UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

RENATO SOUSA LIMA

Sistemas microfluídicos eletroquímicos ultrassensíveis

São Carlos

2013

RENATO SOUSA LIMA

Sistemas microfluídicos eletroquímicos ultrassensíveis

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho.

São Carlos

2013

EXEMPLAR REVISADO

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

São Carlos, 13 de Setembro de 2013.

Renato Sousa Lima

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Francisco Sousa Neto e Maria Aparecida de Sousa Lima, avó (*In Memoriam*), Ana Rosa Xavier, e aos meus irmãos Francisco Sousa Júnior e Rosana Sousa Lima. Todos foram essenciais para as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

- + Aos meus pais, Francisco Sousa Neto e Maria Aparecida de Sousa Lima, minhas maiores referências de vida.
- + Ao professor Dr. Emanuel Carrilho pelas discussões, científicas ou não e que, embora em poucas ocasiões, foram valiosas, e pela liberdade de pesquisa concedida, fundamental para o que sou hoje como pesquisador.
- + Aos amigos Thiago Segato e Marco Horn (Gaúcho) pelos pensamentos científicos e, mais importante, filosóficos compartilhados e também pela amizade valiosa durante todos esses últimos anos.
- + Ao Laboratório de Microfabricação (LMF) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), em especial ao seu responsável, Angelo Luiz Gobbi, e técnica, Maria Helena de Oliveira Piazzetta. Esses contribuíram de maneira expressiva para a viabilidade prática das ideias propostas durante o doutoramento com soluções e alternativas sempre inteligentes e objetivas. Agradeço-lhes também pela amizade, conselhos e solicitude.
- + Aos integrantes do grupo BioMics, em especial à Juliane Borba, Alessandra Maffei e Paulo Leão pelas discussões e amizade. Esses dois últimos foram essenciais para a execução do **CAPÍTULO 3** desta tese.
- + Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), a se considerar professores e demais funcionários, pela assistência acadêmica e suporte técnico concedidos durante todos esses anos de mestrado e doutorado.
- + À FAPESP (processo 2010/08559-9) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro quanto à execução deste projeto de pesquisa.
- + Ao pessoal do futebol do IQSC (Fala Muito Futebol Clube—Marcelão, Prof. Sérgio, Ti Marco, Eduardo, Murilo, Fernando, Thiago, Toni, Eli e tantos outros) e à galera do *hockey in line* [São Carlos Locomotiva, Sertãozinho *Spider* e Bauru BTC—João Luiz Coube (Coubessom ou, mais popularmente, Patifaria), Aref (Arefssom), Vinícius, André Higa, Lucas (*In Memoriam*), João Poletto, Helder, Tornich, Daniel, Wesley, Ricardo, Gordo, João Crês, Cláudio, Gabriel, Emmerich, Marinho, Bruno, Magon, Desson e tantos outros] pelos momentos bons de diversão/competição e “recarga” mental.

RESUMO

LIMA, R. S. **Sistemas microfluídicos eletroquímicos ultrassensíveis**. 2013. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Esta tese de doutorado aborda o desenvolvimento de sistemas microfluídicos eletroquímicos ultrassensíveis mediante a integração de eletrodos *i)* concêntricos e *ii)* nanoestruturados seletivos à detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (*capacitively coupled contactless conductivity detection*, C⁴D) e à amperometria, respectivamente. O uso dos eletrodos concêntricos, uma configuração inédita em microdispositivos na qual o filme fino metálico circunda todo o microcanal, se mostrou efetivo na melhora da detectabilidade da C⁴D para análises em fluxo de soluções padrão de LiClO₄. O limite de detecção (LD) para esse sal foi igual a 343 pmol L⁻¹, um valor aproximadamente quatro ordens de grandeza inferior àquele obtido com eletrodos planares. O *microchip* amperométrico nanoestruturado, por sua vez, consistiu de filmes de Au modificados com nanotubos de carbono de parede única (*single-walled carbon nanotubes*, SWCNTs) verticalmente alinhados e foi aplicado a padrões do neurotransmissor serotonina. A melhora na detectabilidade do método foi novamente apreciável; os valores de LD foram de 11,8 (Au liso) e 0,2 nmol L⁻¹ (Au modificado com os SWCNTs verticalmente alinhados). Esse último é menor frente à grande maioria dos valores descritos na literatura, para os quais técnicas diversas foram empregadas, incluindo: *i)* potenciometria com eletrodos modificados (1,0 a 500 nmol L⁻¹), *ii)* HPLC-MS (18,2 nmol L⁻¹), *iii)* eletroforese capilar combinada com etapas de extração, empilhamento e préconcentração do analito (7,9 nmol L⁻¹) e *iv)* sensor químico (200 nmol L⁻¹). Finalmente, objetivando a fabricação de *microchips* de vidro, condutométricos e amperométricos, incorporando eletrodos concêntricos nanoestruturados, uma nova técnica de selagem foi desenvolvida. Essa técnica, designada como selagem adesiva de sacrifício, baseia-se no uso do resiste negativo SU-8 como camada intermediária de modo a permitir a vedação entre duas lâminas de vidro. Numa etapa posterior, a remoção seletiva do SU-8 sob o microcanal é realizada. Logo, canais microfluídicos com propriedades de superfície similares às do vidro foram obtidos. O protocolo experimental adotado é *i)* simples, *ii)* rápido, *iii)* não envolve níveis de pressão e temperatura elevados e *iv)* prescinde o uso de salas “limpas”. Vedações com forças de adesão satisfatórias foram alcançadas, suportando pressões superiores a 4 MPa.

Palavras-chave: Sensibilidade. *Microchip*. Configuração de eletrodos.

ABSTRACT

LIMA, R. S. **Ultrasensitive electrochemical microfluidic systems**. 2013. Thesis (Doctorate in Analytical Chemistry) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

This PhD thesis reports the development of ultrasensitive electrochemical microfluidic systems by integrating concentric and nanostructured electrodes selective to capacitively coupled contactless conductivity detection (C^4D) and amperometry, respectively. The use of the concentric electrodes, a new assembly in microdevices with thin films wrapping around the microchannel, showed to be effective towards improvement of the detectability in pressure-driven flow platforms incorporating C^4D . The limit-of-detection (LOD) in flow analysis of $LiClO_4$ solutions was 343 pmol L^{-1} , *ca.* four orders of magnitude lower than to the levels obtained with planar electrodes alone. The nanostructured amperometric microchip, in turn, is related to integration of vertically aligned single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) over Au film. Such platform was applied to determination of serotonin standards. The nanomaterial influenced remarkably the sensitivity and detectability. Our system achieved a LOD of 0.2 nmol L^{-1} , to the best of our knowledge one of the lowest values reported in the literature. Finally, in order to fabricate glass microdevices, conductometric and amperometric, with nanostructured concentric electrodes, we developed a new bonding method. This technique, called as sacrificial adhesive bonding, is based on SU-8 negative resist like intermediate layer so to allow the sealing between two glass slides. Next, the selective removal of the SU-8 under the microchannel is carried out. Thus, microfluidic channels presenting glass-like surface properties were achieved. The experimental protocol is simple and fast. In addition, neither high-pressure and elevated-temperature nor the use of “clean” rooms were not required. Bondings with satisfactory adhesion forces were obtained, supporting pressures above 4 MPa.

Keywords: Sensitivity. Microchip. Electrode assembly.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1.** *Microchip* C⁴D_C. Lâminas de vidro com eletrodos planares recobertos por PDMS (a) e eletrodos semiconcêntricos depositados no microcanal e isolados por SiO₂ (b), dispositivo final (c) e micrografia do microcanal ilustrando o eletrodo semiconcêntrico no interior do microcanal (d). R₁, R₂ e R₃, reservatórios para água, eletrólito e descarte, respectivamente; e_{exc}, eletrodo de excitação e e_r, eletrodo receptor. 35
- Figura 1.2.** *Layouts* das máscaras utilizadas nos processos de gravação dos microcanaís (a) e eletrodos (b) em C⁴D_C. Os microcanaís desenhados na figura (a) tiveram 100 µm de largura. Na figura (b), os *pads* localizados no centro da máscara apresentaram espaçamento de 0,6 mm e dimensões iguais a 1,0 x 1,0 mm. 36
- Figura 1.3.** Oxidação da superfície do PDMS em plasma de O₂ (a) e reação de condensação entre as superfícies hidratadas de PDMS e vidro (b). 40
- Figura 1.4.** Instrumentação analítica empregada. Inserção 1, foto ampliada do porta-amostra ilustrando a integração entre as mangueiras dos fluidos e o *microchip* e as conexões elétricas (J). G, gerador de função; B, bomba-seringa; S_A e S_B, seringas contendo amostra e tampão, respectivamente; T, mangueira de teflon; F, fonte de alimentação; C, circuito de recepção de sinais e porta-amostra (6,2 x 13,3 x 15,1 cm); A, circuito de amplificação de sinais (5,2 x 8,3 x 13,1 cm) e D, descarte. 41
- Figura 1.5.** Circuitos do detector C⁴D. Módulo (a), contendo as etapas de conversão i/e, 1, retificação, 2, e filtragem, 3, e módulo (b), contendo as etapas de amplificação, 4, e compensação da linha de base, 5. 41
- Figura 1.6.** Modelo elétrico do C⁴D_C. S, sinal RF; D, detector; C_S and C_P, capacitâncias estabelecidas entre a solução e os eletrodos planares e semiconcêntricos, respectivamente; C_o, capacitância de fuga e R, resistência da solução. 43
- Figura 1.7.** Capacitores representando o sistema eletrodo semiconcêntrico/SiO₂/solução. 44
- Figura 1.8.** Imagens de FEG-SEM do microcanal selado e dos filmes finos de Cr/Al isolados com SiO₂ em regiões diferentes do microcanal. i, interior do microcanal. As espessuras discriminadas são valores médios obtidos ao longo da micrografia. 47
- Figura 1.9.** Imagens de AFM obtidas para os dielétricos PDMS (a) e SiO₂ (b). Os picos observados na figura (b) se devem à presença de material particulado na superfície de SiO₂ (a amostra não foi preparada em sala “limpa”). 48
- Figura 1.10.** Caracterização do filme nanofino de SiO₂ empregado como dielétrico em C⁴D_C. Espectro de XPS exploratório (a) e linha de fotoemissão do pico N 1s. Na figura (b), os valores de E_L (eV) e as quantidades percentuais relativas de cada componente são discriminados entre parênteses. 51
- Figura 1.11.** Voltamogramas cíclicos referentes ao tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH 8,0) empregando eletrodos planar (a) e semiconcêntrico (b) como eletrodo de trabalho. Foram empregados Ag/AgCl como eletrodo de referência e fio de Pt como eletrodo auxiliar. Na figura (b) são expressas as espessuras de SiO₂ utilizadas para deposição sobre os eletrodos. 54
- Figura 1.12.** Estudo dos parâmetros da C⁴D. Variações da razão S/N em função da frequência sob amplitudes de potencial diferentes usando C⁴D_P (a), C⁴D_S (b) e C⁴D_C (c) aos padrões 1,0 mmol L⁻¹, 0,5 µmol L⁻¹ e 0,3 µmol L⁻¹ de LiClO₄, respectivamente. A frequência ótima é destacada para cada valor de amplitude aplicada. Condições experimentais: vazão de 20 µL min⁻¹ e tempo de amostragem em torno de 90 s. 56
- Figura 1.13.** Respostas obtidas a padrões aquosos de LiClO₄ aplicando-se os *microchips* C⁴D_P (a), C⁴D_S (b) e C⁴D_C (c). Condições experimentais: 10 (C⁴D_P), 5 (C⁴D_S) e 2 kHz (C⁴D_C) de frequência e 10 V_{P-P} de amplitude para todos os dispositivos. Demais condições descritas na Figura 1.12. 58
- Figura 1.14.** Curvas analíticas obtidas a padrões aquosos de LiClO₄ usando os *microchips* C⁴D_P (a), C⁴D_S (a,b) e C⁴D_C (a,b). Na figura (b) é mostrada uma visão ampliada das curvas considerando-se a faixa de concentração utilizada para os microdispositivos C⁴D_S e C⁴D_C—destacada na figura (a). Condições experimentais: ver Figuras 1.12 e 1.13. 59

Figura 1.15. Respostas médias ($n = 4$) obtidas a padrões aquosos de LiClO_4 25 nmol L^{-1} usando <i>microchips</i> C^4D_c em dias e por operadores diferentes (seguem em cores distintas). Condições experimentais: ver Figuras 1.12 e 1.13 .	61
Figura 2.1. Tipos de CNTs. Arte gráfica ilustrando SWCNTs (a) e MWCNTs (b) . Imagens extraídas do site: http://www.sciencephoto.com/ .	66
Figura 2.2. Dispositivo microfluídico e caracterização morfológica do eletrodo de trabalho. Diagrama esquemático das camadas que compõem o <i>microchip</i> (a) , foto do dispositivo (b) e imagens de AFM das superfícies de Au lisa (c) e modificada com os SWCNTs verticalmente alinhados (d) . WE, CE e RE são os eletrodos de trabalho (contendo os SWCNTs), auxiliar e de <i>pseudoreferência</i> , respectivamente.	70
Figura 2.3. <i>Layouts</i> das máscaras usadas nos processos de gravação dos microcanais (a) e eletrodos (b) , respectivamente.	71
Figura 2.4 Caracterização eletroquímica do sistema sob regime de fluxo estático. Análises por CV (a) e DPV (b) utilizando-se Au e Au/ssDNA/SWCNT como eletrodos de trabalho em solução de serotonina 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 100 mmol L^{-1} (pH 6,0). Inserção na figura (a) : estrutura da serotonina (extraída do site: http://www.sciencephoto.com/). Condições experimentais: filmes finos de Au como CE e RE, taxa de varredura igual a 50 mV s^{-1} (CV), 100 mV de amplitude (DPV) e degrau de potencial em 2 mV (DPV).	75
Figura 2.5. Estudo do efeito dos SWCNTs sobre a sensibilidade e detectabilidade a partir da análise em fluxo a padrões de serotonina por amperometria. Curvas de calibração obtidas em <i>microchips</i> incorporando Au e Au/ssDNA/CNTs como eletrodos de trabalho (a) e sinais associados ao eletrodo Au/ssDNA/CNTs (b) . Condições experimentais: soluções contendo padrões de serotonina em PBS 100 mmol L^{-1} (pH 6,0), potencial de trabalho igual a +0,4 V, tempo de injeção em 5 s e vazões de 30 e 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ para amostra e eletrólito, respectivamente.	77
Figura 3.1. Seção transversal de um microcanal obtido através da técnica de selagem com camada intermediária seletiva. m, microcanal; c, camada intermediária e s, substrato.	86
Figura 3.2. Etapas da selagem com camada adesiva de sacrifício. Lâmina plana de vidro (a) , deposição do SU-8 sobre essa lâmina seguida da etapa de <i>prebake</i> (b) , selagem preliminar pressionando a lâmina plana contra o substrato contendo canal recoberto por filme fino opaco (dourado na figura) (c) , cura (exposição UV e PEB) do fotorresiste localizado em volta do canal (d) , remoção do SU-8 não curado e, sequencialmente, do filme fino presentes no interior do canal microfluídico mediante o bombeamento de soluções removedores específicas (fluidos representados em azul) (e) e resultado final com o microcanal apresentando uma estrutura idêntica àquela mostrada na Figura 3.1 (f) .	89
Figura 3.3. Estruturas e reações envolvidas no processo de cura do SU-8. Monômeros de SU-8 (a) , formação do ácido de Lewis fotoiniciador das reações de polimerização em UV (b) e polimerização sob o efeito da temperatura (PEB) (c) .	91
Figura 3.4. Máscaras alternativas. Solução de corante ou metal líquido no interior do canal (a) e máscara convencional (b) .	92
Figura 3.5. Etapas para deposição do filme de Al no interior das cavidades do microcanal e ATZs.	93
Figura 3.6. Lâmina do substrato incorporando microcanal, ATZs e reservatórios. Foto da lâmina (a) , imagem de perfilometria do microcanal e ATZs (b) e fotos (Hirox digital microscope KH-7700) ilustrando o recobrimento dessas cavidades pelo filme de Al (c,d) . m, microcanal; ATZ, <i>air-trapping zone</i> e r, reservatório.	97
Figura 3.7. Teste de uniformidade. Espessuras de filmes de SU-8 depositados por <i>spinning</i> sobre vidro (a) e imagem de AFM da superfície desse resiste obtido utilizando-se dois ciclos de velocidade (b) .	101
Figura 3.8. Teste de hermeticidade. Fotos de <i>microchips</i> com (a) e sem (b) as ATZs. m, microcanal e ATZ, <i>air-trapping zone</i> .	102
Figura 3.9. Imagens de FEG-SEM da seção transversal do microcanal a níveis de resolução diferentes.	103
Figura 3.10. Teste da força de adesão. Dados de pressão em função da vazão aplicada para microdispositivos selados usando filmes de SU-8 obtidos após as etapas de <i>prebake</i> , exposição UV e PEB.	104

- Figura 3.11.** Imagem de FEG-SEM da seção transversal do microcanal vidro/SU-8 a níveis de resolução diferentes. Inserções: **1**, imagem ampliada da borda da lâmina de vidro inferior recoberta por SU-8 e **2**, foto do microdispositivo vidro/SU-8 usado para os testes de caracterização elétrica. m, microcanal; r, reservatório; S₁, lâmina de vidro plana recoberta por SU-8 e S₂, substrato de vidro incorporando microcanal, ATZs e reservatórios. O espaçamento observado entre o vidro corroído e a camada de resiste reflete zonas não seladas as quais se originaram do processo de corte do microdispositivo para a obtenção das imagens. Esse processo baseou-se numa fratura mecânica do *microchip* na região do microcanal. 107
- Figura 3.12.** Mobilidade eletrosmótica em função do pH para *microchips* de vidro e vidro/SU-8. Seu cálculo foi feito pelo método de monitoramento da corrente usando tampão fosfato (10 e 20 mmol L⁻¹) e campo elétrico de 400 V cm⁻¹. 109
- Figura 3.13.** Gráficos da lei de Ohm para *microchips* de vidro e vidro/SU-8. Condições: tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ e pH 8. 111
- Figura 3.14.** Gráfico da lei de Ohm para microdispositivos de vidro e vidro/SU-8/vidro. Condições: tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ e pH 8. Monitoramento da corrente em tempo real por 2 min. 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Valores de LD reportados na literatura para métodos baseados em C ⁴ D e fluxo assistido por pressão	61
Tabela 2.1. Valores de LD reportados na literatura para determinação de serotonina	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Ácido ascórbico (*ascorbic acid*).

AFM - Microscopia de força atômica (*atomic force microscopy*).

ALD - Deposição por camadas atômicas (*atomic layer deposition*).

AMPA - Ácido aminometilfosfônico (*aminomethylphosphonic acid*).

APTS - 3-aminopropil(trietoxisilano) (*3-aminopropyltriethoxy silane*).

C - Capacitância.

C⁴D - Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (*capacitively coupled contactless conductivity detection*).

C⁴D_c - Detecção condutométrica sem contato com eletrodos concêntricos.

C⁴D_p - Detecção condutométrica sem contato com eletrodos planares.

C⁴D_s - Detecção condutométrica sem contato com eletrodos semiconcêntricos.

CCDM - Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais.

CD-R - Disco compacto regravável (*recordable compact disc*).

CE - Eletroforese capilar (*capillary electrophoresis*).

CE-LIF - *Capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence*.

C_o - Capacitância de fuga (*stray capacitance*).

Conversão A/D - Conversão analógico/digital.

Conversão i/e - Conversão corrente/potencial.

CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais.

DC - Corrente alternada (*direct current*).

D_p - Densidade de picos.

E_L - Energia de ligação.

e_{exc} - Eletrodo de excitação.

e_r - Eletrodo receptor.

GBL - Gama-butirolactona.

HMDS - 1,1,1,3,3,3-Hexametildisilazano.

HPLC - Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*).

IQ - Instituto de Química.

IQSC - Instituto de Química de São Carlos.

ITO - Óxido de índio e estanho (*indium tin oxide*).

LCE - Laboratório de Caracterização Estrutural.

LC-MS - *Liquid chromatography-mass spectrometry*.

LD - Limite de detecção.

LMF - Laboratórios de Microfabricação.

LNNano - Laboratório Nacional de Nanotecnologia.

MEMS - Sistema microeletromecânico (*microelectromechanical system*).

MEV - Microscopia eletrônica de varredura.

MMQ - Método dos mínimos quadrados.

MW - Micro-ondas (*microwave*).

MWCNT - Nanotubo de carbono de paredes múltiplas (*multiwalled carbon nanotubes*).

NP - Nanopartículas (*nanoparticles*).

NT - Nanotubos (*nanotubes*).

NW - Nanofios (*nanowires*).

OPA - Amplificador operacional (*operational amplifier*).

PBS - Tampão fosfato (*phosphate buffer solution*).

PC - Policarbonato.

PCB - Placa de circuito impresso (*printed circuit board*).

PDMS - Poli(dimetilsiloxano).

PE - Polietileno.

PEB - Cura pós-exposição (*post exposure bake*).

PECVD - Deposição química em fase vapor assistida por plasma (*plasma-enhanced chemical vapor deposition*).

PEEK - Poli(éter-éter-cetona) (*polyether ether ketone*).

PET - Poli(etileno-tereftalato).

PFPE - Perfluoropoliéter.

PGMEA - Propileno glicol monometil éter acetato (*propylene glycol monomethyl ether acetate*).

PMMA - Poli(metilmetacrilato).

PP - Poli(propileno).

PPF - Filmes obtidos pela polimerização por plasma.

PS - Poli(estireno).

PT - Poliéster/toner.

PTFE - Politetrafluoretileno (*polytetrafluoroethylene*).

PU - Poli(uretana).

PVC - Poli(cloreto de vinila).

RC - Canal de referência (*reference channel*).

RF - Radiofrequência.

RIE - Corrosão por íon reativo (*reactive ion etching*).

RMS - Rugosidade média quadrática (*root mean square*).

RSD - Desvio padrão relativo (*relative standard deviation*).

SC - Canal de separação (*separation channel*).

FEG-SEM - Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (*field emission gun scanning electron microscopy*).

SWCNT - Nanotubo de carbono de parede única (*single-walled carbon nanotubes*).

S/N - Razão sinal/ruído (*signal-to-noise ratio*).

S/V - Razão área/volume (*surface-to-sample-volume ratio*).

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos.

ULSI - Integração em escala ultra larga (*ultra large scale integration*).

USP - Universidade de São Paulo.

UA - Ácido úrico (*uric acid*).

XPS - Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (*X-ray photoelectron spectroscopy*).

μCP - Impressão por microcontato (*microcontact printing*).

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	17
CAPÍTULO 1 - Eletrodos concêntricos em C⁴D	19
1.1. Considerações gerais sobre C ⁴ D em microdispositivos	20
1.2. Microfabricação	33
1.3. Modelo elétrico e cálculo da capacitância	42
1.4. Distribuição dos filmes finos no microcanal	46
1.5. Caracterização dos dielétricos	48
1.6. Teste de isolamento elétrico dos eletrodos	52
1.7. Estudo dos parâmetros da C ⁴ D	55
1.8. Teste de sensibilidade e detectabilidade	57
1.9. Teste de repetibilidade	60
1.10. Conclusões	62
CAPÍTULO 2 - Eletrodos nanoestruturados em voltametria	64
2.1. Introdução	65
2.2. Microfabricação e construção dos nanotubos	69
2.3. Caracterização morfológica	73
2.4. Aplicação do microdispositivo em voltametria	74
2.5. Conclusões	79
CAPÍTULO 3 – Selagem adesiva de sacrifício	80
3.1. Introdução	81
3.2. Selagem com camada adesiva de sacrifício	88

3.3. Microfabricação	95
3.4. Caracterização	100
3.5. Efeito das camadas residuais de SU-8 sobre as propriedades do microcanal	106
3.6. Conclusões	113
 ETAPAS FUTURAS	 116
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 119
 ANEXOS	 127
 SÚMULA CURRICULAR	 209

APRESENTAÇÃO

O uso dos eletrodos concêntricos foi avaliado em experimentos de condutometria sem contato, ao passo que os eletrodos modificados com nanotubos de carbono foram aplicados somente em voltametria. Os resultados obtidos são descritos nos **CAPÍTULOS 1** (condutometria) e **2** (voltametria) desta tese. Finalmente, visando à construção de *micro-chips* amperométricos de vidro contendo eletrodos concêntricos nanoestruturados, um método de selagem inédito foi proposto. Considerações gerais e os resultados obtidos de desenvolvimento do protocolo experimental e estudos de caracterização e validação da técnica seguem descritos no **CAPÍTULO 3** desta tese.

As páginas que antecedem cada capítulo contemplam figuras e legendas as quais tem por finalidade permitir uma visualização e compreensão rápidas do tema abordado e seus resultados principais.

CAPÍTULO 1

Eletrodos concêntricos em C^4D

Microdispositivo com eletrodos concêntricos e estudo de sensibilidade e detectabilidade. Lâminas de vidro contendo eletrodos planares recobertos por PDMS (a) e eletrodos semiconcêntricos depositados no microcanal e isolados por SiO_2 (b), *microchip* selado com os eletrodos alinhados (c), imagem de perfilometria mostrando o eletrodo semiconcêntrico depositado no interior do microcanal (d), e curvas de calibração obtidas a padrões aquosos de $LiClO_4$ usando os microssistemas C^4D_P (e), C^4D_S (e,f) e C^4D_C (e,f). R_1 , R_2 e R_3 , reservatórios para água, eletrólito e descarte, respectivamente, e C^4D_P , C^4D_S , e C^4D_C , sistemas condutométricos sem contato com eletrodos planares (eletrodos apenas na lâmina mostrada em (a)), semiconcêntricos (eletrodos apenas na lâmina mostrada em (b)) e concêntricos, respectivamente.

O uso da detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (*capacitively coupled contactless conductivity detection*, C⁴D) em sistemas analíticos miniaturizados cresceu significativamente nos últimos doze anos. Desde o primeiro trabalho reportado na literatura, em 2001, avanços na geometria da cela de detecção, estratégias para aumentar a detectabilidade do método e aplicações a matrizes diversas foram descritos. Uma revisão bibliográfica abordando os avanços ocorrentes entre 2001 e 2012 em C⁴D integrada a dispositivos microfluídicos foi publicada recentemente no periódico *Analytical Methods*. Esse artigo se encontra disponível em ANEXO I. Adicionalmente, considerações teóricas sobre técnica podem ser encontradas em ANEXO II e em ANEXO III.

1.1. Considerações gerais sobre C⁴D em microdispositivos

Substratos

Histórico

Os primeiros microssistemas analíticos resultaram de adaptações da fotolitografia, tecnologia então desenvolvida nas décadas de 70 e 80 pela indústria microeletrônica. Em face ao amplo emprego do silício para a confecção de circuitos integrados, esse material foi o substrato pioneiro em microfluídica. No entanto, em função do seu custo elevado e demais parâmetros (transparência óptica, inércia química e propriedades elétricas) inadequados para esse tipo de aplicação, o silício foi substituído gradualmente por vidro e quartzo.¹

No início da década de 90, vidro e quartzo eram os substratos mais utilizados. Tais compostos, embora possuam propriedades de superfície adequadas para uma série de

aplicações, requerem instrumentação de alto custo e salas “limpas” para o processo de microfabricação restringindo, desse modo, o seu uso a poucos grupos de pesquisa. Neste contexto, avanços tecnológicos ocorrentes nas últimas duas décadas possibilitaram o desenvolvimento de substratos alternativos, em especial os polímeros. Para o campo da microfluídica, essas substâncias agregam vantagens significativas, incluindo: i) custo reduzido, ii) facilidade de microfabricação, iii) transparência óptica e iv) inércia química.² Por outro lado, o uso de polímeros em microfluídica exhibe desvantagens dentre as quais se destacam a autofluorescência e baixas estabilidades mecânica, térmica e química (quando expostos a solventes orgânicos).^{3,4} Nos últimos dez anos, os microdispositivos híbridos vidro/polímero surgiram como uma nova alternativa, em especial para aplicações em eletroforese.⁵⁻¹⁰ Tais sistemas agregam vantagens intrínsecas a compostos vítreos (fluxo eletrosmótico estável, condutividade térmica alta e estabilidades mecânica, térmica e química apreciáveis) e poliméricos (facilidade e baixo custo de fabricação).

Vidro

O vidro, o qual se constitui basicamente de uma estrutura amorfa de SiO_2 , é o material mais utilizado em microfluídica, seja para a confecção de microcanais ou para a deposição/integração de eletrodos em métodos elétricos e eletroquímicos.¹ Algumas de suas vantagens incluem: i) baixo custo, ii) inércia química, iii) estabilidade térmica, iv) compatibilidade de superfície para a deposição de metais e semicondutores (seus coeficientes de expansão térmica são, em geral, da mesma ordem de grandeza, variando de unidades a dezenas de 10^{-6} cm/cm °C), v) fluxo eletrosmótico elevado, ideal para aplicações em CE, e a vi) repetibilidade e robustez de suas tecnologias de microfabricação.^{1,11,12}

Mediante o uso de técnicas de litografia de alta resolução (por feixes de fótons, íons ou elétrons) e corrosão via úmida, o vidro possibilita a fabricação de canais da ordem de até unidades de nanômetros.¹³ Atualmente, a nanofluídica figura como um campo de pesquisa promissor em segmentos distintos da ciência moderna. Ganhos expressivos de sensibilidade, detectabilidade, cinética e resolução de separação são advindos com o uso de sistemas nanofluídicos. Em adição, dadas as similaridades entre o comprimento de Debye e as dimensões do canal—o que eleva o efeito da dupla camada elétrica sobre o transporte de massas, alternativas inovadoras no tocante ao desenvolvimento de circuitos eletrônicos fluídicos e sistemas de separação, préconcentração e injeção são criadas.^{14,15}

PDMS

Poli(dimetilsiloxano) (PDMS) é o substrato polimérico mais usado em microfluídica.¹⁶ O PDMS é um elastômero cujos monômeros apresentam a fórmula molecular: $-(\text{CH}_3)_2\text{O}-$. Algumas de suas vantagens são: *i)* absorção de água reduzida e *ii)* energia de superfície alta (20 erg cm^{-2}), facilitando o seu desprendimento de moldes em processos de microfabricação por moldagem.¹⁷ Em adição, embora tenha um tempo de vida prolongado em temperaturas altas, o PDMS se degrada completamente e de maneira relativamente rápida em condições naturais de pressão e temperatura, não representando, assim, um risco importante ao meio ambiente.¹⁸

Pesquisas em microfluídica empregando o PDMS como substrato cresceram exponencialmente desde o ano de 2003. Sua fabricação simples e propriedades físicas elastoméricas facilitam a integração de válvulas, bombas, reatores e detectores aos *microchips* com vista à construção de microssistemas para análises totais (*micro total*

analysis systems, μ TAS).² O desenvolvimento de dispositivos μ TAS representa um dos desafios atuais em microfluídica.

O avanço das tecnologias de microfabricação ocorrente, em especial, nas últimas duas décadas, possibilitou um avanço notório no campo das pesquisas biomédicas instrumentais *in vivo*, a destacar aquelas baseadas em eletrodos implantáveis (em geral, Au ou Pt) para uso elétrico ou eletroquímico. Substratos como vidro, quartzo, silício e alumina não são viáveis nesse caso haja vista sua rigidez mecânica. Neste cenário, os polímeros elastoméricos (flexíveis e, em alguns casos, biocompatíveis) representam uma alternativa potencial. Neste ínterim, em linhas gerais, o uso de elastômeros como substrato para a deposição de filmes finos semicondutores e metálicos apresenta limitações importantes.

A primeira das limitações associadas ao uso de elastômeros como substrato para a deposição de eletrodos diz respeito à diferença entre os coeficiente de expansão térmica de polímeros e semicondutores/metais, para os quais são cerca de uma ordem de grandeza menores. Esse fenômeno gera estresse térmico (gradiente de temperatura entre regiões adjacentes) podendo levar a rachaduras ou até mesmo remoção dos filmes depositados sobre a superfície do polímero. Ademais, grande parte dos elastômeros e termoplásticos apresentam incompatibilidade química no tocante aos solventes (geralmente orgânicos) utilizados na etapa de revelação em técnicas litográficas de microfabricação.² O polidimetilsiloxano (PDMS), por exemplo, intumescce quando exposto a solventes orgânicos como hexano, tolueno, diclorometano e acetonitrila, dentre outros.¹⁹ Um outro obstáculo frente ao uso de polímeros como substrato para a deposição de eletrodos diz respeito à adesão ineficiente entre superfícies poliméricas e semicondutores/metais. O uso de agentes promotores de adesão (usualmente um segundo metal, como Ti e Cr) e a oxidação da

superfície do polímero em plasma de O₂ figuram como alternativas objetivando uma adesão mais efetiva.²

Não obstante as dificuldades relacionadas ao uso de elastômeros como substrato para a deposição de semicondutores e metais, métodos foram desenvolvidos com sucesso em relação ao uso do PDMS. Neste contexto, existem três possibilidades: i) revestimento autocatalítico (*electroless plating*), ii) impressão por microcontato (*microcontact printing*, μ CP) e iii) fotolitografia seguida de deposição de filmes finos em fase vapor. A primeira baseia-se em reações químicas as quais resultam no revestimento metálico das paredes internas do PDMS. O processo pode ocorrer utilizando-se fluidos sob regime de fluxo laminar (número de Reynolds menor que 2.000 de modo que a mistura das espécies se dá apenas por difusão)^{20,21} ou em áreas seletivas gravadas por fotolitografia,²² permitindo a obtenção de estruturas reduzidas e complexas com maior facilidade.

A técnica de μ CP consiste em funcionalizar um molde recoberto por metal com grupos tióis (**–SH**).^{23–28} Essas espécies possibilitam, numa etapa posterior de moldagem, a transferência de parte desse metal ao substrato de PDMS mediante reações entre os grupos tióis e silanois (**–SiOH**) presentes no molde e no polímero, respectivamente, conforme ilustra a reação abaixo:

Os inconvenientes dessa técnica são uma maior demora no processo em função das reações químicas envolvidas e a adesão fraca entre substrato e metal, podendo ocorrer a delaminação desse último em CE²⁵ ou até mesmo rachaduras nos eletrodos quando flexionado o PDMS.²⁷

Em face ao seu amplo emprego para a deposição de filmes finos sobre vidro, a técnica de fotolitografia e deposição em fase vapor é também a mais utilizada para a gravação de eletrodos sobre PDMS.²⁹⁻³⁸ Algumas de suas vantagens são: i) simplicidade, ii) rapidez e iii) capacidade de gravação de estruturas reduzidas, complexas e em regiões seletivas. Adicionalmente, em função do seu uso exaustivo pela indústria microeletrônica e na fabricação de dispositivos microfluídicos, o processo já é bastante consolidado. Para a deposição de semicondutores e metais sobre PDMS, o aumento da rugosidade de sua superfície em plasma de O₂ é uma etapa necessária objetivando energias de interface com o metal suficientemente fortes para uma adesão satisfatória.³⁹ Os filmes finos podem ser depositados sobre toda a superfície plana do PDMS, sendo removidos por corrosão utilizando-se fotorresiste positivo para definição do *layout* dos eletrodos.³⁴ Outra possibilidade é a deposição dos filmes sobre o substrato contendo fotorresiste negativo, como o SU-8. O eletrodo é obtido após a etapa de *lift-off*, que consiste na revelação desse fotorresiste em solvente específico.³⁸

Em sistemas microfluídicos, a razão área/volume (*surface-to-sample-volume*, S/V) é aumentada. Logo, ganhos de detectabilidade são observados. Outra consequência é o efeito mais pronunciado das propriedades físico-químicas do material que compõe o *microchip* sobre a resposta analítica. Elasticidade, permeabilidade, adsorção e absorção listam como parâmetros intervenientes quanto ao emprego do PDMS.¹⁸

A elasticidade do PDMS varia diretamente com a quantidade do agente de cura adicionado e pode ser usada para o desenvolvimento de válvulas e bombas pneumáticas, bem como para a integração de reatores e detectores aos *microchips*.⁴⁰ Em contrapartida, a depender dos níveis de pressão aplicada, esse parâmetro pode levar a deformações do microcanal. Nesse caso, a vazão dos fluidos e o volume da cela de detecção são alterados.

Obstruções ao fluxo em microestruturas com razões de aspecto (profundidade/largura) elevadas também podem ocorrer.¹⁸

O PDMS apresenta uma permeabilidade (solubilidade do gás no polímero) aos gases O₂ e CO₂ apreciável. Esse fato é vantajoso no tocante ao seu uso em aplicações biomédicas. Ensaio bioanalítico e a fabricação de lentes de contato, cateteres e pele artificial são exemplos dentre tais aplicações. Por outro lado, mediante a evaporação dos gases ou alterações do pH devido à difusão do CO₂, esse fenômeno pode também interferir adversamente sobre a resposta do método.¹⁸

O PDMS apresenta em sua estrutura grupos polares (–Si–O–) e apolares (CH₃–Si–CH₃) os quais respondem pelos fenômenos de adsorção e absorção. O grupo siloxano (–Si–O–) interage com as espécies, em especial moléculas pequenas, por ligações de hidrogênio ou interações polar-polar. Moléculas contendo grupos alquil, por sua vez, podem interagir com o PDMS a partir dos grupos metil desse por forças de van der Waals. Os fenômenos referentes podem ser utilizados, por exemplo, na preparação de fases de separação em cromatografia. Como desvantagem, temos a adsorção de proteínas e corantes fluorescentes usados em procedimentos experimentais padrão o que afeta drasticamente determinações analíticas qualitativas e quantitativas.^{18,41}

Em adição aos inconvenientes possíveis gerados pela elasticidade, permeabilidade, adsorção e absorção, outra desvantagem quanto ao uso do PDMS é a sua expansão quando exposto a solventes orgânicos como hexano, tolueno, diclorometano e acetonitrila.¹⁹ Compostos poliméricos alternativos incluem: poli(metilmetacrilato) (PMMA), poli(carbonato) (PC), poli(etileno) (PE), poli(propileno) (PP),² poli(cloreto de vinila) (PVC), poli(etileno-tereftalato) (PET) e poliéster/toner (PT),⁵ perfluoropoliéter (PFPE),⁴² poli(uretana) (PU)⁴³ e uretana-acrilato (UA).⁴⁴

Substratos em microdispositivos C⁴D

Em C⁴D, os primeiros *microchips*—publicados em 2001—consistiram de lâminas de vidro contendo eletrodos incorporados fora do plano.^{2,27} Em 2002, os dispositivos de vidro continuaram a ser os mais empregados,³⁷ sendo desenvolvida a configuração de eletrodos incorporados no mesmo plano.¹⁶ Nesse mesmo ano, Pumera e colaboradores reportaram pela primeira vez o uso de *microchips* C⁴D poliméricos mediante o emprego do PMMA, os quais integravam eletrodos externos.⁵³ Em 2003, demais publicações relacionadas ao tema utilizando-se esse polímero foram reportadas na literatura;^{36,39} adicionalmente, Do Lago e colaboradores desenvolveram um microdispositivo de PT contendo C⁴D.³⁰ Somente cinco anos mais tarde, o uso do PDMS para a microfabricação desses sistemas foi relatado.¹⁰⁹ Em 2009, o uso de cerâmica cossintetizada a temperaturas baixas (*low temperature co-fired ceramics*, LTCC) para fabricação de microssistemas C⁴D foi descrito.¹¹⁰ Os eletrodos foram posicionados sob (incorporado) e sobre (externo) o microcanal da amostra. Finalmente, os microdispositivos C⁴D vidro/polímero foram desenvolvidos a princípio em 2004 por Do Lago e colaboradores (vidro/PT),³⁵ tendo uma atenção maior da comunidade científica somente nos dois últimos anos com o desenvolvimento dos *chips* vidro/PDMS^{20,21} e vidro/PMMA.²² Adaptações dessas plataformas, retratadas em 2011, são os microssistemas PCB/PDMS.^{14,34}

Geometrias da cela de detecção

Em linhas gerais, os eletrodos podem ser integrados aos *microchips* C⁴D sob dois arranjos: i) incorporados e ii) externos ao dispositivo analítico conforme mostra a **Figura S1** (ver ANEXO IV). No primeiro caso, a fabricação dos eletrodos ocorre previamente à etapa de selagem das lâminas que compõem o microdispositivo, de maneira que eles se encontram

integrados internamente ao sistema. Esses eletrodos podem ser fabricados fora do plano (eletrodos planares)⁴⁵ ou no mesmo plano em relação ao microcanal da amostra (planares⁴⁶ e semicirculares).⁴⁷ No que concerne à configuração fora do plano, o uso de filme adesivo termossensível,⁴⁸ resina acrílica (em processos de deposição de eletrodos por *silk-screen*)⁴⁹ e filmes finos depositados por *spinning*^{50,51} e processo químico em fase vapor assistido por plasma (*plasma-enhanced chemical vapor deposition*, PECVD)⁵² listam como alternativas empregadas para se conseguir o isolamento elétrico efetivo dos eletrodos. Em termos da configuração no mesmo plano, microcanal e eletrodos são separados por uma fina camada da própria lâmina do substrato. Os eletrodos externos (planares), por sua vez, são impressos após a etapa de selagem.⁵³ Nesse caso, o metal é separado do eletrólito pela lâmina de cobertura que compõe o microdispositivo segundo uma configuração fora do plano.

Eletrodos

Os eletrodos podem ser fabricados/integrados utilizando-se: i) fotolitografia seguida de deposição metálica em fase vapor, como evaporação (térmica⁴⁶ ou por feixe de elétrons)⁵² e *sputtering*,⁵⁴ ii) deposição de tintas condutoras a partir da tecnologia de *screen-printing*,^{49,55} mais conhecida como *silkscreen*, iii) gravação de estruturas de poli(anilina), um polímero intrinsecamente condutor, utilizando-se ablação à laser⁵⁶ e, mais recentemente, iv) líquidos condutores injetados em canais de PDMS laterais ao microcanal das amostras. Até o momento, o uso de liga de Gálio⁵⁷ e solução de KCl⁵⁸ foi reportado na literatura. Pt, Cr e Au são os metais comumente empregados em técnicas de deposição em fase vapor, ao passo que a tecnologia de *silkscreen* foi utilizada para a deposição de óxido de índio e estanho (*indium tin oxide*, ITO)⁴⁹ e Ag como eletrodos em *microchips* C⁴D.⁵⁵ Outra técnica de fabricação de eletrodos agrega processos de impressão direta, transferência térmica e

corrosão do substrato.⁵ Esse método consiste em transferir termicamente camadas de toner impressas em papel vegetal para a superfície de discos compactos regraváveis (*recordable compact disc*, CD-R)⁵⁹ ou placas de circuito impresso (*printed circuit board*, PCB).^{48,60,61} As máscaras de toner definem as dimensões dos eletrodos, enquanto que as áreas não protegidas são expostas a reações corrosivas em soluções de KI/I₂ e FeCl₃ nos casos dos CD-Rs e PCBs, respectivamente.

Quando confeccionados externamente ao microdispositivo, os eletrodos podem ainda ser impressos mediante o uso de fitas adesivas metálicas,^{6,62} tinta de prata⁶³ e folhas de alumínio,^{54,64,65} as quais são fixadas sobre uma plataforma móvel ou diretamente sobre a lâmina de cobertura do dispositivo. Neste contexto, os eletrodos externos apresentam maior simplicidade e menor custo de fabricação frente aos eletrodos incorporados. No âmbito comercial, contudo, a instrumentação sofisticada requerida para fabricação dos eletrodos incorporados não representa um obstáculo. Pois ela permite a produção de *microchips* em larga escala. Ademais, as camadas de dielétrico utilizadas para o isolamento dos eletrodos externos são mais espessas o que contribui para uma redução da detectabilidade do método. Os valores dessa espessura para *microchips* C⁴D contendo eletrodos incorporados e externos variam entre 0,1 a 40,0 µm e 100,0 a 300,0 µm, respectivamente.

Vantagens e desvantagem da C⁴D

A vantagem principal de sistemas C⁴D consiste no isolamento elétrico dos eletrodos com relação ao eletrólito. Esse fato evita os problemas comumente presentes em condutometria convencional e métodos eletroquímicos faradaicos, a listar: i) contaminação dos eletrodos, ii) fenômenos de irreprodutibilidade de superfície, iii) formação de bolhas, iv)

necessidade de limpeza dos eletrodos e v) interferências consequentes do campo elétrico quando aplicado em sistemas de eletroforese capilar (*capillary electrophoresis*, CE) ou, simplesmente, transporte eletrocinético.⁶⁶ Em geral, a etapa de limpeza do eletrodo e os procedimentos realizados a fim de se obter uma superfície do metal uniforme afetam a estrutura e a densidade das espécies ancoradas ao transdutor em sensores químicos. Esse fenômeno limita a reprodutibilidade do método analítico.⁶⁷ Outro aspecto positivo da C⁴D quando comparada às técnicas faradaicas é a independência do seu sinal frente à natureza do material condutor empregado como eletrodo. Isso permite o uso de metais mais baratos em substituição, por exemplo, ao ouro.

