progress in Polymer Science**. v. 31, p. 698 - 725, 2007.
182. Material Safety, 3M. PP2200. Disponível em <<http://multimedia.3m.com/mws/media/3602000/pp-2200-dk.pdf>>. Acesso dia: 07 de junho de 2017.
183. 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, p. 192–197, 2005.

184. Material Safety, 3M. 3M Multipurpose Transparency Film. Disponível em <<http://multimedia.3m.com/mws/media/7930480/3mtm-multipurpose-transparency-film-material-safety-data-sheet.pdf>>. Acesso dia: 07 de junho de 2017.
185. CARRASCO, F.; PAGES, P. Thermogravimetric Analysis of Polystyrene: Influence of Sample Weight and Heating Rate on Thermal and Kinetic Parameters. **Journal Applied Polymer Science**. v. 61, p. 187–197, 1996.
186. HOLLAND, B.; HAY, J. The thermal degradation of PET and analogous polyesters measured by thermal analysis–Fourier transform infrared spectroscopy. **Polymer**. v. 43, p. 2207–2211, 2002.
187. Espectral database for organic compounds (SDBS). http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi 1 (2017). Available at: http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi. (Accessed: 28th June 2017)
188. MERRETT, K.; CORNELIUS, R. M.; MCCLUNG, W. G.; UNSWORTH, L. D.; SHEARDOWN, H. Surface analysis methods for characterizing polymeric biomaterials. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**. v. 13, p. 593–621, 2002.
189. GORKIN, R.; PARK, J.; SIEGRIST, J.; AMASIA, M.; LEE, B. S.; PARK, J.-M.; KIM, J.; KIM, H.; MADOU, M.; CHO, Y.-K. Centrifugal microfluidics for biomedical applications. **Lab on a Chip**. v. 10, p. 1758–1773, 2010.
190. GIORDANO, B. C.; FERRANCE, J.; SWEDBERG, S.; HÜHMER, A. F.; LANDERS, J. P. Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds. **Analytical Biochemistry**. v. 291, p. 124–132, 2001.
191. CANOLA, P. A.; OLIVEIRA, R.; BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z. Estudo comparativo entre técnicas de extração de DNA e realização de reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico de *Theileria equi* e *Babesia caballi*. **ARS Veterinária**. v. 23, p. 165–171, 2007.
192. Applied Biosystems. PCR Optimization --Reaction Conditions and Components. PCR Technical Section. PE Biosystems. p. 1-6. Disponível em <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_039627.pdf>. Acesso dia: 20 de junho de 2017.
193. PALUMBI, S.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; MCMILLAN, W. O.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. The simple Fool's guide to PCR. v. 2, p. , 2002.