A consolidação da C⁴D em microfluídica se deve, em especial, a fatores os quais fazem dessa técnica uma alternativa ideal para aplicações em CE, incluindo facilidade de miniaturização e isolamento elétrico dos eletrodos. A realização de ensaios eletroquímicos faradaicos em *microchips* CE apresenta como limitação as interferências entre os campos elétricos de separação e detecção, o que resulta em variações aleatórias do sinal obtido. Nesse caso, os eletrodos são usualmente posicionados na saída do canal de separação (*end-channel*) de modo a eliminar as interferências provenientes do campo elétrico aplicado em CE.^{68,69} Esse fenômeno, contudo, reduz significativamente a razão sinal/ruído (*signal-to-noise ratio*, S/N) do método e pode danificar seriamente o circuito do detector em casos de sobrecarga elétrica. Existem dois arranjos para os eletrodos *end-channel*: i) integrados à lâmina de cobertura do microdispositivo⁶⁸ e ii) impressos em um suporte externo que é ajustado perpendicularmente ao canal de separação segundo uma configuração *wall-jet*.⁶⁹ Ambas os arranjos são as alternativas mais simples para eliminar as interferência de campo em sistemas CE com detecção eletroquímica. Entretanto, eles acarretam em alargamento de pico devido à difusão das espécies da extremidade do canal até o eletrodo de trabalho. Esse

fenômeno reduz a eficiência de separação, a sensibilidade e a detectabilidade do método analítico. Outro fator inconveniente são as alterações no potencial redox que se devem à falta de precisão em se ajustar o posicionamento relativo do eletrodo de trabalho em relação à saída do microcanal.⁷⁰

Frente às desvantagens do método *end-channel*, a solução consiste em incorporar os eletrodos de detecção no interior do canal de separação (*in-channel*). Para isso, a técnica mais empregada é o uso dos desacopladores de campo,^{71,72} que isolam os eletrodos do campo eletroforético. Contudo, ainda se observa o alargamento de pico o que se deve ao decréscimo rápido do campo elétrico entre o desacoplador e o eletrodo de trabalho, gerando a difusão das espécies.⁹ As alternativas ao uso dos desacopladores são: i) sistema com dois microcanais paralelos⁷³ e ii) ponte salina de gel polieletrólítico.⁷⁰ No primeiro método, paralelamente ao canal de separação (SC, *separation channel*), há um canal de referência (RC, *reference channel*) contendo apenas o fluido tamponado. Os eletrodos de trabalho e referência, inseridos no SC e RC, respectivamente, são posicionados a uma distância mínima (200 µm) do eletrodo auxiliar—posicionado na saída de um reservatório comum a ambos os canais. Isso visa à redução da queda ôhmica do meio. A ponte salina de gel polieletrólítico, por sua vez, atua isolando o eletrodo de trabalho (inserido no interior do canal) dos demais eletrodos, referência e auxiliar.

A desvantagem da C⁴D é a sua baixa detectabilidade (LDs, da ordem de dezenas de µmol L⁻¹) em relação a outras técnicas eletroquímicas,⁶⁶ incluindo a amperometria⁷⁴ e a condutometria convencional.^{75,76} Os níveis de LD elevados resultam da ausência de transferência de carga na interface eletrodo-solução e do acoplamento capacitivo direto entre os eletrodos em C⁴D, gerando a capacitância de fuga. Dentre as alternativas já propostas objetivando melhorias nos limites de detecção da C⁴D, temos: i) aplicação de sinais de

excitação de alta voltagem (centenas de volts), ii) uso de um plano-terra entre os eletrodos para redução da capacitância de fuga⁶³ e iii) desenvolvimento de métodos com intento a aumentar a área sensível.^{47,77-79} Ademais, em 2011, reportamos o uso da dopagem da camada isolante dos eletrodos com nanopartículas de TiO₂ visando ao aumento da sua constante dielétrica. Com isso, os LDs alcançados pela técnica melhoraram apreciavelmente. Essa nova alternativa foi publicada em 2011 no jornal *Lab on a Chip* (ANEXO II).

Melhora da detectabilidade

As técnicas reportadas na literatura visando aumentar a área de detecção em *microchips* C⁴D incluem: eletrodos semicirculares,⁴⁷ *sidewall*,⁷⁸ e *dual top-bottom*.⁷⁹ As duas primeiras configurações consistem de eletrodos incorporados no mesmo plano do canal da amostra e apresentam maior área sensível em relação aos eletrodos planares fora do plano. Adicionalmente, o acoplamento capacitivo direto entre os eletrodos é reduzido, o que diminui a capacitância de fuga. De acordo com Lee e colaboradores,⁴⁷ a magnitude da capacitância obtida com eletrodos semicirculares é mais do que quatro vezes superior quando comparada àquela registrada com eletrodos externos planares. Tais configurações, no entanto, requerem um processo de microfabricação lento e laborioso, sendo necessários valores de temperatura e pressão elevados o que pode danificar os eletrodos e etapas de corrosão sequenciais para a gravação dos microcanais e eletrodos. A configuração *dual top-bottom*,⁷⁹ por sua vez, consiste de dois pares de eletrodos externos (planares) posicionados sob e sobre o microcanal. Comparada à geometria convencional para eletrodos externos, os eletrodos *dual top-bottom* proporcionaram um ganho de 65% de sinal (altura de pico) para

separações eletroforéticas de Li⁺. Seu processo de microfabricação, embora mais simples, também requer valores de temperatura e pressão elevados.

Outro parâmetro que interfere drasticamente na detectabilidade em C⁴D é a espessura do dielétrico que isola os eletrodos. Segundo dados da literatura,⁷⁷ há uma perda de 75% do sinal (altura de pico) quando essa espessura é aumentada de 125 para 425 µm. Em 2001, Guijt e colaboradores publicaram o uso de filmes nanofinos de SiC (30 nm de espessura) para isolamento de eletrodos incorporados no mesmo plano;⁴⁵ esse trabalho foi o primeiro artigo publicado na literatura sobre C⁴D em *microchip*. O método proposto requereu um processo de microfabricação laborioso e apresentou estabilidade limitada a campos de separação baixos em eletroforese capilar (CE), não sendo replicado por demais grupos de pesquisa. Presumivelmente, o problema de instabilidade em CE decorreu de um isolamento elétrico não efetivo dos eletrodos, resultando em interferências entre os campos do detector e da técnica de separação. Recentemente, Liu e colaboradores reportaram o desenvolvimento de microdispositivos C⁴D-CE incorporando filmes nanofinos de PDMS como dielétrico.⁸⁰ Uma espessura mínima de 600 nm foi conseguida por *spinning* após diluição dos monômeros do polímero em tolueno numa razão 1:2 (PDMS:tolueno) v/v. O menor valor de LD até então registrado na literatura foi obtido para o cátion Na⁺, 70 nmol L⁻¹.

C⁴D_c

A configuração de cela C⁴D ideal em termos de uma área sensível máxima consiste de eletrodos posicionados em volta de todo o microcanal (eletrodos concêntricos ao canal), bem como ocorre em CE convencional. Neste capítulo, nós descrevemos pela primeira vez a integração de eletrodos concêntricos em microdispositivos C⁴D, designados como C⁴D_c. O

processo de microfabricação desenvolvido é simples e reproduzível, não sendo necessários valores de pressão e temperatura elevados ou etapas de corrosão subsequentes para gravação dos microcanais e eletrodos. Em adição, sua detectabilidade foi melhorada através do uso de filmes nanofinos de SiO₂ como dielétrico. Não obstante a simplicidade do método, os *microchips* C⁴D_C alcançaram LDs da ordem de picomolar para análises em fluxo a padrões de LiClO₄. A microfabricação, a caracterização dos filmes finos depositados, os testes de isolamento elétrico dos eletrodos e os estudos de sensibilidade, detectabilidade e repetibilidade da técnica são discutidos neste capítulo.

1.2. Microfabricação

Para a integração dos eletrodos concêntricos nos dispositivos microfluídicos, os quais consistiram de duas lâminas de vidro, o processo de deposição metálica foi realizado não somente na lâmina de cobertura (eletrodos planares) como também no interior do microcanal da amostra impresso no substrato (eletrodos semiconcêntricos). Em ambos os casos, *layouts* que permitissem a sobreposição dos eletrodos durante a etapa de selagem foram empregados. A **Figura 1.1** mostra fotos das lâminas de vidro e do *microchip* C⁴D_C final, bem como uma microscopia do microcanal na zona de detecção onde se observa a interface entre o substrato e o eletrodo semiconcêntrico em alto relevo. Essa micrografia foi obtida por perfilometria (Veeco Dektak 2210) com 4 µm de resolução.

As etapas principais de microfabricação foram: i) gravação dos microcanais em vidro; ii) deposição dos eletrodos planares (sobre o substrato de vidro) e semiconcêntricos (sobre uma lâmina plana de vidro); iii) isolamento elétrico desses eletrodos e v) selagem. Todo o

Figura 1.1. *Microchip C⁴D_c*. Lâminas de vidro com eletrodos planares recobertos por PDMS **(a)** e eletrodos semiconcêntricos depositados no microcanal e isolados por SiO₂ **(b)**, dispositivo final **(c)** e micrografia do microcanal ilustrando o eletrodo semiconcêntrico no interior do microcanal **(d)**. R₁, R₂ e R₃, reservatórios para água, eletrólito e descarte, respectivamente; e_{exc}, eletrodo de excitação e e_r, eletrodo receptor.

processo de microfabricação foi realizado nos Laboratórios de Microfabricação (LMF) e Filmes Finos (LFF), ambos instalados no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM, Campinas-SP).

Confecção dos microcanais

Os microcanais foram gravados utilizando-se fotolitografia e corrosão química via úmida. A configuração desses microcanais, ilustrada na **Figura 1.2 a**, foi gerada mediante o uso de máscara física de fotolito em acetato (DGM Design, Curitiba-PR) e resiste positivo AZ 4620 (Clariant Corporation). O fotorresiste foi depositado sobre uma lâmina de vidro (Glass Técnica) por *spinning* (Headway Research Inc. EC101DT) a 3.000 rpm durante 30 s. Sua cura foi feita a 95 °C por 10 min em chapa térmica (Tecnal TE-038). As lâminas foram então expostas à radiação UV por 90 s utilizando-se uma fotoalinhadora (Karl Suss America Inc. MJB 3 UV 200) com potência de 10 mW cm⁻². Para remoção das partes solúveis do AZ 4620,

Figura 1.2. Layouts das máscaras utilizadas nos processos de gravação dos microcanais (a) e eletrodos (b) em C⁴D_c. Os microcanais desenhados na figura (a) tiveram 100 µm de largura. Na figura (b), os *pads* localizados no centro da máscara apresentaram espaçamento de 0,6 mm e dimensões iguais a 1,0 x 1,0 mm.

a lâmina foi imersa em solução reveladora específica (AZ[®] 400K, MicroChem Corporation) durante 40 s sob agitação. A etapa de pós-cura foi realizada a 120 °C por 5 min. Posteriormente, os microcanais foram gravados imergindo as lâminas sob agitação contínua nos reagentes: *i*) H₂O 396 mL, HF (Clariant Corporation) 54 mL e NH₄F (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 270 g por 14 min; *ii*) H₂O 150 mL, HCl (Clariant Corporation) 150 mL e HF 150 mL por 3 min e *iii*) HCl por 1 min. Em seguida, os substratos foram lavados com acetona (Clariant Corporation) em ultrassom (Unique Group 1450) e água deionizada (Milli-Q, resistividade maior que 17 MΩ cm). Finalmente, a etapa de secagem em fluxo de N₂ foi realizada. Os valores de RMS fora e dentro do microcanal foram de 0,5 e 0,8 nm, respectivamente.

Em C⁴D_c, as dimensões do microcanal determinam o volume da cela de detecção, que está diretamente associado com a resposta em condutometria. Neste contexto, a precisão analítica do método está relacionada, dentre outros fatores, à precisão do processo de corrosão das lâminas de vidro. Visando a estimar esse parâmetro, microcanais foram

gravados em dez lâminas e os valores de profundidade e largura—na base e no fundo do microcanal—foram mensurados em quatro pontos distintos para cada lâmina de vidro utilizando-se perfilometria. Os valores globais médios mensurados foram: $31,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (profundidade), $178,4 \pm 11,8 \mu\text{m}$ (largura na base) e $73,1 \pm 1,4 \mu\text{m}$ (largura no fundo). Os desvios-padrão relativos (*relative standards deviations*, RSDs) para uma mesma lâmina (precisão *intra-chip*) tiveram valores médios iguais a 1,0, 6,7 e 1,9% para profundidade, largura na base e largura no fundo do microcanal, respectivamente. Ademais, considerando-se os parâmetros dimensionais médios obtidos para as diferentes lâminas (precisão *inter-chip*), os níveis de RSD foram: 2,6% μm (profundidade), 6,3% (largura na base) e 2,3% (largura no fundo).

Fabricação dos Eletrodos

Os eletrodos foram depositados usando os processos de fotolitografia e deposição metálica por *sputtering*. A geometria desses eletrodos, apresentada na **Figura 1.2 b**, foi baseada em estudos feitos por Kubáň e Hauser tendo por finalidade reduzir a capacitância de fuga gerada pelo detector.⁸¹ Nessa configuração, os eletrodos são separados por 0,6 mm e possuem 1,0 mm de largura na zona de detecção.

Para a deposição dos eletrodos, usamos máscara física de fotolito em acetato e fotorresiste positivo AZ 4210 (Clariant Corporation). O fotorresiste foi depositado sobre lâminas de vidro por *spinning* a 3.000 rpm durante 30 s, gerando uma espessura aproximada de $2,4 \mu\text{m}$. A cura foi feita a 90°C por 10 min em chapa aquecedora, seguida do processo de fotolitografia que durou 55 s. A etapa de pós-cura do fotorresiste foi feita sob a mesma condição anterior. Por fim, as partes solúveis do AZ 4210 foram removidas por imersão em

borato de potássio (MicroChem Corporation) 33% em água (v/v) durante 1 min sob agitação. A lavagem foi feita com água deionizada. Finalmente, a etapa de secagem em fluxo de N₂ foi procedida.

Realizada a fotogração em fotorresiste positivo, a remoção de resíduos orgânicos em plasma de O₂ (Plasma Technology Inc. PE 80) foi implementada; os valores de potência, pressão e tempo foram de 100 W, 50 mTorr e 5 min, respectivamente. Em seguida, foram feitas deposições sequenciais dos metais Cr/Al por *sputtering* (Oerlikon Balzers BA510, com sistema de bombeamento criogênico). Uma vez que o sinal em C⁴D independe da natureza do metal empregado como eletrodo, o Au foi substituído por filmes de Al (200 nm) que apresentam menor custo. Uma camada de Cr (50 nm) foi utilizada como promotor de adesão do Al à superfície do vidro. Os metais foram impressos sobre a lâmina de cobertura (eletrodos planares) e o substrato (eletrodos semiconcêntricos) a 5,0 mm da extremidade do canal.

Isolamento elétrico dos eletrodos

Os eletrodos planares e semiconcêntricos foram isolados empregando filmes finos de PDMS e SiO₂, respectivamente. Para preparação do PDMS, monômeros desse polímero foram misturados a um agente de cura específico (Sylgard 184 Elastomer) na proporção 10:1 (m/m). Visando remover bolhas, a mistura foi mantida por 40 min em dessecador de vidro (Hexasystems) adaptado a uma bomba de vácuo (Tecnal TE-058). Em seguida, monômeros e agente de cura foram despejados sobre a lâmina contendo os eletrodos planares procedendo-se com a etapa de *spinning* a 1.000 rpm por 10 s. A polimerização dessa mistura foi realizada em chapa aquecedora a uma temperatura de 90 °C e tempo de 5 min. A camada

de PDMS apresentou uma espessura de 50 μm . Para o isolamento dos eletrodos semiconcêntricos, por sua vez, utilizamos um equipamento de PECVD (Vacutec® VPS 1500). Nesse processo, os gases SiH_4 e N_2O são expostos a um campo RF do qual resultam os radicais $\text{Si}\bullet$ e $\text{O}\bullet$. Essas espécies reagem entre si formando camada(s) de SiO_2 . Abaixo, segue a reação global associada ao fenômeno:⁸²

Os gases SiH_4 (diluído em He 2%) e N_2O foram introduzidos na câmara reacional a vazões de 150 e 70 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$, respectivamente, sob uma pressão de 1 Torr a 350 °C. No interior do reator, o campo RF foi aplicado usando uma potência de 20 W e 13,6 MHz de frequência.

Selagem

A oxidação do PDMS sob plasma de O_2 converte os grupos $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$ presentes em sua superfície em $-\text{O}_n\text{Si}(\text{OH})_{4-n}$. Esses últimos, conhecidos como grupos silanois, podem fazer ligações covalentes através de reações de condensação com outros grupos silanois adsorvidos na superfície do vidro como mostra a **Figura 1.3**. Como resultado, pontes de siloxano ($-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$) são formadas as quais respondem pela selagem química irreversível obtida. A oxidação em plasma foi feita durante 13 s. Em seguida, as lâminas de vidro recobertas por SiO_2 e PDMS foram mantidas em contato sob pressão manual.⁸³ As lâminas foram vedadas de modo que os eletrodos ficassem sobrepostos (**Figura 1.1**). Como resultado, obteve-se uma configuração de eletrodos concêntricos, com filmes finos de metal e dielétrico posicionados em volta de todo o microcanal.

Figura 1.3. Oxidação da superfície do PDMS em plasma de O_2 (a) e reação de condensação entre as superfícies hidratadas de PDMS e vidro (b).

Instrumentação e rotina de análise

Em linhas gerais, a instrumentação analítica empregada constituiu-se de cinco componentes: i) gerador de sinal alternado (Minipa MFG 4202), ii) bombas-seringas para transporte hidrodinâmico dos fluidos (New Era Pump Systems Inc. NE-300), iii) porta-amostra, iv) circuito do detector C^4D e v) sistema de aquisição dos dados gerados durante os experimentos. Na **Figura 1.4** é mostrada uma foto contemplando os componentes que integram o método analítico. O detector C^4D é sensível a perturbações físicas externas que venham a interferir no campo elétrico gerado pelos eletrodos. Dessa maneira, o porta-amostra e os circuitos de recepção e amplificação de sinais foram isolados do meio externo utilizando-se caixas de alumínio (blindagens ou gaiolas de Faraday) ligadas eletricamente ao terra do circuito do detector C^4D . Esse detector foi construído em acordo com a literatura.⁸⁴ Seu circuito foi montado em dois módulos, apresentados na **Figura 1.5**.

Figura 1.4. Instrumentação analítica empregada. Inserção 1, foto ampliada do porta-amostra ilustrando a integração entre as mangueira dos fluidos e o *microchip* e as conexões elétricas (J). G, gerador de função; B, bomba-seringa; S_A e S_B, seringas contendo amostra e tampão, respectivamente; T, mangueira de teflon; F, fonte de alimentação; C, circuito de recepção de sinais e porta-amostra (6,2 x 13,3 x 15,1 cm); A, circuito de amplificação de sinais (5,2 x 8,3 x 13,1 cm) e D, descartê.

Figura 1.5. Circuitos do detector C⁴D. Módulo (a), contendo as etapas de conversão i/e, 1, retificação, 2, e filtragem, 3, e módulo (b), contendo as etapas de amplificação, 4, e compensação da linha de base, 5.

O módulo 1 (item C da **Figura 1.4**) incorpora o estágio de conversão corrente/potencial (i/e), um retificador de precisão meia-onda e um filtro RC passa-baixa. No módulo 2 (item A da **Figura 1.4**), estão presentes as etapas de amplificação do sinal, compensação da linha de base e conversão analógico/digital (A/D), feita a partir de um conversor com 16 *bits* de resolução (PCL711). A aquisição dos dados foi realizada a partir de uma interface da National Instruments e *software* programado em linguagem gráfica LabView®; os parâmetros de amostragem, como taxa de leitura e número de pontos para processamento gráfico, puderam ser facilmente alterados.

O *microchip* possuiu dois canais de entrada (para eletrólito e água deionizada) e um de saída (para descarte). Monitoramos as variações de condutância em tempo real sob um regime de análise em fluxo baseado na simples comutação entre as bombas. Agulhas de aço inoxidável foram coladas aos reservatórios R_1 , R_2 e R_3 (**Figura 1.1**) do microdispositivo utilizando-se cola epóxi, o que permitiu a sua conexão aos dispositivos de transporte microfluídico mediante o uso de tubos de silicone. A princípio, uma vez preenchidos os microcanais, a água foi bombeada por tempo necessário para a estabilização do sinal (cerca de 2 min). Em seguida, iniciou-se a aquisição do potencial registrado pelo eletrodo receptor. Decorridos dez segundos, o eletrólito foi bombeado gerando alteração da resposta do detector. Após estabilização do sinal, água foi transportada novamente o que acarretou na redução do sinal ao seu valor inicial. Os sinais analíticos foram estimados considerando-se a altura de potencial obtida previamente ao término da etapa de amostragem.

1.3. Modelo elétrico e cálculo da capacitância

Modelo elétrico

A **Figura 1.6** mostra o circuito do modelo elétrico que caracteriza o C⁴D_C. Nesse caso, os capacitores relativos aos eletrodos planares e semiconcêntricos encontram-se conectados em paralelo.⁶⁶

Capacitância do sistema: eletrodo planar/PDMS/solução

O acoplamento capacitivo eletrodo planar/PDMS/solução apresenta a geometria de um capacitor de placas paralelas. O cálculo dessa capacitância (C_P) segue descrito em ANEXO II. Nesse caso, temos que:⁸⁵

$$C_P = \frac{\epsilon_{PDMS} \epsilon_0 A_P}{d_P} \quad (1.1)$$

Figura 1.6. Modelo elétrico do C⁴D_C. S, sinal RF; D, detector; C_S and C_P , capacitâncias estabelecidas entre a solução e os eletrodos planares e semiconcêntricos, respectivamente; C_o , capacitância de fuga e R, resistência da solução.

sendo ϵ_{PDMS} a constante dielétrica da membrana de PDMS que isola os eletrodos, A_P a área do eletrodo planar e d_P a distância entre esse eletrodo e a solução representando, assim, a espessura do PDMS.

Capacitância do sistema: eletrodo semiconcêntrico/SiO₂/solução

Para o cálculo da capacitância do sistema eletrodo semiconcêntrico/SiO₂/solução (C_s), assumimos inicialmente um conjunto de sete capacitores conectados em paralelo para caracterização daquele sistema como mostra a **Figura 1.7**. Com base nessa figura, C_s é dado por:

$$C_s = \sum_{i=1}^7 C_i \quad (1.2)$$

Considerando-se que o capacitor é formado por partes laterais simétricas a partir de seu centro, temos que: $C_1 = C_7$, $C_2 = C_6$ e $C_3 = C_5$. Demais condições de contorno levadas a

Figura 1.7. Capacitores representando o sistema eletrodo semiconcêntrico/SiO₂/solução.

termo incluem: i) campo elétrico linear, ii) espessura do dielétrico invariável para cada capacitor e iii) distribuição dos filmes finos (eletrodo e SiO₂) no microcanal segundo uma geometria na qual C₁, C₄, C₇ e C₂, C₃, C₅, C₆ possam ser caracterizados por capacitores de placas paralelas e capacitores cilíndricos, respectivamente. Matematicamente:⁸⁵

$$C_1 = \frac{\epsilon_{\text{SiO}_2} \epsilon_0 A_1}{d_1}, \quad C_1 = C_7 \quad (1.3)$$

$$C_2 = \frac{2\pi}{n} \epsilon_{\text{SiO}_2} \epsilon_0 \frac{L}{\ln\left(\frac{d_2 - a}{a}\right)}, \quad C_2 = C_6 \quad (1.4)$$

$$C_3 = \frac{2\pi}{n} \epsilon_{\text{SiO}_2} \epsilon_0 \frac{L}{\ln\left(\frac{d_3 - a}{a}\right)}, \quad C_3 = C_5 \quad (1.5)$$

$$C_4 = \frac{\epsilon_{\text{SiO}_2} \epsilon_0 A_4}{d_4} \quad (1.6)$$

em que ϵ_{SiO_2} é a constante dielétrica do filme de SiO₂ que isola os eletrodos, A_{1-7}/d_{1-7} são os parâmetros de área e espessura do dielétrico referentes aos capacitores mostrados na **Figura 1.7**, L é o comprimento da placa externa e a é o raio da placa interna do capacitor cilíndrico. A partir das equações (1.3)–(1.6), calculamos a capacitância relativa ao eletrodo semiconcêntrico como se segue:

$$C_s = \frac{2\epsilon_{\text{SiO}_2} \epsilon_0 A_1}{d_1} + \frac{4\pi}{n} \epsilon_{\text{SiO}_2} \epsilon_0 \frac{L}{\ln\left(\frac{d_2 - a}{a}\right)} + \frac{4\pi}{n} \epsilon_{\text{SiO}_2} \epsilon_0 \frac{L}{\ln\left(\frac{d_3 - a}{a}\right)} + \frac{\epsilon_{\text{SiO}_2} \epsilon_0 A_4}{d_4} \quad (1.7)$$

Conforme pode ser observado na equação (1.7), C_s aumenta linearmente com a área do eletrodo ($A \propto L$, sendo $A = 2\pi rL$). Por outro lado, a contribuição da espessura do dielétrico para as variações na capacitância é mais pronunciada; C_s aumenta com a redução do logaritmo natural da espessura para C_2 , C_3 , C_5 e C_6 . Adicionalmente, essa alteração é linear para C_1 , C_4 e C_7 .

Capacitância global

Como mostra a Figura 1.6, a capacitância equivalente do acoplamento entre C_P e C_S (C_C , sistema eletrodo concêntrico/dielétrico/solução) é dada por:

$$C_C = C_P + C_S \quad (1.8)$$

Substituindo (1.1) e (1.7) na equação (1.8):

$$C_C = \frac{\epsilon_{PDMS}\epsilon_0 A_P}{d_P} + \frac{2\epsilon_{SiO_2}\epsilon_0 A_1}{d_1} + \frac{4\pi}{n} \epsilon_{SiO_2}\epsilon_0 \frac{L}{\ln\left(\frac{d_2 - a}{a}\right)} + \frac{4\pi}{n} \epsilon_{SiO_2}\epsilon_0 \frac{L}{\ln\left(\frac{d_3 - a}{a}\right)} + \frac{\epsilon_{SiO_2}\epsilon_0 A_4}{d_4} \quad (1.9)$$

1.4. Distribuição dos filmes finos no microcanal

Imagens da seção transversal do microcanal e ampliações dos filmes depositados (eletrodo semiconcêntrico e SiO_2) foram obtidas usando a técnica de microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (*field emission gun*

scanning electron microscopy, FEG-SEM). As análises foram feitas no Laboratório de Caracterização Estrutural da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O equipamento (Philips XL 30) operou com filamento termiônico de tungstênio, 15 kV de potência e detector de elétrons secundários como modo analítico. Para promover um aumento no contraste das micrografias, as amostras foram inicialmente metalizadas com Au por *sputtering* (Bal-Tec MCS 010). A **Figura 1.8** mostra as micrografias obtidas. Observa-se a partir dela que os filmes se distribuíram de forma mais espessa no topo do microcanal, com espessuras médias da ordem de 250 (Cr/Al) e 200 nm (SiO_2). Após uma redução para valores em torno de 190 (Cr/Al) e 170 nm (SiO_2), tais espessuras se mantiveram uniformes em aproximadamente 175 (Cr/Al) e 150 nm (SiO_2) nos dois pontos localizados na extremidade do microcanal.

Figura 1.8. Imagens de FEG-SEM do microcanal selado e dos filmes finos de Cr/Al isolados com SiO_2 em regiões diferentes do microcanal. i, interior do microcanal. As espessuras discriminadas são valores médios obtidos ao longo da micrografia.

1.5. Caracterização dos dielétricos

Caracterização morfológica

Análises por microscopia de força atômica (*atomic force microscopy*, AFM) determinaram a morfologia das superfícies dos filmes de PDMS e SiO₂, utilizados como dielétricos em C⁴D_C. As medidas foram feitas sob modo oscilante em um equipamento da Nanosurf AG, modelo EasyScan 2.

Na **Figura 1.9** são apresentadas as imagens de AFM obtidas para os dielétricos. Os parâmetros de rugosidade indicaram que ambas as superfícies analisadas são altamente lisas, com valores de RMS iguais a 0,51 (PDMS) e 0,46 nm (SiO₂). Em C⁴D, a área sensível é determinada pela região do dielétrico sobre os eletrodos. Neste contexto, dada a rugosidade reduzida dos filmes de PDMS e SiO₂, podemos concluir que a área de detecção corresponde à área dos eletrodos.

Figura 1.9. Imagens de AFM obtidas para os dielétricos PDMS **(a)** e SiO₂ **(b)**. Os picos observados na figura **(b)** se devem à presença de material particulado na superfície de SiO₂ (a amostra não foi preparada em sala “limpa”).

Caracterização química

Conforme pode ser verificado na reação (1.2), o método de deposição de SiO₂ por PECVD gera os gases N₂ e H₂, os quais representam fontes de contaminação possíveis da superfície do dielétrico. De modo a avaliar o grau de pureza do filme obtido, medidas de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (*X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS) foram realizadas no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais da UFSCar. O espectromicroscópio (Kratos XSAM HS) operou em ambiente de ultra-alto vácuo a pressões em torno de 7,5 nTorr. Foi utilizada a radiação não-monocromática K α do Mg como fonte excitadora, com energia de 1.253,6 eV e potência de 50 W. Para subtração do sinal de fundo, utilizou-se o método de Shirley. A amostra, por sua vez, consistiu de uma placa de Si(100) de 1 cm² recoberta por filme de SiO₂.

Em substratos não condutores como SiO₂, pode ocorrer carregamento da amostra devido ao efeito fotoelétrico—fenômeno no qual se baseia a técnica de XPS. Nesses casos, são formadas lacunas as quais elevam o potencial eletrostático sobre os fotoelétrons vizinhos, resultando em deslocamentos homogêneos das linhas espectrais em até 3 eV para valores maiores de energia de ligação (E_L). Paralelamente, o efeito de carregamento pode conduzir a um alargamento dos picos e ligeira assimetria na região de menor E_L , o que afeta adversamente a resolução das medidas.⁸⁶

Para correção dos níveis de E_L , utilizou-se a linha Si 2p do SiO₂ (E_L teórica igual a 103,3 eV) como referência, pois esse componente sofre pouca influência em relação ao ambiente químico do óxido. Como resultado, não foram observados deslocamentos sendo a energia de ligação obtida para as amostras concordante com o valor teórico. Presumivelmente, dois fatores contribuíram para esse fenômeno: i) *flood-gun* (acessório neutralizador de cargas do

equipamento) e ii) radiação de fonte não-monocromática. O *flood-gun* consiste de um dispositivo de injeção de elétrons e íons Ag^+ sobre a superfície da amostra. Visa-se, assim, à neutralização das lacunas e do excesso de cargas negativas decorrente dos elétrons injetados pelo próprio acessório, respectivamente.⁸⁷ O emprego de radiações não-monocromáticas, por sua vez, contribui para a neutralização da amostra em função do fluxo de elétrons de baixa energia que emana da fonte de raios-X. Esse fluxo é consequente da ionização causada pela linha $k\beta$ do feixe.⁸⁸

Não obstante a ausência de deslocamentos espectrais, se fez necessário o ajuste das curvas devido à baixa resolução experimental dos espectros ($1,2 \text{ eV} \pm 0,1 \text{ eV}$). Tais ajustes, os quais tiveram por finalidade auxiliar na interpretação e caracterização dos picos espectrais, foram feitos através do *software* Winspec, cedido gentilmente pelo *Laboratoire Interdisciplinaire de Spectroscopie Électronique* da *Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix*. Na **Figura 1.10** são mostrados o espectro exploratório e a linha de fotoemissão N 1s obtidos.

Para correlação dos picos ajustados aos átomos constituintes da amostra, valores de E_L referenciais descritos na literatura foram utilizados.⁸⁹⁻⁹³ O filme nanofino de SiO_2 crescido por PECVD apresentou grau de pureza elevado. As concentrações atômicas percentuais associadas a todos os componentes do espectro foram: i) O 55,6; ii) Si 27,7; iii) C 16,1 e iv) somente 0,6% de N. Esse último, atribuído ao processo PECVD, fez-se presente nas formas: Si_3N_4 e NO_2^- . Os valores de E_L e as quantidades relativas dessas espécies foram obtidos após a deconvolução do pico N 1s (**Figura 1.10 b**).

É importante destacar que os óxidos depositados em fase vapor apresentam, em geral, maior uniformidade quando comparados aos compostos crescidos termica ou quimicamente. Essa característica representa uma vantagem no que concerne ao seu uso

Figura 1.10. Caracterização do filme nanofino de SiO₂ empregado como dielétrico em C⁴D_c. Espectro de XPS exploratório (a) e linha de fotoemissão do pico N 1s. Na figura (b), os valores de E_L (eV) e as quantidades percentuais relativas de cada componente são discriminados entre parênteses.

como substrato em sensores químicos. O óxido formado a partir de reações químicas em fase vapor exibe um grau de hidratação baixo. Como resultado, a formação de espécies protonadas, as quais resultam de interações entre os compostos ancorados ao transdutor e grupos –OH presentes na superfície do substrato, é prevenida. Tais espécies favorecem a

ocorrência de polimerizações e/ou oligomerizações homogêneas (no seio da solução), com consequente depósito de aglomerados coloidais sobre o substrato. Esse fenômeno inibe a formação de camadas moleculares organizadas e reduz a reprodutibilidade do processo de funcionalização de superfície. Adicionalmente, os óxidos depositados em fase vapor requerem temperaturas bastante inferiores às utilizadas para o crescimento térmico de filmes finos.⁹⁴

1.6. Teste de isolamento elétrico dos eletrodos

Os parâmetros de sensibilidade e detectabilidade em C⁴D diminuem com a espessura do dielétrico. Adicionalmente, um isolamento efetivo dos eletrodos em relação ao eletrólito é imprescindível para eliminar interferências entre os campos elétricos de detecção e separação em CE e demais problemas decorrentes do contato eletrodo-solução. Neste cenário, a espessura ideal do dielétrico corresponde ao valor mínimo que venha a isolar os eletrodos de uma forma eletricamente efetiva.

O grau de isolamento dos eletrodos foi investigado utilizando-se voltametria cíclica (VC). Os testes foram conduzidos a temperatura ambiente em um galvanostato da Metrohm Autolab (PGSTAT 30), equipado com *software* GPES (Eco Chemie) e três eletrodos: i) Ag/AgCl como eletrodo de referência, ii) fio de Pt como eletrodo auxiliar e iii) filmes finos (eletrodos, planares e semiconcêntricos, isolados com dielétrico contendo as dimensões mostradas na **Figura 1.2 b**) como eletrodo de trabalho. O potencial foi aplicado entre -0,4 e +0,2 V a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. O eletrólito consistiu de tampão fosfato (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 0,2 mol L⁻¹, pH 8,0. Os voltamogramas tiveram por finalidade medir a

corrente capacitiva, a qual resulta do carregamento da dupla camada elétrica;⁹⁵ sua ausência indicou o isolamento elétrico efetivo do eletrodo de trabalho pelo dielétrico depositado.

Eletrodos planares

Os eletrodos planares foram isolados por uma membrana de PDMS com 50 μm de espessura. Camadas menos espessas, desejáveis com vista a uma maior detectabilidade do método, não foram possíveis devido à irreprodutibilidade do processo de deposição utilizado, o *spinning*.⁷ A **Figura 1.11 a** mostra os perfis voltamétricos obtidos, para os quais filmes de Ti/Au exposto e isolado com PDMS (50 μm de espessura) foram empregados. Para o filme metálico exposto, correntes capacitivas da ordem de 230,0 nA foram detectadas. Para o filme recoberto por PDMS, contudo, níveis de corrente superiores a 0,3 nA não foram obtidos. Esse valor está abaixo do limite de medição do equipamento, que é de 10,0 nA.

Eletrodos semiconcêntricos

Os eletrodos semiconcêntricos foram isolados por um filme nanofino de SiO_2 . Nesse caso, os testes de isolamento elétrico se deram mediante a deposição de dielétricos com espessuras distintas sobre filmes de Cr/Al. Os valores de espessura avaliados foram: 100, 150 e 200 nm (considerando o topo do microcanal corroído).

Os resultados obtidos são ilustrados na **Figura 1.11 b**. Para 100 e 150 nm de SiO_2 , correntes capacitivas iguais a 40 e 20 nA foram observadas, respectivamente. Neste ínterim, para a espessura de 200 nm, não foi detectada a presença de corrente capacitiva a níveis maiores que 5 nA. Esse valor, conforme supracitado, está abaixo da resolução máxima de medida do potenciostato o que indica um isolamento efetivo dos filmes de Cr/Al.

Figura 1.11. Voltamogramas cíclicos referentes ao tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) empregando eletrodos planar **(a)** e semiconcêntrico **(b)** como eletrodo de trabalho. Foram empregados Ag/AgCl como eletrodo de referência e fio de Pt como eletrodo auxiliar. Na figura **(b)** são expressas as espessuras (nm) de SiO_2 utilizadas para deposição sobre os eletrodos.

Em consequência dos testes de isolamento elétrico, as espessuras de $50 \mu\text{m}$ (PDMS) e 200 nm (SiO_2 , no topo do microcanal) foram adotadas com intento a isolar os eletrodos planar e semiconcêntrico, respectivamente, no processo de microfabricação dos *microchips* C⁴D_C.

1.7. Estudo dos parâmetros da C⁴D

Os parâmetros da C⁴D são: frequência (kHz) e amplitude de potencial (V_{p-p}) do sinal alternado aplicado a e_{exc} . A depender da instrumentação utilizada, da natureza da amostra e demais fatores intervenientes nos valores de condutância e capacitância, o máximo de razão S/N será obtido em valores específicos de frequência e amplitude. Para o estudo desses parâmetros, foram utilizados o *microchip* C⁴D_C e outros dois dispositivos os quais incorporaram apenas eletrodos semiconcêntricos (C⁴D_S, eletrodos depositados no interior do microcanal) e planares (C⁴D_P, eletrodos depositados sobre a superfície plana do vidro). Tais eletrodos apresentaram a mesma geometria adotada em C⁴D_C. Análises em fluxo a padrões de LiClO₄ (Sigma-Aldrich Chemical Co.) nas concentrações de 1,0 mmol L⁻¹, 0,5 μmol L⁻¹ e 0,3 μmol L⁻¹ em água foram realizadas aplicando-se C⁴D_P, C⁴D_S e C⁴D_C, respectivamente.

A **Figura 1.12** mostra as variações da razão S/N em função da frequência sob a aplicação de amplitudes de potencial diferentes. Adotamos as condições experimentais seguintes: tempo de amostragem em torno de 90 s e vazão igual a 20 μL min⁻¹ (para água e eletrólito). Os perfis aqui apresentados são similares àqueles reportados na literatura para *microchips* C⁴D contendo eletrodos planares externos.⁹⁶ Com base na **Figura 1.12**, observa-se que há um máximo de sinal o que indica a existência de um valor ótimo para a frequência de operação. Adicionalmente, esse máximo se eleva e é deslocado para valores de frequência menores com o aumento da amplitude. As frequências ótimas associadas aos *microchips* de menor área sensível (C⁴D_P < C⁴D_S < C⁴D_C) foram maiores, o que está em acordo perante o efeito da impedância sobre o acoplamento capacitivo eletrodo/solução em C⁴D.⁵ Seus valores foram: 10 (C⁴D_P), 5 (C⁴D_S) e 2 kHz (C⁴D_C). Em termos da amplitude de potencial, seu valor ótimo foi igual a 10 V_{p-p} para todas as configurações investigadas.

Figura 1.12. Estudo dos parâmetros da C⁴D. Variações da razão S/N em função da frequência sob amplitudes de potencial diferentes usando C⁴D_P (a), C⁴D_S (b) e C⁴D_C (c) aos padrões 1,0 mmol L⁻¹, 0,5 μmol L⁻¹ e 0,3 μmol L⁻¹ de LiClO₄, respectivamente. A frequência ótima é destacada para cada valor de amplitude aplicada. Condições experimentais: vazão de 20 μL min⁻¹ e tempo de amostragem em torno de 90 s.

1.8. Teste de sensibilidade e detectabilidade

As Figuras 1.13 e 1.14 mostram, respectivamente, os sinais analíticos e as curvas analíticas obtidas com padrões aquosos de LiClO₄ utilizando-se os *microchips* C⁴D_P, C⁴D_S e C⁴D_C. sob suas respectivas condições ideais de frequência e amplitude de potencial. Análises em fluxo foram conduzidas sob os mesmos valores de vazão e tempo de amostragem em relação aos parâmetros adotados no estudo dos parâmetros da C⁴D.

Os limites de detecção foram calculados com base em uma razão S/N igual a 3, sendo realizadas cinco medidas para cada nível de concentração e o método dos mínimos quadrados para as regressões lineares. A análise de resíduos e testes F de linearidade validaram o ajuste linear para todos os modelos de calibração a 95,0, 99,0 e 99,9% de confiança.

Os níveis de detectabilidade registrados foram notavelmente influenciados pela área de detecção e espessura do dielétrico; os LDs referentes aos *microchips* C⁴D_P, C⁴D_S e C⁴D_C foram 3,4 μmol L⁻¹, 0,7 nmol L⁻¹ e 0,3 nmol L⁻¹, respectivamente.

Os dielétricos SiO₂ e PDMS exibiram superfícies lisas (Figura 1.9). Neste contexto, as áreas sensíveis são similares à área dos eletrodos. Seus valores, calculados por perfilometria, foram iguais a 178,4 (C⁴D_P), 209,1 (C⁴D_S) e 387,5 nm² (C⁴D_C). Podemos verificar que não houve um acréscimo significativo na área para as configurações estudadas. Logo, desde que a condutância e a capacitância aumentam linearmente com a área dos eletrodos, presumimos que esse parâmetro não é o responsável principal pelas diferenças de detectabilidade obtidas para C⁴D_S e C⁴D_C em relação ao C⁴D_P. Não obstante essa hipótese, a redução no valor de LD para o C⁴D_C foi ainda assim satisfatória frente àquele obtido com o C⁴D_S. Isso evidencia a importância da área para a resposta em C⁴D.

Figura 1.13. Respostas obtidas a padrões aquosos de LiClO_4 aplicando-se os *microchips* $\text{C}^4\text{D}_\text{P}$ (a), $\text{C}^4\text{D}_\text{S}$ (b) e $\text{C}^4\text{D}_\text{C}$ (c).

Condições experimentais: 10 ($\text{C}^4\text{D}_\text{P}$), 5 ($\text{C}^4\text{D}_\text{S}$) e 2 kHz ($\text{C}^4\text{D}_\text{C}$) de frequência e 10 $\text{V}_{\text{p-p}}$ de amplitude para todos os dispositivos.

Demais condições descritas na Figura 1.12.

Figura 1.14. Curvas analíticas obtidas a padrões aquosos de LiClO₄ usando os *microchips* C⁴D_p (a), C⁴D_s (a,b) e C⁴D_c (a,b). Na figura (b) é mostrada uma visão ampliada das curvas considerando-se a faixa de concentração utilizada para os microdispositivos C⁴D_s e C⁴D_c—destacada na figura (a). Condições experimentais: ver **Figuras 1.12** e **1.13**.

A espessura do dielétrico, por sua vez, diferiu em aproximadamente três ordens de grandeza para os sistemas incorporando eletrodos planares (50 μm) e semiconcêntricos (150 a 200 nm). A contribuição desse parâmetro perante as variações de capacitância é mais

pronunciada para os sistemas capacitivos que integram os eletrodos semiconcêntricos e concêntricos. Nessas configurações (equação 1.7), a capacitância aumenta com a redução do logaritmo natural da espessura do dielétrico depositado no interior do microcanal. Neste cenário, acreditamos que as espessuras dos filmes de SiO₂ e PDMS respondem em uma maior parcela pela discrepância nos valores de LD alcançados para C⁴D_P e C⁴D_S/C⁴D_C.

O valor de 343,7 pmol L⁻¹ alcançado pelo C⁴D_C é promissor levando-se a termo os LDs descritos na literatura para sistemas convencionais de análise em fluxo incorporando C⁴D, conforme mostra a **Tabela 1.1**. De modo a obter análises seletivas, esses sistemas fazem uso de técnicas de separação, a saber: i) difusão em fase gasosa, ii) HPLC e iii) cromatografia de íons. Nesse caso, uma alternativa que propomos é a funcionalização do dielétrico com receptores específicos. O uso da C⁴D como ferramenta de transdução em sensores químicos foi publicada de forma inédita em 2012 no periódico *Lab on a Chip* (ANEXO III).

1.9. Teste de repetibilidade

O processo de confecção dos canais microfluídicos mostrou níveis de precisão *inter-* e *intra-chip* satisfatórios. Com a finalidade de avaliar a repetibilidade de todo o processo de microfabricação, análises em fluxo a padrões de LiClO₄ 25 nmol L⁻¹ em água foram realizadas aplicando-se C⁴D_C. A **Figura 1.15** mostra os sinais analíticos médios (n = 4) obtidos para quatro *microchips* em dias diferentes e por dois operadores também distintos. Os dados de precisão *inter-chip* considerando-se os sinais obtidos nos dias diferentes de análise foram: 7,7%, 23,0%, 18,2% e 13,4% para os quatro microdispositivos. Adicionalmente, para todos os sinais obtidos, o dado de repetibilidade foi calculado como 17,4%. A partir desses valores, podemos concluir que o método desenvolvido apresentou uma repetibilidade satisfatória.

Tabela 1.1. Valores de LD reportados na literatura para métodos baseados em C⁴D e fluxo assistido por pressão

Método de Separação	Analitos e Amostras	Dielétrico [†]	LD (μmol L ⁻¹) [‡]	Referência
<i>Difusão em fase gasosa</i>	Carbono inorgânico total	PTFE* (1.333,5)	0,6	99
	Carbonato inorgânico total	Poliimida (5)	19	100
	Carbonato de cálcio em cimento	PEEK* (600)	2,5	101
	Amônia em água de chuva	SiO ₂ (170)	0,8	102
	Carbono inorgânico em estuário	Teflon (600)	120	103
HPLC	Peptídeos	SiO ₂ (340)	0,04	104
	Proteínas	SiO ₂ (340)	0,21	104
	Ácidos graxos em óleos vegetais	SiO ₂ (110)	352 x 10 ³	105
	Ácidos graxos em óleos vegetais	SiO ₂ (110)	1,1	106
	Ácidos orgânicos	SiO ₂ (675)	0,7	107
<i>Cromatografia de íons</i>	Ânions inorgânicos	SiO ₂ (215)	12	108
	Cátions em amostras de água	PEEK (500)	0,15	109
	Cátions em amostras de água	SiO ₂ (290)	0,8	110
	Ânions inorgânicos	SiO ₂ (240)	1,2	111

[†] A espessura de cada dielétrico encontra-se discriminada em unidade de μm; [‡] Somente os valores menores obtidos são mostrados; *Politetrafluoretileno (*polytetrafluoroethylene*, PTFE) e poli(éter-éter-cetona) (*polyether ether ketone*, PEEK).

Figura 1.15. Respostas médias ($n = 4$) obtidas a padrões aquosos de LiClO_4 25 nmol L⁻¹ usando *microchips* C⁴D_C em dias e por operadores diferentes (seguem em cores distintas). Condições experimentais: ver Figuras 1.12 e 1.13.

1.10. Conclusões

Os valores de LD do C⁴D_C melhoraram em aproximadamente quatro ordens de grandeza comparados aos níveis registrados com eletrodos planares. Os resultados obtidos lançam novas perspectivas para a C⁴D no tocante aos níveis de detectabilidade alcançados, com LDs da ordem de pmol L⁻¹—os valores relatados na literatura utilizando-se eletrodos *sidewall* são da ordem de nmol L⁻¹ para análises em fluxo de eletrólito.⁷⁸ Ademais, os limites de detecção conseguidos nesse trabalho podem ser reduzidos integrando-se aos *microchips* C⁴D_C métodos já descritos na literatura. Esses incluem: i) amplitudes de alta tensão (centenas de volts), ii) plano-terra para diminuição da capacitância de fuga,⁶³ e iii) técnicas de redução da linha de base.^{84,112–114} A dopagem da camada de PDMS que isola os eletrodos planares conforme desenvolvido pelo grupo não se mostrou possível devido ao aumento da rugosidade superficial do filme. Isso impossibilitou a etapa posterior de selagem do microdispositivo, que envolve as superfícies dos dielétricos PDMS e SiO₂. Trabalhos envolvendo demais substratos, dielétricos e métodos de dopagem deverão ser estudados.

O C⁴D_C converge para a transformação da técnica em uma alternativa real com relação aos métodos condutométricos convencionais e eletroquímicos faradaicos, nos quais se observam os inconvenientes relacionados ao contato eletrodo-solução. Ademais, a aplicação e a comercialização de dispositivos integrando a detecção condutométrica sem contato são potencializadas mediante o desenvolvimento de plataformas C⁴D de alto desempenho. Atualmente, do nosso conhecimento, somente duas empresas comercializam plataformas analíticas contendo a C⁴D como ferramenta de detecção (nesse caso, com eletrodos planares).^{115,116}

Um artigo abordando a integração dos eletrodos concêntricos em *microchips* C⁴D foi publicado recentemente no periódico *Chemical Communications* (ANEXO IV). Em adição, essa plataforma encontra-se atualmente em fase final de depósito de patente junto ao Polo São Carlos da Agência USP de Inovação.

CAPÍTULO 2

Eletrodos nanoestruturados em voltametria

Microdispositivo com SWCNTs verticalmente alinhados e estudo de sensibilidade. Imagem de AFM da superfície dos SWCNTs obtidos **(a)**, foto do microdispositivo **(b)** e curvas de calibração obtidas a padrões aquosos de serotonina usando microsistemas com (em azul) e sem os nanotubos (em cinza) crescidos sobre eletrodos planares **(c)**. WE, CE e RE, eletrodos de trabalho, auxiliar e de pseudoreferência, respectivamente, e S, sensibilidade analítica (coeficiente angular da reta de calibração).

2.1. Introdução

Considerações gerais

A determinação de traços de proteínas em matrizes biológicas figura como um dos grandes desafios atuais em diagnósticos clínicos e pesquisas biomédicas.¹¹⁷ Recentemente, visando a melhores desempenho analítico e cinética do processo de aquisição do sinal obtido, o uso de eletrodos nanoestruturados tem sido alvo de destaque na pesquisa científica mundial. Nanotubos (*nanotubes*, NTs),^{118,119} nanofios (*nanowires*, NW),^{120,121} nanopartículas (*nanoparticles*, NP)^{122,123} e sistemas nanoestruturados^{124–129} listam como nanomaterial usualmente empregado. A vantagem principal dessas espécies é sua razão S/V alta, o que contribui para um transporte de massa mais rápido (favorece o estudo cinético de reações ultrarrápidas e possibilita a eletrocatalise) e pronunciado (melhora a sensibilidade e a seletividade mediante o aumento da resolução em termos de potencial de pico).¹¹⁹

SWCNTs e MWCNTs

Os nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*, CNTs), os quais exibem uma estabilidade termoquímica satisfatória, são amplamente utilizados para o desenvolvimento de detectores e sensores em eletroanalítica.¹¹⁹ Os CNTs consistem de lâminas de grafeno bem ordenadas, ocas e cilíndricas com átomos de carbono sp^2 densamente compactados segundo uma estrutura cristalina hexagonal.¹³⁰ Essas lâminas podem ser individuais ou múltiplas concêntricas com um eixo longitudinal comum e são denominadas CNTs de parede única (*single-walled carbon nanotubes*, SWCNTs) e de paredes múltiplas (*multiwalled carbon nanotubes*, MWCNTs), respectivamente.¹¹⁹ A **Figura 2.1.** mostra a estrutura desses CNTs.

Figura 2.1. Tipos de CNTs. Arte gráfica ilustrando SWCNTs (a) e MWCNTs (b). Imagens extraídas do site: <http://www.sciencephoto.com/>.

Os CNTs apresentam comprimentos que variam desde centenas de nm até centenas de mm. Seus diâmetros, por sua vez, possuem valores de 2 a 100 nm para MWCNTs e de 0,4 a 2,0 nm para SWCNTs, apresentando assim uma razão S/V maior.¹³¹ Outra vantagem dos SWCNTs diz respeito ao seu comportamento eletrônico. Enquanto que os MWCNTs são metálicos, os SWCNTs podem mostrar um comportamento metálico (ideal para uso como eletrodo em determinações eletroanalíticas) ou semicondutor (ideal para aplicações em transistores de efeito de campo) a depender do seu diâmetro e sua quiralidade. Esse último refere-se ao alinhamento dos orbitais π do grafeno, que irá definir o ângulo de ligação de suas lâminas. Neste contexto, a uniformidade das propriedades eletrônicas dos SWCNTs está intimamente relacionada à sua homogeneidade estrutural.¹¹⁹ O *gap* de energia entre as bandas de valência e de condução para SWCNTs semicondutores diminui com o aumento do diâmetro das lâminas de grafeno. Em geral, aproximadamente 1/3 e 2/3 dos nanotubos são metálicos e semicondutores, respectivamente, para SWCNTs com quiralidade uniforme.¹³¹

Comportamento eletroquímico dos CNTs: impurezas metálicas e anisotropia local

Os parâmetros analíticos e cinéticos de um método que incorpora CNTs dependem não somente da razão S/V dessas nanoestruturas, mas também de outros dois fenômenos os quais definem suas propriedades eletroquímicas. São eles: *i*) presença de impurezas metálicas e *ii*) anisotropia local.

Compostos ou nanopartículas metálicas derivam da etapa de catálise necessária para o crescimento dos nanotubos. Sua retenção nas lâminas de grafeno pode ocorrer mesmo após uma lavagem ácida extensiva. Em alguns casos, essas impurezas respondem pela atividade eletrocatalítica, ou eletrocatalise, de eletrodos modificados com CNTs.¹¹⁹

No que tange ao fenômeno da anisotropia local, esse se relaciona às diferenças químico-estruturais entre a parede lateral e as extremidades dos CNTs. A parede lateral constitui-se apenas de átomos de carbono sp^2 , ao passo que nas extremidades podem ocorrer ligações carbono-oxigênio gerando espécies mais reativas. A contribuição relativa dessas regiões para a resposta analítica ainda não é totalmente compreendida. Dados da literatura indicam que esse parâmetro está associado à natureza e intensidade da interação dos CNTs com as espécies presentes na amostra. Logo, conclui-se que o mecanismo de reação envolvido é o fator determinante nesse caso. Por outro lado, os estudos mostraram também que a taxa de transferência de massa nas extremidades dos CNTs é mais rápida (cinética) e pronunciada (sensibilidade e detectabilidade) em maior sendo a densidade de grupos carbono-oxigênio, em especial grupos carboxila. Esse efeito é mais intenso para os SWCNTs o que confere uma vantagem adicional frente aos MWCNTs.¹¹⁹

Alinhamento vertical dos CNTs

Uma alternativa potencial para inibir a adsorção não específica de proteínas é o alinhamento vertical dos CNTs.¹¹⁹ Ademais, estudos recentes mostraram que o emprego de SWCNTs verticalmente alinhados acarreta em melhoras no efeito eletrocatalítico e na detectabilidade do método quanto ao uso de SWCNTs dispersos para a oxidação de padrões de bisfenol A.¹³² Os LDs alcançados foram de 45,8 (alinhados) e 11,0 nmol L⁻¹ (dispersos) para medidas de voltametria de pulso diferencial. Os autores presumiram que isso se deve ao fato de que, nos nanotubos alinhados, as extremidades (mais reativas do que as paredes laterais) expostas ao meio reacional estão presentes em uma densidade de área maior. Um meio simples e eficiente para se conseguir esse alinhamento é a modificação da superfície do Au com SWCNTs mediante o uso de moléculas DNA de cadeia única (*single-stranded DNA*, ssDNA) como intermediário de imobilização.^{133,134}

SWCNTs verticalmente alinhados em microssistemas eletroquímicos

Neste capítulo, a integração dos SWCNTs verticalmente alinhados a filmes finos de Au em plataformas microfluídicas é descrita. Os itens abordados são: i) construção do microdispositivo, ii) caracterização morfológica dos nanotubos, iii) estudo eletroquímico do microssistema e iv) aplicação a padrões de serotonina utilizando-se cronoamperometria. As análises foram realizadas em colaboração com o LMF (CNPq) e o GME (USP).

Serotonina

Serotonina é o neurotransmissor principal do nosso cérebro e alterações em seus níveis podem estar relacionadas a algumas doenças, tais como: i) Alzheimer, ii) autismo

infantil, iii) transtornos do sono, iv) depressão e v) bulimia.^{135,136} Técnicas distintas foram usadas para análise dessa espécie, como métodos indiretos (LC-MS, *liquid chromatography-mass spectrometry*, e CE-LIF, *capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence*) e diretos (detectores e sensores eletroquímicos).¹³⁵⁻¹⁴⁰

2.2. Microfabricação e construção dos nanotubos

As etapas requeridas para fabricação dos microdispositivos, os quais consistiram de laminas de vidro e PDMS, foram: i) deposição dos eletrodos (Ti/Au) por *sputtering* sobre uma superfície plana de vidro, ii) confecção dos microcanais em PDMS por litografia suave, iii) selagem irreversível e iv) imobilização *in-situ* dos SWCNTs verticalmente alinhados sobre a superfície do eletrodo de Au. As **Figuras 2.2 a,b** ilustram, respectivamente, as camadas que compõem o *microchip* e uma foto do microdispositivo final.

Confecção dos microcanais

Os microcanais foram confeccionados em PDMS empregando-se moldagem por litografia suave. O molde consistiu de estruturas em alto relevo do fotorresiste negativo SU-8 impressas sobre uma lâmina circular de vidro (5,0 cm de diâmetro). Para sua fabricação, o fotorresiste AZ 4210 foi depositado por *spinning* a uma velocidade de 1.000 rpm e tempo de 30 s, resultando em uma espessura aproximada de 50 µm segundo dados de perfilometria. A etapa de cura do SU-8 foi feita em chapa aquecedora sob três ciclos sequenciais, quais sejam: 65°C por 5 min, 95°C por 15 min e 65°C por 5 min. Em seguida, o fotorresiste foi exposto à radiação UV durante 55 s utilizando-se uma máscara impressa em fotolito conten-

Figura 2.2. Dispositivo microfluídico e caracterização morfológica do eletrodo de trabalho. Diagrama esquemático das camadas que compõem o *microchip* (a), foto do dispositivo (b) e imagens de AFM das superfícies de Au lisa (c) e modificada com os SWCNTs verticalmente alinhados (d). WE, CE e RE são os eletrodos de trabalho (contendo os SWCNTs), auxiliar e de *pseudoreferência*, respectivamente.

do um desenho conforme mostra a **Figura 2.3 a**. Posteriormente, foram conduzidas as etapas de pós-cura (sob os mesmos ciclos anteriores) e revelação do SU-8 em solução de 1-metóxi-2-acetato 98 % (MicroChem Corporation) durante 1 min sob agitação. Após lavagem com isopropanol, estruturas em alto-relevo com largura igual a 250 μm e altura em torno de 50 μm foram obtidas.

Figura 2.3. Layouts das máscaras usadas nos processos de gravação dos microcanais (a) e eletrodos (b), respectivamente.

Para a etapa de replicação, monômeros de PDMS foram misturados a um agente de cura específico na proporção 10:1 (m/m). Visando a remover as bolhas formadas durante a homogeneização dos monômeros e seu agente de cura, a mistura foi mantida por 40 min em dessecador de vidro adaptado a uma bomba de vácuo. Em seguida, o substrato foi despejado sobre o molde. Estruturas metálicas foram usadas para delimitar a área de dispersão dos monômeros, ao passo que o alinhamento de mangueiras de silicone (1,0 mm de diâmetro interno) para acesso aos reservatórios foi auxiliado com peças de acrílico. A polimerização procedeu-se em chapa aquecedora a uma temperatura de 90°C e tempo de 45 min. Uma vez que o PDMS apresenta energia de superfície baixa (20 erg cm^{-2}) e caráter elastomérico, o substrato contendo os microcanais pode ser desmoldado facilmente sem a danificação do molde.⁷ Os canais microfluídicos apresentaram configuração em Y, com largura de 250 μm e altura de 50 μm .

Fabricação dos Eletrodos

Os eletrodos foram gravados utilizando fotolitografia e deposição de filmes finos por *sputtering* conforme abordado nas páginas 36 e 37. Nesse caso, no entanto, a camada de Al foi substituída por Au com intento a usá-lo como eletrodos de trabalho (*working*, WE), auxiliar (*counter*, CE) e de pseudoreferência (*pseudo-reference electrode*, RE). O *layout* dos eletrodos é mostrado na **Figura 2.3 b**, os quais exibiram largura e *gap* iguais a 1 mm.

Selagem

Para a etapa da selagem das lâminas de vidro e PDMS, um procedimento idêntico àquele discutido nas páginas 38 e 39 foi empregado, com a oxidação das superfícies dos substratos em plasma de O₂ durante 13 s.

Construção dos nanotubos

Para imobilização dos SWCNTs sobre o filme de Au, 100 mg de SWCNTs (98% de pureza, NanoLab) foram inicialmente adicionados a 100 mL da solução HNO₃/H₂SO₄ (3:1, v/v) e mantidos por 12 h visando promover a funcionalização dos CNTs. Os SWCNTs foram então filtrados utilizando-se uma membrana de filtro de Nylon (0,22 µm, Millipore®). Os nanotubos resultantes foram lavados com água destilada até que o pH obtivesse valor neutro. Na sequência, as nanoestruturas foram secas de um dia para o outro a vácuo sob 120 °C.¹⁴¹ Para ancoramento dos SWCNTs à superfície do Au utilizando-se ssDNA—contendo grupos terminais tiol e a sequência 5-HS-TGG-GGT-TTA-TGG-AAA-TTG-GAA-3', Sinapse Biotecnologia—como intermediário, nos baseamos em artigo publicado por Zheng e colaboradores.¹⁴² A ligação ssDNA/SWCNTs se dá a partir de interações π - π entre átomos de carbono, as quais

envolvem os anéis aromáticos das bases nucleotídicas do ssDNA e o carbono hexagonal sp^2 dos nanotubos. Em seguida, o par ssDNA/SWCNTs liga-se ao Au mediante quimissorção espontânea que ocorre através dos grupos tiol das moléculas de ssDNA (reação 1.1). Experimentalmente, 1 mg de SWCNTs foi, a princípio, misturado a 500 μ L de solução de ssDNA 1 μ mol L^{-1} , preparada em tampão fosfato 100 mmol L^{-1} (*phosphate buffer solution*, PBS) contendo NaCl 10% (m/v). Posteriormente, a mistura foi sonicada em banho de ultrassom e, então, centrifugada a 7000 rpm; cada processo durou 45 min. Por fim, a solução sobrenadante foi coletada e bombeada para o interior do canal microfluídico do dispositivo até a zona de detecção, sobre WE (**Figura 2.2 b**). Monocamadas automontadas do complexo ssDNA/SWCNT foram formadas após 24 h em ambiente refrigerado à 4 °C.

2.3. Caracterização morfológica

As características morfológicas da superfície Au/ssDNA/SWCNT foram examinadas por AFM sob modo oscilante. A **Figura 2.2 c** mostra a imagem correspondente ao filme de Au não modificado, para o qual obtivemos a RMS extremamente reduzida de 1,5 nm. A **Figura 2.2 d** ilustra a imagem do WE, onde se observa o alinhamento vertical dos SWCNTs. Em adição, verifica-se que os nanotubos cresceram em “ilhas”. Esse fenômeno inibe adsorções não específicas e impedimentos estéricos, contribuindo também para transferências de massa mais rápidas e pronunciadas.

O valor de RMS da superfície Au/ssDNA/SWCNT aumentou em quase quarenta vezes (55 nm) quando comparado ao RMS do Au liso. O comprimento (altura) médio dos nanotubos foi de 123,9 nm, com um RSD equivalente a 11,8%.

2.4. Aplicação do microdispositivo em voltametria

Microchips contendo SWCNTs verticalmente alinhados foram aplicados utilizando-se detecção eletroquímica faradaica—voltametria cíclica (*cyclic voltammetry*, CV), voltametria de pulso diferencial (*differential pulse voltammetry*, DPV) e cronoamperometria—com o intento de avaliar os efeitos dos nanotubos sobre a sensibilidade e a detectabilidade do microdispositivo. Para isso, análises foram conduzidas a padrões de serotonina. Medidas de corrente foram feitas em tempo real mediante comutação dos dispositivos de bombeamento contendo amostra e eletrólito. Todas as análises foram conduzidas no potenciostato PGSTAT 30 (Metrohm Autolab).

Caracterização eletroquímica

O comportamento eletroquímico da serotonina, sob uma concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, foi investigado em solução de PBS 100 mmol L^{-1} (pH 6,0). Os eletrodos de Au e Au/ssDNA/SWCNT foram aplicados. Os experimentos foram realizados usando CV, a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , e DPV, com uma amplitude de 100 mV e degrau de potencial igual a 2 mV. Os resultados são apresentados na **Figura 2.4**.

O eletrodo Au/ssDNA/SWCNT exibiu picos de oxidação bem definidos em +400 mV. Esses picos correspondem à oxidação irreversível dos grupos hidroxila (ROH) presentes no anel aromático da serotonina, formando grupos funcionais carbonila (RCO).¹³⁸ A superfície Au/ssDNA/SWCNT gerou uma alteração de 140 mV no potencial de oxidação para um valor menos positivo quando comparado ao filme de Au liso (+540 mV). Isso evidencia uma atividade eletrocatalítica que decorre de um processo de transferência de carga mais rápido

Figura 2.4. Caracterização eletroquímica do sistema sob regime de fluxo estático. Análises por CV (a) e DPV (b) utilizando-se Au e Au/ssDNA/SWCNT como eletrodos de trabalho em solução de serotonina $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 100 mmol L^{-1} (pH 6,0). Inserção na figura (a): estrutura da serotonina (extraída do site: <http://www.sciencephoto.com/>). Condições experimentais: filmes finos de Au como CE e RE, taxa de varredura igual a 50 mV s^{-1} (CV), 100 mV de amplitude (DPV) e degrau de potencial em 2 mV (DPV).

promovido pelos SWCNTs. Adicionalmente, as correntes de pico obtidas para o eletrodo modificado aumentaram em aproximadamente três vezes com relação à corrente medida

para o eletrodo liso. As causas para esses ganhos cinéticos e de sensibilidade e detectabilidade são: i) razão S/V maior, os efeitos possíveis da ii) presença de impurezas metálicas e da iii) anisotropia local e, presumivelmente, iv) o alinhamento vertical e a v) disposição 2D em “ilhas” dos SWCNTs.

Teste de sensibilidade e detectabilidade

De modo a avaliar o efeito das nanoestruturas de carbono sobre a sensibilidade e a detectabilidade do *microchip*, uma curva analítica com padrões de serotonina foi obtida usando detecção por cronoamperometria e analisador em fluxo. Previamente a essa etapa, alguns parâmetros experimentais (vazões da amostra e do eletrólito e potencial de trabalho) foram investigados visando a maximizar a razão S/N. Os ensaios foram feitos com solução de serotonina $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 100 mmol L^{-1} (pH 6,0) e tempo de injeção de 5 s. Os potenciais aplicados foram: +0,2, +0,3, +0,4, +0,5 e +0,6 V. O sinal transiente da corrente obteve um máximo em +0,4 V, indicando o potencial de trabalho ótimo. Mantendo-se o potencial em +0,4 V, as vazões da amostra (5 a $30 \mu\text{L min}^{-1}$, vazão do eletrólito fixada em $5 \mu\text{L min}^{-1}$) e do eletrólito (5 a $30 \mu\text{L min}^{-1}$, vazão da amostra fixada em $30 \mu\text{L min}^{-1}$) foram avaliadas sequencialmente. As vazões ideais foram 30 (amostra) e $5 \mu\text{L min}^{-1}$ (eletrólito).

A partir das condições ótimas citadas anteriormente, *microchips* amperométricos integrando Au e Au/ssDNA/CNTs como eletrodos de trabalho foram aplicados a padrões de serotonina. As curvas de calibração e os sinais obtidos (correntes do pico de oxidação da serotonina com o eletrodo Au/ssDNA/CNTs) se encontram na **Figura 2.5**. Três medidas para cada concentração foram realizadas. A análise de resíduos e testes F de linearidade validaram o ajuste linear para ambos os modelos de calibração a 95,0, 99,0 e 99,9% de confiança.

Figura 2.5. Estudo do efeito dos SWCNTs sobre a sensibilidade e detectabilidade a partir da análise em fluxo a padrões de serotonina por amperometria. Curvas de calibração obtidas em *microchips* incorporando Au e Au/ssDNA/CNTs como eletrodos de trabalho **(a)** e sinais associados ao eletrodo Au/ssDNA/CNTs **(b)**. Condições experimentais: soluções contendo padrões de serotonina em PBS 100 mmol L⁻¹ (pH 6,0), potencial de trabalho igual a +0,4 V, tempo de injeção em 5 s e vazões de 30 e 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ para amostra e eletrólito, respectivamente.

Os valores de LD para cada dispositivo, determinados com base em uma razão S/N igual a 3, foram: 11,8 (Au) e 0,2 nmol L⁻¹ (Au/ssDNA/SWCNTs). O LD de 0,2 nmol L⁻¹ é 25

vezes menor frente ao reportado na literatura ($5,0 \text{ nmol L}^{-1}$), obtido utilizando-se eletrodo de carbono vítreo modificado com SWCNTs.¹⁴² Em termos da sensibilidade, o efeito dos SWCNTs pode ser avaliado através dos valores de sensibilidade analítica. Esse foi quase três vezes maior para o eletrodo Au/ssDNA/SWCNT ($4,54 \text{ nA } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$) em relação ao obtido com o filme de Au liso ($1,33 \text{ nA } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$). Novamente, a razão S/V, a presença de impurezas metálicas, a anisotropia local, o alinhamento vertical e a disposição 2D em “ilhas” dos SWCNTs figuram como as causas para esse aumento na sensibilidade do *microchip*.

A serotonina tem sido determinada por técnicas analíticas diversas, as quais integram métodos de separação—cromatografia em fase líquida^{139,143,144} e CE¹⁴⁵—ou métodos diretos usando potenciometria^{138,140,146} e sensores potenciométrico¹⁴⁷ e voltamétrico.¹⁴⁸ Conforme mostrado na **Tabela 2.1**, nosso microdispositivo, que envolve a determinação direta do analito sem funcionalização dos CNTs, mostra um LD menor mesmo quanto ao uso da etapa de préconcentração da amostra e espectrometria de massas.^{140,145} Ademais, o LD é similar ao menor publicado, obtido por detecção potenciométrica com eletrodo de ITO.¹⁴⁶

Tabela 2.1. Valores de LD reportados na literatura para determinação de serotonina

Detector	LD (nmol L ⁻¹)	Referência
Potenciometria (usando eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs)	500	138
HPLC-MS	18,2	139
Potenciometria (usando eletrodo de carbono vítreo modificado com SWCNTs)	100	140
CE com extração por micro-ondas, empilhamento da amostra e préconcentração	7,9	145
Potenciometria (usando eletrodo de ITO)	0,1	146
Potenciometria (usando eletrodo de carbono vítreo modificado com modificado com Au/polipirrol)	1,0	147
Sensor eletroquímico (usando ciclodextrina)	200	148
Dispositivo microfluídico com SWCNTs verticalmente alinhados	0,2	Este trabalho

Teste de precisão

Os testes de precisão foram realizados adotando-se as condições experimentais descritas na **Figura 2.5**. A precisão *inter-chip* (precisão da microfabricação) para o eletrodo de trabalho Au/ssDNA/SWCNTs foi estimada a partir de cinco medidas em dias diferentes. Inicialmente, as superfícies dos eletrodos foram lavadas com água bidestilada. Em seguida, sete injeções de serotonina $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 100 mmol L^{-1} (pH 6,0) foram realizadas para cada *microchip*. O RSD foi calculado como 2,3%. O teste de precisão *intra-chip*, por sua vez, se deu a partir de sete injeções para cada dispositivo. As análises foram feitas no mesmo dia, com um RSD médio de 1,7%. Logo, conclui-se que os níveis de precisão, *inter-* e *intra-chip*, foram satisfatórios. Finalmente, a frequência analítica do método incorporando os eletrodos nanoestruturados foi calculada em 55 determinações por hora.

2.5. Conclusões

Neste capítulo, nós descrevemos uma alternativa potencial para determinações eletroquímicas ultrasensíveis. Os resultados discutidos indicaram que i) a razão S/V alta, os efeitos possíveis ii) das impurezas metálicas e iii) da anisotropia local, iv) o alinhamento vertical e v) a disposição 2D em “ilhas” dos SWCNTs verticalmente alinhados resultaram numa transferência de massas mais rápida e pronunciada. Tais aspectos contribuíram para a presença de atividade eletrocatalítica e aumento na sensibilidade e na detectabilidade do microdispositivo. A integração dos SWCNTs verticalmente alinhados a filmes de Au em dispositivos microfluídicos vidro/ PDMS foi publicada recentemente no periódico *Lab on a Chip* como uma alternativa para determinações eletroquímicas ultrasensíveis (ANEXO V).

CAPÍTULO 3

Selagem adesiva de sacrifício

Etapas principais do processo de selagem desenvolvido. Inserções: 1, imagem de AFM da superfície do SU-8; 2, foto da lâmina do substrato incorporando as cavidades (microcanal em Y e ATZs) recobertas por filme de Alumínio (Al); 3, imagem de perfilometria dessas cavidades; 4, foto ilustrando o recobrimento do microcanal e ATZs pelo filme de Al e 5, imagem de SEM da secção transversal do microcanal selado, com a presença da camada de SU-8 apenas em volta do microcanal. m, microcanal e ATZ, *air-trapping-zone* (cavidades as quais reduzem o estresse térmico na interface substrato/SU-8 e retêm as bolhas geradas durante a selagem preliminar).

Uma etapa futura decorrente deste doutoramento diz respeito à fabricação de *microchips* amperométricos incorporando eletrodos concêntricos nanoestruturados—com SWCNTs. Conforme destacado na página 22, polímeros elastoméricos como o PDMS exibem limitações importantes no que concerne ao seu uso como substrato para a deposição de filmes finos semicondutores e metálicos. Neste contexto, o material híbrido vidro/PDMS, utilizado nas medidas de voltametria (**CAPÍTULO 2**) não seria uma opção adequada para a fabricação daqueles microdispositivos. Pois envolveria a deposição dos eletrodos concêntricos no microcanal de PDMS. Acreditamos que o uso apenas de lâminas de vidro seria a melhor escolha considerando-se as suas vantagens supracitadas na página 20.

O processo de fabricação do microssistema amperométrico contendo eletrodos concêntricos nanoestruturados (ver **Figura 1.1**, sem os dielétricos) possui uma limitação fundamental: a sua etapa de selagem. Para tal, as técnicas convencionais, as quais incluem os métodos térmico e com camada adesiva, não se aplicam a esse caso dadas as temperaturas extremas (gera estresse térmico levando a rachaduras dos filmes depositados) e o isolamento elétrico dos eletrodos pela camada adesiva, respectivamente.¹⁴⁹ Neste contexto, um método de selagem que viesse a permitir a integração dos eletrodos concêntricos em microdispositivos de vidro foi desenvolvido de forma inédita. Considerações gerais sobre a selagem e os resultados obtidos de estudo do protocolo experimental, caracterização e validação da técnica seguem descritos neste capítulo.

3.1. Introdução

Problemática

Desde o início da década de 90, o vidro é o substrato mais utilizado na construção de sistemas microfluídicos. Seus processos de microfabricação, seja para a realização de etapas aditivas (deposição de filmes finos) ou redutivas (corrosão), são extremamente consolidados e reproduzíveis.¹⁶ Adicionalmente, canais de dimensões nanométricas podem ser obtidos mediante o uso de técnicas litográficas de alta resolução as quais consistem de feixe de fótons, íons ou elétrons—microscopias eletrônicas de varredura ($> 1,5$ nm), de transmissão ($> 0,5$ nm) e de tunelamento ($> 0,1$ nm).¹³ Demais vantagens do vidro incluem: i) estabilidade mecânica e térmica, ii) inércia química, iii) transparência óptica e iv) coeficientes de expansão térmica similares àqueles dos compostos metálicos e semicondutores.¹ Essa última característica, conforme discutido anteriormente, permite a deposição de semicondutores e metais sem geração de estresse térmico até temperaturas consideráveis, eliminando os riscos de formação de rachaduras e/ou remoção dos filmes finos depositados. Em adição, o vidro é o material ideal para separações por eletroforese capilar (*capillary electrophoresis*, CE). Sua química de superfície, densa em grupos silanois ($-\text{SiOH}$) ionizáveis, promove um fluxo eletrosmótico (μ_{EO}) estável e elevado o que resulta em separações reproduzíveis e de alta resolução. Por fim, sua condutividade térmica ($1,5 \text{ W mK}^{-1}$) possibilita a aplicação de campos elétricos maiores do que 600 V cm^{-1} sem a geração de gradientes de temperatura com um efeito Joule negligenciável, contribuindo para separações com eficiência elevada em tempos reduzidos.¹²

Não obstante as vantagens diversas intrínsecas ao vidro, seu processo de microfabricação envolve, em geral, uma instrumentação de custo elevado e um protocolo laborioso e lento. Esses fatores se devem especialmente à etapa de selagem, que requer, em linhas gerais, equipamentos sofisticados e pode levar mais do que 24 h. Neste contexto, os polímeros emergiram como material alternativo para as tecnologias de microfabricação no

final da década de 90.² Tais substratos, contudo, exibem limitações relevantes, incluindo: i) permeabilidade, ii) elasticidade, iii) absorção, iv) adsorção, v) intumescimento em meio orgânico e vi) parâmetros inadequados para aplicações em CE (condutividade térmica e mobilidade eletrosmótica) e deposição de filmes semicondutores e metálicos (coeficiente de expansão térmica) conforme abordado no **CAPÍTULO 1**.^{1,18} Neste cenário, o desenvolvimento de métodos que venham a eliminar ou reduzir os inconvenientes do processo de fabricação de *microchips* de vidro se mostra amplamente importante sob os pontos de vista acadêmico e, também, industrial haja vista a atuação crucial da microfluídica na construção de plataformas de análise comerciais.

Selagem térmica e técnicas alternativas

O processo convencional utilizado para a vedação de microdispositivos de vidro é a selagem térmica. Criado em 1966 e consolidado a partir do final dos anos 80,¹⁵⁰ esse método (direto) consiste na aplicação de temperaturas altas (tipicamente acima de 1.000 °C para SiO₂ e entre 450 a 650 °C para vidro)¹⁵¹ as quais geram uma vedação irreversível entre as lâminas a partir de reações de condensação conforme ilustradas abaixo (ver **Figura 1.3**):¹⁵⁰

Com intento a aumentar a densidade dos grupos **-SiOH** presentes nas superfícies dos substratos e, assim, elevar a energia de interface entre as lâminas (força de adesão entre as lâminas), um procedimento usual é a oxidação dessas superfícies em solução piranha (H₂SO₄/H₂O₂) e/ou plasma de O₂. Tais processos contribuem também para a remoção de

material particulado, contaminantes e *scummings* (resistes residuais da etapa de revelação que é realizada durante um processo de fotolitografia).¹⁵⁰ O aquecimento necessário para a selagem térmica pode ser aplicado diretamente através de equipamentos dedicados e muflas ou ainda a partir do uso de pulsos de laser¹⁵² e ultrassom.¹⁴⁹ A técnica baseada em laser permite um aquecimento localizado do *microchip*, protegendo, assim, componentes termossensíveis presentes no sistema. O uso de ultrassom, por outro lado, contribui para a remoção de material particulado adsorvido na interface das lâminas.

A selagem direta destina-se a microdispositivos contendo lâminas de Si, vidro, alumina e/ou quartzo e resulta em forças de adesão elevadas. Nesse processo, contudo, é imprescindível que ambas as lâminas sejam planas—rugosidades de superfície da ordem de nm—e estejam extremamente limpas. Esse fato implica em eliminar todos os resíduos inerentes aos processos de gravação dos canais e eletrodos, bem como operar em ambiente livre de material particulado (sala “limpa”).¹⁵¹ Segundo levantamento feito por pesquisadores brasileiros, a construção de um laboratório de microfabricação contendo sala “limpa” envolvia em 2007 um investimento superior a um milhão de reais.⁸³ Como desvantagem adicional da selagem térmica, suas condições severas de temperatura limitam drasticamente a integração de unidades ópticas, térmicas, químicas ou biológicas aos microdispositivos, bem como a fabricação de eletrodos para uso em aplicações elétricas e eletroquímicas.¹⁵³ As temperaturas elevadas podem também levar a rachaduras e delaminação dos filmes depositados em consequência ao estresse térmico gerado.¹⁵¹

Em consequência aos inconvenientes apresentados pela selagem térmica, meios alternativos foram desenvolvidos, quais sejam: i) selagem direta a temperaturas baixas e ii) à temperatura ambiente, iii) selagem por frita de vidro e iv) selagem com camada adesiva seletiva.

A partir da década de 90, métodos diversos foram desenvolvidos visando a reduzir a temperatura utilizada em processos de selagem térmica. Tempos prolongados de contato entre as lâminas (150 °C),¹⁵⁴ funcionalização com os grupos –SiOH/–NH₂ (200 °C)¹⁵⁵ e ativação de superfície com HF (vapor, 70 °C,¹⁵⁶ e solução, 65 °C)¹⁵⁷ e soluções de Na⁺ (90 °C)¹⁵⁸ e Ca²⁺ (115 °C)¹⁵⁹ listam como alguns dos procedimentos utilizados.

Selagens diretas à temperatura ambiente foram conseguidas através da ativação das superfícies dos substratos em plasma ou em fase líquida. Os procedimentos descritos na literatura baseados em plasma são: i) feixe de átomos rápidos de argônio,¹⁶⁰ ii) corrosão por íon reativo (RIE, *reactive ion etching*) em plasma por radiofrequência (RF) de O₂ seguida do plasma por micro-ondas (*microwave*, MW) de radicais de N₂¹⁶¹ e iii) RIE em plasma de uma mistura dos gases O₂ e CF₄.¹⁵³ Os plasmas RF e MW operam em unidades de MHz e GHz, respectivamente. O uso do feixe de átomos rápidos de argônio e o tratamento em plasma RIE dos gases O₂/CF₄ exigem a aplicação de 1 e 2 Mpa de pressão, respectivamente, ao passo que a ação subsequente dos plasmas RF e MW permite selagens irreversíveis apenas pressionando manualmente as lâminas. Em relação à ativação em fase líquida, nesse processo as lâminas são inicialmente lavadas de modo sequencial em acetona, detergente, água de torneira sob vazões elevadas e etanol. Em seguida, realiza-se a sua imersão em ácido sulfúrico durante 8 a 12 h. As lâminas são então lavadas em água de torneira e, uma vez posicionadas muito próximas uma da outra, água desmineralizada. Finalmente, as lâminas de vidro são mantidas à temperatura ambiente por 3 h para secagem sem o auxílio de pressão. Os autores assumiram o aumento na densidade de grupos –SiOH como sendo o mecanismo responsável pela selagem irreversível obtida.

A selagem por frita de vidro (vidro sinterizado) é um processo termocompressivo no qual se faz o uso de uma camada intermediária que é posicionada entre as lâminas do

microdispositivo. Tal camada consiste de fritas de vidro cristalinas ou amorfas depositas por *spinning*, *silk-screen*, *spray*, extrusão ou sedimentação. A vedação das lâminas se dá mediante a fusão das fritas de vidro a temperaturas que variam entre 400 e 1100 °C com o auxílio de pressão.¹⁴⁹ Essa técnica foi proposta no início da década de 90 para a selagem vidro/cerâmica em sistemas abrasivos.¹⁶² No entanto, apenas a partir de 2001, esse método de selagem ganhou destaque no meio acadêmico com aplicações em áreas como sensores, microfluídica e sistemas microeletromecânicos (*microelectromechanical systems*, MEMS).¹⁶³ Recentemente, Cruz e colaboradores reportaram o uso de pulsos de laser como fonte de aquecimento para a selagem por frita de vidro de lâminas vidro-vidro.¹⁶⁴

A selagem com camada adesiva seletiva, uma outra alternativa à selagem térmica, foi proposta por Wu e colaboradores em 2005.¹⁶⁵ Esse método diz respeito à deposição seletiva de uma camada intermediária (ou adesiva) apenas sobre a superfície plana do substrato, como mostra a **Figura 3.1**.

Para *microchips* vidro/vidro, o filme adesivo (PDMS) é, a princípio, depositado por *spinning* sobre uma lâmina plana de vidro. Posteriormente, mediante simples contato, aproximadamente 50% em espessura da camada não curada desse ligante é transferida para

Figura 3.1. Seção transversal de um microcanal obtido através da técnica de selagem com camada intermediária seletiva. m, microcanal; c, camada intermediária e s, substrato.

uma lâmina também plana de PDMS curado. Em seguida, essa lâmina é posicionada sobre o substrato contendo os microcanais. Após sua remoção, observa-se o recobrimento seletivo pela camada intermediária apenas sobre a parte plana do substrato. Finalmente, procede-se com a selagem através da polimerização térmica da resina. Os estudos mostraram que apenas 0,2% do PDMS penetrou o canal microfluídico.¹⁶⁵

A selagem direta a temperaturas baixas requer níveis de limpeza menos severos em relação à técnica direta convencional (térmica), bem como reduz os riscos de estresse térmico e, assim, maiores danos aos filmes finos depositados. Neste ínterim, a técnica referente envolve um protocolo experimental laborioso e lento, com etapas diversas de tratamento químico de superfície que são extremamente demoradas podendo levar mais de 24 horas. Esse fato torna o processo relativamente caro e inviável para a produção em sistemas de integração em escala ultra larga (*ultra large scale integration*, ULSI).

As técnicas de selagem direta à temperatura ambiente, por sua vez, evitam os problemas relacionados ao estresse térmico. O método por ativação em plasma exibe uma velocidade de operação maior. Contudo, ele requer uma instrumentação dedicada, sofisticada e de custo elevado. Ademais, o processo baseado em plasma dos gases O_2/CF_4 leva mais de 24 h. O uso da ativação em fase líquida apresenta como aspectos positivos o custo reduzido e a ausência de pressões externas aplicadas ao *microchip*. O seu protocolo laborioso e lento, por outro lado, consta como desvantagem principal.

No que concerne à selagem por frita de vidro, suas condições de pressão e temperatura não são compatíveis, em linhas gerais, com a integração de unidades elétricas, ópticas, térmicas, químicas ou biológicas aos microdispositivos. Por fim, a selagem com camada adesiva seletiva agrega as vantagens das técnicas adesivas convencionais. Logo, seu processo dispensa o uso de pressões, temperaturas ou potenciais elevados e pode ser

aplicado à maioria dos substratos. O método também requer condições menos severas de limpeza e rugosidade das lâminas quando comparado à selagem térmica – tolera partículas da ordem de μm devido à sua planarização pela camada adesiva, prescindindo o uso de salas “limpas”.

A selagem com camada adesiva seletiva permite a fabricação de microcanais em vidro (vidro-vidro) e a integração de filmes finos semicondutores e metálicos expostos no interior do canal microfluídico. O seu protocolo experimental, por outro lado, é mais lento e laborioso frente às técnicas adesivas convencionais. Em adição, a planaridade relativa das lâminas previamente à etapa de transferência da camada adesiva é um aspecto importante e representa um obstáculo para a reprodutibilidade do processo em trabalhos manuais. Esse fator exigiria o uso de sistemas automatizados em trabalhos de alta precisão e/ou processos ULSI.

3.2. Selagem com camada adesiva de sacrifício

Considerações gerais

Face aos inconvenientes das técnicas de selagem reportadas na literatura para nosso propósito, desenvolvemos um método de selagem inédito objetivando a construção de microdispositivos de vidro (ou demais substratos duros como sílica, quartzo, alumina e aço para os quais são usados processos de selagem similares) mediante um protocolo simples, barato, rápido, ideal para processos ULSI e compatível com a integração de filmes finos. A técnica proposta foi designada como selagem adesiva de sacrifício e consiste no uso de resinas fotossensíveis como filme intermediário; o SU-8, um resiste negativo, foi usado até o

momento. Essa camada, a princípio, permite uma selagem preliminar das lâminas que compõem o *microchip*. Posteriormente, é realizada uma remoção seletiva do resiste fluindo o seu revelador (dissolve as partes não polimerizadas/curadas do fotorresiste) no interior do canal microfluídico. Assim, microcanais em vidro são obtidos com um perfil idêntico àquele mostrado na **Figura 3.1**. As etapas principais da técnica de selagem adesiva de sacrifício seguem discriminadas na **Figura 3.2** (essas etapas são mostradas em diagramas 2D na capa deste capítulo). Elas incluem: i) deposição do resiste SU-8 (adesivo) sobre a lâmina plana do *microchip*, ii) *prebake* (aquecimento para redução do estresse térmico e remoção do solven-

Figura 3.2. Etapas da selagem com camada adesiva de sacrifício. Lâmina plana de vidro **(a)**, deposição do SU-8 sobre essa lâmina seguida da etapa de *prebake* **(b)**, selagem preliminar pressionando a lâmina plana contra o substrato contendo canal recoberto por filme fino opaco (dourado na figura) **(c)**, cura (exposição UV e PEB) do fotorresiste localizado em volta do canal **(d)**, remoção do SU-8 não curado e, sequencialmente, do filme fino presentes no interior do canal microfluídico mediante o bombeamento de soluções removedores específicas (fluidos representados em azul) **(e)** e resultado final com o microcanal apresentando uma estrutura idêntica àquela mostrada na **Figura 3.1 (f)**.

te do resiste, melhorando sua adesão), iii) selagem preliminar contra o substrato que incorpora os microcanais, iv) cura do resiste apenas em volta do microcanal, v) revelação seletiva da camada adesiva sob o microcanal fluindo no seu interior o revelador de SU-8, vi) lavagem do microcanal e vii) *postbake* (aquecimento para remoção do revelador remanescente e aumento da dureza do resiste).¹

Cavidades laterais ao microcanal designadas como *air-trapping zones* (ATZs) foram corroídas no substrato de vidro ao mesmo tempo da etapa de corrosão dos microcanais (ver **Figura 3.6**); para isso, a máscara fotolitográfica simplesmente contemplou ambas as regiões.¹⁶⁵ As ATZs tem a função de reter as bolhas de ar produzidas na interface das lâminas durante a selagem preliminar melhorando, assim, a força de adesão e a qualidade da selagem no que concerne à taxa de defeitos. Em adição, essas estruturas reduzem o estresse por diminuir a área de contato entre substrato e fotorresiste.

Ao se utilizar SU-8 como intermediário, o processo de cura requer necessariamente duas etapas sequenciais, quais sejam: i) exposição à radiação UV e ii) cura pós-exposição (*post exposure bake*, PEB—para completar as reações de polimerização). As estruturas químicas e reações envolvidas nesse processo de selagem são mostradas na **Figura 3.3**.¹ Reações de condensação (reação 3.1) entre as superfícies do vidro e do resiste garantem uma vedação irreversível.¹⁴⁹ Com intento à revelação seletiva do SU-8 sob o microcanal, essa região deve ser protegida da exposição à radiação UV de maneira que o agente fotoiniciador não seja gerado (**Figura 3.6 b**) e, assim, não ocorra a polimerização do resiste durante a etapa de PEB.

Para a remoção seletiva da camada adesiva, as máscaras (negativas) que podem ser utilizadas a fim de se obter uma exposição seletiva do resiste à radiação são: i) filme fino depositado no interior do microcanal (método utilizado até o momento, ver **Figura 3.2**), ii)

Figura 3.3. Estruturas e reações envolvidas no processo de cura do SU-8. Monômeros de SU-8 **(a)**, formação do ácido de Lewis fotoiniciador das reações de polimerização em UV **(b)** e polimerização sob o efeito da temperatura (PEB) **(c)**.

corante ou metal líquido injetado no microcanal e *iii*) máscara convencional (padrão de absorção impresso num suporte sólido transparente) segundo um modo de exposição por sombra. As últimas duas alternativas são contempladas na **Figura 3.4**.

Figura 3.4. Máscaras alternativas. Solução de corante ou metal líquido no interior do canal (a) e máscara convencional (b).

Um filme fino ideal para uso como padrão de absorção no interior do microcanal é o alumínio (Al); esse metal é mais barato que o ouro (Au) e é facilmente removido em soluções alcalinas ou de ácido fluorídrico (HF) diluído em água—etapa necessária após a revelação da camada de SU-8. Os métodos de deposição em fase vapor listam como as técnicas preferenciais para o recobrimento do microcanal pelo Al dadas a alta capacidade de amostragem e uniformidade dos filmes. Visando a esse recobrimento seletivo, a máscara de fotorresiste sobre o substrato (usada para a gravação das cavidades dos microcanais e ATZs) é mantida após a corrosão do vidro como mostra a **Figura 3.5**. Posteriormente à deposição do filme metálico, procede-se com a etapa de *lift-off* para remoção da máscara de corrosão. Por conseguinte, um recobrimento seletivo das cavidades (microcanal e ATZs) pelo metal é conseguido. Esse protocolo prescinde técnicas de alinhamento e etapas de fotolitografia adicionais ao processo convencional de gravação dos microcanais.

Por outro lado, no que tange ao emprego de corante ou metal líquido para cura seletiva do resiste adesivo, suas soluções deverão apresentar concentrações limites a partir das quais não se observe a passagem de radiação e, assim, consigam proteger efetivamente o resiste de qualquer exposição ao UV.¹⁶⁶ O método baseado em máscaras convencionais, por sua vez, é factível desde que a difração do feixe de fótons na lâmina do substrato não afete drasticamente a resolução do padrão de resiste.¹⁶⁷ Estudos recentes realizados no LMF

revelaram um aumento de $4,8 \pm 1,5 \mu\text{m}$ na largura final de padrões de SU-8, os quais foram obtidos usando máscara de fotolito e tempo de exposição igual a 30 s. Neste contexto, o uso de padrões de absorção no interior do microcanal (filme fino, corante ou metal líquido) se mostra o método mais adequado uma vez que elimina os problemas relacionados a essa perda de resolução. Adicionalmente, a etapa de alinhamento máscara/microcanal durante a exposição UV é também eliminada. O uso de filmes finos, em particular, é a alternativa mais vantajosa no tocante aos processos ULSI em função da alta capacidade de amostragem dos equipamentos de deposição que são empregados. Essa característica ainda reduz o impacto dos custos associados a tais equipamentos, em especial na indústria.

SU-8

SU-8 é um fotorresiste negativo fundamental em processos de transferência de padrão por fotolitografia.¹ Em adição, esse resiste foi utilizado na fabricação de reatores,¹⁶⁸

Figura 3.5. Etapas para deposição do filme de Al no interior das cavidades do microcanal e ATZs.

cantilevers,^{169,170} cristais fotônicos^{171,172} e células solares¹⁷³ e de combustível.¹⁷⁴ Demais aplicações dizem respeito à integração de sensores/detectores químicos,^{175–177} componentes microeletromecânicos (MEMS),^{178,179} guias de onda,^{180,181} filtros moleculares,¹⁸² analisador de reações em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*),^{183,184} fases de separação cromatográficas^{185,186} e dispositivos de eletroforese capilar.¹⁸⁷

A escolha do SU-8 como camada adesiva se deve a várias de suas vantagens as quais podemos citar: i) estabilidade térmica; ii) inércia química (resistente a soluções orgânicas, ácidas e básicas, incluindo NaOH a 90 °C); iii) transparência óptica no UV próximo e visível; iv) sensibilidade, contraste e resolução à radiação UV (365 nm); v) biocompatibilidade; vi) temperatura de transição vítrea baixa ($T_g = 64$ °C); vii) compatibilidade com as técnicas de deposição de filmes finos, apresentando áreas de cobertura elevadas; viii) perfil da parede lateral vertical, permitindo a realização de processos de *lift-off* e ix) uma faixa de espessura ampla (de unidades de μm até mais de 2 mm) pode ser obtida por *spinning*, resultando em estruturas com razões de aspecto muito elevadas (até 190).¹

Ao contrário de polímeros como PDMS, o SU-8 não apresenta limitações inerentes a parâmetros como permeabilidade, elasticidade, absorção, adsorção e intumescimento em solventes orgânicos. Sikanen e colaboradores relataram em 2007¹² que os efeitos da adsorção da proteína BSA (adsorvida pela grande maioria dos polímeros) em SU-8 nativo são mínimos e podem ser eliminados simplesmente alterando parâmetros relacionados à solução tampão utilizada, prescindindo, logo, etapas de modificação de superfície. Nessa mesma publicação, microcanais em SU-8 exibiram um desempenho de separação por CE similar àquele observado com o vidro, o que reflete mais uma propriedade diferencial desse resiste em relação aos polímeros.

3.3. Microfabricação

Confecção dos microcanais e ATZs

Os microcanais e ATZs foram gravados utilizando-se fotolitografia e corrosão química via úmida por imersão. Tais estruturas foram geradas usando uma máscara de fotolito em acetato com linhas de 100 μm de largura (DGM Design) e o fotorresiste positivo AZ 4620 para a etapa de transferência de padrão. Inicialmente, o agente promotor de aderência 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS) (Clariant Corporation) foi depositado sobre uma lâmina de vidro de dimensões 35 $\times$ 15 mm por *spinning* a 3.000 rpm durante 30 s. Após aquecimento em chapa térmica a 90 °C por 10 min, a lâmina foi recoberta pelo fotorresiste utilizando-se *spinning* sob as mesmas condições descritas para o HMDS. O *prebake* foi feito a 95 °C por 15 min. As lâminas foram então expostas à radiação UV por 90 s no modo contato. Para remoção das partes solúveis do AZ 4620 (revelação), a lâmina foi imersa em solução AZ® 400K durante 40 s sob agitação contínua. Finalmente, o *postbake* foi realizado a 150 °C por 30 min. Nessa etapa, visando a reduzir os efeitos do estresse térmico, a chapa foi inicialmente configurada a 95 °C; apenas em seguida, essa temperatura foi aumentada para 150 °C. Para corrosão do vidro, as lâminas foram imersas sequencialmente e sob agitação contínua nas soluções: i) H₂O 396 mL, HF (Synth) 54 mL e NH₄F (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 270 g por 6 min; ii) HF 48% v/v em H₂O por 4 min e iii) HCl (Synth) por 1 min. A secagem das lâminas foi realizada em fluxo de N₂.

A corrosão do vidro apresentou uma repetibilidade satisfatória. Para avaliação desse parâmetro, microcanais foram gravados em 11 lâminas e os seus valores de profundidade e largura foram medidos em 5 pontos distintos para cada lâmina utilizando-se perfilometria. Os valores globais médios (n = 55) obtidos foram: 29,8 $\pm$ 0,1 μm (profundidade) e 116,0 $\pm$ 2,0

μm (largura). Os desvios-padrão relativos (RSDs, *relative standards deviations*) para uma mesma lâmina (precisão *intra-chip*) tiveram valores médios iguais a 0,1 e 2,3% para profundidade e largura, respectivamente. Em adição, considerando-se os parâmetros dimensionais médios mensurados para as diferentes lâminas (precisão *inter-chip*), os níveis de RSD foram: 0,2% μm (profundidade) e 2,9% (largura). Em relação às ATZs, suas dimensões médias considerando-se o cálculo para cinco lâminas ($n = 25$) foram: $28,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de profundidade e $293,0 \pm 2,9 \mu\text{m}$ de largura.

Fabricação da máscara para polimerização seletiva do SU-8

Uma vez concluída a corrosão do vidro, a máscara de resiste não foi removida objetivando a deposição seletiva dos filmes finos de Al apenas no interior das cavidades das lâminas de vidro (ver **Figura 3.5**). Tais filmes foram depositados por *sputtering* para uso como padrão de absorção durante a etapa de exposição UV. Esse procedimento, conforme supracitado, impediu a polimerização da camada de SU-8 sob o microcanal. Após a deposição do Al, a etapa de *lift-off* foi feita em acetona com o auxílio de ultrassom durante 2 min (Unique Group 1450). Em seguida, os reservatórios foram impressos no vidro usando brocas diamantadas. A **Figura 3.6** exibe imagens da lâmina do substrato os reservatórios e as cavidades do microcanal e ATZs recobertas por Al.

Selagem

Como discutido anteriormente, o método de selagem apresentado na **Figura 3.2** foi aquele adotado para a fabricação dos dispositivos microfluídicos de vidro. Suas etapas são: i) espalhamento de SU-8 sobre uma lâmina de vidro por *spinning*, ii) vedação dessa lâmina

Figura 3.6. Lâmina do substrato incorporando microcanal, ATZs e reservatórios. Foto da lâmina (a), imagem de perfilometria do microcanal e ATZs (b) e fotos (Hirox digital microscope KH-7700) ilustrando o recobrimento dessas cavidades pelo filme de Al (c,d). m, microcanal; ATZ, *air-trapping zone* e r, reservatório.

contra um substrato de vidro contendo microcanais, ATZs, padrões de absorção (Al) e reservatórios, iii) polimerização seletiva da camada adesiva, iv) revelação do resiste fluindo seu revelador no interior do canal microfluídico, v) lavagem do microcanal e vi) *postbake*.

Em relação ao procedimento de selagem, a princípio, as lâminas de vidro foram desidratadas em chapa térmica a 120 °C por 30 min. A etapa de desidratação melhorou a adesão substrato/resiste, dispensando o uso de promotores de adesão como o HMDS. Essa melhora ocorre graças à remoção de moléculas de água adsorvidas sobre o vidro (umidade), o que gera o aumento do caráter hidrofóbico desse substrato e, logo, a redução de sua energia de superfície.¹ O resiste SU-8 5 (52% m/m em gama-butirolactona, GBL) (Microchem Corporation) foi depositado sobre uma lâmina de vidro de dimensões 45 × 25 mm (Glass Técnica) usando *spinning* a 500 e 3.000 rpm durante 5 e 25 s, respectivamente. A camada de

SU-8 apresentou uma espessura de $4,35 \pm 0,08 \mu\text{m}$. O *prebake* foi conduzido a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1,0 min e $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2,5 min. A lâmina plana recoberta por SU-8 foi então vedada contra o substrato de vidro (incorporando os microcanais, ATZs e reservatórios) mediante simples contato e aplicação uniforme e constante de um peso de 200 g por 2,5 min. A temperatura da chapa térmica foi mantida a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esse procedimento eliminou a formação de áreas não seladas e gerou um preenchimento suave do microcanal pela camada adesiva conforme discutido adiante.

Usualmente, a selagem preliminar é conduzida pressionando-se manualmente ou por pinça as lâminas. Esses meios, no entanto, mostram uma precisão de alinhamento e flexibilidade para processos ULSI pobres. A temperatura de selagem de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ é maior do que a T_g do SU-8 ($64\text{ }^{\circ}\text{C}$).¹⁸⁸ Esse é um aspecto importante dada a redução da viscosidade do resiste, o que contribui para evitar a formação de áreas não seladas e, assim, aumentar a força de adesão. Neste íterim, cabe ressaltar que valores excessivos de pressão e temperatura geram o preenchimento do microcanal pela camada adesiva. Esse fenômeno ocorre em função da viscosidade baixa do resiste, que flui para dentro do canal microfluídico devido a pressão e forças de capilaridade.¹⁸⁹ Quando filmes espessos são utilizados, os efeitos desse preenchimento são mais pronunciados. Para uma camada de SU-8 com $50\text{ }\mu\text{m}$ de espessura, por exemplo, há o bloqueio de microcanais com profundidades menores do que $100\text{ }\mu\text{m}$ para uma temperatura de selagem de $68\text{ }^{\circ}\text{C}$.¹⁹⁰ Por outro lado, valores insuficientes de pressão e temperatura produzem áreas não seladas as quais reduzem a força de adesão e afetam as dimensões e forma dos microcanais.¹¹

O uso de SU-8 não curado como camada adesiva permitiu vedações com uma força de adesão satisfatória—discutido adiante. Contudo, visando a melhorar as propriedades de superfície do resiste (estabilidade térmica, inércia química e fluxo eletrosmótico, dentre

outras) e aumentar a força de adesão, procedemos com a polimerização dos monômeros de SU-8. Para tal, as etapas de exposição à radiação UV e PEB foram realizadas. O *microchip* foi exposto à radiação UV durante 60 s utilizando-se uma dose de 600 mJ cm^{-2} e 365 nm de comprimento de onda. Posteriormente, a etapa de PEB foi feita a 65 e 95 °C por 1,0 min cada para cura do SU-8 em volta do microcanal. A extensão de exposição à luz UV é um parâmetro crítico. Tempos de exposição muito curtos geram polímeros de baixa densidade, favorecendo a difusão das moléculas de solvente (revelador) para o interior das cavidades poliméricas. Como resultado, se observa o intumescimento do resiste. Tal fenômeno não foi observado neste trabalho. A etapa de PEB, por sua vez, aumenta a adesão, reduz o *scumming* e melhora o contraste e o perfil do resiste.¹

Para a etapa de revelação, o solvente propileno glicol monometil éter acetato (*propylene glycol monomethyl ether acetate*, PGMEA) (Microchem Corporation) foi usado. Seu transporte hidrodinâmico no interior do microcanal foi realizado utilizando bomba-seringa a $20 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ por 40 s. Esse tempo foi suficiente para a remoção total do resiste não curado posicionado sob o canal microfluídico. Uma revelação excessiva do SU-8 não foi observada, pois as camadas de resiste laterais ao canal microfluídico já se encontram curadas durante esse estágio.

Visando à conexão da bomba-seringa ao *microchip*, agulhas de aço inoxidável foram coladas aos reservatórios através de cola epóxi; adicionalmente, tubos de silicone promoveram o contato entre as seringas posicionadas na bomba e as agulhas de aço. Após a etapa de revelação, o microcanal foi lavado com isopropanol (Synth) (1 min), HF 10% v/v em água (2 min, para remoção do Al) e água deionizada (5 min). Em todos os casos, uma vazão de $20 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ foi utilizada. Finalmente, o *postbake* foi feito a 150 °C por 10 min.

3.4. Caracterização

Uniformidade do filme de SU-8

A uniformidade dos filmes de SU-8 depositados por *spinning* sobre vidro foi avaliada considerando-se duas rotinas de deposição: i) uma única etapa de rotação e ii) e duas etapas subsequentes de rotação. Para o processo i), a etapa de deposição foi feita a 3000 rpm durante 30 s ao passo que para o processo ii), duas etapas sequenciais foram adotadas, quais sejam: 500 rpm por 5 s (ciclo de espalhamento) e 3000 rpm por 25 s (ciclo de *spin*), mantendo-se o mesmo tempo total de 30 s em relação ao caso anterior. Em seguida, os procedimentos de *prebake* (65 °C por 1 min e 95 °C por 3 min), exposição à radiação UV (40 s) e PEB (65 °C por 1 min e 95 °C por 1 min) foram realizados.

Para o estudo de uniformidade, as espessuras dos filmes depositados foram medidas por perfilometria em 7 pontos ao longo de cada lâmina. Foram investigadas um total de 10 lâminas para cada processo.

A **Figura 3.7 a** mostra os resultados obtidos. A partir desses dados, se observa uma melhora substancial na uniformidade dos filmes de SU-8 ao se utilizar o protocolo com dois ciclos de velocidade – essa rotina foi usada na fabricação dos *microchips* de vidro. Os valores globais médios de espessura e seus respectivos intervalos de confiança (para um nível de confiança de 95%) foram iguais a $3,76 \pm 0,41 \mu\text{m}$ e $4,35 \pm 0,08 \mu\text{m}$ para os processos i) e ii), respectivamente.

Na **Figura 3.7 b** é apresentada uma imagem de AFM da superfície do filme fino de SU-8 depositado por *spinning* utilizando-se o processo de dois ciclos de velocidade. Sua superfície se mostrou altamente lisa, com uma rugosidade média quadrática (*root mean square*, RMS) de 0,59 nm.

Figura 3.7. Teste de uniformidade. Espessuras de filmes de SU-8 depositados por *spinning* sobre vidro (a) e imagem de AFM da superfície desse resiste obtido utilizando-se dois ciclos de velocidade (b).

Formação de bolhas

Para avaliação do efeito das ATZs sobre a formação de bolhas durante a selagem preliminar, imagens da interface vidro/SU-8 (Hirox, digital microscope KH-7700) foram registradas para microdispositivos com e sem as ATZs conforme ilustra a **Figura 3.8**. Tais

Figura 3.8. Teste de hermeticidade. Fotos de *microchips* com (a) e sem (b) as ATZs. m, microcanal e ATZ, *air-trapping zone*.

imagens ratificam a eficiência das cavidades impressas no substrato, com uma redução drástica na formação das bolhas as quais contribuem para uma menor força de adesão da selagem e podem afetar adversamente as dimensões e forma de microestruturas e microcomponentes integrados. Em adição, não foram observadas rachaduras nos filmes finos de SU-8 depositados, o que indica uma ação eficiente das ATZs também no que concerne à redução da área de contato substrato/resiste e, logo, minimização do estresse.

Secção transversal do microcanal

Na **Figura 3.9** é apresentada uma imagem de FEG-SEM (FEI Inspect F50) da secção transversal do microcanal selado. Nela, podemos perceber que houve a remoção seletiva do filme de SU-8 na região sob o canal microfluídico. Por outro lado, em função da pressão e temperatura aplicadas para a selagem preliminar das lâminas, uma porção de aproximada-

Figura 3.9. Imagens de FEG-SEM da seção transversal do microcanal a níveis de resolução diferentes.

mente 5% da camada adesiva foi espalhada para o interior do microcanal gerando uma seção transversal semiesférica. Entendemos que esse fenômeno é favorável uma vez que que as extremidades dos microcanais corroídos em vidro (**Figura 3.11**) favorecem a retenção de material particulado.

Força de adesão

A força de adesão para três microdispositivos foi avaliada medindo-se a pressão no interior do microcanal resultante do transporte hidrodinâmico de água a vazões diferentes. Uma bomba de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*, HPLC) (Shimadzu LC-10AVP) foi utilizada o para bombeamento do fluido e medição da pressão.

Os sistemas estudados diferiram entre si quanto ao uso da camada adesiva em estágios distintos de seu processamento, quais sejam: i) filme pós-*prebake* (não curado), ii)

filme pós-exposição UV (com fotoiniciador gerado mas ainda não curado) e *iii*) filme pós-PEB (curado). Os resultados obtidos são mostrados na **Figura 3.10**. Não foram verificados quaisquer vazamentos nos canais microfluídicos para as três configurações. Vazões acima de 1.200 e 800 $\mu\text{L min}^{-1}$, por outro lado, danificaram as conexões *microchip*/bomba para os sistemas *i*) e *ii*), *iii*), respectivamente, o que gerou uma queda da pressão acentuada.

A selagem exibiu forças de adesão satisfatórias, suportando pressões de até 4,0 MPa. Estudos descritos na literatura mostram que as selagens adesivas baseadas em SU-8 suportam pressões da ordem de 8,0 até 45,0 MPa.^{191–193} Tais valores são significativamente maiores do que aquele registrado quanto ao uso do PDMS como camada adesiva, que é de 0,5 MPa.¹⁹⁴ A vedação irreversível entre as superfícies do vidro e do SU-8 curado se deve, em especial, a reações químicas de condensação (adsorção química por ligações covalentes) as quais ocorrem entre os grupos $-\text{Si}-\text{OH}$ do vidro e $-\text{C}-\text{OH}$ do resiste (Reação 3.1).¹

Figura 3.10. Teste da força de adesão. Dados de pressão em função da vazão aplicada para microdispositivos selados usando filmes de SU-8 obtidos após as etapas de *prebake*, exposição UV e PEB.

Um outro fenômeno que contribui para essa vedação é o que chamamos de adesão intrínseca e diz respeito às forças intermoleculares atrativas entre os substratos e a camada adesiva (adsorção física). A força da adesão intrínseca aumenta com a diminuição da tensão interfacial (γ_i). Matematicamente, isso pode ser relacionado à redução da energia livre de superfície (ΔG) conforme a equação:^{195–197}

$$\Delta G = A_c \cdot \gamma_i \quad (3.1)$$

sendo A_c a área de contato entre substrato e camada adesiva. Correlações experimentais diretas com a tensão interfacial podem ser inferidas a partir do ângulo de contato (θ). Esse parâmetro é calculado segundo a equação de Young:¹⁹⁷

$$\gamma_i = \gamma_s - \gamma_l \cos \theta \quad (3.2)$$

em que γ_s e γ_l são as tensões superficiais do substrato sólido e do líquido (neste caso, o resiste adesivo), respectivamente. Um ângulo de contato maior e, assim, uma molhabilidade menor, revela um baixo grau de interação substrato/líquido o que implica numa tensão interfacial elevada. Visando a promover uma molhabilidade maior de modo a aumentar a força da adesão, é ideal que a tensão superficial do substrato seja maior do que o do líquido. É importante ainda destacar que a presença de contaminantes adsorvidos no substrato—em geral moléculas orgânicas ou umidade—pode aumentar consideravelmente a tensão interfacial reduzindo a força de adesão e a uniformidade da selagem.¹⁹⁷

A adesão intrínseca é um fenômeno interferente também no tocante à vedação com o SU-8 não curado. Adicionalmente, presumimos que adsorções químicas possam vir a

ocorrer nesse caso graças à abertura dos grupos epóxi do resiste pelos grupos **-Si-OH** presentes na superfície do vidro. Isso resultaria em condensações bem como ocorre com a interface vidro/SU-8 curado. Considerando-se que esse último é mais denso em grupos **-C-OH** pelos efeitos da exposição UV e PEB, acreditamos que o sistema vidro/SU-8 curado apresenta uma força de adesão maior em relação à selagem com resiste não curado.

3.5. Efeito das camadas residuais de SU-8 sobre as propriedades do microcanal

A obtenção de microcanais em vidro pelo método da selagem com camada adesiva de sacrifício limita-se a uma condição: o efeito das camadas residuais de SU-8 sobre as propriedades de superfície do canal microfluídico deve ser desprezível. Tais camadas se localizam em ambas as extremidades do microcanal (**Figura 3.9**) e possuem uma espessura de $4,35 \pm 0,08 \mu\text{m}$. A fim de se validar a técnica desenvolvida para a fabricação de microdispositivos de vidro, esse efeito foi avaliado mediante a determinação dos parâmetros: i) mobilidade eletrosmótica (μ_{EO}) e ii) capacidade de dissipação térmica. Inicialmente, apenas *microchips* de vidro e vidro/SU-8 foram aplicados. Os microdispositivos de vidro foram selados termicamente em mufla (EDG F3000) a 590 °C sob um peso de 1,6 kg com rampa de aquecimento de 2 °C min⁻¹. O processo levou 480 min. Para os substratos vidro/SU-8, por sua vez, um procedimento similar àquele da selagem com camada adesiva de sacrifício foi empregado. Nesse caso, as etapas de deposição dos filmes de Al e revelação seletiva da camada de resiste sob o microcanal não foram realizadas (a **Figura 3.11** mostra uma foto desses *microchips*).

Todos os microcanais em vidro e vidro/SU-8 apresentaram um comprimento de 27 mm e foram corroídos conforme descrito nas páginas 94 e 95. Em suas extremidades, bases

de ponteiros de pipetadores de 100 μL foram coladas sobre o *microchip* usando resina epóxi de modo a servirem como reservatórios para as soluções. Na **Figura 3.11** é mostrada uma imagem de FEG-SEM (FEI Inspect S50) da seção transversal de microcanal vidro/SU-8, ilustrando a sua composição pelo vidro corroído e pela camada plana de resiste. Novamente, devido à pressão e temperatura aplicadas para a selagem preliminar das lâminas, uma porção de 0,4% da camada adesiva foi espalhada para o interior do microcanal produzindo um perfil semiesférico.

Os valores de μ_{EO} foram calculados em função do pH usando o método de monitoramento da corrente, ao passo que a capacidade de dissipação térmica dos microcanais foi investigada mediante a construção de gráficos da lei de Ohm por medir a

Figura 3.11. Imagem de FEG-SEM da seção transversal do microcanal vidro/SU-8 a níveis de resolução diferentes. Inserções: **1**, imagem ampliada da borda da lâmina de vidro inferior recoberta por SU-8 e **2**, foto do microdispositivo vidro/SU-8 usado para os testes de caracterização elétrica. m, microcanal; r, reservatório; S₁, lâmina de vidro plana recoberta por SU-8 e S₂, substrato de vidro incorporando microcanal, ATZs e reservatórios. O espaçamento observado entre o vidro corroído e a camada de resiste reflete zonas não seladas as quais se originaram do processo de corte do microdispositivo para a obtenção das imagens. Esse processo baseou-se numa fratura mecânica do *microchip* na região do microcanal.

corrente resultante do potencial aplicado.¹¹ Em ambos os casos, usamos uma fonte de alta tensão para aplicação dos potenciais e medição dos dados de corrente gerados (Spellman CZE 1000R). Para o controle dos parâmetros experimentais e a aquisição dos resultados, um *software* escrito em linguagem gráfica LabVIEW® foi utilizado.

A mobilidade eletrosmótica e a capacidade de dissipação térmica são parâmetros que dependem da rugosidade, dimensão e composição das paredes do microcanal, bem como da temperatura, pH e força iônica do eletrólito.¹⁹⁸ Desde que o processo de corrosão dos microcanais apresentou uma repetibilidade satisfatória e que as condições de análise foram as mesmas para ambos os microdispositivos investigados, podemos inferir que os dados de caracterização elétrica obtidos nesta etapa do projeto são atribuídos somente à natureza das paredes que compõem os microcanais.

Visando à formação de grupos carregados negativamente em suas paredes, os microcanais foram condicionados com solução aquosa de NaOH (Synth) 0,1 mol L⁻¹ por 30 min antes das medidas. Em seguida, fizemos o uso de água deionizada e tampão fosfato por 20 e 10 min, respectivamente. A solução tampão teve por finalidade o equilíbrio da dupla camada elétrica e do pH nas paredes do microcanal. Finalmente, os reservatórios foram preenchidos com o mesmo volume de solução tampão (100 µL) e os testes de caracterização elétrica foram então iniciados. O bombeamento dos fluidos para condicionamento (NaOH, água e tampão) dos canais foi realizado aplicando-se vácuo nos reservatórios de descarte.

Mobilidade eletrosmótica

Os valores de mobilidade eletrosmótica foram determinados pelo método de monitoramento da corrente usando tampão fosfato a uma faixa de pH entre 4 e 12 e sob um

campo elétrico de 400 V cm^{-1} . As soluções foram preparadas a partir de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e dibásico (Na_2HPO_4) (Mallinckrodt), enquanto que hidróxido de sódio foi empregado no ajuste do pH para valores maiores que 9. As medidas foram conduzidas sob um campo elétrico de 400 V cm^{-1} alternando-se soluções tampão em concentrações diferentes, quais sejam, 10 e 20 mmol L^{-1} .

A **Figura 3.12** mostra os resultados alcançados os quais estão em concordância com dados da literatura.¹¹ Os valores de μ_{EO} expressos neste gráfico representam médias globais obtidas para três microdispositivos com $n = 4$. Como esperado, não houve uma diferença significativa entre os resultados referentes aos dois *microchips* uma vez que vidro e SU-8 exibem mobilidades eletrosmóticas similares. Essa diferença foi de aproximadamente 13% em pH 6, um percentual similar àquele reportado para microcanais em vidro e em SU-8.

Em linhas gerais, os polímeros possuem uma μ_{EO} inferior à do vidro. Esse fato se origina da diferença de densidade de cargas negativas entre suas superfícies, de modo que o

Figura 3.12. Mobilidade eletrosmótica em função do pH para *microchips* de vidro e vidro/SU-8. Seu cálculo foi feito pelo método de monitoramento da corrente usando tampão fosfato (10 e 20 mmol L^{-1}) e campo elétrico de 400 V cm^{-1} .

vidro possui uma maior densidade de grupos -Si-OH ionizáveis.¹⁹⁹ Por outro lado, a origem da mobilidade eletrosmótica elevada do resiste SU-8 ainda não tem suas causas bem definidas. Sikanen e colaboradores¹¹ sugeriram que as cargas presentes nas paredes do SU-8 decorrem de duas espécies, quais sejam: i) grupos -Si-OH e, em especial, ii) ácido de hexafluoroantimonato (HF_6Sb^-) os quais são remanescentes das reações de polimerização do resiste (**Figura 3.3**). Finalmente, considerando-se os intervalos de confiança mostrados na **Figura 3.12**, os microcanais de vidro e vidro/SU-8 exibiram valores de μ_{EO} estáveis.

Dissipação térmica

Além da redução na velocidade de separação eletroforética, a geração do efeito Joule pode afetar adversamente a magnitude e a estabilidade da mobilidade eletrosmótica.¹⁹¹ Neste contexto, a capacidade de dissipação térmica reduzida associada aos polímeros é um obstáculo relevante em aplicações eletrocínéticas, incluindo CE e transporte de massa. A condutividade térmica do SU-8 é apreciavelmente inferior à do vidro; seus valores são iguais a 1,5 e 0,2 W mK⁻¹, respectivamente. Essa discrepância explica a dissipação térmica pobre dos microcanais em SU-8.¹¹ Análises a tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 8) utilizando-se *microchips* de SU-8 mostraram haver a geração do efeito Joule sob campos elétricos superiores a 300 V cm⁻¹, com perda de linearidade da relação corrente/potencial. Diferentemente, em vidro esse efeito não foi observado até campos elétricos de até 600 V cm⁻¹.

Os gráficos da lei de Ohm obtidos para os microdispositivos de vidro e vidro/SU-8 são ilustrados na **Figura 3.13**. Nesse caso, usamos tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ em pH 8. Os dados de corrente representam médias globais obtidas para quatro microdispositivos e foram monitorados em tempo real durante um intervalo de 2 min. O efeito Joule foi conside-

Figura 3.13. Gráficos da lei de Ohm para *microchips* de vidro e vidro/SU-8. Condições: tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ e pH 8.

rado ausente nas regiões onde se observou uma variação linear da corrente com o potencial aplicado, nas quais a lei de Ohm é válida. O substrato vidro/SU-8 melhorou efetivamente a dissipação térmica com respeito aos microcanais somente de SU-8. Desvios de linearidade da relação corrente/potencial ocorreram sob campos elétricos superiores a 580 V cm⁻¹, representando um aumento substancial de 48% em relação aos microcanais de SU-8 (300 V cm⁻¹).¹¹ Em vidro, o efeito Joule foi gerado apenas sob valores de campo elétrico maiores do que 700 V cm⁻¹.

Efeito das camadas residuais de SU-8 sobre as propriedades de superfície do microcanal

Para avaliação do efeito das camadas residuais de SU-8 sobre as propriedades de superfície do microcanal, medidas de μ_{EO} a microdispositivos vidro/SU-8/vidro (obtidos pela selagem com camada adesiva de sacrifício) não foram consideradas dada à similaridade entre os valores de mobilidade eletroforética de vidro e SU-8 (**Figura 3.12**). Por outro lado,

conforme pode ser observado na **Figura 3.13**, esses compostos possuem capacidades de dissipação térmica significativamente diferentes. Neste contexto, gráficos da lei de Ohm foram obtidos para quatro *microchips* vidro/SU-8/vidro.

Os microcanais apresentaram uma geometria idêntica àquela mostrada na **Figura 3.11**. As condições experimentais também foram as mesmas em relação àquelas adotadas para os microdispositivos de vidro e vidro/SU-8—tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ em pH 8. Os resultados correspondentes aos substratos vidro e vidro/SU-8/vidro se encontram na **Figura 3.14**. A partir dos dados de dissipação térmica obtidos para vidro e vidro/SU-8/vidro, conclui-se que as camadas residuais do resiste SU-8 não interferiram nas propriedades de superfície do microcanal. Esse apresentou um comportamento similar àquele registrado para os microcanais somente de vidro. Em ambos os casos, o efeito Joule foi gerado apenas sob valores de campo elétrico superiores a 700 V cm⁻¹. Adicionalmente, esses resultados indicam que o processo de selagem apresentou uma repetibilidade satisfatória.

Figura 3.14. Gráfico da lei de Ohm para microdispositivos de vidro e vidro/SU-8/vidro. Condições: tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ e pH 8. Monitoramento da corrente em tempo real por 2 min.

3.6. Conclusões

A selagem com camada adesiva de sacrifício se mostrou uma alternativa potencial para a fabricação de sistemas microfluídicos de vidro. Seu processo exhibe requisitos de um método ideal, quais sejam: i) barato; ii) rápido—oxidação das superfícies em plasma/fase líquida ou processos de funcionalização não são requeridos; iii) adequado para processos ULSI; iv) elimina o uso de temperatura, pressão ou potencial elétrico elevados, permitindo a deposição de filmes finos e evitando os riscos de estresse térmico; v) demanda níveis de limpeza e planaridade das lâminas baixos, prescindindo o uso de salas “limpas”; vi) não há obstrução do microcanal pelo filme ligante e vii) somente o vidro contribui para as propriedades de superfície do microcanal, mantendo as vantagens advindas desse material e evitando interferências sobre o resultado analítico dadas as interações entre a amostra e a camada adesiva.

É importante destacar também os aspectos positivos provenientes do uso do SU-8 como camada adesiva. Em adição a parâmetros como estabilidade térmica, inércia química, transparência óptica, sensibilidade, contraste e resolução à radiação UV e compatibilidade com as técnicas de deposição de filmes finos, esse resiste não agrega muitas das limitações inerentes a polímeros como o PDMS, incluindo os fenômenos de i) absorção e adsorção não específicas, ii) intumescimento em solventes orgânicos e iii) desempenho em separações eletroforéticas insatisfatório.

Por fim, cabe salientar que o protocolo adotado para o método de selagem desenvolvido foi melhorado com relação às técnicas de selagem adesiva convencional baseadas em SU-8. Fatores como a aderência entre substrato e resiste, a formação de bolhas e o estresse térmico foram efetivamente solucionados mediante o uso de alternativas

simples e baratas. As etapas de desidratação e PEB, bem como o uso de filmes de SU-8 com uma espessura reduzida, garantiram uma boa adesão vidro/SU-8. Isso prescindiu a aplicação de métodos adicionais para melhoramento desse parâmetro como: i) oxidação do substrato em plasma de O_2 ,²⁰⁰ ii) dopagem do resiste com espécies hidrofílicas^{201,202} e iii) recobrimento da superfície do substrato com filme fino de Titânio.²⁰³ Adicionalmente, as cavidades ATZ gravadas nas lâminas do substrato reduziram sensivelmente a formação de bolhas durante a selagem preliminar e contribuíram para a diminuição do estresse térmico; rachaduras dos filmes finos depositados sobre vidro durante as etapas de *prebake*, PEB e *postbake* não foram observadas. Os métodos descritos na literatura com intento a eliminar o estresse térmico em interfaces vidro/SU-8 incluem: i) dopagem do resiste com nanopartículas de SiO_2 ,²⁰⁴ ii) tratamento em ultrassom²⁰⁵ e iii) o uso de temperaturas de *bake* menores.^{206,207}

A técnica de selagem descrita neste capítulo encontra-se atualmente em fase inicial de depósito de patente junto ao polo de inovação do CNPEM. Pretende-se posteriormente, a considerar uma melhor definição sobre as perspectivas da data deste depósito, submeter um artigo científico ao periódico *Lab on a Chip*. Adicionalmente, um artigo descrevendo o protocolo de selagem e os estudos de caracterização elétrica de microdispositivos vidro/SU-8 (protocolo similar ao da selagem adesiva de sacrifício, entretanto sem a revelação do SU-8 sob o microcanal) foi aceito pelo periódico *Electrophoresis* (ANEXO VI). Intitulado como “*Glass/SU-8 Microchip for Electrokinetic Applications*”, o artigo retrata esse material híbrido como uma alternativa potencial para aplicações eletrocinéticas dadas as características: i) facilidade de fabricação, ii) compatibilidade com a integração de unidades elétricas, ópticas e MEMS (limitações do vidro), iii) mobilidade eletrosmótica alta e estável e iv) capacidade de dissipação térmica superior frente ao uso de polímeros (limitações do SU-8). O método pode ainda ser aplicado na construção de microdispositivos C^4D ; em adição às vantagens

relacionadas ao método de fabricação e à química de superfície de vidro e SU-8, esse último possui demais propriedades as quais são cruciais para o desenvolvimento de sistemas C⁴D de alto desempenho. Elas incluem: *i*) força dielétrica alta ($4,4 \text{ MV cm}^{-1}$),²⁰⁸ *ii*) constante dielétrica de 4,1,²⁰⁹ um valor similar à de filmes de SiO₂ depositados em fase vapor (4,2)²¹⁰ e superior à do PDMS (2,7)²¹¹ e *iii*) espessuras em nanoescala (centenas de nm) podem ser conseguidas por *spinning*.²¹²

ETAPAS FUTURAS

Uma das etapas futuras decorrentes deste doutoramento é a fabricação de microdispositivos C⁴D e amperométricos incorporando eletrodos concêntricos com SWCNTs verticalmente alinhados.

Em termos da C⁴D_C, o maior desafio será o isolamento elétrico efetivo dos nanotubos pelo dielétrico. Competirá a essa espécie não apenas o isolamento dos eletrodos, como também um recobrimento conformal das nanoestruturas de modo que a razão S/V dos SWCNTs não seja reduzida apreciavelmente. Neste contexto, um método viável é a técnica de deposição por camadas atômicas (*atomic layer deposition*, ALD) a qual gera finos conformais extremamente finos e amorfos.²¹³ Isso permite o isolamento elétrico dos filmes finos metálicos utilizando-se dielétricos com espessuras reduzidas. Recentemente, experimentos realizados no LMF demonstraram que filmes de Al₂O₃ crescidos por ALD com espessuras de até 20 nm conseguem esse isolamento quanto ao uso de eletrodos planares—essa espessura para SiO₂ depositada por PECVD sobre eletrodos semiconcêntricos foi de 200 nm. Adicionalmente, demais meios de melhoramento da sensibilidade e detectabilidade do C⁴D_C poderão ser integradas paralelamente, incluindo: i) amplitudes de alta tensão, ii) plano-terra para diminuição da capacitância de fuga,⁶³ iii) técnicas de redução da linha de base^{84,112–114} e iv) o isolamento dos eletrodos planares por camadas nanométricas de PDMS mediante a diluição dos seus monômeros em tolueno.⁸⁰

Em relação aos *microchips* amperométricos, a etapa mais crítica é a selagem dos microdispositivos. Nesse caso, a selagem adesiva de sacrifício poderá ser empregada sem danos aos filmes de eletrodos. Tais sistemas serão aplicados na determinação de dopamina. Os resultados obtidos serão confrontados com aqueles observados para os eletrodos planares nanoestruturados (**CAPÍTULO 2**).³ Até o momento, a caracterização morfológica do processo de modificação dos eletrodos semiconcêntricos foi feita. Essa etapa consistiu de

imagens de AFM em regiões diferentes de um filme de Au depositado no interior do canal microfluídico. Em todas as regiões investigadas, o alinhamento vertical dos nanotubos foi observado.

Por fim, conforme destacado no **CAPÍTULO 3**, os microdispositivos de vidro/SU-8 figuram como um método atrativo para aplicações eletrocinéticas (CE e transporte de massa por migração). Vantagens como *i)* facilidade de fabricação, *ii)* compatibilidade com a integração de unidades elétricas, ópticas e MEMS, *iii)* mobilidade eletrosmótica alta e estável e *iv)* capacidade de dissipação térmica satisfatória se somam a propriedades do SU-8 as quais fazem desse fotorresiste um dielétrico ideal para uso em C⁴D. Tais propriedades incluem níveis desejáveis de *i)* força dielétrica,²⁰⁸ *ii)* constante dielétrica²⁰⁹ e *iii)* espessura.²¹²

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MADOU, M. J. **Fundamentals of microfabrication and nanotechnology. Manufacturing techniques for microfabrication and nanotechnology**, 2011, *Volume II*, Third Ed. New York, CRC Press.
2. BECKER, H.; GÄRTNER, C. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 89, 2008.
3. PIRUSKA, A.; NIKCEVIC, I.; LEE, S. H.; AHN, C.; HEINEMAN, W. R.; LIMBACH, P. A.; SELISKAR, C. J. **Lab on a Chip**, v. 5, p. 1348, 2005.
4. SHADPOUR, H.; MUSYIMI H.; CHEN, J.; SOPER, S. A. **Journal of Chromatography A**, v. 1111, p. 238, 2006.
5. DO LAGO, C. L.; DA SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA, J. A. F. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 3853, 2003.
6. 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. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3825, 2004.
7. SEGATO, T. P.; COLTRO, W. K. T.; ALMEIDA, A. L. J.; PIAZETTA, M. H. O.; MAZO, L. H.; CARRILHO, E. **Electrophoresis**, v. 31, p. 2526, 2010.
8. LIU, B.; JIN, Q.; ZHANG, Y.; MAYER, D.; KRAUSE, H.; ZHAO, J.; OFFENHÄUSSER, A. **Microchimica Acta**, v. 172, p. 193, 2011.
9. LIU, J.; WANG, J.; CHEN, Z.; YU, Y.; YANG, X.; ZHANG, X.; XU, Z.; LIU, C.; **Lab on a Chip**, v. 11, p. 969, 2011.
10. SHANG, T.; TENG, E.; WOOLLEY, A. T.; MAZZEO, B. A.; SCHULTZ, S. M.; HAWKINS, A. R. **Electrophoresis**, v. 31, p. 2596, 2010.
11. SIKANEN, T.; TUOMIKOSKI, S.; KETOLA, R. A.; KOSTIAINEN, R.; FRANSSILA, S.; KOTIAHO, T. **Lab on a Chip**, v. 5, p. 888, 2005.
12. SIKANEN, T.; HEIKKILÄ, L.; TUOMIKOSKI, S.; KETOLA, R. A.; KOSTIAINEN, R.; FRANSSILA, S.; KOTIAHO, T. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 6255, 2007.
13. SCHULTZE, J. W.; OSAKA, T.; DATTA, M. **New trends in electrochemical technology: Electrochemical microsystem technologies**, 2002, *Volume II*, New York, Taylor & Francis.
14. PRAKASH, S.; PIRUSKA, A.; GATIMU, E. N.; BOHN, P. W.; SWEEDLER, J. V.; SHANNON, M. A. **IEEE Sensors Journal**, v. 8, p. 441, 2008.
15. PIRUSKA, A.; GONG, M.; SWEEDLER, J. V.; BOHN, P. W. **Chemical Society Review**, v. 39, p. 1060, 2010.
16. NGE, P. N.; ROGERS, C. I.; WOOLLEY, A. T. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 2550, 2013.
17. ROLLAND, J. P.; VAN DAM, R. M.; SCHORZMAN, D. A.; QUAKE, S. R.; DESIMONE, J. M. **Journal of American Chemical Society**, v. 126, p. 2322, 2004.
18. KUNCOVÁ-KALLIO, J.; KALLIO, P. J. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Society**, v. 1, p. 2688, 2006.
19. LEE, J. N.; PARK, C.; WHITESIDES, G. M. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 6544, 2003.
20. KENIS, P. J. A.; ISMAGILOV, R. F.; WHITESIDES, G. M. **Science**, v. 285, p. 83, 1999.
21. GAO, Y. X.; CHEN, I. W. **Lab on a Chip**, v. 8, p. 1695, 2008.
22. HAO, Z.; CHEN, H.; MA, D. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 8649, 2009.
23. LOO, Y. L.; WILLETT, R. L.; BALDWIN, K. W.; ROGERS, J. A. **Journal of American Chemical Society**, v. 124, p. 7654, 2002.
24. TOPRAK, M.; KIM, D. K.; MIKHAILOVA, M.; MUHAMMED, M. **Materials Research Society Symposium Proceedings**, v. 705, p. 139, 2002.
25. LEE, K. J.; FOSSER, K. A.; NUZZO, R. G. **Advanced Functional Materials**, v. 15, p. 557, 2005.
26. ATMAJA, B.; FROMMER, J.; SCOTT, J. C. **Langmuir**, v. 22, p. 4734, 2006.
27. LIM, S. S.; CHANG, W. J.; KOO, Y. M.; BASHIR, R. **Lab on a Chip**, v. 6, p. 578, 2006.
28. KANG, M. G.; GUO, L. J. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 26, p. 2421, 2008.
29. BOWDEN, N.; BRITTEN, S.; EVANS, A. G.; HUTCHINSON, J. W.; WHITESIDES, G. M. **Nature**, v. 393, p. 146, 1998.
30. LOO, Y. L.; WILLETT, R. L.; BALDWIN, K. W.; ROGERS, **Applied Physics Letters**, v. 81, p. 562, 2002.
31. JONES, J.; LACOUR, S. P.; WAGNER, S.; SUO, Z. G. **Materials Research Society Symposium Proceedings**, v. 769, p. 189, 2003.
32. SCHMID, H.; WOLF, H.; ALLENSPACH, R.; RIEL, H.; KARG, S.; MICHEL, B.; DELAMARCHE, E. **Advanced Functional Materials**, v. 13, p. 145, 2003.
33. LACOUR, S. P.; JONES, J.; SUO, Z.; WAGNER, S. **IEEE Electron Device Letters**, v. 25, p. 179, 2004.

34. BAEK, J. Y.; KWON, G. H.; KIM, J. Y.; CHO, J. H.; LEE, S. H.; SUN, K.; LEE, S. H. **Solid State Phenomena**, v. 124, p. 165, 2007.
35. PANGULE, R. C.; BANERJEE, I.; SHARMA, A. **Journal of Chemical Physics**, v. 128, p. 234708, 2008.
36. MEACHAM, K. W.; GIULY, R. J.; GUO, L.; HOCHMAN, S.; DEWEERTH, S. P. **Biomed. Microdevices**, v. 10, p. 259, 2008.
37. BAEK, J. Y.; AN, J. H.; CHIO, J. M.; PARK, K. S.; LEE, S. H. **Sensors and Actuators A**, v. 143, p. 423, 2008.
38. PATEL, J. N.; KAMINSKA, B.; GRAY, B. L.; GATES, B. D. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 19, p. 1, 2009.
39. JEONG, J.; KIM, S.; CHO, J.; KIM, D.; HONG, Y. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 49, p. 05EB09-1, 2010.
40. ZHANG, W.; LIN, S.; WANG, C.; HU, J.; LI, C.; ZHUANG, Z.; ZHOU, Y.; MATHIES, R. A.; YANG, C. J. **Lab on a Chip**, v. 9, p. 3088, 2009.
41. TOEPKE, M. W.; BEEBE, D. J. **Lab on a Chip**, v. 6, p. 1484, 2006.
42. RÍOS, A.; ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C.; CREVILLÉN, A. G. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 467, 2006.
43. PICCIN, E.; COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; NETO, S. C.; MAZO, L. H.; CARRILHO, E. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, p. 151, 2007.
44. FONSECA, A.; RAIMUNDO I. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; LIMA, R. S.; ARAÚJO, M. C. U. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 7155, 2010.
45. GUIJT, R. M.; BALTUSSEN, E.; VAN DER STEEN, G.; FRANK, H.; BILLIET, H.; SCHALKHAMMER, T.; LAUGERE, F.; VELLEKOOP, M.; BERTHOLD, A.; SARRO, L.; VAN DEDEDM, G. W. K. **Electrophoresis**, v. 22, p. 2537, 2001.
46. LICHTENBERG, J.; ROOIJ, N. F.; VERPOORTE, E. **Electrophoresis**, v. 23, p. 3769, 2002.
47. LEE, C. Y.; CHEN, J. C. M.; CHANG, G. L.; LIN, C. H.; FU, L. M. **Electrophoresis**, v. 27, p. 5043, 2006.
48. COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E. **Analytical Methods**, v. 3, p. 168, 2011.
49. ZHAO, J.; CHEN, Z.; LI, X.; PAN, J. **Talanta**, v. 85, p. 2614, 2011.
50. LIU, B.; JIN, Q.; ZHANG, Y.; MAYER, D.; KRAUSE, H.; ZHAO, J.; OFFENHÄUSSER, A. **Microchimica Acta**, v. 172, p. 193, 2011.
51. LIU, J.; WANG, J.; CHEN, Z.; YU, Y.; YANG, X.; ZHANG, X.; XU, Z.; LIU, C.; **Lab on a Chip**, v. 11, p. 969, 2011.
52. SHANG, T.; TENG, E.; WOOLLEY, A. T.; MAZZEO, B. A.; SCHULTZ, S. M.; HAWKINS, A. R. **Electrophoresis**, v. 31, p. 2596, 2010.
53. PUMERA, M.; WANG, J.; OPEKAR, F.; JELÍNEK, I.; FELDMAN, J.; LÖWE, H.; HARDT, S. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 1968, 2002.
54. BERTHOLD, A.; LAUGERE, F.; SCHELLEVIS, H.; DE BOER, C. R.; LAROS, M.; GUIJT, R. M.; SARRO, P. M.; VELLEKOOP, M. J. **Electrophoresis**, v. 22, p. 3511, 2001.
55. WANG, J.; CHEN, G.; CHATRATHI, M. P.; WANG, M.; RINEHART, R.; MUCK JR. A. **Electroanalysis**, v. 20, p. 2416, 2008.
56. HENDERSON, R. D.; GUIJT, R. M.; ANDREWARTHA, L.; LEWIS, T. W.; RODEMANN, T.; HENDERSON, A.; HILDER, E. F.; HADDAD, P. R.; BREADMORE, M. C. **Chemical Communications**, v. 48, p. 9287, 2012.
57. THREDGOLD, L. D.; KHODAKOV, D. A.; ELLIS, A. V.; LENEHAN, C. E. **Analyst**, v. 138, p. 4275, 2013.
58. BLASZCZYK, K.; CHUDY, M.; BRZOZKA, Z.; DYBKO, A. **Metrology and Measurement Systems**, v. XX, p. 299, 2013.
59. DANIEL, D.; GUTZ, I. G. R. **Electrochemistry Communication**, v. 5, p. 782, 2003.
60. CHEN, Z.; LI, Q.; LI, O.; ZHOU, X.; WEI, Y.; MO, J. **Talanta**, v. 71, p. 1944, 2007.
61. GUIJT, R. M.; ARMSTRONG, J. P.; CANDISH, E.; LEFLEUR, V.; PERCEY, W. J.; SHABALA, S.; HAUSER, P. C.; BREADMORE, M. C. **Sensors and Actuators B**, v. 159, p. 307, 2011.
62. TANYANYIWA, J.; ABAD-VILLAR, E. M.; FERNANDÉZ-ABEDUL, T.; COSTA-GARCÍA, A.; HOFFMANN, W.; GUBER, A. E.; HERRMANN, D.; GERLACH, A.; GOTTSCHLICH, N.; HAUSER, P. C. **Analyst**, v. 128, p. 1019, 2003.
63. TANYANYIWA, J.; HAUSER, P. C. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 6378, 2002.
64. WANG, J.; PUMERA, M. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 5919, 2002.
65. WANG, J.; CHEN, G.; MUCK JR, A.; COLLINS, C. E. **Electrophoresis**, v. 24, p. 3728, 2003.

66. KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. **Electrophoresis**, v. 34, p. 55, 2013.
67. GRÜNDLER, P. **Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers**, 2007, Berlin, Springer.
68. WOOLLEY, A. T.; LAO, K. Q.; GLAZER, A. N.; MATHIES, R. A. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 684, 1998.
69. WANG, J.; TIAN, B. M.; SAHLIN, E. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 5436, 1999.
70. KANG, C. M.; JOO, S.; BAE, J. H.; KIM, Y. R.; KIM, Y.; CHUNG, T. D. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 901, 2012.
71. ROSSIER, J. S.; FERRIGNO, R.; GIRAULT, H. H. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 492, p. 15, 2000.
72. CHEN, D. C.; HSU, F. L.; ZHAN, D. Z.; CHEN, C. H. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 758, 2001.
73. CHEN, C. P.; HAHN, J. H. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 7182, 2007.
74. MATYSIK, F. M. **Microchimica Acta**, v. 160, p. 1, 2008.
75. VROUWE, E. X.; LUTTGE, R.; VAN DEN BERG, A. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1660, 2004.
76. ŠOLÍNOVÁ, V.; KAŠIČKA, V. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1743, 2006.
77. KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. **Lab on a Chip**, v. 25, p. 407, 2005.
78. XU, Y.; LIANG, J.; LIU, H.; HU, X.; WEN, Z.; WU, Y.; CAO, M.; **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 1583, 2010.
79. MAHABADI, K. A.; RODRIGUEZ, I.; LIM, C. Y.; MAURYA, D. K.; HAUSER, P. C.; ROOIJ, N. F. **Electrophoresis**, v. 31, p. 1063, 2010.
80. LIU, J.; XU, F.; WANG, S.; CHEN, Z.; PAN, J.; MA, X.; JIA, X.; XU, Z.; LIU, C.; WANG, L. **Electrochemistry Communications**, v. 25, p. 147, 2012.
81. KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. **Lab on a Chip**, v. 8, p. 1829, 2008.
82. RANDHAWA, H. **Thin Solid Films**, v. 196, p. 329, 1991.
83. COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; CARRILHO, E.; JESUS, D. P.; DA SILVA, J. A. F.; SILVA, H. D. T.; DO LAGO, C. L. **Química Nova**, v. 30, p. 1986, 2007.
84. DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 4339, 1998.
85. HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentals of Physics**. New York: John Wiley & Sons, 2001.
86. REHR, J. J.; ALBERS, R. C. **Reviews of Modern Physics**, v. 72, p. 621, 2000.
87. BEAMSON, G.; BRIGGS, D. **High Resolution XPS of Organic Polymers – The Scienta ESCA300 Database**. West Sussex: John Wiley & Sons, 1992.
88. NASCENTE, P. A. P. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, v. 228, p. 145, 2005.
89. WAGNER, C. D.; NAUMKIN, A. V.; KRAUT-VASS, A.; ALLISON, J. W.; POWELL, C. J.; RUMBLE, J. R. **NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database**. Disponível em: <http://srdata.nist.gov/xps/selectEnergyType.aspx>, acessado em março de 2011.
90. MOULDER, J. F.; STICKLE, W. F.; SOBOL, P. E.; BOMBEN, K. D. **Handbook of x-ray photoelectron spectroscopy**. New York: Perkin-Elmer Corporation, 1992.
91. MAGALHÃES, J. L.; MOREIRA, L. M.; RODRIGUES-FILHO, U. P.; GIZ, M. J.; PEREIRA-DA-SILVA, M. A.; LANDERS, R.; VINHAS, R. C. G.; NASCENTE, P. A. P. **Surface and Interface Analysis**, v. 33, p. 293, 2002.
92. GUERROANI, N.; BALDO, A.; MAAROUF, T.; BELU, A. M.; KASSIS, C. M.; MAS, A. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 128, p. 925, 2007.
93. MARTIN, H. J.; SCHULZ, K. H.; BUMGARDNER, J. D.; WALTERS, K. B. **Langmuir**, v. 23, p. 6645, 2007.
94. FIORILLI, S.; RIVOLO, P.; DESCROVI, E.; RICCIARDI, C.; PASQUARDINI, L.; LUNELLI, L.; VANZETTI, L.; PEDERZOLLI, C.; ONIDA, B.; GARRONE, E. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, p. 235, 2008.
95. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. New York: John Wiley & Sons, 2001.
96. COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E. **Electrophoresis**, v. 29, p. 2260, 2008.
97. <http://www.dowcorning.com/applications/search/default.aspx?r=131en>, acessado em abril de 2011.
98. KIM, H. J.; SHAO, Q.; KIM, Y. H. **Surface and Coatings Technology**, v. 171, p. 39, 2003.
99. HOHERČÁKOVÁ, Z.; OPEKAR, F. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p. 132, 2005.
100. HOHERČÁKOVÁ, Z.; OPEKAR, F.; ŠTULÍK, K. **Electroanalysis**, v. 17, p. 1924, 2005.

101. SEREENONCHAI, K.; TEERASONG, S.; CHAN-EAM, S.; SAETEAR, P.; CHOENGCHAN, N.; URAISIN, K.; AMORNTHAMMARONG, N.; MOTOMIZU, S.; NACAPRICHA, D. **Talanta**, v. 81, p. 1040, 2010.
102. BRAZ, H. L.; ITO, D. T.; DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L.; PEDROTTI, J. J. **Electroanalysis**, v. 23, p. 2594, 2011.
103. PENCHAREE, S.; FABER, P. A.; ELLIS, P. S.; COOK, P.; INTARAPRASERT, J.; GRUDPAN, K.; MCKELVIE, I. D. **Analytical Methods**, v. 4, p. 1278, 2012.
104. KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. **Journal of Chromatography A**, v. 1176, p. 185, 2007.
105. MAKAHLEH, A.; SAAD, B.; SIANG, G. H.; SALEH, M. I.; OSMAN, H.; SALLEH, B. **Talanta**, v. 81, p. 20, 2010.
106. MAKAHLEH, A.; SAAD, B. **Analytica Chimica Acta**, v. 694, p. 90, 2011.
107. MARK, J. J. P.; COUFAL, P.; OPEKAR, F.; MATYSIK, F. M. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 1669, 2011.
108. RÍORDÁIN, C. Ó.; GILLESPIE, E.; CONNOLLY, D.; NESTERENKO, P. N.; PAULL, B. **Journal of Chromatography A**, v. 1142, p. 185, 2007.
109. KUBÁŇ, P.; PELCOVÁ, P.; KUBÁŇ, V.; KLAKURKOVA, L.; DASGUPTA, P. K. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 2745, 2008.
110. KIPLAGAT, I. K.; KUBÁŇ, P.; PELCOVÁ, P.; KUBÁŇ, V. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5116, 2010.
111. ZHANG, Z.; LI, D.; LIU, X.; SUBHANI, Q.; ZHU, Y.; KANG, Q.; SHEN, D. **Analyst**, v. 137, p. 2876, 2012.
112. KANG, Q.; SHEN, D.; LI, Q.; HU, Q.; DONG, J.; DU, J.; TANG, B. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 7826, 2008.
113. FRANCISCO, K. J. M.; DO LAGO, C. L. **Electrophoresis**, v. 30, p. 3458, 2009.
114. FERCHER, G.; HALLER, A.; SMETANA, W.; VELLEKOOP, M. J. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 3270, 2010.
115. <http://www.edaq.com/index.php>, acessado em maio de 2013.
116. <http://www.istech.at>, acessado em maio de 2013.
117. HO, J. A.; LIN, Y. C.; WANG, L. S.; HWANG, K. C.; CHOU, P. T. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 1340, 2009.
118. QURESHI, A.; KANG, W. P.; DAVIDSON, J. L.; GURBUZ, Y. **Diamond & Related Materials**, v. 18, p. 1401, 2009.
119. YANG, W.; RATINAC, K. R.; RINGER, S. P.; THORDARSON, P.; GOODING, J. J.; BRAET, F. **Biosensors and Carbon Nanomaterials**, v. 49, p. 2114, 2010.
120. YOGESWARAN, U.; CHEN, S. M. **Sensors**, v. 8, p. 290, 2008.
121. RAMGIR, N. S.; YANG, Y.; ZACHARIAS, M. **Small**, v. 6, p. 1705, 2010.
122. ESCOSURA-MUÑIZ, A.; AMBROSI, A.; MERKOÇI, A. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 568, 2008.
123. LARGUINHO, M.; BAPTISTA, P. V. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2811, 2012.
124. KELLER, L. O.; KALLIS, K. T.; FIEDLER, H. L. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 5921, 2010.
125. QIAN, Z.; BAI, H. J.; WANG, G. L.; XU, J. J.; CHEN, H. Y. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 2045, 2010.
126. SINGH, A. K.; RAJPUT, N. S.; SHUKLA, N.; TRIPATHI, S. K.; KUMAR, J.; KULKARNI, V. N. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 268, p. 3282, 2010.
127. BOCCACCINI, A. R.; EROL, M.; STARK, W. J.; MOHN, D.; HONG, Z.; MANO, J. F. **Sensors and Actuators A**, v. 163, p. 54, 2010.
128. LI, H.; ZOU, L.; PAN, L.; SUN, Z. **Separation and Purification Technology**, v. 75, p. 8, 2010.
129. VIDOTTI, M.; CARVALHAL, R. F.; MENDES, R. K.; FERREIRA, D. C. M.; KUBOTA, L. T. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 3, 2011.
130. BOEHM, H. P.; SETTON, R.; STUMPP, E. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1893, 1994.
131. SAITO, R.; FUJITA, M.; DRESSSELHAUS, G.; DRESSSELHAUS, M. S. **Applied Physics Letters**, v. 60, p. 2204, 1992.
132. MORAES, F. C.; SILVA, T. A.; CESARINO, I.; MACHADO, S. A. S. **Sensors and Actuators B**, v. 177, p. 14, 2013.
133. HU, C.; ZHANG, Y.; BAO, G.; ZHANG, Y.; LIU, M.; Wang, Z. L.; **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 20072, 2005.

134. VISWANATHAN, S.; RADECKA, H.; RADECKI, J. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2772, 2009.
135. PARK, S.; PARK, J.; CHO, E.; HWANG, J.; OHSAKA, T. **Research on Chemical Intermediates**, v. 32, p. 595, 2006.
136. ABBASPOUR, A.; NOORI, A. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 4674, 2011.
137. INOKUCHI, H.; KATO, D.; UEDA, A.; NIWA, O. **Electroanalysis**, v. 23, p. 827, 2011.
138. BABAEI, A.; BABAZADEH, M. **Electroanalysis**, v. 23, p. 1726, 2011.
139. MORIARTY, M.; LEE, A.; O'CONNELL, B.; KELLEHER, A.; KEELEY, H.; FUREY, A. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 2481, 2011.
140. KIM, S. K.; BAE, S. R.; AHMED, M. S.; YOU, J.; JEON, S. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, p. 1215, 2011.
141. MORAES, F. C.; CABRAL, M. F.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S. **Surface Science**, v. 605, p. 435, 2011.
142. ZHENG, M.; JAGOTA, A.; SEMKE, E. D.; DINER, B. A.; MCLEAN, R. S.; LUSTIG, S. R.; RICHARDSON, R. E.; TASSI, N. G. **Nature Materials**, v. 2, p. 338, 2003.
143. GONZÁLEZ, R. R.; FERNÁNDEZ, R. F.; VIDAL, J. L.; FRENICH, A. G.; PÉREZ, M. L. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, p. 187, 2011.
144. CARIS, J. A.; CHAVES, A. R.; QUEIROZ, M. E. C. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 57, 2012.
145. HUANG, H.; CHEN, Z.; YAN, X. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 436, 2012.
146. KHAN, M. Z. H.; NAKANISHI, T.; OSAKA, T. **Sensor Letters**, v. 9, p. 1849, 2011.
147. LI, J.; LIN, X. Q. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 222, 2007.
148. ABBASPOUR, A.; NOORI, A. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 4674, 2011.
149. NIKLAUS, F.; STEMME, G.; LU, J. -Q.; GUTMANN, R. J. **Journal of Applied Physics**, v. 99, p. 031101-1, 2006.
150. BARTH, P. W. **Sensors and Actuators**, v. A21, p. 919, 1990.
151. BART, J.; TIGGELAAR, R.; YANG, M.; SCHLAUTMANN, S.; ZUILHOF, H.; GARDENIERS, H. **Lab on a Chip**, v. 9, p. 3481, 2009.
152. ZIMMERMANN, F.; RICHTER, S.; DÖRING, S.; TÜNNERMANN, A.; NOLTE, S. **Applied Optics**, v. 52, p. 1149, 2013.
153. XU, Y.; WANG, C.; LI, L.; MATSUMOTO, N.; JANG, K.; DONG, Y.; MAWATARI, K.; SUGA, T.; KITAMORI, T. **Lab on a Chip**, v. 13, p. 1048, 2013.
154. TONG, Q. Y. **Journal of Microelectromechanical Systems**, v. 3, p. 29, 1994.
155. ZHANG, M.; ZHAO, J.; GAO, L. **Sensors and Actuators A**, v. 141, p. 213, 2008.
156. CHEN, L.; LUO, G.; LIU, K.; MA, J.; YAO, B.; YAN, Y.; WANG, Y. **Sensors and Actuators B**, v. 119, p. 335, 2006.
157. ILES, A.; OKI, A.; PAMME, N. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 3, p. 119, 2007.
158. WANG, H. Y.; FOOTE, R. S.; JACOBSON, S. C.; SCHNEIBEL, J. H.; RAMSEY, J. M. **Sensors and Actuators B**, v. 45, p. 199, 1997.
159. ALLEN, P. B.; CHIU, D. T. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 7153, 2008.
160. TAKAGI, H.; MAEDA, R.; CHUNG, T. R.; SUGA, T. **Sensors and Actuators A**, v. 70, p. 164, 1998.
161. HOWLADER, M. M. R.; SUEHARA, S.; SUGA, T. **Sensors and Actuators A**, v. 127, p. 31, 2006.
162. VALENTI, A.; PETROVIČ, P.; DROFENIK, M. **Journal of Materials Science**, v. 27, p. 4145, 1992.
163. DRESBACH, C.; KROMBOLZ, A.; BAGDAHN, J. **Microsystem Technologies**, v. 12, p. 473, 2006.
164. CRUZ, R.; RANITA, J. A. C.; MAÇAIRA, J.; RIBEIRO, F.; DA SILVA, A. M. B.; OLIVEIRA, J. M.; FERNANDES, M. H. F. V.; RIBEIRO, H. A.; MENDES, J. G.; MENDES, A. **IEEE Transactions on Components, Packaging and Manufacturing Technology**, v. 2, p. 1949, 2012.
165. WU, H.; HUANG, B.; ZARE, R. N. **Lab on a Chip**, v. 5, p. 1393, 2005.
166. CHEN, C.; HIRDES, D.; FOLCH, A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 1499, 2003.
167. MOREAU, W. M. **Semiconductor Lithography – Principles, Practices, and Materials**, New York, Plenum Press, 1988.
168. ZIZZARI, A.; ARIMA, V.; ZACHEO, A.; PASCALI, G.; SALVADORI, P. A.; PERRONE, E.; MANGIULLO, D.; RINALDI, R. **Microelectronic Engineering**, v. 88, p. 1664, 2011.
169. LARSEN, T.; KELLER, S.; SCHMID, S.; DOHN, S.; BOISEN, A. **Microelectronic Engineering**, v. 88, p. 2311, 2011.

170. REDDY, C. V. B.; KHADERBAD, M. A.; GANDHI, S.; KANDPAL, M.; PATIL, S.; CHETTY, K. N.; RAJULU, K. G.; CHARY, P. C. K.; RAVIKANTH, M.; RAO, V. R. **IEEE Transactions on Nanotechnology**, v. 11, p. 701, 2012.
171. KUO, S. M.; HUANG, Y. W.; YEH, S. M.; LIN, C. H. **Optics Express**, v. 19, p. 18372, 2011.
172. TUYEN, L. D.; WU, C. Y.; ANH, T. K.; MINH, L. Q.; KAN, H. C.; HSU, C. C. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 7, p. 198, 2012.
173. KIM, K. J.; KIMA, Y. S.; BAE, J. J.; KANG, B. H.; YEOM, S. H.; YUAN, H.; KANG, S. W. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 95, p. 1238, 2011.
174. ESQUIVEL, J. P.; SENN, T.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, P.; SANTANDER, J.; LÖRGEN, M.; ROJAS, S.; LÖCHEL, B.; CANÉ, C.; SABATÉ, N. **Journal of Power Sources**, v. 195, p. 8110, 2010.
175. PANG, C.; ZHAO, Z.; LI, S.; DU, L.; FANG, Z. **Advanced Materials Research**, v. 60–61, p. 68, 2009.
176. XUE, N.; CHANG, S. P.; LEE, J. B. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 21, 1338, 2012.
177. ALTUNA, A.; DE LA PRIDA, L. M.; BELLISTRI, E.; GABRIEL, G.; GUIMERA, A.; FERNANDEZ, L. J. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 37, p. 1, 2012.
178. CHAO, T. Y.; HSU, M. C.; LIN, C. D.; CHENG, Y. T. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 21, 025010 6 pp, 2011.
179. ROUBAH, H. A.; PARK, B. Y.; ZAOUK, R. B.; MORGAN, H.; MADOU, M. J.; GREEN, N. G. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 21, 035018 9 pp, 2011.
180. YANG, B.; ZHU, Y.; JIAO, Y.; YANG, L.; SHENG, Z.; HE, S.; DAI, D. **Journal of Lightwave Technology**, v. 29, p. 2009, 2011.
181. AIDA, T.; TOKUHARA, T.; ASAH, S.; HIROYA, M.; HIROSHI, K. **Microelectronic Engineering**, v. 98, p. 258, 2012.
182. CHANG, C. J.; YANG, C. S.; CHUANG, Y. J.; KHOO, H. S.; TSENG, F. G. **Nanotechnology**, v. 19, 365301 8 pp, 2008.
183. TSAI, N. C.; SUE, C. Y. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 313, 2006.
184. EL-ALI, J.; PERCH-NIELSEN, I. R.; POULSEN, C. R.; BANG, D. D.; TEFLEMAN, P.; WOLFF, A. **Sensors and Actuators A**, v. 110, p. 3, 2004.
185. CARLIER, J.; ARSCOTT, S.; THONNY, V.; FOURRIER, J. C.; CARON, F.; CAMART, J. C.; DRUON, C.; TABOURIER, P. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 14, p. 619, 2004.
186. LEGAC, C.; CARLIER, J.; CAMART, J. C.; CREN-OLIVÉ, C.; ROLANDO, C. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 808, p. 3, 2004.
187. WANG, Z.; HANSEN, O.; PETERSEN, P. K.; ROGEBERG, A.; KUTTER, J. P.; BANG, D. D.; WOLFF, A. **Electrophoresis**, v. 27, p. 5081, 2006.
188. PFEIFER, K.; FINK, M.; GRUETZNER, G.; BLEIDIESSEL, G.; SCHULZ, H.; SCHEER, H. **Microelectronic Engineering**, v. 57–58, p. 381, 2001.
189. TUOMIKOSKI, S.; FRANSSILA, S. **Sensors and Actuators A**, v. 120, p. 408, 2005.
190. TUOMIKOSKI, S.; FRANSSILA, S. **Physica Scripta**, v. T114, p. 223, 2004.
191. BLANCO, F. J.; AGIRREGABIRIA, M.; GARCIA, J.; BERGANZO, J.; TIJERO, M.; ARROYO, M. T.; RUANO, J. M.; ARAMBURU, I.; MAYORA, K. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 14, p. 1047, 2004.
192. STEIGERT, J.; BRETT, O.; MÜLLER, C.; STRASSER, M.; WANGLER, N.; REINECKE, H.; DAUB, M.; ZENGERLE, R. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 18, 095013 8 pp, 2008.
193. PAN, C. T.; YANG, H.; SHEN, S. C.; CHOU, M. C.; CHOU, H. P. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 12, p. 611, 2002.
194. BEH, C. W.; ZHOU, W.; WANG, T. H. **Lab on a Chip**, v. 12, p. 4120, 2012.
195. YACOBI, B. G.; MARTIN, S.; DAVIS, K.; HUDSON, A.; HUBERT, M. **Journal of Applied Physics**, v. 91, p. 6227, 2002.
196. NIKLAUS, F.; STEMME, G.; LU, J. Q.; GUTMANN, R. J. **Journal of Applied Physics**, v. 99, 031101 28 pp, 2006.
197. BALDAN, A. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 38, p. 95, 2012.
198. BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**, 1995, New York, John Wiley & Sons.
199. COLTRO, W. K. T.; LUNTE, S. M.; CARRILHO, E. **Electrophoresis**, v. 29, p. 4928, 2008.
200. MOGENSEN, K. B.; AL-ALI, J.; WOLFF, A.; KUTTER, J. P. **Applied Optics**, v. 42, p. 4072, 2003.
201. CHEN, Y. T.; LEE, D. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 17, p. 1978, 2007.

- 202. CARLIER, J.; CHUDA, K.; ARSCOTT, S.; THOMY, V.; VERBEKE, B.; COQUERET, X.; CAMART, J. C.; DRUON, C.; TABOURIER, P. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 16, p. 2211, 2006.
- 203. DAI, W.; LIAN, K.; WANG, W. J. **Microsystem Technologies**, v. 11, p. 526, 2005.
- 204. JIGUET, S.; BERTSCH, A.; JUDELEWICZ, M.; HOFMANN, H.; RENAUD, P. **Microelectronic Engineering**, v. 83, p. 1966, 2006.
- 205. DU, L. Q.; WANG, Q. J.; ZHANG, X. L. **Science China Technological Sciences**, v. 53, p. 3006, 2010.
- 206. LI, B.; LIU, M.; CHEN, Q. F. **Journal of Microlithography, Microfabrication, and Microsystems**, v. 4, p. 043008/1-6, 2005.
- 207. ANHOJ, T. A.; JORGENSEN, A. M.; ZAUNER, D. A.; HÜBNER, J. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 16, p. 1819, 2006.
- 208. MELAI, J.; SALM, C.; SMITS, S.; VISSCHERS, J.; SCHIMITZ, J. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 19, 065012 7 pp, 2009.
- 209. <http://www.microchem.com/pdf/SU-8-table-of-properties.pdf>, acessado em fevereiro de 2013.
- 210. KIM, H. J.; SHAO, Q.; KIM, Y. H. **Surf. Coat. Tech.**, v. 171, p. 39, 2003.
- 211. FARCICH, N. J.; SALONEN, J.; ASBECK, P. M. **IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques**, v. 56, p. 2963, 2008.
- 212. ABGRALL, P.; CONEDERA, V.; CAMON, H.; GUE, A. M.; NGUYEN, N. T. **Electrophoresis**, v. 28, p. 4539, 2007.
- 213. PONRAJ, J. S.; ATTOLINI, G.; BOSI, M. **Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences**, v. 38, p. 203, 2013.

ANEXOS

ANEXO I

**Capacitively coupled contactless conductivity detection
on microfluidic systems—ten years of development**

Cite this: *Anal. Methods*, 2012, **4**, 25

www.rsc.org/methods

CRITICAL REVIEW

Capacitively coupled contactless conductivity detection on microfluidic systems—ten years of development†

Wendell Karlos Tomazelli Coltro,^{ab} Renato Sousa Lima,^{bc} Thiago Pinotti Segato,^{bc} Emanuel Carrilho,^{bc} Dosil Pereira de Jesus,^{bd} Claudimir Lucio do Lago^{bc} and José Alberto Fracassi da Silva^{*bd}

Received 20th June 2011, Accepted 22nd August 2011

DOI: 10.1039/c1ay05364g

The use of capacitively coupled contactless conductivity detection (C⁴D) on miniaturized systems has increased considerably over the last few years. Since the first report, 10 years ago, several advances on the detection cell geometry, strategies for increasing the sensitivity and a wide range of applications have been reported. This review intends to cover the main features related to the instrumental setup of this detection method for analytical and bioanalytical assays on microfluidic chips.

Introduction

The use of microfluidic platforms for chemical and biochemical applications has achieved remarkable progress in the last two

decades.^{1–4} The miniaturization of analytical components (valves, pumps, mixers, pH regulators, reactors, *etc.*), the development of ultrasensitive methods, and the integration of different detectors with separation techniques are attractive features in this field.^{1,2} Although a rapid advance has been observed in this area, greater efforts should be spent to fabricate and use real micro total analysis systems (μTAS).⁵ These devices, which were conceptually designed in 1990 by Manz *et al.*,⁶ involve the on-chip integration of multiple analytical steps including sampling, sample pretreatment, separation, chemical reactions, detection, and even electronics for data acquisition. This characteristic is highly relevant in many cases, such as in clinical diagnostics and health care.⁷

Over the past years, different detection systems, including fluorescence,⁸ mass spectrometry,⁹ and electrochemical detectors,^{10–12} have been coupled with microfluidic systems. Due to its inherent compatibility with miniaturization techniques, electrochemical detection is becoming increasingly popular for on-chip

^aInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil. E-mail: wendell@quimica.ufg.br; Fax: +55 62 3521-1127

^bInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, Campinas, SP, Brazil

^cInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13566-970 São Carlos, SP, Brazil. E-mail: emanuel@iqsc.usp.br

^dInstituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brazil. E-mail: fracassi@iqm.unicamp.br

^eInstituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: claudemi@iq.usp.br

† This article is part of a web theme in *Analyst* and *Analytical Methods* on Future Electroanalytical Developments, highlighting important developments and novel applications. Also in this theme is work presented at the Eirelec 2011 meeting, dedicated to Professor Malcolm Smyth on the occasion of his 60th birthday.

Wendell Karlos Tomazelli Coltro

Wendell K. T. Coltro received his MS (2004) and PhD (2008) in Chemistry (Analytical Chemistry Concentration) from University of São Paulo. Since 2009, he has been an Assistant Professor at Institute of Chemistry from Federal University of Goiás, Brazil. His research interests involve the development of alternative microfabrication technologies (toner-based technologies), coupling of electrochemical detectors and bioanalytical assays on microfluidic devices.

Thiago Pinotti Segato

Thiago P. Segato, PhD, is a postdoctoral student at the Institute of Chemistry at São Carlos, Brazil, and an associate researcher at the INCTBio. His current research is focused on fabrication of microfluidic chips and their coupling with detection techniques.

applications.^{10–15} By using standard^{10–15} or alternative¹⁶ micro-fabrication technologies, detection electrodes and microfluidic channels can be integrated and co-fabricated on a single device. Among all electrochemical techniques, the capacitively coupled contactless conductivity detection (C⁴D) is one of the most promising for microfluidic applications.^{13–15}

The C⁴D history started in 1928, when Zahn¹⁷ reported that conductance measurements could be carried out without physical contact of the electrodes with the measured solution, as reported by Burkhalter.¹⁸ The contactless conductivity technique was popular in the 1960s under the format of “High Frequency Titrations” but its use was discontinued in the next decades, mainly due to advances in the instrumentation and methods for chromatography. A new impulse occurred in the 1980s when “Oscillometry” was employed as a detection scheme for flow injection analysis and chromatography.^{19–21} A few reports about C⁴D applied to isotachopheresis appeared during the 1980s, being the first reports for electroseparation techniques.^{22–24} In 1998, the use of C⁴D coupled to capillary electrophoresis (CE) was proposed independently by Zemann *et al.*²⁵ and by da Silva and do Lago.²⁶ Further information about the fundamentals,

instrumentation and applications using conventional CE-C⁴D can be found in excellent review articles.^{14,15,27–32}

The first report about C⁴D on microfluidic systems was published in 2001, by Guijt *et al.*³³ The use of a contactless electrochemical detection mode offers some advantages over faradaic electrochemical methods. The electrical insulation of the electrodes from the electrolytic fluid avoids problems commonly found in the contact mode including electrode fouling, bubble formation (electrolysis), and electrical interference due to the electric field applied in electrophoretic systems, for example.^{13–15,27–33} The main disadvantage of the C⁴D system is attributed to its lower sensitivity when compared to other electrochemical modes of detection, *e.g.*, to amperometric³² or contact conductivity^{31,34} detection.

Since the first publication, many reports on microchips with C⁴D have appeared in the literature. In 2007, Pumera reported an outstanding review article exclusively dedicated to the designs and applications of C⁴D on microfluidics.¹³ This current review describes the main advances about C⁴D on microfluidic systems reported in the last ten years. The detection cell geometry, the strategies for increasing the sensitivity as well as the main applications are presented and discussed.

Theory of C⁴D

In C⁴D, the faradaic current is absent, because the electrodes are insulated from the solution by a dielectric and, then, we say that

Fig. 1 Comparison between (a) contact and (b) contactless conductivity detection. The current $i(t)$ is proportional to the conductance of the solution, and this information can be coded as a voltage $V_o(t)$ by using a current-to-voltage converter (also known as transimpedance amplifier).

Emanuel Carrilho

Emanuel Carrilho is an Associate Professor in Bioanalytical Chemistry at the University of São Paulo, Brazil. He obtained his PhD in Bioanalytical Chemistry at the Barnett Institute, Northeastern University and took a two-year sabbatical at Harvard University. His current research interests focus on the development of analytical methods for biological systems and the development of instrumentation based on microfluidics for diagnosis of disease.

Dosil Pereira de Jesus

Dosil P. Jesus received his MS (1999) and PhD (2003) in Analytical Chemistry from the Institute of Chemistry at the University of São Paulo (Brazil), where he was a postdoctoral research fellow (2004–2005). From 2009 to 2010 he was a visiting scholar at the Department of Chemistry and Chemical Biology at Harvard University. He is currently a professor in the Institute of Chemistry at State University of Campinas (Brazil). His

research is focused on capillary electrophoresis separations and development of microfluidic devices for Analytical Chemistry.

José Alberto Fracassi da Silva

José Alberto Fracassi da Silva graduated in Chemistry from the São Paulo State University in 1996, where he also received his PhD in Analytical Chemistry in 2001. Afterwards, he got a post-doctoral position at the Laboratory of Integrated Systems, in Polytechnic School in the University of São Paulo. In 2004, he got a position at State University of Campinas, in Campinas, SP, Brazil. In 2010 he was a visiting scholar at The Ralph Adams Institute for Bio-analytical Chemistry, The

University of Kansas (USA). His main research interests are focused on instrumentation and methods for both capillary and microchip electrophoresis.

they are capacitively coupled to the electrolyte. On microchips, the electrode/dielectric/solution system exhibits behaviour similar to a parallel plate capacitor.

In direct conductivity, a small amplitude alternate signal (a sinusoidal wave, for example) is applied to two inert electrodes as illustrated in Fig. 1(a). Since the electrodes are in direct contact with the solution, a low frequency is used since the capacitance of the electrical double layer (EDL) is relatively high, approximately a few μF per cm^2 .³⁵ The use of an alternate signal also minimizes the electrolysis effects on the conductivity measurement. If the electrodes were placed outside the reservoir (Fig. 1(b)), the capacitance of the wall of the reservoir will impose a high impedance to signal transmission or, more accurately, a high capacitive reactance (X_C). X_C is inversely proportional to both the operating frequency and the capacitance value—in this case, the capacitance of the wall of the reservoir (C_w). Since C_w is very small, a high frequency signal must be applied to the electrodes to overcome the capacitive reactance of the reservoir.

Fig. 2 illustrates a typical C^4D microchip and the simplest equivalent electrical circuit^{26,36} is composed by the following elements: (i) solution resistance (R_S); (ii) capacitances relative to the dielectric, defined by the electrode geometry and wall thickness (C_w); and (iii) a third capacitance resulting from the direct capacitive coupling between the electrodes, called stray capacitance (C_0). In general, the C^4D consists in applying an alternating signal to a detection cell electrode (excitation electrode, e_{exc}), which generates the polarization of the dielectric. This phenomenon induces ion movement in the electrolyte solution due to the formation of an interfacial potential difference. Finally, in the region of the second electrode (receiver electrode, e_r), an analogous process occurs resulting in an alternate current between the electrodes.

The current measured by the C^4D detector reflects the system total admittance (the inverse of the impedance), which depends on the capacitive reactance of the dielectric wall (X_{Cw}), the resistance of the solution (R_S), and the reactance of the stray capacitance (X_{C0}).

When simultaneously X_{Cw} is made low and X_{C0} is made high, one can infer that the cell admittance (and, thus, the resulting current or voltage signal) varies linearly with the conductivity of the solution. However, for the typical configurations used for C^4D , the presence of the capacitances leads to non-linear behaviour of the cell admittance as a function of the conductivity of the solution. Fortunately, the analytical signal represents only a very small variation of conductivity; so small that one can approximate a straight line to that region of the curve (the reader

Fig. 2 Representation of (A) constituent layers of a microfluidic system with a typical C^4D microcell and (B) its equivalent electrical circuit. In (A), the substrate contains microchannels and electrodes in its bottom and top surfaces, respectively. C_w , C_0 , and R_S stand for the wall capacitance, stray capacitance, and solution resistance, respectively.

can have an insight about this discussion by considering the concept of mathematical differentiation, *i.e.*, under a close look, any curve segment can be approximated to a straight line).

It is also important to highlight that conductivity is a universal method of detection, since the response will be promoted by any ion in solution. The method requires a separation step in order to enhance the selectivity. This is the reason for the success of conductivity-based detectors for chromatography and electro-separation techniques.

Detection cell geometry

Since the first reports,^{33,37} C^4D has been extensively applied to monitor electrophoretic separations, chemical reactions, as well as bioassays on microchips. One of the main trends is its coupling with microchip electrophoresis (MCE). When compared to the C^4D instrumentation employed for conventional CE, the most remarkable difference is the electrode format used for MCE. In fused-silica capillary, tubular electrodes are placed around the outer polyimide coating of the capillary. The integration of this geometry on miniaturized devices is not compatible with the main fabrication technologies available today. Thus, planar electrodes, which are much easier to be integrated into the chip-based devices, are nearly the only geometry.^{13,14}

Regarding the detection cell arrangement in MCE, basically the electrodes may be (i) embedded in the microchip, (ii) attached to it (placed either underneath the bottom or on top of the device) or (iii) can be external to the device (see Fig. 3). In the first option, the electrodes are physically separated from the inside microchannel with an insulating layer to enable the capacitive coupling. In the second one, the bottom plate or top cover thicknesses provide insulation from the microfluidic channel. The last option is similar to the second one, but the electrodes are not part of the device, *i.e.*, they are made on a holder and are preserved when the fluidic device is discarded. The significant thickness of the top and bottom parts causes an augment of the impedance of the wall. On the other hand, the external electrodes are advantageous, because they are not part of the microchip itself.^{13,14}

Fig. 3 Detection cell geometries for MCE- C^4D . (A) Representation of in-plane embedded electrodes; (B) design of attached electrodes directly on MCE; (C) scheme of an external holder containing two electrodes and their coupling with MCE; and (D) wall-jet configuration on the chip. (A), (B), (C), and (D) were adapted with permission from ref. 38–41, respectively.

The electrodes for C^4D measurements on MCE (MCE- C^4D) have been fabricated by different approaches including photolithographic steps, screen-printing techniques, metal sputtering or evaporation, as well as using practical and inexpensive tools like silver paint, aluminium foil, adhesive metal tapes, or printed circuit boards (PCB). The following sections will present a short review about the improvements in detection cell geometry and analytical sensitivity as well as recent applications using C^4D on microfluidic devices.

Geometry of the detection electrodes

As mentioned before, the electrodes for MCE- C^4D can be embedded (Fig. 3(A)), attached (Fig. 3(B)), or external (Fig. 3C and D) to the microfluidic device. Due to compatibility with microfabrication techniques, electrodes and channels can be incorporated on the same substrate. This compatibility allowed constructing microsystems containing channels and planar electrodes for electrochemical detection. Regarding C^4D measurements, electrodes have been often insulated from the separation channel by using thin film deposition technologies. However, simpler and easier approaches have also been reported.

Embedded electrodes

The first report about MCE- C^4D was published by Guijt *et al.*³³ In this work, a four-electrode configuration was fabricated in a glass substrate and insulated by a 30 nm thick silicon carbide layer. The wafers containing the electrodes and etched channels were integrated by anodic bonding at 400 °C and 100 V for 1 h.^{33,42} Berthold *et al.* reported a very similar approach.³⁷

Lichtenberg *et al.* reported a new approach to integrate in-plane electrodes for C^4D with glass channels.³⁸ Microchannels and electrodes were formed on glass wafers in sequential photolithographic steps. Platinum electrodes were fabricated by first evaporating 20 nm of tantalum as adhesion layer, followed by 150 nm of Pt. A thin glass wall of 10–15 μm (see Fig. 3(A)) provided the separation between the detection electrodes and the buffer electrolyte. The wafer containing the etched-glass channels and the electrodes was fused against another glass plate by thermal bonding at 650 °C.

Lee *et al.* reported the construction of semicircular electrodes for C^4D on a glass chip.⁴³ The electrodes were deposited around the separation channel by Cr/Au sputtering and patterned using the lift-off process as depicted in Fig. 4. The electrodes were separated from the microfluidic channel at a distance of 40 μm . Although the use of semicircular detection electrodes seems to provide better sensitivity, the authors did not supply an

Fig. 4 Scanning electron micrographs showing (A) the detection section of the separation channel, and (B) semicircular and (C) planar electrodes in the bonded chips. Reprinted from ref. 43, with permission.

explanation for the shift of the operation frequency to the range of 5–25 kHz, which is unusual for C^4D . Also, it is not very clear why the resolution is better using the circular geometry and why the migration order, in some electropherograms, for common cations in 10 mmol L^{-1} MES/His does not agree with previous published papers.

Shang *et al.* reported the fabrication of a MCE- C^4D with insulated detection electrodes.⁴⁴ Chromium electrodes were formed using an e-beam evaporator and a 100 nm SiO_2 layer provided the electrical insulation. The insulating layer was deposited by plasma-enhanced chemical vapour deposition (PECVD).

In 2010 and 2011, some authors have reported simpler methods to fabricate embedded electrodes for performing MCE- C^4D . Segato *et al.* explored the use of a thin PDMS layer (50 μm thick) to provide the electrical insulation of glass channels to sputtered electrodes (see Fig. 5). This PDMS membrane enabled the capacitive coupling, and also allowed the sealing of the glass channels at room temperature.⁴⁵ Liu *et al.* have also explored the use of a PDMS membrane to insulate electrodes fabricated on glass substrates and to enable the capacitive coupling for C^4D .⁴⁶ A similar strategy was adopted to produce a three-layer PMMA MCE, in which a 50 μm layer provided the insulation of Pt microelectrodes.⁴⁷

Coltro *et al.* have reported a simple approach to produce polymeric microchips with integrated copper electrodes for C^4D .⁴⁸ Copper electrodes were fabricated using a printed circuit board (PCB), as an inexpensive source of thin metal film, and toner masks, for the wet chemical etching of the metal layer on the PCB. A poly(ethylene terephthalate) (PET) film coated with a thin thermo-sensitive adhesive layer was laminated to the PCB plate, providing the insulation of the electrodes to perform C^4D measurements. Guijt *et al.* have also demonstrated the photolithographic fabrication of planar electrodes on PCB substrates for C^4D on MCE.⁴⁹

Attachment of electrodes

One of the limitations of using embedded electrodes is the dependence on sophisticated instrumentation to provide an effective and reproducible insulation between the solution channel and the electrode. A non-effective electrical insulation between the electrodes and the microfluidic channel can lead to a damage of the detector's electronic circuit, due to the high

Fig. 5 Examples of (A) a SEM image from the transversal section of the glass channel sealed by a thin PDMS layer, and (B) optical micrograph of a three layer PMMA device with integrated Pt electrodes for C^4D . Figures (A) and (B) were reprinted, with permission, from ref. 45 and 47, respectively.

electric fields used in the separations. In practice, it is very common to find defects on the insulation layer when the thickness is around tens of nm. For this reason, the search for effective and simpler configurations has been the focus of many research groups.

In 2002, Pumera *et al.* described one of the simplest methods to couple C⁴D electrodes with MCE.⁵⁰ Two rectangular-shaped electrodes, fabricated from aluminium strips, were placed on the outer side of PMMA microfluidic chips. In this case, the substrate thickness (125 µm) provided the insulation between the electrodes and the solution. Due to its simplicity and low instrumental requirements, this approach has been adopted by other groups. This system was adapted, by Pumera and Wang,⁵¹ to perform dual amperometric and C⁴D measurements on MCE.

Tanyanyiwa and Hauser,⁵² at the end of 2002, published the use of high-voltage C⁴D for MCE. In their report, the application of an AC excitation signal of 500 V_{pp} and a frequency of 100 kHz allowed them to detect through a cover plate of 1 mm thickness. As detection electrodes, the authors used two parallel strips 0.5 mm wide and 5 mm long that were formed with silver paint.

A movable C⁴D system was adapted from the conventional CE to MCE system.^{53,54} Rectangular shaped electrodes were fabricated from 10 µm thick aluminium foil and glued around two sides of the 1 mm thick PMMA plate of the detector. The cover plate of the chip (125 µm thick) was thus mechanically pressed against the detection electrodes. The position of the electrodes could be changed by “sliding” the detector holder along the separation channel.

In 2003, do Lago *et al.* demonstrated the coupling of C⁴D with polyester-toner (PT) devices.⁵⁵ Electrodes were formed using adhesive copper strips that were glued outside the polyester film. The 100 µm thickness allowed capacitive coupling with the solution. This same approach was later used for glass-toner devices.⁵⁶ Ding *et al.* also showed that tapered rectangular electrodes for C⁴D can be attached to PDMS chips.⁵⁷ Wang *et al.* demonstrated the use of the screen-printing process for generating highly reproducible sets of silver-ink electrodes for MCE-C⁴D.⁵⁸ Printing of silver electrodes was performed through a patterned stencil on thin PMMA sheets. The screen-printed PMMA sheets were cut, aligned and sealed to the channel plate thus establishing a complete MCE-C⁴D.

The integration of planar electrodes on PT devices was also demonstrated by Coltro *et al.*³⁹ Aluminium electrodes were sputtered on polyester films using toner masks that defined the electrode area (see Fig. 3(B)). After removal of the toner, the polyester with incorporated electrodes (on the outer surface) was laminated, at 40 cm min⁻¹ and 120 °C, against a printed PT channel layer (on the inner surface) to create a low cost MCE-C⁴D on PT with integrated electrodes.

Most recently, an end-to-end differential MCE-C⁴D was reported by Fercher *et al.*⁵⁹ This new approach is based on the placement of two distinct detector areas (consisting of two screen-printed silver electrodes) near the ends of the fluid inlet and fluid outlet of the separation channel. Both output signals are subtracted from each other, and the resulting differential signal is amplified and measured. This measurement approach has several advantages over the established single-end detection. The high baseline level resulting from parasitic stray capacitance and buffer conductivity is reduced, leading to better signal-to-

noise ratio (*S/N*) and hence higher sensitivity. Furthermore, temperature and, thus, baseline drift effects are diminished owing to the differentiating nature of the system. These last two configurations will be better discussed ahead.

External electrodes

Tanyanyiwa *et al.* described the use of external electrodes on a holder to perform high voltage C⁴D (HVC⁴D) on MCE.⁴⁰ In this approach, two electrodes, fabricated by using strips of adhesive copper tape, were mounted on a holder constructed from PMMA (see design presented in Fig. 3(C)). The holder also features a vertical Faraday shield, which is employed to minimize direct capacitive coupling between the electrodes. For operation, the chip is placed and then clamped onto its holder. This instrumentation is very simple and allows the use of any kind of substrate material.

Chen *et al.* reported the coupling of a glass microchip,⁶⁰ bonded with a thin cover glass plate, with an external copper plate containing detection electrodes previously fabricated by wet chemical etching. The authors investigated the effect of sine, square, and triangular waveforms. The sine wave offered the most favourable *S/N*. This conclusion agrees with results previously published by Wang *et al.*⁶¹

Wang *et al.* also developed a “hybrid” electrode configuration for performing MCE-C⁴D.⁴¹ It is based on an arrangement where the receiving electrode is insulated by a thin layer of poly (vinylchloride) and placed in the bulk solution of the detection reservoir of the chip, whereas the emitting electrode is in contact with the solution eluted from the channel outlet in a wall-jet configuration (see design depicted in Fig. 3(D)).

Recently, Mahabadi *et al.* described a dual top–bottom C⁴D cell configuration for microchips.⁶² The sensing cell consists of two pairs of copper strips embedded into two polymer blocks and placed inside the housing at the top and the bottom. When compared to conventional top–top electrode geometry, the dual top–bottom geometry exhibited improved detector performance.

Alternatives for increasing the C⁴D sensitivity

The main disadvantage reported for the C⁴D systems is their lower sensitivity when compared with other electrochemical detection methods. This low sensitivity arises from two phenomena: absence of charge transfer on the electrode surface and direct capacitive coupling between the electrodes, generating the stray capacitance. The alternatives described in the literature in order to improve the C⁴D sensitivity are based on three strategies, namely: (i) increasing the detection area, (ii) decreasing the dielectric thickness, and (iii) minimizing the stray capacitance. The hybrid detection mode,⁴¹ containing the emitting electrode in contact with the electrolyte, can be included in the second case. Such arrangement provided over 10-fold sensitivity enhancement compared to the full wall-jet contactless conductivity detector.

According to eqn (1), the detection area (*A*) and the dielectric thickness (*d*) affect the capacitance (*C*) of the electrode/dielectric/solution system. Consequently, the C⁴D signal is also affected.

$$C = K\epsilon_0 \frac{A}{d} \quad (1)$$

where K is the dielectric constant of the insulation layer and ϵ_0 the vacuum permittivity constant ($8.85 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$). Eqn (1) is calculated using Gauss law for a planar capacitor, assuming the absence of edge effects of the electric field.

The stray capacitance (C_0), by its turn, occurs owing to direct capacitive coupling between the electrodes, which can cause detection problems due to the drop of the equivalent impedance of the detection cell.^{26,28,29} Stray capacitances can affect the peak height, increase the background signal, and generate peak overshooting leading to a deterioration of the S/N . This phenomenon is particularly pronounced at higher frequencies.⁶³ Some studies about the improvements on sensitivity are presented in the following sections.

Detection area

The approaches aiming at increasing the sensing area of integrated electrodes include: dual top–bottom,⁶² semicircular,⁴³ and sidewall electrodes. These last two configurations consist of embedded electrodes placed on the same plane of the micro-channel and with greater detection area. The dual top–bottom electrode geometry, in conjunction with thin electrophoresis microchips, doubles the total wall capacitance and enables an enhancement on the signal coupling with the detection volume. Compared to the top–top geometry, this configuration gave an increase in signal ranging from 40 to 65% in terms of peak height for NH_4^+ and Li^+ , respectively. The reported data in this case represent the best limits of detection for small inorganic ions found in the literature, with a detection limit of approximately $0.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ for cations and $0.15 \mu\text{mol L}^{-1}$ for anions.⁶²

Thickness of the dielectric layer

Besides the detection area, the thickness of the dielectric layer also directly affects the C^4D sensitivity. As reported by Kubán and Hauser,⁶⁴ there is a loss of approximately 75% of the analytical signal when this thickness is increased from 125 to 425 μm , with C^4D electrodes in antiparallel orientation (see Fig. 6 (A)). In general, the minimum thickness values found for C^4D devices range between 0.1 and 40 μm for embedded electrodes and between 100 and 200 μm for both attached and external electrodes. Regarding the embedded electrodes configuration, Guijt *et al.* depicted the insulation with SiC thin films of approximately 30 nm thickness.³³ The proposed method,

however, requires a laborious fabrication process and exhibits limited electric field stability. Presumably, the limited stability problem occurred as a function of a non-effective insulation of the electrodes or the dielectric strength.

Stray capacitance

The orientation of the electrodes and the use of Faraday shield (see Fig. 3(C)) list as alternatives for reduction of the C_0 value. In 2005, Kubán and Hauser⁶⁴ investigated the effects of cell geometry and operating parameters on the performance of external electrodes for C^4D on MCE. One of the evaluated parameters was the orientation of the electrodes: parallel or antiparallel, as shown in Fig. 6(A). In this study, the cell output voltage, the peak heights, and the S/N were evaluated as functions of the excitation frequency. Due to the higher stray capacitance, the parallel orientation was found to give higher output voltage. As expected, the greater stray capacitance results in a reduced peak height and also lower S/N as shown in Fig. 6 (B). Electrodes in antiparallel orientation have been often adopted for C^4D measurements on MCE owing to their better sensitivity.

Finally, reports discussing other parameters that also affect the C^4D sensitivity—including the cell geometry configuration, electrode dimensions (length, width, and gap) and electronics—can also be found in the literature.^{64–66}

Applications

The coupling of C^4D on microfluidic systems has led to a large range of applications. Some examples including bioanalytical assays, on-chip enzymatic reactions, food analysis, and determinations of explosives, and chemical warfare agents are listed below.

Bioanalytical applications

MCE- C^4D has been applied for the determination of a wide range of biochemical species including amino acids, proteins, peptides, DNA, and immunoglobulin G (IgG). Tanyaniwa *et al.* showed the first separation and detection of amino acids on MCE using C^4D .^{40,67} One year later, Abad-Villar *et al.* reported the detection of a wide range of biochemically relevant species.⁶⁸ In this study, 12 essential amino acids were detected in approximately 4 min using a 2.3 mol L^{-1} acetic acid solution (pH 2.1) as BGE. The separation of peptides (leucine enkephalin, bradykinin, angiotensin II, thyrotropin releasing hormone, and oxytocin) was also demonstrated using the same media with addition of 0.05% Tween 20. Electrophoretic separations of the proteins cytochrome c, human serum albumin (HSA), and myoglobin were also shown. For the applications mentioned here, separation efficiencies up to 15 000 plates could be obtained and LODs were in the low $\mu\text{mol L}^{-1}$ range, except for IgG that could be determined down to 0.4 nmol L^{-1} .

Analytical feasibility has been also shown for detecting neurotransmitters (dopamine, ephedrine, and metanephrene), β -blockers (pindolol, atenolol, and acebutolol) and some physiologically active amines (doxylamine, octopamine, noradrenaline, adrenaline, and isoproterenol) using MCE- C^4D .^{67,69}

Fig. 6 (A) Schematic drawing of detection electrodes in (i) parallel and (ii) antiparallel orientation. (B) Effect of the parallel (square) and antiparallel (circle) design of electrodes on output voltage (solid), peak heights (open, dotted line) and S/N (open, solid line) for the lithium peak. Reprinted from ref. 64, with permission.

Gong and Hauser⁷⁰ reported the baseline separation of the enantiomers of *trans*-cyclohexane-1,2-diamine is less than 2 min. In this case, MCE with C⁴D was quite advantageous since these compounds have neither strong UV-absorbance nor fluorescence. The determination of 3-methylhistidine (3-MH) and 1-methylhistidine (1-MH) on MCE-C⁴D was reported by Tuma *et al.*, in which a silicon microchip with electrodes made of aluminium strips was employed.⁷¹ Both compounds are of clinical relevance. Kubáň and Hauser showed recently the determination of inorganic ions in clinical samples (serum and urine samples) using MCE-C⁴D.⁶⁵ Bare electrophoresis chips were used in combination with external electrodes.

On-chip enzymatic reactions

Wang *et al.* described an on-chip enzymatic assay for screening organophosphate (OP) nerve agents,⁷² based on a pre-column reaction of organophosphorus hydrolase (OPH) and electrophoretic separation of the phosphonic acid products by MCE-C⁴D. The complete bioassay was carried out in around 3 min including the OPH reaction, separation and detection of the reaction products.

Abad-Villar *et al.* performed on-chip enzymatic digestions of HSA using pepsin.⁶⁸ As the enzymatic digestion proceeds, the amount of different fragments varies, resulting in changes in the peak heights and shapes. The products of the enzymatic reaction were successfully monitored with MCE-C⁴D. Schuchert-Shi *et al.* successfully showed the conversion of glucose to gluconate using glucose oxidase and the enzymatic hydrolysis of ethyl acetate generating acetate ions.⁷³ These same authors reported one year later the monitoring of the production of ammonium from urea in serum samples.⁷⁴

Vázquez *et al.* have demonstrated the ability of MCE-C⁴D to monitor the detection of peroxynitrite degradation products.⁷⁵ Peroxynitrite (ONOO⁻) is a strong oxidizing agent that is produced in cells from the reaction of superoxide (O₂⁻) and nitric oxide (NO). It degrades rapidly into its main metabolites: nitrate and nitrite. Both metabolites were successfully detected on MCE by C⁴D and amperometric detection coupled in-line.

Food analysis

A quantitative analysis of inorganic and organic ions in alcoholic (beer and wine) and non-alcoholic (potable water, fruit juices and milk) beverages has been performed by MCE-C⁴D.⁷⁶ Law *et al.* reported the application of MCE with C⁴D to determine food additives in soft drinks and vitamin C tablets.⁷⁷ For the vitamin C tablet, besides the ascorbate (that is the major component) small amounts of chloride, citrate, maleate, and acetate were also found. For the soft drinks, sorbate and benzoate are the major additives present, accompanied by very small amounts of acetate and lactate.

Lee *et al.* reported the determination of major inorganic cations in commercial sports drinks, mineral waters, and red wine.⁴³ Mühlberger *et al.* also reported an analytical method to separate carbohydrates on MCE-C⁴D.⁷⁸ Some carbohydrates such as glucose, fructose, and sucrose were determined in fruit nectar, fruit juice, and cola samples using polyether ether ketone (PEEK) chips.

Lu *et al.* reported that the rapid and quantitative determination of fluoroacetate in diluted fruit juices and tap water was performed by MCE-C⁴D.⁷⁹

In 2011, Mark *et al.* reported a method for the efficient extraction and determination of volatile aliphatic amines in the biodegradation process of seafood samples.⁸⁰ The authors combined single-drop microextraction (SDME) with MCE-C⁴D. The separation and detection of methylamine, dimethylamine, trimethylamine, diethylamine, and triethylamine was performed in less than 40 s. The LODs were lower than 400 ng mL⁻¹.

Explosives and chemical warfare agents

MCE-C⁴D appears to be a very promising tool to detect major explosive-related ions (ammonium, methylammonium, potassium, sodium, perchlorate, chloride and nitrate) as well as their residues at the sites of terrorist attacks. Wang *et al.* described the use of MCE-C⁴D for the rapid separation and detection of explosive-related cations and anions using the same micro-channel and running buffer.⁸¹ Using a movable C⁴D and a dual-opposite injection strategy, the separation/detection of these explosive-related ions was also demonstrated.^{41,53,54}

Nerve agents derive their name from their adverse effect on the nervous system. In response to recent terrorist activity and to the ratification of the Chemical Warfare Convention, there are urgent demands for rapid and reliable methods for the determination of chemical warfare agents (CWAs) and their degradation products.⁸¹ Wang *et al.* demonstrated the application of MCE-C⁴D for the screening of organophosphonate nerve agent degradation products.⁶¹ The miniaturized system relies on an efficient chip-based separation of alkyl methylphosphonic acids (hydrolysis products of sarin, soman, and VX nerve agents). The applicability to analysis of natural (river) water samples was demonstrated. Wang *et al.* demonstrated the same application using a movable C⁴D.⁵³ Nerve agents were also used as model analytes to evaluate a MCE with dual-opposite injection strategy.⁵⁴ Ding *et al.* have also shown the applicability of a PDMS device with C⁴D for the determination of organophosphonate nerve agent degradation products.⁵⁷ Applicability of this method to natural (lake and tap) water samples was also demonstrated.

Ding and Rogers reported the use of MCE-C⁴D for the determination of nitrogen mustard gas degradation products.⁸² Three alkyl ethanolamines: *N*-methyldiethanolamine (MDEA), *N*-ethyldiethanolamine (EDEA), and triethanolamine (TEA),

Fig. 7 Representation of the (A) measurement setup for sC⁴D and (B) typical scan results for packed microfluidic channels. Reprinted from ref. 84, with permission.

(degradation/precursor products of HN-1, HN-2 and HN-3 blister agents) were analyzed by MCE-C⁴D. The original PDMS channel was coated with poly(ethyleneimine) (PEI) to improve the separation of the three ethanolamines.

Other applications

Tanyanyiwa *et al.* reported the separation of sucrose and fructose⁶⁷ using a 10 mmol L⁻¹ sodium hydroxide electrolyte or a 100 mmol L⁻¹ triethylamine buffer at pH 12. Better sensitivity was obtained with the sodium hydroxide electrolyte. Chen *et al.* used a movable C⁴D to detect sodium and chloride ions in seawater samples.⁸³ In addition, detection of organic acids and pharmaceutical substances⁶⁷ as well as heavy metals⁴⁰ has also been described by other groups using MCE-C⁴D.

Walsh *et al.* reported the use of scanning C⁴D (sC⁴D) for the evaluation of the structural homogeneity and density of both packed and monolithic stationary phases in microfluidic chips.⁸⁴ The chip was placed on top of the substrate containing the copper electrodes and, by sliding the chip through the micro-channel, the packed columns were sequentially scanned along their whole length, from the beginning to the end as illustrated in Fig. 7(A). In order to continue scanning another channel, the chip was simply displaced accordingly to the left or right. The resulting sC⁴D profiles are shown in Fig. 7(B). As can be seen, there are dramatic changes in the C⁴D response observed for packed and unpacked regions.

Conclusions and future trends

The implementation of C⁴D on MCE fabricated with different substrate materials with conventional and alternative micro-fabrication techniques was described. Since UV-vis transparent window detection is not required in C⁴D, microchips made with materials other than glass can be used. In addition, as the electrodes used in the detection are not in contact with the solutions, inexpensive materials (e.g., aluminium, carbon, and copper) can be used to manufacture the electrodes. Thus, low-cost and disposable MCE-C⁴D can be produced and used for fast biochemical assays, diagnostics, homeland security, food safety, and many other applications. On the other hand, the higher limits of detection generally attained with some other detection methods, and the strong influence of the temperature on the C⁴D signal can be pointed out as the major drawbacks.

The wide range of successful applications described in the literature for MCE-C⁴D demonstrates the versatility of this detection method. Additionally, the fact that commercial detectors are now available suggests that there will be many more applications in the coming years.

Acknowledgements

The authors gratefully thank financial support, research fellowships and also scholarships from CNPq and FAPESP (Grants 2010/08559-9, 2008/57805-2, and 2008/53868-0).

References

- 1 P. S. Dittrich, K. Tachikawa and A. Manz, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 3887.
- 2 W. K. T. Coltro, E. Piccin, E. Carrilho, D. P. de Jesus, J. A. F. da Silva, H. D. T. da Silva and C. L. do Lago, *Quim. Nova*, 2007, **30**, 1986.
- 3 J. West, M. Becker, S. Tombrink and A. Manz, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 4403.
- 4 A. Arora, G. Simone, G. B. Salieb-Beugelaar, J. T. Kim and A. Manz, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 4830.
- 5 F. Sassa, K. Morimoto, W. Satoh and H. Suzuki, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 1787.
- 6 A. Manz, N. Graber and H. M. Widmer, *Sens. Actuators, B*, 1990, **1**, 244.
- 7 A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides and E. Carrilho, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3.
- 8 M. E. Johnson and J. P. Landers, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3513.
- 9 I. M. Lazar, J. Grym and F. Foret, *Mass Spectrom. Rev.*, 2006, **25**, 572.
- 10 W. R. Vandaveer, S. A. Pasas-Farmer, D. J. Fischer, C. N. Frankenfeld and S. M. Lunte, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3528.
- 11 D. J. Fischer, M. K. Hulvey, A. R. Regel and S. M. Lunte, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 3324.
- 12 D. C. Kirkpatrick, C. Antwi and R. S. Martin, *Anal. Methods*, 2010, **2**, 811.
- 13 M. Pumera, *Talanta*, 2007, **74**, 358–364.
- 14 P. Kubán and P. C. Hauser, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **607**, 15.
- 15 P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2011, **32**, 30.
- 16 W. K. T. Coltro, D. P. de Jesus, J. A. F. da Silva, C. L. do Lago and E. Carrilho, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 2487.
- 17 H. Zahn, *Z. Phys.*, 1928, **51**, 350.
- 18 T. S. Burkhalt, High Frequency Conductometric (Impedimetric) Titrations, in *Comprehensive Analytical Chemistry, IIA—Electrical Methods*, ed. C. L. Wilson and D. W. Wilson, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1964, ch. V.
- 19 E. Pungor, F. Pal and K. Toth, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 1728.
- 20 J. F. Alder, P. R. Fielden and A. J. Clark, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 985.
- 21 F. Pal, E. Pungor and F. Kovats, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 2254.
- 22 B. Gas and J. Vacik, *Chem. Listy*, 1980, **74**, 652.
- 23 B. Gas, M. Demjanenko and J. Vacik, *J. Chromatogr., A*, 1980, **192**, 253.
- 24 J. Vacik, J. Zuska and I. Muselasova, *J. Chromatogr., A*, 1985, **320**, 233.
- 25 A. J. Zemmann, E. Schnell, D. Volgger and G. K. Bonn, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 563.
- 26 J. A. F. da Silva and C. L. do Lago, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4339.
- 27 A. J. Zemmann, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 2125.
- 28 J. G. A. Brito-Neto, J. A. F. da Silva, L. Blanes and C. L. do Lago, *Electroanalysis*, 2005, **17**, 1198.
- 29 J. G. A. Brito-Neto, J. A. F. da Silva, L. Blanes and C. L. do Lago, *Electroanalysis*, 2005, **17**, 1207.
- 30 P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 176.
- 31 V. Šolínová and V. Kašička, *J. Sep. Sci.*, 2006, **29**, 1743.
- 32 F. M. Matysik, *Microchim. Acta*, 2008, **160**, 1.
- 33 R. M. Guijt, E. Baltussen, G. van Der Steen, J. Frank, H. A. H. Billiet, T. Schalkhammer, F. Laugere, M. J. Vellekoop, A. Berthold, P. M. Sarro and G. W. K. van Dedem, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 2537.
- 34 E. X. Vrouwe, R. Luttge and A. van den Berg, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 1660.
- 35 A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 2001.
- 36 P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3387.
- 37 A. Berthold, F. Laugere, H. Schellevis, C. R. de Boer, M. Laros, R. M. Guijt, P. M. Sarro and M. J. Vellekoop, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 3511.
- 38 J. Lichtenberg, N. F. Rooij and E. Verpoorte, *Electrophoresis*, 2002, **23**, 3769.
- 39 W. K. T. Coltro, J. A. F. da Silva and E. Carrilho, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 2260.
- 40 J. Tanyanyiwa, E. M. Abad-Villar, T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, W. Hoffmann, A. E. Guber, D. Herrmann, A. Gerlach, N. Gottschlich and P. C. Hauser, *Analyst*, 2003, **128**, 1019.
- 41 J. Wang, G. Chen and A. Muck, *Talanta*, 2009, **78**, 207.
- 42 F. Laugere, R. M. Guijt, J. Bastemeijer, G. van der Steen, A. Berthold, E. Baltussen, P. Sarro, G. W. K. van Dedem, M. J. Vellekoop and A. Bossche, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 306.

- 43 C. Y. Lee, C. M. Chen, G. L. Chang, C. H. Lin and L. M. Fu, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 5043.
- 44 T. Shang, E. Teng, A. T. Woolley, B. A. Mazzeo, S. M. Schultz and A. R. Hawkins, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 2596.
- 45 T. P. Segato, W. K. T. Coltro, A. L. J. Almeida, M. H. O. Piazzetta, A. L. Gobbi, L. H. Mazo and E. Carrilho, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 2526.
- 46 B. Liu, Q. Jin, Y. Zhang, D. Mayer, H. Krause, J. Zhao and A. Offenhäusser, *Microchim. Acta*, 2011, **172**, 193.
- 47 J. Liu, J. Wang, Z. Chen, Y. Yu, X. Yang, X. Zhang, Z. Xu and C. Liu, *Lab Chip*, 2011, **11**, 969–973.
- 48 W. K. T. Coltro, J. A. F. da Silva and E. Carrilho, *Anal. Methods*, 2011, **3**, 168.
- 49 R. M. Guijt, J. P. Armstrong, E. Candish, V. Lefleur, W. J. Percey, S. Shabala, P. C. Hauser and M. C. Breadmore, *Sens. Actuators, B*, 2011, **159**, 307.
- 50 M. Pumera, J. Wang, F. Opekar, I. Jelínek, J. Feldman, H. Löwe and S. Hardt, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 1968.
- 51 J. Wang and M. Pumera, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 5919.
- 52 J. Tanyanyiwa and P. C. Hauser, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 6378.
- 53 J. Wang, G. Chen and A. Muck, Jr, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 4475.
- 54 J. Wang, G. Chen, A. Muck, Jr and C. E. Collins, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 3728.
- 55 C. L. do Lago, H. D. T. da Silva, C. A. Neves, J. G. A. Brito-Neto and J. A. F. da Silva, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 3853.
- 56 C. L. do Lago, C. A. Neves, D. P. de Jesus, H. D. T. da Silva, J. G. A. Brito-Neto and J. A. F. da Silva, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3825.
- 57 Y. Ding, C. D. Garcia and K. R. Rogers, *Anal. Lett.*, 2008, **41**, 335.
- 58 J. Wang, G. Chen, M. P. Chatrathi, M. Wang, R. Rinehart and A. Muck, Jr, *Electroanalysis*, 2008, **20**, 2416.
- 59 G. Fercher, A. Haller, W. Smetana and M. J. Vellekoop, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3270.
- 60 Z. Chen, Q. Li, O. Li, X. Zhou, Y. Wei and J. Mo, *Talanta*, 2007, **71**, 1944.
- 61 J. Wang, M. Pumera, G. E. Collins and A. Mulchandani, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 6121.
- 62 K. A. Mahabadi, I. Rodriguez, C. Y. Lim, D. K. Maurya, P. C. Hauser and N. F. Rooij, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 1063.
- 63 P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3398.
- 64 P. Kubán and P. C. Hauser, *Lab Chip*, 2005, **5**, 407.
- 65 P. Kubán and P. C. Hauser, *Lab Chip*, 2008, **8**, 1829.
- 66 B. Liu, Y. Zhang, D. Mayer, H. Krause, Q. Jin, J. Zhao and A. Offenhäusser, *Electrophoresis*, 2011, **32**, 699.
- 67 J. Tanyanyiwa, E. M. Abad-Villar and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 903.
- 68 E. M. Abad-Villar, P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 3609.
- 69 J. Tanyanyiwa and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3010.
- 70 X. Y. Gong and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 4375.
- 71 P. Tuma, E. Samková, F. Opekar, V. Jurka and K. Stulik, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 2174.
- 72 J. Wang, G. Chen, A. Muck, Jr, M. P. Chatrathi, A. Mulchandani and W. Chen, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **505**, 183.
- 73 A. Schuchert-Shi, P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 4690.
- 74 A. Schuchert-Shi and P. C. Hauser, *Anal. Biochem.*, 2008, **376**, 262.
- 75 M. Vázquez, C. Frankenfeld, W. K. T. Coltro, E. Carrilho, D. Diamond and S. M. Lunte, *Analyst*, 2010, **135**, 96.
- 76 P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 3169.
- 77 W. S. Law, P. Kubán, J. H. Zhao, S. F. Y. Li and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 4648.
- 78 H. Mühlberger, W. Hwang, A. E. Guber, V. Saile and W. Hoffmann, *IEEE Sens. J.*, 2008, **8**, 572.
- 79 Q. Lu, P. Wu and G. E. Collins, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 3485.
- 80 J. J. P. Mark, A. Kumar, H. Demattio, W. Hoffmann, A. Malik and F. M. Matysik, *Electroanalysis*, 2011, **23**, 161–168.
- 81 J. Wang, M. Pumera, G. Collins, F. Opekar and I. Jelínek, *Analyst*, 2002, **127**, 719.
- 82 Y. Ding and K. R. Rogers, *Electroanalysis*, 2008, **20**, 2192.
- 83 Y. Chen, P. Yang, J. Li, D. Chen and G. Chen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **384**, 683.
- 84 Z. Walsh, M. Vazquez, F. Benito-Lopez, B. Paull, M. Macka, F. Svec and D. Diamond, *Lab Chip*, 2010, **10**, 1777.

ANEXO II

**Doping of a dielectric layer as a new alternative for increasing sensitivity
of the contactless conductivity detection in microchips**

Cite this: *Lab Chip*, 2011, **11**, 4148

www.rsc.org/loc

COMMUNICATION

Doping of a dielectric layer as a new alternative for increasing sensitivity of the contactless conductivity detection in microchips†

Renato Sousa Lima,^{ab} Thiago Pinotti Segato,^{ab} Angelo Luiz Gobbi,^c Wendell Karlos Tomazelli Coltro^{bd} and Emanuel Carrilho^{*ab}

Received 12th August 2011, Accepted 11th October 2011

DOI: 10.1039/c1lc20757a

This communication describes a new procedure to increase the sensitivity of C⁴D in PDMS/glass microchips. The method consists in doping the insulating layer (PDMS) over the electrodes with nanoparticles of TiO₂, increasing thus its dielectric constant. The experimental protocol is simple, inexpensive, and fast.

Hybrid PDMS/glass microchips represent a potential alternative for producing miniaturized analytical systems.^{1,2} This kind of a microfluidic platform is advantageous because polymeric microchannels can be easily fabricated by soft lithography and reversibly or irreversibly sealed against a flat plate of glass containing other integrated analytical elements like electrodes.³ Furthermore, PDMS/glass microchips exhibit good inter-assay precision (chip-to-chip reproducibility).⁴ In microfluidic devices, capacitively coupled contactless conductivity detection (C⁴D) has proven to be a useful tool for determination of a wide range of compounds, including biomolecules,^{5–9} organic,^{10–12} and inorganic ions.^{13–17} Recently, C⁴D was also used in the characterization of stationary phases.^{18,19} This detection method has appreciable advantages such as instrumental simplicity, low cost, and high compatibility with miniaturization techniques.¹⁵

In C⁴D measurements, the electrodes are physically separated from the electrolyte solution by a dielectric layer (see Fig. S1†).²⁰ The non-contact mode between the electrode and the solution avoids a number of problems often found with conventional conductometry (contact-mode) and faradaic electrochemical methods, including contamination and passivation of the electrodes, effects of non-reproducibility of the surface, and electrical interference between the detector circuit and the separation field applied in capillary electrophoresis.^{21,22} Probably, the main limiting factor reported for the C⁴D system is its poor limit of detection (LOD). Some alternatives to improve the

LOD for this technique have been previously published, as: (i) the application of high voltage excitation signals (hundreds of volts),²³ (ii) the use of a ground plane to reduce the stray capacitance,²³ (iii) the design of semicircular electrodes¹⁴ and (iv) dual top-bottom electrodes,¹⁷ (v) new materials used as dielectric,²⁴ (vi) hybrid conductivity detection in which the excitation electrode is kept in contact with the solution,²⁵ as well as (vii) new detection cell geometries.²⁶

Considering the advantages of C⁴D and its wide use in analytical applications, this communication describes a simple approach to increase the normally deficient sensitivity (expressed in term of LOD) of this detection system on hybrid PDMS/glass microchips (but not limited to this combination). Our approach consists in doping the insulating membrane (PDMS) over the electrodes with nanoparticles of TiO₂ (NP–TiO₂) to increase its dielectric constant. The theoretical basis of the method relies on raising the magnitude of dielectric constant of the PDMS membrane by adding NP–TiO₂; in consequence, the C⁴D signals are increased as discussed in the ESI†. The use of semiconductors for increasing the conductivity of dielectrics is already adopted in the fabrication of flexible materials for high-density energy storage in capacitor applications.^{27–29} Finally, since our intent was just to study the effect of the doping on C⁴D sensitivity, the LOD values were estimated for microchips presenting the same configuration and incorporating different levels of NP–TiO₂. Additionally, the same experimental conditions were employed in all cases.

The fabrication of the proposed devices involved five main steps: (i) sputtering deposition of the electrodes (Ti/Au) on glass; (ii) addition of NP–TiO₂ in different percentages (0, 10, 25, and 50% m/m to PDMS) during the PDMS preparation using its monomer and curing agent (PDMS_d); (iii) electrical isolation of the electrodes using a PDMS_d dielectric membrane deposited by spinning, followed by the polymer curing; (iv) fabrication of PDMS microchannels by soft lithography; and (v) irreversible sealing of the glass/PDMS_d/PDMS device. More details about the steps (i), (iv), and (v) can be found in ref. 2. PDMS was adopted as a dielectric because it facilitates the sealing step, achieved by simple contact among the layers after oxidation of the PDMS_d and PDMS surfaces in O₂ plasma.³⁰ Regarding the deposition of PDMS_d membranes, these were coated on glass by spinning at 1000 rpm during 10 s. Afterwards, the curing step was performed at 90 °C for 5 min resulting in 50 μm thick PDMS membranes. Fig. 1 shows the device scheme constructed in three-layers (Fig. 1a) and a photograph of the resulting device (Fig. 1b), which presented two receiver electrodes, e_{r1} and e_{r2}. The use

^aInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil. E-mail: emanuel@iqsc.usp.br; Fax: +55 (16) 3373 9975; Tel: +55 16 3373 9441

^bInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, Campinas, Brazil

^cLaboratório Nacional de Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, Brazil

^dInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available: Theoretical basis of the proposed method, material and methods, and electrical insulation test of the electrodes. See DOI: 10.1039/c1lc20757a

Fig. 1 Expanded view of the layers composing the microfluidic device (a) and a photo of the microchip (b) containing PDMS doped (PDMS_d) with NP-TiO₂ 1% m/m (this percentage was selected because it allows for the visualization of the electrodes; levels of NP-TiO₂ above 5% m/m make the PDMS_d membrane opaque). e_{exc}, excitation electrode; e_{r1} and e_{r2}, receiving electrodes; and i, glass/PDMS_d interface.

of either e_{r1} or e_{r2} did not alter the analytical responses; e_{r2} was employed during the sensitivity measurement.

A field-emission gun scanning electron microscopy (SEM-FEG) micrograph of the NP-TiO₂ is depicted in Fig. 2, the diameter of the nanoparticles ranged between 30 and 45 nm. The evaluation of the roughness parameters of the surfaces of the dielectric layer, in turn, involved the (i) root mean square (RMS, statistical measure of the magnitude of a varying quantity) and the (ii) surface area ratio (*S_{ar}*, increment of the interfacial surface area relative to the area of the projected *x, y* plane). Fig. 3 shows atomic force microscopy (AFM) images obtained for PDMS_d membranes doped with 0, 10, 25, and 50% of NP-TiO₂. As verified in this figure, the addition of increasing levels of NP-TiO₂ generated surfaces with roughness and an area greater than the native PDMS, as expected. On the other hand, the doping of the PDMS membranes did not lead to an appreciable lowering of its ohmic resistance; all the electrodes remained electrically insulated from solution with increasing levels of NP-TiO₂ (Fig. S2†), ensuring conductivity measurements under contactless-mode.

Flow analyses were carried out in order to assess the effect of the doping process on the C⁴D sensitivity. The device has two inlets and one outlet (for waste) vias. Conductivity measurements were carried out in real time while either water or analyte solution was flowing through the microfluidic channels, driven by two external syringe pumps. First, water was circulated for approximately 10 min for the signal stabilization. Once a stable signal was obtained, samples were introduced generating a potential change on the receiving electrode. Next, water was added resulting in a decrease of the signal nearly to its initial value. The analytical responses recorded in this study were associated to the signal difference after stabilization of the signal from the sample and its baseline (water) values. The experimental conditions for all microchips in the sensitivity tests were: 20 s salt-injection

Fig. 2 Image of field-emission gun scanning electron microscopy of the NP-TiO₂.

Fig. 3 Images of atomic force microscopy recorded for the PDMS_d membranes containing 0 (a), 10 (b), 25 (c), and 50% m/m of NP-TiO₂ (d). In each case, the RMS and *S_{ar}* values are specified.

time; 1.0 mm for electrode width and spacing; Y-shaped microfluidic channels (see Fig. 1) presenting 250 μm width and 50 μm depth; 100 μL min⁻¹ flow rate; 400 kHz frequency; and peak-to-peak potential equal to 2.5 *V_{p-p}*. The LOD values were determined using standard solutions of NH₄Cl (diluted in water) and calculated based on the parameters of the analytical curve at 95.0, 99.0, and 99.9% confidence levels. This method presents higher statistical reliability compared to the other techniques (either visual or the signal/noise ratio) because it does not relate to qualitative factors, but to the confidence interval of the regression.³¹ We performed five measurements for each concentration level.

Fig. 4 shows the analytical responses obtained for each PDMS_d membrane using NH₄Cl standards used for the calculation of LOD; the calibration curves are shown in Fig. S3a†. The analysis of residues and F test for linearity validated the linear fit for all calibration curves.³¹ LOD values calculated for each doping level were: 385.5 (0%), 269.9 (10%), 144.8 (25%), and 14.7 μmol L⁻¹ (50% of NP-TiO₂). There was a noticeable reduction in the LOD values with increasing levels of NP-TiO₂, as well as an increase in analytical

Fig. 4 Transient signals of C⁴D obtained for NH₄Cl standards for the following doping percentages: 0 (a), 10 (b), 25 (c), and 50% m/m (d) of NP-TiO₂ in PDMS_d membranes.

sensitivity (slope of the calibration curves) as shown in Fig. S3b†. Such results ensure our initial goal of developing a method to improve the sensitivity in $C^{4}D$ microchips, given that all parameters were kept the same. The improvement was over 25 fold when comparing 0 to 50% doping level. Regarding the 0 and 10% of NP-TiO₂, in turn, this improvement was nearly 2 fold. On the other hand, it is important to highlight that the absolute values of LOD can be further improved combining other alternatives already reported in the literature, including: (i) improved electronic circuitry for reduction of the baseline noise;³² (ii) Faraday shield between the electrodes to reduce the stray capacitance;²³ and (iii) application of higher amplitudes to the excitation electrodes.²³

The PDMS used in this study has a ϵ value of 2.65 (25 °C, 1 kHz),³³ while the TiO₂ possesses the following properties: the rutile crystalline state³⁴ and ϵ equal to 86.00 (25 °C, 1 kHz).³⁵ Mixture laws reported in the literature permit the dielectric constant of composites (PDMS_d/NP-TiO₂ in this study) with those of its pure constituents to link.³⁶ Among these laws, the Looyenga law is derived from a model consisting of spherical particles,³⁷ being applicable to the PDMS_d/NP-TiO₂ given the spherical shape of these nanoparticles (see Fig. 2). This model is widely applied in the literature.^{36,38,39} Applying the Looyenga law, ϵ values for PDMS_d doped with 10, 25, and 50% in NP-TiO₂ were calculated. Fig. 5 presents LOD values and $C^{4}D$ signals as a function of ϵ . The considered responses were obtained for the same NH₄Cl concentration (2 mmol L⁻¹), used to ensure a constant conductance in all cases and, thus, a direct dependence of the signal regarding the capacitance.

Concerning the variation of the $C^{4}D$ response as a function of ϵ , the linear behaviour verified is in concordance with the theoretical considerations described in the ESI†. Once the electrodes used in this study had the same dimensions and geometry, the microchips differed only in terms of the surface area of the dielectric (Fig. 3) and ϵ as the intervenient factors in the capacitance. The increase in the surface area of the PDMS membranes for higher doping levels tends to increase the number of charge carriers generating higher conductance values.⁴⁰ Nevertheless, as confirmed by the analysis of residues and F test, the analytical signals and dielectric constants exhibited a linear relationship so that, presumably, the variations in the area were not sufficient to affect the $C^{4}D$ responses. The effect of the area of the

surface, if significant, would result in a positive deviation in the $C^{4}D$ signal vs. ϵ curve.

As seen in Fig. 4, the noise was uniform for all systems, thus contributing equally to the calculation of LOD. Therefore, we can assume that the variation of the LOD values as a function of ϵ , which decreased asymptotically, is attributed to the non-linear increase of the analytical sensitivity (see Fig. S3b†).

A new strategy for increasing the $C^{4}D$ sensitivity in glass/PDMS hybrid microchips is reported here. This strategy, which consists primarily in raising the dielectric constant of the insulating layer, involved an experimental protocol that is simple, inexpensive, and fast. Moreover, the addition of increasing levels of NP-TiO₂ did not affect the PDMS curing step, and proved to be effective regarding the increase in sensitivity for $C^{4}D$. In further investigation, other doping percentages, dopant substances (conductors and semiconductors), dielectrics, and thickness of insulation of the electrodes may be investigated aiming for a more significant increase in sensitivity. This research field is very important concerning the instrumental chemical analyses; since presenting satisfactory LODs, $C^{4}D$ will become a competitive alternative to the faradaic electrochemical methods, in which the electrode/solution interactions generate a number of drawbacks. In this context, the contactless conductivity detection represents an attractive tool for various purposes and matrices employing, for example, titrations, capillary electrophoresis, or chemical sensors. Finally, by using different dielectrics, dopants, and doping methods, it is important to note that the described approach can be extended to other microfluidic platforms, like glass/PMMA, glass/glass, among other possibilities.

Financial support for this project was provided by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant no 2010/08559-9) and the Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES). The authors would like to thank Vinícius L. Pimentel, Maria H. O. Piazzetta, and Dr Fernando C. de Moraes for their assistance with the AFM analysis, microfabrication processes, and electrical insulation tests of the electrodes, respectively. Dr Carlos D. Garcia is acknowledged for his critical comments and manuscript revision. Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais and NANOX® are also recognized for their support and supply of the NP-TiO₂ samples, respectively.

Notes and references

- O. L. Li, Y. L. Tong, Z. G. Chen, C. Liu, S. Zhao and J. Y. Mo, *Chromatographia*, 2008, **68**, 1039.
- N. H. Moreira, A. L. J. Almeida, M. H. O. Piazzetta, D. P. de Jesus, A. Deblire, A. L. Gobbi and J. A. F. da Silva, *Lab Chip*, 2009, **9**, 115.
- D. Qin, Y. N. Xia and G. M. Whitesides, *Nat. Protoc.*, 2010, **5**, 491.
- H. Becker and C. Gärtner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 89.
- X. Y. Gong, D. Dobrunz, M. Kümin, M. Wiesner, J. D. Revell, H. Wennemers and P. C. Hauser, *J. Sep. Sci.*, 2008, **31**, 565.
- E. M. Abad-Villar, P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 3609.
- E. M. Abad-Villar, J. Tanyanyiwa, M. T. Fernández-Abedul, A. Costa-García and P. C. Hauser, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 1282.
- P. Tuma, E. Samcova, F. Opekar, V. Jurka and K. Stulik, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 2174.
- Y. Xu, J. Liang, H. Liu, X. Hu, Z. Wen, Y. Wu and M. Cao, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 1583.
- X. Y. Gong and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 4375.
- J. Tanyanyiwa, E. M. Abad-Villar and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 903.
- J. Wang, G. Chen, A. Muck, M. Chatrathi, A. Mulchandani and W. Chen, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **505**, 183.

Fig. 5 Effect of the doping of the PDMS insulating layer on the detectability in $C^{4}D$ considering the LOD values and signals obtained for NH₄Cl 2 mmol L⁻¹. The dielectric constants are related to the doping levels of 0, 10, 25, and 50% m/m of NP-TiO₂ in PDMS_d membranes, shown in the top axis.

- 13 J. Wang, G. Chen, A. M. Muck and G. E. Collins, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 3728.
- 14 C. Y. Lee, C. M. Chen, G. L. Chang, C. H. Lin and L. M. Fu, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 5043.
- 15 P. Kubán and P. C. Hauser, *Lab Chip*, 2008, **8**, 1829.
- 16 S. Qu, X. Chen, D. Chen, P. Yang and G. Chen, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 4910.
- 17 K. A. Mahabadi, I. Rodriguez, C. Y. Lim, D. K. Maurya, P. C. Hauser and N. F. Rooij, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 1063.
- 18 Z. Walsh, M. Vásquez, F. Benito-Lopez, B. Paull, M. Macka, F. Svec and D. Diamond, *Lab Chip*, 2010, **10**, 1777.
- 19 D. Connolly, P. Floris, P. N. Nesterenko and B. Paull, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2010, **29**, 870.
- 20 J. G. A. Brito-Neto, J. A. F. da Silva, L. Blanes and C. L. do Lago, *Electroanalysis*, 2005, **17**, 1198.
- 21 R. M. Guijt, C. J. Evenhuis, M. Macka and P. R. Haddad, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 4032.
- 22 P. Kubán and P. C. Hauser, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **607**, 15.
- 23 J. Tanyanyiwa and P. C. Hauser, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 6378.
- 24 G. Fercher, W. Smetana and M. J. Vellekoop, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 2516.
- 25 J. Wang, G. Chen and A. Muck, *Talanta*, 2009, **78**, 207.
- 26 P. Kubán and P. C. Hauser, *Lab Chip*, 2008, **8**, 1829.
- 27 Y. Bai, Z. Y. Cheng, V. Bharti, H. S. Xu and Q. M. Zhang, *Appl. Phys. Lett.*, 2000, **76**, 3804.
- 28 Y. Y. Yan, L. Jin, L. X. Feng and G. H. Cao, *Mater. Sci. Eng., B*, 2006, **130**, 146.
- 29 J. Kutek, I. Szafraniak-Wisa, B. Hilczer and M. Połomska, *J. Non-Cryst. Solids*, 2007, **353**, 4448.
- 30 T. P. Segato, W. K. T. Coltro, A. L. J. Almeida, M. H. O. Piazzetta, A. L. Gobbi, L. H. Mazo and E. Carrilho, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 2526.
- 31 F. A. L. Ribeiro, M. M. C. Ferreira, S. C. Morano, L. R. da Silva and R. P. Schneider, *Quim. Nova*, 2008, **31**, 164.
- 32 K. J. M. Francisco and C. L. do Lago, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 3458.
- 33 <http://www.dowcorning.com/applications/search/default.aspx?r=131en>, accessed in April 2010.
- 34 http://www2.dupont.com/Titanium_Technologies/en_US/products/900/CO_B_H_65962_5_900_Grade_Description.pdf, accessed in April 2010.
- 35 H. P. R. Frederikse, Permittivity (Dielectric Constant) of Inorganic Solids, in *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, ed. D. R. Lide, CRC Press, Boca Raton FL, 84nd edn, 2003–2004, p. 195.
- 36 F. Amaral, C. P. L. Rubinger, F. Henry, L. C. Costa, M. A. Valente and A. Barros-Timmons, *J. Non-Cryst. Solids*, 2008, **354**, 5321.
- 37 H. Looyenga, *Physica*, 1965, **31**, 401.
- 38 N. Maron and O. Maron, *Mon. Not. R. Astron. Soc.*, 2008, **391**, 738.
- 39 R. B. Yang, S. D. Hsu and C. K. Lin, *J. Appl. Phys.*, 2009, **105**, 07A527.
- 40 P. Gründler, *Chemical Sensors: an Introduction for Scientists and Engineers*, Springer, Berlin, 2007.

Electronic Supplementary Information

Doping of dielectric layer as a new alternative for increasing sensitivity of the contactless conductivity detection in microchips†

Renato Sousa Lima,^{a,b} Thiago Pinotti Segato,^{a,b} Angelo Luiz Gobbi,^c Wendell Karlos Tomazelli Coltro,^{b,d} and Emanuel Carrilho^{*a,b}

^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil;

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, Campinas, Brazil;

^c Laboratório Nacional de Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, Brazil;

^d Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil.

^{*}emanuel@iqsc.usp.br

Theoretical basis of the proposed method:

In C⁴D there is no faradaic current so that the electrodes, which are insulated by a dielectric, essentially form capacitors with the electrolyte. In microchips, the electrode/solution system exhibits behavior similar to a capacitor of parallel plates.¹ Fig. S1a illustrates an electrical model of the detector, in which the following elements are present: resistance of the sample solution (R), capacitances concerning to the electrode/solution systems (C₁ and C₂), and a third capacitance resulting from the direct capacitive coupling between electrodes, called stray capacitance (C_o). The later affects adversely the sensitivity of the method. In general, the use of C⁴D consists on the application of a high-frequency alternate signal to an electrode (excitation electrode, e_{exc}), which generates polarization of the dielectric molecules. This phenomenon induces a charge in the solution by forming an interfacial potential. In the region of the second electrode (receiving electrode, e_r) occurs an analogous process to the former, with induction of electric current in e_r.²

Figure S1. Model systems for C⁴D detection: (a) Schematic diagram of the electrical model of the C⁴D detector overlaid to the physical elements: electrodes, dielectric, and solution; (b) schematic diagram with the elements of an electrical circuit incorporating capacitor and battery; (c) depiction of polarization phenomenon of the charge centers (+/-) of the dielectric in capacitors. S, alternating signal; D, detector; C₁, C₂, and C₀, capacitors 1, 2, and stray capacitances, respectively; R, resistance of the solution; $\vec{E}_B$, $\vec{E}_D$, $\vec{E}_0$, and $\vec{E}_C$, electric fields of the battery, dielectric, initial value of the capacitor, and the resulting electric field of the capacitor, respectively.

The output voltage of the C⁴D amplifier (V_{out} , in volts) directly varies with the conductance of the electrolyte and the capacitances of the electrode/solution systems (C_1 and C_2) according to equation (1).¹

$$V_{out} = \frac{V_{in}}{1 + j2\pi fRC_o} \cdot R_f \cdot \frac{1}{j2\pi(C + C_o) \left(1 + \frac{j2\pi fRC_o}{C + C_o} \right)} \quad (1)$$

being V_{in} the input voltage in volts, j the imaginary unit, f the frequency in Hz, R_f the feedback resistance on the amplifier in Ω , R the cell resistance (inverse of the conductance) in Ω , C the cell capacitance [$C_1C_2/(C_1+C_2)$] in F, and C_o the stray capacitance as above mentioned, in F. As it can be observed in equation (1), keeping constant the frequency of operation, the detector electronics, and the geometry of the conductivity cell (affects C_o), the variations in V_{out} will occur in function of the values of conductance and capacitance. Studies show that there is a linear relation among the C⁴D signals (in volts) and these two parameters in the range of 0.2 to 1.5 mS cm⁻¹ of specific conductivity. The solutions used in conductometric determinations, with and without contact, usually present conductivities in this range.³

The effect of the dielectric constant of the material that insulates the electrodes on the response in C⁴D is based on the increasing of C . For a better understanding about the phenomenon responsible for these variations, let us consider a capacitor connected to a battery. In Fig. S1b, a schematic diagram containing the elements of this hypothetic circuit is presented. Since connecting the capacitor, initially uncharged, to the battery, electrons (charge carriers) flow through conducting wires according to a direction determined by the battery electric field ($\vec{E}_B$). Due to the charging process of the capacitor plates (electrode and solution in C⁴D), an electric field ($\vec{E}_C$) contrary to $\vec{E}_B$ is formed. The $\vec{E}_C$

magnitude is obtained from a Gaussian surface enclosing all the charge q on any one of the plates of the capacitor, as illustrates the equation (2).³

$$\epsilon\epsilon_0 \oint \vec{E}_C d\vec{A} = q \quad (2)$$

being A the area of each one of these plates (area of the electrodes in C⁴D), ϵ the dielectric constant of the material that insulates the electrodes, and ϵ_0 the permittivity constant of the free space (8.85 pF m⁻¹). When the plates are very close to each other, we can neglect the edge effect of the electric field. Therefore, $\vec{E}_C$ will be linear throughout the Gaussian surface so that equation (2) reduces to:

$$E_C = \frac{q}{\epsilon\epsilon_0 A} \quad (3)$$

Once the $\vec{E}_B$ and $\vec{E}_C$ are equal, the electrical field between these components (and consequently the current) cancels out. The capacitor is then fully charged and its capacitance, which measures the charge density at a given potential, reaches its maximum value (equilibrium capacitance).

Mathematically, the capacitance of any one of the plates of the capacitor (C) is calculated using the equation (4).

$$C = \frac{q}{V} \quad (4)$$

where V is the potential difference among the plates of the capacitor. For a linear electrical field, it is given by:

$$V = E_C d \quad (5)$$

In this equation, d is the distance between the plates. Substituting (3) and (5) in (4):

$$C = \frac{\epsilon\epsilon_0 A}{d} \quad (6)$$

Based on the equation (6), C linearly increases with the dielectric constant.

In atomic and molecular terms, what causes such increase? The dielectric constant of the insulating material expresses the polarization ability of its charge centers under an electric field. Regardless of whether they have permanent electric dipole moments (polar and polarizable dipole) or not, the molecules that constitute the dielectric acquire these moments by induction of its positive and negative charge centers when exposed to an external electric field. The phenomenon of dipole polarization, shown in Fig. S1c, induces an electric field ($\bar{E}_D$) less intense and contrary to the capacitor initial field ($\bar{E}_0$, hypothetical value for the capacitor without dielectric). Thus, $\bar{E}_0$ is reduced to a resulting field ($\bar{E}_C$) as a magnitude given by the P parameter, called dielectric polarization and calculated as follows:⁴

$$P = \frac{\epsilon - 1}{\epsilon} \quad (7)$$

In this context, since $\bar{E}_C$ is opposed to the battery field, the charging process of the capacitor has increased its efficiency with a consequent raise in equilibrium capacitance.³

Similarly to what occurs with electrical capacitors, in C⁴D the increment in the capacitance values of the electrode/solution systems is due primarily to a reduction in $\bar{E}_0$, which arises from a more effective polarization of the dielectric molecules. The efficiency of this polarization process is expressed by ϵ .

Material and methods:

Ammonium chloride (NH_4Cl) was purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co (MO, USA). The samples of NP-TiO₂ were kindly provided by NANOX[®] (São Carlos, Brazil). All solutions were prepared utilizing deionized water (Milli-Q, Bedford, USA) with resistivity no less than 18 MΩ cm. The analytical instrumentation required by C⁴D consisted of three principal components, namely: *i*) function generator (Minipa, model MFG 4202, São Paulo, Brazil); *ii*) conductivity detector, whose electronic circuit was designed according to a previously reported scheme;⁵ and *iii*) two syringe-pumps for microfluidic handling (New Era Pump Systems Inc., model NE-300, MA, USA). Data acquisition was carried out in software written in LabVIEW[®]. Field-emission gun scanning electron microscopy (SEM-FEG) image of the NP-TiO₂ was carried out in a Philips XL 30 microscope (Eindhoven, Netherlands). This instrument operated with tungsten thermionic filament, 15 kV potential, and secondary electron detector as analytical mode. In order to improve the contrast in the SEM-FEG micrographies, the samples were previously metalized using a Baltec MCS 010 sputter coater (Balzers, Liechtenstein). Atomic force microscopy (AFM) analyses of the doped and non-doped polymers measured the morphology of the surfaces of the dielectric layer. The measures were carried out using dielectric-coated glass plates with area of 1.0 cm² in tapping mode with constant force in a Veeco MultiModeTM SPM equipment (Plainview, USA), containing 512 x 512 pixels at maximum resolution with optical detection. AFM images were collected at room temperature, 1.2 Hz rate, and the scans covered an area of 5 μm x 5 μm. Roughness parameters and fractal graphics were determined from the software Nanoscope 6.11 (program supplied by the equipment manufacturer).

Electrical insulation test of the electrodes:

The insulation degree of the electrodes was studied by cyclic voltammetry. The tests were performed at room temperature using an Eco Chemie Autolab PGSTAT 30 potentiostat (Utrecht,

Netherlands) with three-electrode system, featuring Ag/AgCl reference electrode, Pt wire auxiliary electrode, and sputtered Ti/Au thin films as working electrodes. We used Ti/Au films exposed and covered by PDMS_d membranes containing 0, 10, 25, and 50% m/m of NP-TiO₂. The electrochemical cell volume (500 μ L) was delimited by a piece of PDMS, which was sealed reversibly onto glass upon contact under pressure. The detection area was of 3.0 mm² for all cases. The electrode potential was swept in the positive direction between -0.4 and +0.2 V with a scan rate of 0.1 V s⁻¹. The electrolyte solution was 0.2 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 8). The pH was adjusted with 1 mol L⁻¹ NaOH or 1 mol L⁻¹ HCl. Sodium phosphate dibasic and potassium phosphate monobasic were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co (MO, USA).

The voltammograms were carried out to measure the capacitive current, that arises from electrolyte polarization in the double layer;⁶ its absence indicated the effective electrical insulation of the electrodes. Fig. S2 shows the voltammetric profiles obtained for exposed and PDMS_d-coated (50% m/m of NP-TiO₂) electrode.

Fig. S2 Cyclic voltammograms to 0.2 mol L⁻¹ phosphate buffer (pH 8.0) employing Ti/Au films as working electrodes exposed and insulated by PDMS_d containing 50% m/m of NP-TiO₂. Inset: amplified voltammogram recorded for the PDMS_d-coated electrode.

For the exposed Ti/Au films, capacitive currents of the order of 230 nA were detected. For the PDMS_d-coated films (only the level of 50% m/m NP-TiO₂ is shown here), meanwhile, it was not seen any measurable capacitive current, at least any current larger than 0.3 nA; such value is below the lower limit-range of the potentiostat (10 nA) we used. Thereby, we can conclude that the Ti/Au films remained electrically insulated from solution even at the highest levels of NP-TiO₂.

Fig. S3 Calibration analytical curves obtained for the doping percentages 0, 10, 25, and 50% (a), and the behavior of the analytical sensitivity (slopes) at the resulting dielectric constants (b). In Fig. S3(b) the dielectric constants are related to the doping levels 0, 10, 25, and 50% m/m of NP-TiO₂ in PDMS, showed in top axis.

Notes and references

1. P. Kubáň and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3387.
2. P. Kubáň and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3398.
3. D. Halliday, R. Resnick and J. Walker, *Fundamentals of Physics*, New York: Ed. John Wiley & Sons, 6th ed., 2001.
4. A. Paul, *Chemistry of Glasses*, London: Ed. Chapman and Hall, 1982.
5. J. A. F. da Silva and C. L. do Lago, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4339.
6. A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, New York: Ed. John Wiley & Sons, 2nd ed., 2001.

ANEXO III

**Contactless conductivity biosensor in microchip
containing folic acid as bioreceptor**

Cite this: *Lab Chip*, 2012, 12, 1963–1966

www.rsc.org/loc

COMMUNICATION

Contactless conductivity biosensor in microchip containing folic acid as bioreceptor†‡

Renato S. Lima,^{ab} Maria H. O. Piazzetta,^c Angelo L. Gobbi,^c Ubirajara P. Rodrigues-Filho,^a Pedro A. P. Nascente,^d Wendell K. T. Coltro^{be} and Emanuel Carrilho^{*ab}

Received 13th February 2012, Accepted 17th April 2012

DOI: 10.1039/c2lc40157f

We report a glass/PDMS-based microfluidic biosensor that integrates contactless conductivity transduction and folic acid, a target for tumor biomarker, as a bioreceptor. The device presents relevant advantages such as direct determination—dismiss the use of redox mediators as in faradaic electrochemical techniques—and the absence of the known drawbacks related to the electrode-solution interface. Characterizations of the functionalization processes and chemical sensor are described in this communication.

To capture exogenous folic acid (FA)—an oxidized and non-physiological species of vitamin B—animal cells possess at their surface folate receptors (FR), which bind FA with high affinity (association constants in the order of 10^9 to 10^{10}) at 1 : 1 stoichiometry. A homology search of the human genome revealed four distinct FR genes, termed: FR- α , - β , - γ , and - δ . FR- α is an extracellular tumor biomarker which is present under elevated expression levels in cancer cells arising from the glandular tissue in ovary, uterus, and cervix. The highest expression of FR- α is associated with poorly differentiated and more aggressive tumors. Such aspects assist in the implementation of future therapeutic actions and allow the monitoring of the cancer in order to evaluate curative effects.¹ A few reports have demonstrated the use of FA as a bioreceptor in biosensors for detection of FR- α . Cyclic voltammetry,² atomic force microscopy (AFM),³ diffraction,⁴ and impedance⁵ are transduction techniques used so far. These studies showed the potential use of FA-based biosensors for FR- α in

blood samples, obtained from patients with different types of cancer.

Lab-on-a-chip (LOC) platforms for cancer biomarker detection have been reported in the literature and it is subject of great interest.^{6–10} LOC systems carry important advantages, including: *i*) reduced chemical consumption, *ii*) high analytical frequency, and *iii*) great device portability.¹¹ Such factors are essential to the development of point-of-care methods, capable of processing samples in the field (as ambulances, clinics, and patient's homes) for analysis of different biomarkers.¹²

Faradaic electrochemical methods are the most widely used in biosensors due to the following factors: *i*) they require low cost instrumentation, *ii*) they present good sensitivity, *iii*) they are non-destructive, and *iv*) they exhibit high integration (co-fabrication of electrodes in microdevices). On the other hand, the main limitation of these devices originates from the contact between the electrode and sample, generating drawbacks such as: *i*) fouling of the electrodes, *ii*) non-uniformity of the surface, and *iii*) interference between the detector circuitry and the high electric field when applied in electrophoresis systems. A potential alternative is the capacitively coupled contactless conductivity detection (C^4D) technique, which has been widely employed for diverse analytical determinations over the last ten years.¹³

In biosensor-based analytical systems, the specificity is mainly governed by the bioreceptor/ligand interactions so that universal transducers such as C^4D can be employed.¹⁴ Recently, Coltro *et al.*¹⁵ reported the use of the C^4D as a new transducer in microchips for biomolecular interactions analysis (named as $\mu BIA-C^4D$). Herein we describe the development, optimization, and characterization of this platform containing FA as a bioreceptor, which represents a promising method aimed at FR- α biomarker detection.

The C^4D microfluidic device consisted of PDMS (with the molded microchannels) and glass (with the electrodes and the insulating dielectric). Fig. 1 shows the constituent layers and a photo of the microsystem. Briefly, the microchannels of 250 μm width and 50 μm depth were molded in a Y-shape using soft lithography. The electrodes, in turn, were sputter-deposited (layered as Ti/Au/Ti) presenting 1.0 mm of width and gap. For electric insulation of the electrodes, a thin film SiO_2 with 50 nm thickness was deposited by plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) (studies about the optimization of the dielectric thickness are described in

^aInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil. E-mail: emanuel@iqsc.usp.br; Fax: +55 (16) 3373 9975; Tel: +55 (16) 3373 9441

^bInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, Campinas, SP, Brazil

^cLaboratório Nacional de Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, SP, Brazil

^dDepartamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

^eInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, GO, Goiânia, Brazil

† Published as part of a themed issue in collaboration with the III International Workshop on Analytical Miniaturization and NANOTEchnologies, Barcelona, 2012.

‡ Electronic supplementary information (ESI) available: Materials and methods, effect of the area on the response in C^4D , optimization of the dielectric thickness and silanization conditions, and details about the FA-functionalization protocol. See DOI: 10.1039/c2lc40157f

Fig. 1 Scheme for $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$. Expanded view of the layers that compose the microchip (a) and photo of the microchip (b). e_{exc} is the excitation electrode, and e_{tr} and e_{wr} are the reference and working receiver electrodes, respectively.

Fig. S1, ESI†). Before the sealing step, the PDMS surface was oxidized in O_2 plasma for 13 s. Then, the plates were put in contact ensuring an irreversible process.¹⁶

The $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$ carries three electrodes; besides an excitation electrode (e_{exc}), in which the alternating signal is applied, there are two receiver electrodes, reference (e_{tr}) and working (e_{wr}) receiver electrodes. Only the dielectric surface over e_{wr} was functionalized. Fig. 2 shows a closer view of the microfluidic channel in the detection zone. For the analyses of biomolecular interactions, conductivity measurements were carried out in real time while either buffer or analyte solution was flowing through the microfluidic channels driven by two external syringe pumps. First, the buffer flushed the channels for approximately five min for stabilization of the signal and definition of the baseline. Afterwards, samples were introduced generating a response change on both receiver electrodes. The e_{tr} signal (S_{r}) correlates to the conductivity of the electrolytic medium, while the e_{wr} signal (S_{w}) also responds to the bioreceptor/ligand interactions. Consequently, the $S_{\text{w}} - S_{\text{r}}$ difference is closely related to the biomolecular interactions. We hypothesize that this signal arises from raising of the biosensing area when the biointeractions occur, along with changes in the dielectric constant. This phenomenon should increase the output voltage recorded by e_{wr} (discussed in the ESI†). Finally, after a specific time (sampling time), the buffer was added again for regeneration of the biosensor phase. As consequence, there was a decrease of the signal nearly to its initial value. The $S_{\text{w}} - S_{\text{r}}$ value obtained at the end of the sampling time represents the analytical response in $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$. All measurements were taken at room temperature. In this study, we performed the commutation

Fig. 2 Detailed scheme of the microchannel with electrode setup and structure in the $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$ detection zone. APTS, FA, and $\alpha\text{-FA}$ are 3-(aminopropyl)triethoxysilane (immobilization intermediary), folic acid (bioreceptor), and monoclonal antibody to the FA (ligand), respectively. Other parameters are defined in Fig. 1.

of the syringe pumps manually. Meanwhile, for high precision tests, software-controlled valves could be used.

For silanization of the surface of the SiO_2 film, the silanes 4-(triethoxysilyl)butyronitrile (ButCN) and 3-(aminopropyl)triethoxysilane (APTS) were investigated as intermediaries for immobilization of FA by formation of self-assembly monolayers (SAMs) on the SiO_2 dielectric film. Table S1 (ESI†) summarizes the parameters used in the assays—solvent, reagent concentration, and reaction time—which were intended to optimize the silanization conditions. Excessive concentrations and long reaction times can generate two artifacts: *i*) condensation in the solvent phase and *ii*) polymerization of the silane on the substrate surface. The first generates oligomers and/or polymers, which are adsorbed on the substrate surface. The second, in turn, arises from condensations between the silanol groups (Si-OH) of the silane.¹⁷ Both phenomena produce colloidal clusters on the substrate, inhibiting the formation of organized, reproducible, dense, and smooth silane layers. Low concentrations and short reaction times, on the other hand, reduce the fractional coverage of the surface by the silane.¹⁸

The silane-modified surfaces were characterized by taking scanning electron microscopy (SEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) measurements. SEM was used for checking the formation of clusters. XPS was employed for qualitative and quantitative determinations of the silanized surfaces, allowing us to ascertain the adsorption rate of the silanes.¹⁹

For all conditions investigated in this paper, the SEM images did not indicate clustering to 3 μm , 1 μm , and 200 nm resolution levels (Fig. S2, ESI†). These results can be attributed to the low hydration degree of the SiO_2 films deposited by PECVD (as the XPS measures confirmed). This fact prevents the formation of protonated species in silanization reactions, which arise from interactions between the organofunctional groups of the silane and silanol groups present on hydrated substrate surfaces. Such species favor homogeneous polymerizations with subsequent deposition of colloidal clusters, as described earlier.

Concerning the XPS assays, the chemical compositions of the films were elucidated as previously reported.^{19–23} The Si 2p peaks for all modified samples were fitted with only one component, the Si–O bond from SiO_2 (about 103.3 eV, Fig. S3, ESI†). Additionally, measures of a non-modified sample resulted in the same setting for the Si 2p peak. This fact confirms the low hydration degree of the SiO_2 substrate given the absence of the Si–OH component (about 99.6 eV). The N 1s peak showed asymmetric line shapes being fitted with three components (Fig. S4a–c, ESI†); two of them correspond to the species Si_3N_4 (about 398.6 eV) and N–C (about 400.4 eV). The third spectral line refers to NH_3^+ (about 401.7 eV) and NO_2^- (about 403.2 eV) for APTS- and ButCN-modified samples, respectively. The N–C component indicates the presence of silane, whereas Si_3N_4 and NO_2^- can be attributed to the dielectric deposition by PECVD. This process generates nitrogen as a product of the reactions in plasma.²⁴ Finally, the NH_3^+ component is assigned to interactions involving silanol groups present in the substrate and the $-\text{NH}_2$ groups of the APTS (Fig. S5, ESI† shows the APTS-silanization mechanism on a SiO_2 surface, followed by the APTS-FA reaction).¹⁹

From the XPS semi-quantitative analyses, it was possible to calculate the N/Si atomic ratios. For this, the N–C N 1s (characterizes the formation of silane) and Si–O Si 2p (inherent to the substrate nature) components were considered.¹⁹ Fig. S4d (ESI†) illustrates the obtained

N/Si ratios, which was highest for the following conditions: 3% (v/v) APTS in ethanol and 300 min of reaction time. Thus, such parameters were used in subsequent analyses.

After optimization of the silanization conditions, the FA-functionalization step was investigated. For this, the experimental protocol reported by Bhalariao *et al.*³ was employed (described in detail in the ESI†). Prior to the biointeraction assays, absolute values of the baseline potential (V_B) in C^4D were obtained by filling the microchip with 100 mmol L⁻¹ MES at pH 2.3 (buffer used in the biomolecular studies). This experiment aimed to select the ideal transduction parameters, namely: frequency (kHz) and peak-to-peak voltage (V_{P-P}). Fig. 3a expresses variations of V_B in function of the frequency under the potentials: 2.5, 6.0, and 9.5 V_{P-P} . The results were similar to those obtained with the polyester-toner C^4D microchip.²⁵ There is a maximum V_B ($V_B^{\max}$) indicating the optimum value of the working frequency. This point is shifted to lower frequencies with the increase of the peak-to-peak voltage. For 2.5, 6.0, and 9.5 V_{P-P} , the $V_B^{\max}$ levels were recorded at 340, 220–300, and 180–260 kHz, respectively. Since the raising of the potential from 6.0 to 9.5, V_{P-P} did not result in significant variations of $V_B^{\max}$ (8.5 to 8.7), the subsequent biomolecular analyses were performed by applying an rf frequency of 300 kHz and a peak-to-peak voltage of 6.0 V_{P-P} . The bioassays were carried out using an antibody specific to FA (α -FA) as a ligand instead of FR- α . The later and circulating tumor cells are not available as analytical standards. Since C^4D is a universal detector, correlation between the binding of α -FA to FA and the signal in $\mu BIA-C^4D$ could be inferred. Three FA-functionalization times were ascertained, namely: 3, 5, and 7 h, and evaluated the signal intensities obtained by the $\mu BIA-C^4D$. Fig. 3b–d show the responses obtained by the $\mu BIA-C^4D$ microsystems commutating MES buffer (100 mmol L⁻¹, pH 2.3) and α -FA ligand (100 μ g mL⁻¹ in TBS, pH 7.3) at 20 μ L min⁻¹ flow rate. The decrease of the analytical signal after the sampling step (30 s) occurred due to

regeneration of the biosensor phase, which consisted of breaking the FA- α -FA interactions allowing new biomolecular events for subsequent analysis. The regeneration phenomenon was achieved by denaturation of the α -FA protein using extremes of pH as denaturing agent.²⁶ The chips obtained with 3 h functionalization presented responses slightly higher than the other reaction times. The $\mu BIA-C^4D$ signals ($S_w - S_r$) were: 0.7 (3 h), 0.5 (5 h), and 0.4 V (7 h of functionalization). These results may be attributed to a steric factor related to higher functionalization times. Although entailing a greater number of bioreceptor anchors, long reaction times may generate steric hindrances for the bioactive component of these species as a function of the high density of molecules near the surface of the sensor phase.²⁷ Using the calibration method and assuming that the concentration of 100 μ g mL⁻¹ is within the dynamic range, the LOD value was calculated as 16.9 μ g mL⁻¹ of α -FA ligand for 3 h of functionalization. In addition, the devices exhibited good inter- and intra-assay (microfabrication reproducibility) precisions. The percentage relative standard deviations (RSD) of seven measurements for each microchip were: 5.7 (3 h), 7.9 (5 h), and 6.4% (7 h of functionalization). Finally, the inter-assay precision of the device for 3 h FA-functionalization was measured from three assays on different days (same conditions as in Fig. 4b). After seven measurements for each microchip, the RSD was calculated as 13.1%.

As a negative control, in addition to the assays with α -FA using the electrode/SiO₂ (e_{rr}) and electrode/SiO₂/APTS/FA (e_{wr} , functionalization for 3 h) microchips, we measured the C^4D signal of a device incorporating only the immobilization intermediary (electrode/SiO₂/APTS). The results shown in Fig. 4a indicate that there was no difference between the signals from electrode/SiO₂ and electrode/SiO₂/APTS. In such cases there were no specific interactions of the α -FA ligand to the electrodes given the absence of FA. Comparatively, we observed an increase of the response only for the electrode/SiO₂/APTS/FA system. These data indicate

Fig. 3 Optimization of detection parameters and FA-functionalization conditions. Variations of C^4D signal as function of the frequency and potential (a) and responses obtained by $\mu BIA-C^4D$ using 3 (b), 5 (c), and 7 h (d) of functionalization. V_B is the baseline potential, whereas S_r and S_w are the signals obtained by the reference and working receiver electrodes, respectively. Conditions: 100 mmol L⁻¹ MES buffer (pH 2.3), 100 μ g mL⁻¹ α -FA ligand in TBS (pH 7.3), 20 μ L min⁻¹ flow rate, 300 kHz frequency, and 6.0 V_{P-P} peak-to-peak voltage.

Fig. 4 Characterization of biosensor phase. C^4D measurements involving the electrode/SiO₂, electrode/SiO₂/APTS, and electrode/SiO₂/APTS/FA systems (a) and AFM images of the SiO₂ (b), SiO₂/APTS (c), and SiO₂/APTS/FA (d) surfaces. S_r signal obtained by the electrode/SiO₂/APTS system. The conditions for figure (a) are described in Fig. 3. The roughness parameters of the surfaces were: i) RMS = 0.4 (SiO₂), 0.8 (SiO₂/APTS), and 1.0 nm (SiO₂/APTS/FA); ii) SAR = 0.8 (SiO₂), 5.1 (SiO₂/APTS), and 6.3% (SiO₂/APTS/FA); and iii) DS = 5,621.7 (SiO₂), 7,055.3 (SiO₂/APTS), and 9,034.6 μ m⁻² (SiO₂/APTS/FA).

a direct correlation between the analytical signal in $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$ and the occurrence of biomolecular interactions in real time, showing that the C^4D can be used as transduction technique in chemical and biochemical sensing.

For morphological characterization of the biosensor phase, the SiO_2 , SiO_2/APTS , and $\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{FA}$ surfaces were analyzed by AFM. The following parameters were considered: root mean square (RMS), surface-to-area ratio (SAR), and density of summits (DS).¹⁶ The images achieved, as well as the RMS, SAR, and DS values, are shown in Fig. 4b–d. We observed the formation of slightly rougher surfaces and with higher surface area and density of peaks for the sequential process of silanization and functionalization.

This communication reports a potential alternative for determination of species that binds FA with high affinity, including the FR- α cancer biomarker. The biosensing microchip, which integrates contactless conductivity transduction and FA as bioreceptor, exhibits relevant advantages. Among these, we can highlight: *i*) reduced sample and reagent consumption ($< 7 \mu\text{L}$); *ii*) rapid analyses ($< 2 \text{ min}$); *iii*) simple assay routine (commuting 2 syringe pumps); *iv*) cheap and portable instrumentation (home-made electronics under \$100); *v*) possibility of fabrication of the chips without use of clean rooms (hundreds of μm features; glass/PDMS sealing); and *vi*) monitoring of the biomolecular interactions in real time (implications in kinetics and thermodynamics of the binding event). The transducer of choice— C^4D —displays two highly positive aspects: *i*) direct determinations, dispensing the use of redox mediators as in faradaic electrochemical methods, and *ii*) absence of drawbacks related to the electrode–solution contact. On the other hand, the levels of detectability achieved by $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$ are rather low with such simple instrumentation and can further be improved. The poor sensitivity is an intrinsic drawback to the conductivity-based sensors. The conductivity of a solution is determined by the migration of all ions present. Thus, in complex matrixes like biological samples, the high ionic strength of the medium may mask the net conductivity changes caused by biointeractions.²⁸ Thus, alternatives for improving the sensitivity of the $\mu\text{BIA-C}^4\text{D}$ can be foreseen. Among the options to improve the signal, we can include: *i*) metal nanoparticles,^{29–31} which increase the density of active species anchored to biosensor phase, *ii*) high-voltage excitation signals,³² *iii*) ground plane to reduce the stray capacitance,³² *iv*) C^4D cells with higher sensing area, such as semicircular^{33,34} and dual top-bottom electrodes,³⁵ and *v*) techniques to raise the signal-to-noise ratio.^{36–41} In addition, the doping of the dielectric thin film insulating the electrodes represents another real possibility.¹⁶ The later consists of increasing the dielectric constant of the thin film and, soon, the conductance recorded by the electrodes in C^4D .

This project was financially supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Grants Nr. 2008/07597-4 and 2010/08559-9). The authors are thankful to Msc. Paulo C. Leme and Dr Adriano L. de Souza for their assistance with the surface modification processes. In addition, Vinicius L. Pimentel and Dr Thiago P. Segato are acknowledged for their assistance with the AFM analyses and processing of the surface images, respectively. Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) and Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM) are also recognized for their support.

References

- 1 M. D. Salazar and M. Ratnam, *Cancer Metastasis Rev.*, 2007, **26**, 141.
- 2 L. Liu, X. Zhu, D. Zhang, J. Huang and G. Li, *Electrochem. Commun.*, 2007, **9**, 2547.
- 3 K. D. Bhalariao, S. C. Lee, W. O. Soboyejo and A. B. O. Soboyejo, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2007, **18**, 3.
- 4 G. Acharya, C. L. Chang, D. D. Doornweerd, E. Vlashi, W. A. Henne, L. C. Hartmann, P. S. Low and C. A. Savran, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 15824.
- 5 J. Weng, Z. Zhang, L. Sun and J. A. Wang, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 1847.
- 6 K. Tsukagoshi, N. Jinno and R. Nakajima, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 1684.
- 7 M. S. Wilson and W. Nie, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 6476.
- 8 N. V. Panini, G. A. Messina, E. Salinas, H. Fernández and J. Raba, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, **23**, 1145.
- 9 S. Choi and J. Chae, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**, 118.
- 10 Y. K. Chung, J. Reboud, K. C. Lee, H. M. Lim, P. Y. Lim, K. Y. Wang, K. C. Tang, H. Ji and Y. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 2520.
- 11 W. K. T. Coltro, E. Piccin, E. Carrilho, D. P. de Jesus, J. A. F. da Silva, H. D. T. Silva and C. L. do Lago, *Quim. Nova*, 2007, **30**, 1986.
- 12 M. Mascini and S. Tombelli, *Biomarkers*, 2008, **13**, 637.
- 13 W. K. T. Coltro, R. S. Lima, T. P. Segato, E. Carrilho, D. P. de Jesus, C. L. do Lago and J. A. F. da Silva, *Anal. Methods*, 2012, **4**, 25.
- 14 I. E. Tothill, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2009, **20**, 55.
- 15 W. K. T. Coltro, E. Carrilho and J. A. F. da Silva, *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, submitted.
- 16 R. S. Lima, T. P. Segato, A. L. Gobbi, W. K. T. Coltro and E. Carrilho, *Lab Chip*, 2011, **11**, 4148.
- 17 A. Ulman, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 1533.
- 18 J. S. Andresa, L. M. Moreira, J. L. Magalhães, E. P. Gonzalez, R. Landers and U. P. Rodrigues-Filho, *Surf. Interface Anal.*, 2004, **36**, 1214.
- 19 J. L. Magalhães, L. M. Moreira, U. P. Rodrigues-Filho, M. J. Giz, M. A. Pereira-da-Silva, R. Landers, R. C. G. Vinhas and P. A. P. Nascete, *Surf. Interface Anal.*, 2002, **33**, 293.
- 20 G. M. Ingo, N. Zacchetti, D. D. Sala and C. Coluzza, *J. Vac. Sci. Technol., A*, 1989, **7**, 3048.
- 21 J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E. Sobol and K. D. Bomben, *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy*, Perkin-Elmer Corporation, 1992.
- 22 N. Guerrouni, A. Baldo, T. Maarouf, A. M. Belu, C. M. Kassis and A. Mas, *J. Fluorine Chem.*, 2007, **128**, 925.
- 23 H. J. Martin, K. H. Schulz, J. D. Bumgardner and K. B. Walters, *Langmuir*, 2007, **23**, 6645.
- 24 H. Randhawa, *Thin Solid Films*, 1991, **196**, 329.
- 25 W. K. T. Coltro, J. A. F. da Silva and E. Carrilho, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 2260.
- 26 D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, New York: Worth Publishers, 3rd ed. 2000.
- 27 P. Gründler, *Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers*, Berlin: Springer, 2007.
- 28 A. Escosura-Muñiz, A. Ambrosi and A. Merkoçi, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2008, **27**, 568.
- 29 J. H. Kim, J. H. Cho, G. S. Cha, C. W. Lee and S. W. Paek, *Biosens. Bioelectron.*, 2000, **14**, 907.
- 30 S. J. Park, T. A. Taton and C. A. Mirkin, *Science*, 2002, **295**, 1503.
- 31 Y. Fan, X. Chen, J. Kong, C. Tung and Z. Gao, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 2051.
- 32 J. Tanyanyiwa and P. C. Hauser, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 6378.
- 33 C. Y. Lee, C. M. Chen, G. L. Chang, C. H. Lin and L. M. Fu, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 5043.
- 34 Y. Xu, J. Liang, H. Liu, X. Hu, Z. Wen, Y. Wu and M. Cao, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 1583.
- 35 K. A. Mahabadi, I. Rodriguez, C. Y. Lim, D. K. Maurya, P. C. Hauser and N. F. Rooij, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 1063.
- 36 J. A. F. da Silva and C. L. do Lago, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4339.
- 37 J. Lichtenberg, N. F. de Rooij and E. Verpoorte, *Electrophoresis*, 2002, **23**, 3769.
- 38 F. Laugere, R. M. Guijt, J. Bastemeijer, G. van Der Steen, A. Berthold, E. Baltussen, P. Sarro, G. W. K. van Dedem, M. Vellekoop and A. Bossche, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 306.
- 39 K. J. M. Francisco and C. L. do Lago, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 2009.
- 40 G. Fercher, A. Haller, W. Smetana and M. J. Vellekoop, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3270.
- 41 B. Liu, Y. Zhang, D. Mayer, H. J. Krause, Q. Jin, J. Zhao and A. Offenhäusser, *Electrophoresis*, 2011, **32**, 699.

Electronic Supplementary Information

Contactless conductivity biosensor in microchip containing folic acid as bioreceptor

Renato S. Lima,^{a,b} Maria H. O. Piazzetta,^c Ângelo L. Gobbi,^c Ubirajara P. Rodrigues-Filho,^a Pedro A. P. Nascente,^d Wendell K. T. Coltro,^e and Emanuel Carrilho^{*a,b}

^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil;

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, Campinas, SP, Brazil;

^c Laboratório Nacional de Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, SP, Brazil;

^d Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brazil.

^e Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, GO, Brazil.

*emanuel@iqsc.usp.br

Material and methods

Ethanol, acetone, acetonitrile, sulfuric acid (H₂SO₄), and hydrogen peroxide (H₂O₂) were supplied from Synth (Diadema, Brazil). Lithium perchlorate (LiClO₄), 4-(triethoxysilyl) butyronitrile (ButCN), 3-(aminopropyl)triethoxysilane (APTS), folic acid (FA), TRIS buffered saline (TBS), MES, monoclonal antibody against FA (α -FA), N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), dimethylsulfoxide (DMSO), and pyridine were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (MO, USA). All solutions were prepared utilizing deionized water (Milli-Q, Bedford, USA) with resistivity no less than 18 M Ω cm.

The analytical instrumentation required by μ BIA-C⁴D consisted of the following components: *i*) alternating signal generator (Minipa MFG 4202, São Paulo, Brazil), *ii*) conductivity detector, whose electronic circuit was home-designed and built according to a previously reported scheme,¹ and *iii*) two syringe-pumps for microfluidic handling (New Era Pump Systems Inc. NE-300, Farmingdale, NY).

Using a program written in LabVIEW carried out the data acquisition. Teflon reactors (8.0 cm internal diameter and 2.0 cm depth) were used for the surface functionalization reactions. These reactors, as all employed glassware, were previously washed in $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (3:1, v/v) solution for 30 min and abundant deionized water. Scanning electron microscopy (SEM) images of the modified surfaces were carried out in a Carl Zeiss LEO 440 microscope (NY, USA). This instrument operated with tungsten thermionic filament, 20 kV potential, sample chamber under high vacuum (pressure of 1 Pa), and secondary electron detector as analytical mode. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) measurements were performed from a Kratos Analytical XSAM HS spectrometer (Chestnut Ridge, NY), operating with non-monochromatic Mg $K\alpha$ radiation (1,253.6 eV in binding energy) and flood-gun (charge neutralizer device) in order to avoid the charging of the samples.² The pressure in the sample chamber was in the range of 10^{-7} Pa, whereas the Shirley method was used for background subtraction. Atomic force microscopy (AFM) images were acquired in tapping mode with constant force in a Veeco MultiModeTM SPM equipment (Plainview, NJ), containing 512 x 512 pixels at maximum resolution. Finally, the thicknesses of the films were measured using a Veeco Dektak 3ST ellipsometer (New York, NY).

Optimization of the dielectric thickness

Alterations in the nature and thickness of the dielectric were carried out seeking to improve the sensitivity of the system. In these studies, flowing aqueous solutions of LiClO_4 into the microchannels performed C4D flow analyses. Microdevices without the biosensor phase were used. Thus, only one of the receiver electrodes was employed (e_{wr} in Fig. 1b) during the experiments. The signals were recorded by flow analyses switching two external syringe pumps so that either water or saline solution was pumped into the microfluidic channels. First, water was circulated for approximately 5 min seeking the signal stabilization. Once a stable baseline was achieved, the samples were introduced

generating a potential change on the receiver electrode. Next, water was added resulting in a decrease of the signal nearly to its initial value. The analytical responses recorded in this study were associated to the signal difference after maximum of the signal from the sample and its baseline (water) values.

The tested dielectrics were: *i*) SiO_2 ($\text{C}^4\text{D}_{\text{SiO}_2}$), deposited by plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) with 50-nm-thickness, and *ii*) PDMS ($\text{C}^4\text{D}_{\text{PDMS}}$), coated by spinning at 1000 rpm for 10 s resulting in a layer 50- μm thick. In both cases, the electrodes were made with a width and gap of 1.0 mm (Fig. 1b). The microchips were applied to LiClO_4 standards (25-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for $\text{C}^4\text{D}_{\text{SiO}_2}$ and 2-8 mmol L^{-1} for $\text{C}^4\text{D}_{\text{PDMS}}$); deionized water was employed as a blank. The following conditions were adopted in both cases: 400 kHz frequency, 2.5 $V_{\text{p-p}}$ peak-to-peak voltage ($V_{\text{p-p}}$), 100 μLmin^{-1} flow rate, and 15 s salt-sampling time. The analytical signals and calibration curves obtained are illustrated in Fig. S1. The analysis of residues and F-test for linearity validated the linear fit for all analytical curves. The limit-of-detections (LODs), calculated using $3\sigma/\text{slope}$ ratio (σ is the standard deviation of the mean voltage for 7 measurements of the blank), were: 12.7 ($\text{C}^4\text{D}_{\text{SiO}_2}$) and 894.6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($\text{C}^4\text{D}_{\text{PDMS}}$).

Fig. S1 Analytical signals and calibration curves (insets) obtained for $\text{C}^4\text{D}_{\text{PDMS}}$ (a) and $\text{C}^4\text{D}_{\text{SiO}_2}$ (b) microchips.

$\text{C}^4\text{D}_{\text{SiO}_2}$ exhibited a LOD (12.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for LiClO_4) considerably smaller than that recorded for $\text{C}^4\text{D}_{\text{PDMS}}$ (894.6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for LiClO_4). SiO_2 and PDMS present similar dielectric constants, around of 4

for SiO₂³ and 3 for PDMS.⁴ Thereby, since that the other intervenient factors in the C⁴D response (nature and concentration of the solutions, dimensions of the detection cell, and gap among the electrodes) were the same for both systems, presumably the difference in the LODs values is due to the thickness values presented: 50 nm for SiO₂ and 50 μm for PDMS. The lowest thicknesses of SiO₂ provided a reduction in resistivity imposed on the capacitive coupling electrode/solution, increasing the capacitance recorded by the receiver electrode as discussed with more details in the following section.⁵ Here, the SiO₂ film was employed in the further experiments.

The use of a nanometric film for electrical insulation of the electrodes in μBIA-C⁴D represents a substantial advantage regarding the majority of other published C⁴D microchips. Commonly, the thicknesses of the insulating layer for C⁴D microdevices range from tens to hundreds of micrometers.⁶

Effect of the area on the response in C⁴D

The area affects the C⁴D signal by increasing the conductance and capacitance parameters as discussed below.

C⁴D signal

The output voltage of the C⁴D amplifier (V_{out}) directly varies with the conductance of the electrolyte and the equivalent capacitance of the of the detector (C) according to equation (1).⁷

$$V_{out} = \frac{V_{in}}{1 + j2\pi fRC_o} \cdot R_f \cdot \frac{1}{j2\pi(C + C_o) \left(1 + \frac{j2\pi fRCC_o}{C + C_o} \right)} \quad (1)$$

being V_{in} the input voltage, j an imaginary unit, f the frequency of the RF signal, R_f the feedback resistance on the amplifier, R the cell resistance (inverse of conductance), and C_o the stray capacitance as above mentioned. Below we discuss the variations of the C^4D response with the conductance and capacitance parameters.

Variation of the C^4D signal with the conductance

In conductometry, with and without contact, the mass transport phenomenon intervenient in the analytical response is the migration. The contribution of the diffusional processes is minimized by applying an alternating signal, usually with sine waves,⁸ to the excitation electrode. Under these conditions, the particles oscillate around a given mean position, preventing the formation of a resulting concentration gradient ($\partial c/\partial x$). Therefore, the diffusion flow (J_D) is eliminated according the Fick's first law:⁹

$$J_D = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (2)$$

in which D is the diffusion coefficient of the species. In this context, the response in conductometry is closely related to the migration flow of the ions in solution (J_M). This parameter is directly dependent on the equilibrium concentration (c_j), the effective ion mobility (μ_j) of the species, and the electric potential generated between the electrodes ($\partial \phi/\partial x$) as shown in equation (3):¹⁰

$$J_M = -\left(\sum_j c_j \mu_j\right) \frac{\partial \phi}{\partial x} \quad (3)$$

The migrational current (i_M) generated at a conductivity cell is proportional to the flow rate, which measures the number of particles that cross a given area per unit time, to the module of the charge of the electrolyte ($|z_j|$), and to the detection area A . Mathematically, we have:

$$i_M = -J_M F A \sum_j |z_j| \quad (4)$$

being F the Faraday constant. Substituting (3) in (4):

$$i_M = F A \left(\sum_j c_j |z_j| \mu_j \right) \frac{\partial \phi}{\partial x} \quad (5)$$

Neglecting the edge effects of the electric field, this field (ΔE) will be linear throughout the detection cell. Under these conditions:¹¹

$$\frac{\partial \phi}{\partial x} = \frac{\Delta E}{l} \quad (6)$$

where l is the distance between the electrodes. Substituting (6) in (5):

$$i_M = F \left(\frac{A}{l} \right) \left(\sum_j c_j |z_j| \mu_j \right) \Delta E \quad (7)$$

The A/l ratio is known as cell constant. From Ohm's law:¹⁰

$$i_M = \frac{\Delta E}{R} \quad (8)$$

being R the resistance imposed to the charge transport among the electrodes. Applying (8) in (7):

$$\frac{1}{R} = F \left(\frac{A}{l} \right) \left(\sum_j c_j |z_j| \mu_j \right) \quad (9)$$

The inverse of resistance is called conductance, L (Ω^{-1}), so that this parameter increases with the cell constant and the linear combination of the contributions from all ions present in the sample. Such contributions take into account the equilibrium concentration (c_i) and the nature of these ions (z_i e u_i) as shown in equation (10):¹⁰

$$L = F \left(\frac{A}{l} \right) \left(\sum_j c_j |z_j| u_j \right) \quad (10)$$

with,

$$L = \kappa \left(\frac{A}{l} \right) \quad (11)$$

where κ , called conductivity ($\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$), is the proportionality constant between L and the cell constant. This parameter is an intensive property and given by:

$$\kappa = F \left(\sum_j c_j |z_j| u_j \right) \quad (12)$$

As it can be observed in equation (1), keeping constant the frequency of operation, the detector electronics, and the geometry of the conductivity cell (affects C and C_o), the variations in V_{out} will occur as function of the values of conductance. Studies show that there is a linear relation among the C^4D signals (in volts) and κ in the range of 0.2 to 1.5 mS cm^{-1} . The solutions used in conductometric determinations, with and without contact, usually present conductivities in this range.⁷

The C^4D sensitivity increases with the sensing area as shown in equation (10), from which it can be observed that L directly depends on A . This phenomenon can be explained according to the

raising in concentration of charge carriers between the electrodes, increasing consequently the resulting conductance values. The effect of the electrodes area on the analytical response in C^4D was demonstrated by Lee and *et al.* in 2006.¹² Electrophoretic signals to Rhodamine B samples were recorded by microdevices incorporating planar and semicircular electrodes. The latter resulted in capacitance intensities more than four times compared to those obtained with planar electrodes. Nevertheless, it is important to highlight that the simple increase of this area by the electrode width does not necessarily improve the signal-to-noise (S/N) ratio in C^4D . Data show that widths greater than 2 mm, although have increased in capacitance, result in signal reduction due to the parallel increase in noise that occurs as function of the stray capacitance. This parameter arises from direct capacitive coupling between the electrodes.⁷

Variation of the C^4D signal with the capacitance

Consider the Gauss's law to mathematical description of C . Briefly, the electric field generated by the electrode/dielectric/solution systems (E_C) is obtained from a Gaussian surface enclosing all the charge q on any one of the plates of the capacitor (electrode and solution in C^4D), as illustrates the equation (13).^{10,11}

$$\epsilon\epsilon_o \oint \vec{E}_C d\vec{A} = q \quad (13)$$

being A the area of each one of these plates (sensing area in C^4D), ϵ the dielectric constant of the material that insulates the electrodes, and ϵ_o the permittivity constant of the free space (8.85 pF m^{-1}). When the plates are very close to each other, we can neglect the edge effect of the electric field. Therefore, E_C will be linear throughout the Gaussian surface so that equation (13) reduces to:

$$E_c = \frac{q}{\epsilon\epsilon_o A} \quad (14)$$

For a linear electric field:

$$V = E_c \int_0^d dS = E_c d \quad (15)$$

In this equation, d is the distance between the plates and dS is the displacement vector. On the other hand, the capacitance (C) represents the ability of a system for accumulating charges (q) under a given applied potential (V). Mathematically, we have:

$$C = \frac{q}{V} \quad (16)$$

Substituting (14) and (15) in (16), the following equation for capacitance is achieved according to Gauss' law:

$$C = \frac{\epsilon\epsilon_o A}{d} \quad (17)$$

Based on equation (17), we can verify that C changes directly and indirectly with the electrode area and the dielectric thicknesses, respectively. For a better understanding about the phenomenon responsible for these variations, let us consider a capacitor connected to a battery as shown in [Scheme S1a](#). Since connecting the capacitor, initially uncharged, to the battery, electrons (charge carriers) flow through conducting wires according to a direction determined by the battery

electric field (E_B). Due to the charging process of the capacitor plates (electrode and solution in C^4D), an electric field (E_C) contrary to E_B is formed whose magnitude is given by equation (14). When there is a dielectric between the capacitor plates, C increases as a numerical factor called dielectric constant (equation 17).¹¹

Scheme S1 Schematic diagrams with (a) the elements of an electrical circuit incorporating capacitor and battery and (b) the polarization phenomenon of the charge centers (+/-) of the dielectric in capacitors. E_B , E_D , E_0 , and E_C , electric fields of the battery, dielectric, initial value of the capacitor, and the resulting electric field of the capacitor, respectively. Figure adapted from reference 5 with permission.

In atomic and molecular terms, what causes such increase? The dielectric constant of the insulating material expresses the polarization ability of its charge centers under an electric field. Regardless of whether they have permanent electric dipole moments (polar and polarizable dipole) or not, the molecules that constitute the dielectric acquire these moments by induction of its positive and negative charge centers when exposed to an external electric field. The phenomenon of dipole polarization, shown in [Scheme S1b](#), induces an electric field (E_D) less intense and contrary to the capacitor initial field (E_0 , hypothetical value for the capacitor without dielectric). Thus, E_0 is reduced to a resulting field (E_C) as a magnitude given by the P parameter, denominated dielectric polarization and calculated as follows:¹³

$$P = \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon} \quad (18)$$

Since E_C is opposed to the battery field, the charging process of the capacitor has increased its efficiency with a consequent raise in equilibrium capacitance.¹¹

Similarly to what occurs with electrical capacitors, in C⁴D the increment in the capacitance values of the electrode/dielectric/solution systems is due primarily to a reduction in E_C , which arises from a more effective polarization of the dielectric molecules. The efficiency of this polarization process is expressed by ε and it is also affected by the A and d parameters. Thus, the increase in capacitance with the electrode area can be explained based on the intensification of the dielectric molecules polarization, resulting in a decrease of E_C . On the other hand, the reduction in capacitance facing to the dielectric thickness occurs thanks to the increase in the number of interactions/collisions between the dielectric molecules during the polarization process.¹¹ This phenomenon reduces the electric field related to the insulating material E_D , increasing thus the capacitor field. According to data in the literature,¹⁴ there is a loss of approximately 75% in analytical signal when d is increased from 125 to 425 μm .

Optimization of the silanization conditions

As highlighted in main text, the silanized surfaces were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) measurements. SEM was used in order to checking the formation of clusters, whereas XPS was employed for qualitative and quantitative determinations of the modified surfaces. This allowed us to ascertain the adsorption rate of the silanes. [Table S1](#) summarizes the parameters used in the assays, which were intended to optimize the silanization conditions.

Table S1 Reactional conditions studied for silanization of the SiO₂ film

<i>Condition</i>	<i>Silane</i>	<i>Concentration</i>	<i>Solvent</i>	<i>Reaction Time (min)</i>
SAM A.1	ButCN	1 mmol L ⁻¹	Acetonitrile	60
SAM A.2	ButCN	1 mmol L ⁻¹	Acetonitrile	150
SAM A.3	ButCN	1 mmol L ⁻¹	Acetonitrile	300
SAM B.1	APTS	1 mmol L ⁻¹	Acetone	60
SAM B.2	APTS	1 mmol L ⁻¹	Acetone	120
SAM B.3	APTS	1 mmol L ⁻¹	Acetone	180
SAM C.1	APTS	3% (v/v)	Ethanol	180
SAM C.2	APTS	3% (v/v)	Ethanol	300

As a didactic example, Fig. S2a shows clusters formed on a SiO₂ film modified with 3-imidazolilpropyltrimethoxysilane (3-IUTS), 1 mmol L⁻¹ in toluene, for 150 min. Meanwhile, for all conditions investigated in this paper, the SEM images did not indicate clustering to 3 μm, 1 μm, and 200 nm resolution levels. The SEM images were recorded at four different and random points for each sample. Fig. S2b shows the SEM image of the silanization condition SAM C.2.

Fig. S2 Assessment of the formation of clusters on the silanized SiO₂ surface. SEM images corresponding to surfaces modified with 1 mmol L⁻¹ 3-IUTS in toluene for 150 min (a) and 3% APTS in ethanol (v/v) for 24 h (b).

Fig. S3 shows the XPS spectra corresponding to the Si 2p peak achieved for the SAM C.2-modified SiO₂ surface.

Fig. S3 XPS spectra of the Si 2p peak obtained for SAM C.2-modified (Table 1 in the communication) SiO₂ surface. The binding energy (E_B , eV) is reported in parentheses for the SiO₂ component.

Fig. S4a–c detail XPS spectra (exploratory and N 1s lines) obtained to modified SiO₂ films using the SAM C.2 and SAM A.3 conditions. **Fig. S4d**, in turn, illustrates the N/Si ratios whose values were similar for SAMs A and B. Presumably, this fact is due to saturation of the silanol groups of the SiO₂ surface available for silanization.¹⁵ Concerning the samples modified with SAM C, there was a reasonable increase in the silanization efficiency with the reactional time. Based on the results, we adopted APTS under the SAM C.2 conditions as FA-immobilization intermediary in subsequent analyses.

FA-functionalization protocol

Briefly, FA in excess (approximately 515 mg) was dissolved in DMSO (50 mL) at temperatures between 40 and 45 °C. Then, pyridine (515 μ L) and DCC (412 μ L) were added to this mixture. DCC functions as a heterobifunctional crosslinker between the groups amine of the silane and carboxyl of the FA groups.¹⁶ Finally, the APTS-silanized SiO₂ surface was incubated in this FA solution for different times at 40–45 °C. Three FA-functionalization times were explored, namely: 3, 5, and 7 hr.

Fig. S4 Optimization of silanization conditions. XPS spectra of SiO₂ films modified with SAM C.2 (a,b) and SAM A.3 (c) and N/Si percentage relationships for all silanization conditions (d). In figures (b) and (c), the binding energies (E_B, eV) and percentage relative quantities are reported in parentheses for each component of the N 1s lines.

The substrate cleaning and drying procedures were carried out with abundant ethanol and N₂ flow, respectively. The modified SiO₂ films presented low hydration level, as shown in the Fig. S3. From this figure, we observed the absence of the Si–OH species (about 99.6 eV). In addition, the interfacial reactions for construction of the biosensor phase are shown in Fig. S5.^{16,17} The –NH₂ group at the top of the FA molecule is its bioactive component, responding mainly by the specific interactions with FR- α whereas, in this communication, we used α -FA.

Fig. S5 Interfacial reactions for functionalization of the SiO₂ film with FA.

References

1. J. A. F. da Silva and C. L. do Lago, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4339.
2. P. A. P. Nascente, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2005, **228**, 145.
3. H. J. Kim, Q. Shao, Y. H. Kim, *Surface and Coatings Technology*, 2003, **171**, 39.
4. N. J. Farcich, J. Salonen, P. M. Asbeck, *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 2008, **56**, 2963.
5. R. S. Lima, T. P. Segato, A. L. Gobbi, W. K. T. Coltro, and E. Carrilho, *Lab Chip*, 2011, **11**, 4148.

6. W. K. T. Coltro, R. S. Lima, T. P. Segato, E. Carrilho, D. P. de Jesus, C. L. do Lago, and J. A. F. da Silva, *Anal. Methods*, 2012, **4**, 25.
7. P. Kubaň and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3387.
8. J. Wang, M. Pumera, G. E. Collins, and A. Mulchandani, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 6121.
9. B. Damaskin, O. Petri, *Fundamentos da electroquímica teórica*, Moscovo: MIR, 1985.
10. A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons: New York, 2001.
11. D. Halliday, R. Resnick, and J. Walker, *Fundamentals of Physics*, John Wiley & Sons: New York, 2001.
12. C. Y. Lee, C. M. Chen, G. L. Chang, C. H. Lin, and L. M. Fu, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 5043.
13. A. Paul, *Chemistry of Glasses*. London: Chapman and Hall, 1982.
14. P. Kubaň and P. C. Hauser, *Lab on a Chip*, 2005, **25**, 407.
15. J. A. Howarter and J. P. Youngblood, *Langmuir*, 2006, **22**, 11142.
16. J. W. Lee, J. Y. Lu, P. S. Low, and P. L. Fuchs, *Bioorg. Medicinal Chem.*, 2002, **10**, 2397.
17. J. A. Howarter and J. P. Youngblood, *Langmuir*, 2006, **22**, 11142.

ANEXO IV

**Highly sensitive contactless conductivity microchips
based on concentric electrodes for flow analysis**

Highly sensitive contactless conductivity microchips based on concentric electrodes for flow analysis†

Cite this: *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 11382Received 29th July 2013,
Accepted 8th October 2013

DOI: 10.1039/c3cc45797d

www.rsc.org/chemcomm

Renato S. Lima,^{abc} Maria H. O. Piazzetta,^a Angelo L. Gobbi,^a Thiago P. Segato,^{bc} Murilo F. Cabral,^{bd} Sergio A. S. Machado^b and Emanuel Carrilho^{*bc}

In this communication, we describe for the first time the integration of concentric electrodes (wrapping around the microchannel) in microchips. The use of such electrodes has been shown to be effective towards improvement of the sensitivity and detectability in pressure-driven flow platforms incorporating C⁴D.

In the last twelve years, microfluidic devices featuring capacitively coupled contactless conductivity detection (C⁴D) have been widely employed for analytical determination, including bioanalytical assays,^{1–7} on-chip enzymatic reactions,^{8–11} food,^{12–16} explosives,^{17–19} and chemical warfare agent analysis.^{20–23} C⁴D is compatible with miniaturization and full on-chip integration, thus, ideal for the development of point-of-care analytical systems. In addition, other advantages of C⁴D systems are related to the electrical insulation of the electrodes with respect to the electrolytic fluid. This isolation avoids problems usually present in contact conductivity and faradaic electrochemical methods such as passivation of the electrodes and electrical interference between the detector circuit and the separation field applied in capillary electrophoresis (CE).²⁴ On the other hand, its major disadvantage is related to its lower sensitivity than faradaic techniques²⁵ and contact conductivity detection.^{26,27} The best limits-of-detection (LODs) reported for C⁴D microchips are usually of the order of $\mu\text{mol L}^{-1}$.^{28,29}

In general, the alternatives described in the literature to improve the LODs in C⁴D systems are based on increasing the detection area. Usually, the electrodes are coupled in microchips either in the same plane of the sample microchannel (semicircular electrodes)^{30,31} or from a dual top–bottom configuration disposed onto a very thin plastic chip.^{32,33} Both arrangements exhibit a sensing area larger than the single planar electrodes (these assemblies are shown in the ESI†). According to Lee *et al.*,³⁰ the capacitance of semicircular electrodes is more than four times that of planar electrodes in CE for Rhodamine B. These approaches, nevertheless, require a slow and laborious microfabrication process, which requires high temperature and pressure values to operate. Sequential steps for glass etching are carried out for embossing microchannels and electrodes in the semicircular configuration.

The ideal cell assembly to achieve the maximum electrode area consists of electrodes wrapped around the entire microchannel (concentric arrangement), like in C⁴D systems with capillary-based CE.³⁴ Compared with conventional capillaries, the LODs for CE-C⁴D microdevices are *ca.* 1 order of magnitude higher.³⁵ Herein, we describe for the first time the integration of concentric electrodes for C⁴D in microfluidic chips. This method presents easy manufacturing, avoiding (i) sequential etching of the glass slides for construction of microchannels and electrodes and (ii) high pressure/temperature to the bonding. The sensitivity of this arrangement was further improved by employing insulation of the electrodes with a nano-thin film of SiO₂. Despite the simplicity of the microfabrication method, C⁴D microchips featuring concentric electrodes (designed as C⁴D_C) attained picomolar sensitivity in flow analyses of LiClO₄, emerging as a powerful platform for high-performance analysis. These include gas diffusion-based techniques, chromatography, and chemical sensors. The current communication shows the fabrication, characterization, sensitivity, and precision tests of the microchips.

For the integration of the concentric electrodes in microchips, which consisted of two glass slides (substrate and cover plate), the metal deposition process was performed not only on the cover plate but also inside the etched microchannel in the substrate. In both cases, special layouts allowed the overlap of the electrodes during the sealing step. Fig. 1 depicts the plates that constitute the C⁴D_C microchip, as well as the final device and a micrograph of the

^a Laboratório de Microfabricação, Laboratório Nacional de Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brazil

^b Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil. E-mail: emanuel@iqsc.usp.br; Fax: +55 16 3373 9975; Tel: +55 16 3373 9441

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, Campinas, São Paulo, Brazil

^d Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available: (i) Electrode configurations in C⁴D microchips, (ii) microfabrication steps, (iii) electric model, (iv) chemicals and instrumentation, (v) precision of glass etching, (vi) characterization of the dielectrics, (vii) tests of electric insulation of the C⁴D electrodes, (viii) flow analysis procedure, (ix) optimization of the C⁴D parameters, (x) analytical calibration curves, (xi) repeatability test, (xii) calculation of the capacitances, and (xiii) LOD values described in the literature using C⁴D and pressure-driven flow. See DOI: 10.1039/c3cc45797d

Fig. 1 C^4D_C platform. Slides containing PDMS-covered electrodes (planar) (a), substrate containing the microchannel, air-trapping zones, and SiO_2 -covered electrodes (semiconcentric) (b), photograph of the bonded microchip (c), and a micrograph of the microchannel in the sensing zone showing the semiconcentric electrode deposited into the microfluidic channel (d). R_1 , R_2 , and R_3 , reservoirs for H_2O , electrolyte, and waste fluids, respectively; e_{exc} , excitation electrode; and e_r , receiving electrode. The 1 cm scale is true to (a) and (b) images.

microchannel zone. In the ESI,[†] we illustrate the microfabrication steps and the equivalent electrical circuit for the developed microdevice.

The fabrication of the proposed microchip involved standard processes of UV photolithography for definition of the patterns, thin film deposition, and etching. The main steps were: (i) carving the microchannels in a glass substrate by wet chemical etching; (ii) transfer of Cr/Al film patterns over the surfaces—substrate (semiconcentric electrode) and cover plate (planar electrode)—by sputtering; (iii) electrically insulating the semiconcentric and the planar electrodes employing a SiO_2 nano-thin film (plasma-enhanced chemical vapor deposition) and a PDMS membrane (spinning), respectively; and (iv) sealing the microchip irreversibly by simple contact after O_2 plasma oxidation treatment. Details about the microfabrication steps, precision of glass etching, characterization of the dielectrics, and electric insulation of the C^4D electrodes are presented in the ESI.[†]

The microchannels were fabricated in a cross-format configuration, with 15 and 55 mm-long channels. Their dimensions were: $31.3 \pm 0.3 \mu m$ (depth), $178.4 \pm 11.8 \mu m$ (width at the opening), and $73.1 \pm 1.4 \mu m$ (width at the bottom). Beyond the microfluidic channels, the etching masks allowed the generation of air-trapping zones over the glass substrates as depicted in Fig. 1. These cavities reduced the formation of bubbles during the bonding process.³⁶ The geometry adopted for the electrodes was based on studies reported recently in the literature,⁶ which were intended to reduce the direct capacitive coupling among the electrodes. This design presents narrow lines (10.0 mm length and 0.2 mm width) connecting the sensing electrodes (0.6 mm gap and $1.0 mm^2$ area) and soldering pads at an angle of 45° . The dielectrics had thicknesses of 200 nm (SiO_2) and 50 μm (PDMS). The latter was adopted as a dielectric because it facilitates the sealing step, achieved by simple contact between the layers after oxidation of the PDMS and SiO_2 dielectrics in O_2 plasma. Here, thinner membranes (desirable to achieve greater sensitivity) were not possible due to reproducibility drawback of the used deposition technique.³⁷ An alternative to overcome this drawback is the dilution of the polymer in toluene;³⁸ in this case, a thickness of 0.6 μm can be achieved.

Field-emission gun scanning electron microscopy (SEM-FEG) images evaluated the thickness and uniformity of the dielectric (SiO_2) and semiconcentric electrode (Cr/Al) films deposited inside the microfluidic channel etched in glass. Fig. 2 shows SEM-FEG images of the cross section of the sealed microchannel and zoomed out films (SiO_2 and semiconcentric electrode) deposited at different

Fig. 2 Distribution of the thin films deposited in the microchannel.

points in the etched glass. As verified in this figure, the film distributes as a thicker layer at the microchannel roof than the walls (1), with average thicknesses around 250 nm (Cr/Al electrode) and 200 nm (SiO_2 insulator). On the walls of the channel there is a reduction of the thickness to values around 190 nm (Cr/Al electrode) and 170 nm (SiO_2 insulator) (2). Such thicknesses remain uniform at approximately 175 nm (Cr/Al) and 150 nm (SiO_2) in the two points located at the end of the microchannel (3, 4).

We carried out flow studies for sensitivity and repeatability involving C^4D_C and two other C^4D microchips, which incorporated either the semiconcentric (C^4D_S) or the planar electrodes (C^4D_P). Conductivity measurements to access the figures of merit of the detector used either water or salt flowing through the microchannels, driven by two external syringe pumps. The analysis procedure as well as the optimization of the C^4D parameters (frequency, kHz, and excitation voltage, V_{P-P}) for each assembly are described in the ESI.[†] The optimum frequencies obtained were 10 (C^4D_P), 5 (C^4D_S), and 2 kHz (C^4D_C). The optimum excitation voltage was 10.0 V_{P-P} for all microchips.

Regarding the sensitivity and detectability tests, micro-devices incorporating planar and semiconcentric/concentric electrodes exhibited dramatically different responses as illustrated in Fig. S11 (ESI[†]). The analytical calibration curves achieved in all cases are shown in the ESI.[†] With the increase in the electrode sensing area, the signal remained constant after salt-injection for longer times (around 3 and 10 s for C^4D_S and C^4D_C , respectively). Further investigation on this phenomenon was not performed so its causes are unknown yet.

The electrode area and the thickness of the dielectric remarkably influenced the limits of detection: the LODs for C^4D_P , C^4D_S , and C^4D_C microchips were $3.4 \mu mol L^{-1}$, $724.0 pmol L^{-1}$, and $343.7 pmol L^{-1}$, respectively. In addition, the analytical sensitivity values were of 0.02 (C^4D_P), 0.04 (C^4D_S), and $0.08 V nmol^{-1} L$ (C^4D_C). The LOD recorded with semiconcentric and concentric electrodes improved *ca.* five orders of magnitude compared to that attained with planar electrodes. This difference can be explained taking into account the (i) electrode area and (ii) dielectric thickness, which contribute to high signals in C^4D by increasing both the capacitance and the conductance.^{7,38,39} Presumably, the dielectric nature did not influence the results since the SiO_2 and PDMS exhibit similar dielectric constants (around 4 for SiO_2 and 3 for PDMS).^{40,41}

The SiO₂ and PDMS dielectrics exhibited smooth surfaces so that the electrode sensing areas for all investigated configurations can be approximated to the geometric area of the electrodes underneath the dielectrics. These areas were accurately measured by profilometry, exhibiting values equal to 178.4 (C⁴D_P), 209.1 (C⁴D_S), and 387.5 nm² (C⁴D_C). We observed that there was no significant increase in area for the microdevices integrating semiconcentric electrodes when compared to the planar electrodes. Because of that, since the conductance and the capacitance rise linearly with the electrode area,⁷ this parameter may not be the only one responsible for the sensitivity and detectability improvement achieved for C⁴D_S and C⁴D_C in relation to C⁴D_P. The reduction in LOD for C⁴D_C over C⁴D_S was, however, satisfactory, evidencing the importance of the area for sensitivity in C⁴D and the contribution of the planar electrode in lowering the LOD further. On the other hand, the thicknesses of the dielectrics differed in about three orders of magnitude from the systems with planar (50 μm) to semiconcentric (150–200 nm) electrodes. Presumably, this fact is mainly responsible for the discrepancy in the LOD values for C⁴D_P and C⁴D_S/C⁴D_C. Besides the difference between the thicknesses of the dielectrics, the contribution of this parameter towards the changes in capacitance is more pronounced in the case of the capacitive systems incorporating semiconcentric and concentric electrodes. In these assemblies, the capacitance increases with the reduction of the natural logarithm of the thickness inside the etched microchannel, whereas this relationship is linear for the planar electrode-based system. In the ESI,[†] a rough calculation of the capacitances that characterize the C⁴D_P, C⁴D_S, and C⁴D_C configurations is described.

The value of 343.7 pmol L⁻¹ achieved by the C⁴D_C assembly is very promising considering the LODs reported in the literature for conventional flow analysis systems as illustrated in the ESI.[†] Furthermore, the LOD of a C⁴D microchip integrating semicircular electrodes (15 V_{P-P}, 450 kHz, and 1 μm SiO₂-polysilicon-SiO₂ as the dielectric) was determined to be 1000 pmol L⁻¹ for KCl standards in flowing mode.³¹ Finally, the C⁴D_C assembly exhibited satisfactory repeatability values for flow analysis of 25 nmol L⁻¹ LiClO₄ in water as discussed in the ESI.[†] Such data show that the microfabrication procedure exhibited good precision and it is robust.

Our findings represent a remarkable breakthrough in making the C⁴D, a technique in which there is no charge transference at the electrode surface, a competitive alternative for the conventional conductivity detection and faradaic electrochemical methods. By enhancing the electrode area and decreasing the dielectric thickness, we improved the LOD of this detector almost five orders of magnitude compared to the levels obtained with planar electrodes to flow analysis of LiClO₄ standards. The developed assembly has great potential for pressure-driven flow methods. Finally, the development of high-performance C⁴D_C microchips will extend the range of applications of this technique as well as boosting the marketability of these devices to a competitive level. To the best of our knowledge, there are only two small-sized manufacturers producing C⁴D microfluidic platforms on the market and improvements in sensitivity could make C⁴D more competitive and more interesting to the analytical community.

Financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Grant No. 2010/08559-9) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) is gratefully acknowledged. Juliette Asdegegh Ohan and Professor Luiz Nunes de Oliveira

from São Carlos Institute of Physics (IFSC/USP) are also thanked for their help with the repeatability tests and calculation of the capacitances, respectively.

Notes and references

- J. Tanyanyiwa, E. M. Abad-Villar, T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, W. Hoffmann, A. E. Guber, D. Herrmann, A. Gerlach, N. Gottschlich and P. C. Hauser, *Analyst*, 2003, **128**, 1019–1022.
- J. Tanyanyiwa and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3010–3016.
- E. M. Abad-Villar, P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 3609–3614.
- X. Y. Gong and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 4375–4382.
- P. Tůma, E. Samková, F. Opekar, V. Jurka and K. Štulík, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 2174–2180.
- P. Kubán and P. C. Hauser, *Lab Chip*, 2008, **8**, 1829–1836.
- R. S. Lima, M. H. O. Piazzetta, A. L. Gobbi, U. P. Rodrigues-Filho, P. A. P. Nascente, W. K. T. Coltro and E. Carrilho, *Lab Chip*, 2012, **12**, 1963–1966.
- J. Wang, G. Chen, A. Muck Jr, M. P. Chatrathi, A. Mulchandani and W. Chen, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **505**, 183–187.
- A. Schuchert-Shi, P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 4690–4696.
- A. Schuchert-Shi and P. C. Hauser, *Anal. Biochem.*, 2008, **376**, 262–267.
- M. Vázquez, C. Frankenfeld, W. K. T. Coltro, E. Carrilho, D. Diamond and S. M. Lunte, *Analyst*, 2010, **135**, 96–103.
- P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 3169–3178.
- W. S. Law, P. Kubán, J. H. Zhao, S. F. Y. Li and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 4648–4655.
- Y. Chen, P. Yang, J. Li, D. Chen and G. Chen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **384**, 683–691.
- Q. Lu, P. Wu and G. E. Collins, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 3485–3491.
- J. J. P. Mark, A. Kumar, H. Demattio, W. Hoffmann, A. Malik and F. M. Matysik, *Electroanalysis*, 2011, **23**, 161–168.
- J. Wang, M. Pumera, G. Collins, F. Opekar and I. Jelinek, *Analyst*, 2002, **127**, 719–723.
- J. Wang, G. Chen, A. Muck Jr and G. E. Collins, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 3728–3734.
- J. Wang, G. Chen and A. Muck Jr, *Talanta*, 2009, **78**, 207–212.
- J. Wang, M. Pumera, G. E. Collins and A. Mulchandani, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 6121–6125.
- J. Wang, G. Chen and A. Muck, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 4475–4479.
- Y. Ding, C. D. Garcia and K. R. Rogers, *Anal. Lett.*, 2008, **41**, 335–350.
- Y. Ding and K. R. Rogers, *Electroanalysis*, 2008, **20**, 2192–2198.
- W. K. T. Coltro, R. S. Lima, T. P. Segato, E. Carrilho, D. P. De Jesus, C. L. Do Lago and J. A. F. Da Silva, *Anal. Methods*, 2012, **4**, 25–33.
- F. M. Matysik, *Microchim. Acta*, 2008, **160**, 1–14.
- E. X. Vrouwe, R. Luttge and A. van den Berg, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 1660–1667.
- V. Šolínová and V. Kašička, *J. Sep. Sci.*, 2006, **29**, 1743–1762.
- P. Kubán and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2013, **34**, 55–69.
- P. N. Nge, C. I. Rogers and A. T. Woolley, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 2550–2583.
- C. Y. Lee, C. M. Chen, G. L. Chang, C. H. Lin and L. M. Fu, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 5043–5050.
- Y. Xu, J. Liang, H. Liu, X. Hu, Z. Wen, Y. Wu and M. Cao, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 1583–1593.
- G. Fercher, W. Smetana and M. J. Vellekoop, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 2516–2522.
- K. A. Mahabadi, I. Rodriguez, C. Y. Lim, D. K. Maurya, P. C. Hauser and N. F. Rooij, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 1063–1070.
- P. Kubán and P. C. Hauser, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **607**, 15–29.
- J. Tanyanyiwa, B. Galliker, M. A. Schwarz and P. C. Hauser, *Analyst*, 2002, **127**, 214–218.
- R. S. Lima, P. A. G. C. Leão, A. M. Monteiro, M. H. O. Piazzetta, A. L. Gobbi, L. H. Mazo and E. Carrilho, *Electrophoresis*, 2013, DOI: 10.1002/elps.201300167, in press.
- T. P. Segato, W. K. T. Coltro, A. L. J. Almeida, M. H. O. Piazzetta, A. L. Gobbi, L. H. Mazo and E. Carrilho, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 2526–2533.
- J. Liu, F. Xu, S. Wang, Z. Chen, J. Pan, X. Ma, X. Jia, Z. Xu, C. Liu and L. Wang, *Electrochem. Commun.*, 2012, **25**, 147–150.
- R. S. Lima, T. P. Segato, A. L. Gobbi, W. K. T. Coltro and E. Carrilho, *Lab Chip*, 2011, **11**, 4148–4151.
- H. J. Kim, Q. Shao and Y. H. Kim, *Surf. Coat. Technol.*, 2003, **171**, 39–45.
- N. J. Farcich, J. Salonen and P. M. Asbeck, *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 2008, **56**, 2963–2971.

Electronic Supplementary Information

Highly sensitive contactless conductivity microchips based on concentric electrodes for flow analysis

Renato Sousa Lima,^{a,b,c} Maria Helena de Oliveira Piazzeta,^a Angelo Luiz Gobbi,^a Thiago Pinotti Segato,^{b,c} Murilo Feitosa Cabral,^{b,d} Sergio Antonio Spínola Machado,^b and Emanuel Carrilho^{*b,c}

^a Laboratório de Microfabricação, Laboratório Nacional de Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, Brasil;

^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil;

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, Campinas, Brasil;

^d Institute of Biology, Department of Genetics, Evolution and Bioagents, University of Campinas, Campinas, Brazil.

*emanuel@iqsc.usp.br

Electrode configurations in C⁴D microchips:

Fig. S1 illustrates the electrode assemblies usually employed for increasing the sensitivity of C⁴D systems (semicircular and dual top-bottom electrodes), as well as a microdevice incorporating planar electrodes.¹

Fig. S1 Configurations of electrodes in C⁴D microchips aiming the improvement of sensitivity. Microdevices integrating planar (a), semicircular (b), and dual top-bottom electrodes (c). Images: 1-3, schematic diagrams of the cross section in the detection zones for systems (a), (b), and (c), respectively.

Microfabrication steps:

The steps required for microfabrication of the C^4D microchip featuring concentric electrodes (designed as C^4D_C) are shown in **Fig. S-2**. The metal deposition process was carried out on the cover plate (planar electrode) and inside the microchannel that was etched in the substrate slide (semiconcentric electrode).

Fig. S-2 Steps for microfabrication of the C^4D_C systems used in this study. **A**, fabrication of the microchannels; **B**, deposition of the semiconcentric electrodes (inside the microchannel); **C**, insulation of the semiconcentric electrodes by SiO_2 ; **D**, deposition of the planar electrodes; **E**, insulation of the planar electrodes by PDMS; and **F**, sealing of the structure. The steps **B** and **D** are performed simultaneously, as well as **C** and **E** if the dielectric is the same.

Etching of the microchannels and air-trapping zones was performed sequentially with the solutions: *i*) 396 mL H_2O , 54 mL HF , and 270 g NH_4F for 14 min; *ii*) 150 mL H_2O , 150 mL HCl , and 150 mL HF for 3 min; and *iii*) HCl for 1 min under continuous stirring. Following the etching step, substrates were rinsed in excess acetone with the aid of ultrasound, washed with deionized water, and then dried with N_2 . The microchannels were fabricated in a cross-format configuration, with 15 and 55-

mm-long channels. The electrodes, in turn, were sputtered at 5 mm from the microchannel extremity. The adopted design presents narrow lines (10.0-mm-length and 0.2-mm-width) connecting the sensing electrodes (0.6-mm-gap and 1.0-mm²-area) and soldering pads at an angle of 45 degrees. After the deposition of the electrodes, the lift-off step was carried out by soaking the substrate in Al-etch, 20% HF, and acetone. Then, the glass slides were washed with deionized water and dried with N₂. Regarding the step for electrical insulation of the electrodes, SiO₂ was deposited by plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) featuring *ca.* 200-nm-thickness (in the microchannel top), whereas PDMS was spin-coated at 1,000 rpm for 10 s down to 50-μm-thickness.

Chemicals and instrumentation:

LiClO₄, NH₄F, NaOH, and sodium phosphate were supplied from Sigma-Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO). HF, HCl, acetone, AZ 400K developer, and AZ 4620/4210 resists were obtained from Clariant Corporation (Branchburg, NJ). All chemicals were of analytical grade or at the highest purity commercially available and used as received. All solutions were prepared utilizing deionized water (Milli-Q, Millipore Corp., Bedford, MA) with resistivity no less than 18 MΩ cm.

The instruments used in C⁴D_C microfabrication were: *i*) Karl Suss America Inc. MJB 3 UV 200 photoaligned (Waterbury, VT); *ii*) Headway Research Inc. EC101DT spinner (Garland, TX); *iii*) Oerlikon Balzers BA510 sputter (Schaumburg, IL); *iv*) Vacutec® VPS1500 plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) system (Randburg, South Africa); and *v*) O₂ Plasma Technology Inc. PE 80 (Hanover, NH). Microchannel parameters, area of the electrodes, and roughness mean square (RMS) values for glass surfaces were estimated by a Veeco Dektak 2210 profilometer (Branson, MO) with 4-μm-resolution. Field-emission gun scanning electron microscopy (SEM-FEG) images of the cross section of the sealed microchannel were carried out in a Philips XL 30 microscope (Eindhoven,

Netherlands). This instrument operated with tungsten thermionic filament, 15 kV potential, and secondary electron detector as analytical mode. In order to improve the contrast in the SEM-FEG micrographs, the samples were previously metalized using a Baltec MCS 010 sputter coater (Balzers, Liechtenstein). Finally, the analytical instrumentation required by the C^4D_C measurements consisted of three principal components, namely: *i*) alternating signal generator (Minipa MFG 4202, São Paulo, Brazil); *ii*) conductivity detector, whose electronic circuit was designed according to a previously reported scheme;³ and *iii*) two syringe-pumps for microfluidic handling (New Era Pump Systems Inc. NE-300, Wantagh, NY). Data acquisition was carried out using a software written in LabVIEW®.

Precision of the glass etching:

In C^4D_C the dimensions of the microchannel determine the detection cell volume, that is directly associated to the response in conductivity measurements. Thus, the analytical precision of the method is related, among other factors, to the precision of the glass etching; this process presented satisfactory intra- and inter-chip precisions. To evaluate this parameter, microchannels were etched in ten slides of glass and the depth and width (at the opening and bottom of the microchannel) values were measured in four distinct points for each slide ($n = 40$). The average global values were: $31.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (depth), $178.4 \pm 11.8 \mu\text{m}$ (width at the opening), and $73.1 \pm 1.4 \mu\text{m}$ (width at the bottom). The relative standard deviations (RSDs) for a same etched glass slide (intra-chip precision) obtained average values equals to: 1.0%, 6.7%, and 1.9% to depth, width at the opening, and width at the bottom of the microchannel, respectively. In addition, considering the average dimensional parameters achieved for the different glass slides (inter-chip precision), the RSDs were: 2.6% (depth), 6.3% (width at the opening), and 2.3% (width at the bottom). Finally, the roughness mean square (RMS) values of the non-etched and etched (microchannels) substrate regions were measured as 0.50 and 0.80 nm,

respectively. Regarding the air-trapping zones, such structures presented $180.7 \pm 7.3 \mu\text{m}$ in width and $31.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$ in depth ($n = 10$ for a unique slide).

Electrical insulation test of the electrodes:

In C^4D , there is no faradaic current so that the electrodes, which are insulated by a dielectric, essentially form capacitors with the electrolyte. **Fig. S3** illustrates an electrical model of the C^4D_C microchip with the following elements: *i*) resistance of the electrolyte solution (R), *ii*) capacitances of the solution and the semiconcentric (C_{SE}) and planar (C_{PE}) electrodes, and *iii*) a third capacitance resulting from the direct capacitive coupling between the electrodes, called stray capacitance (C_o). The latter affects adversely the sensitivity of the method as it increases the background. In general, C^4D measurements consist on the application of a RF signal to an electrode (excitation electrode, e_{exc}), which generates polarization of dipoles in the dielectric. This phenomenon induces a charge in the solution by forming an interfacial potential. In the region of the second electrode (receiving electrode, e_r) occurs an analogous process to the former, with induction of electric current in e_r .²

Fig. S3 Electric model of the C^4D_C electrode assembly. S, RF signal; D, detector; C_{SE} and C_{PE} , capacitances established between the solution and the semiconcentric and planar electrodes, respectively; e_{exc} and e_r , excitation and receiving electrodes, respectively; C_o , stray capacitance; and R , resistance of the solution.

Characterization of the dielectrics:

Micrographs for SiO₂ and PDMS dielectrics were obtained by atomic force microscopy (AFM) as shown in **Fig. S4**. The measurements were performed employing dielectric-coated glass plates with area of 1.0 cm² in tapping mode with constant force in a Veeco MultiModeTM SPM equipment (Plainview, NJ), containing 512 x 512 pixels of maximum resolution with optical detection. AFM images were collected at room temperature, 1.2 Hz rate, with scans covering an area of 5 μm x 5 μm. Both dielectrics presented smooth surfaces, with RMS values of 0.45 (SiO₂) and 0.46 (PDMS) nm. Owing to this smoothness, the electrode sensing area is approximately the same as the geometric area of the electrode.

Fig. S4 AFM images recorded for PDMS membrane (a) and SiO₂ nano-thin film (b). The peaks observed in figure (b) are due to the presence of particulate matter on the SiO₂ surface (the sample was not prepared in clean room).

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) characterized the SiO₂ dielectric film on a Kratos Analytical XSAM HS spectrometer (Spring Valley, NY) operating with non-monochromatic Mg K α radiation (1,253.6 eV in binding energy, E_B). It was necessary to fit the XPS curves due to the low spectral resolution (1.2 $\pm$ 0.1 eV). These fittings, which assisted us in the interpretation and characterization of the XPS lines, were processed with the software Winspec (kindly provided by the

Laboratoire Interdisciplinaire de Spectroscopie Électronique, installed at *Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix*, Belgium). Elucidation of the chemical composition of the film followed as previously described.⁴ PECVD-grown SiO₂ film exhibited high purity as illustrated in **Figure S-5**, with the percentage atomic concentrations of 55.6% O, 27.7% Si, 16.1% C, and 0.6% N. The latter is attributed to the deposition process of the dielectric by PECVD, which produces nitrogen as byproduct of the reactions in plasma.⁵ Deposited-vapor oxides present significantly greater uniformity than compounds thermally and chemically grown, representing an advantage when using this approach in electrophoretic separations or as substrate in chemical sensors.⁶

Fig. S5 XPS exploratory spectra (a) and N 1s peak photoemission line (b) recorded for SiO₂ nano-thin film. The E_B values and the percentage relative quantities are listed for each component in figure b.

Tests of electric insulation of the C⁴D electrodes:

The sensitivity in C⁴D decreases with the thickness of the dielectric. Commonly, the minimum thickness of the dielectric for C⁴D microdevices incorporating electrodes *i*) outside on the microchip lid and *ii*) in the same plane of the sample microchannel range between 100-200 μm and 0.1-40 μm, respectively.¹ Furthermore, the coating film should be thick enough to electrically insulate the electrodes from electrolytic solution in order to ensure contactless-mode capacitive measurement.

Thereby, the ideal dielectric thickness is related to its minimum value that effectively insulates the electrodes/sample system. Herein, cyclic voltammetry tested the insulation degree of the electrodes. PDMS/SiO₂-coated metal films were used as working electrodes. The voltammograms measured the capacitive current that arises from electrolyte polarization in the double layer;⁷ its absence indicated the effective electrical insulation of the electrodes.

The tests were performed at room temperature using an Eco Chemie Autolab PGSTAT 30 potentiostat (Utrecht, Netherlands). The system presented Ag/AgCl, Pt wire, and PDMS/SiO₂-coated metal films as reference, auxiliary, and working electrodes, respectively. The electrochemical cell volume (500 μ L) was delimited by a piece of PDMS, which was sealed reversibly onto glass upon contact under pressure. The electrode potential was swept in the positive direction between -0.4 and $+0.2$ V at 0.1 V s⁻¹. The electrolyte solution was phosphate buffer solution (pH 8). The pH was adjusted with 1 mol L⁻¹ NaOH or 1 mol L⁻¹ HCl. Sodium phosphate dibasic and potassium phosphate monobasic were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co.

The voltammograms measured the capacitive current that arises from electrolyte polarization in the double layer;⁷ its absence indicated the effective electrical insulation of the electrodes.

PDMS-coated electrodes

A PDMS membrane with $50\text{-}\mu\text{m}$ -thickness insulated the planar electrodes. Thinner membranes, desirable to achieve greater sensitivity, were not possible due to limited reproducibility of the deposition process used (spinning).⁸ In this case, we compared the exposed and PDMS-coated Ti/Au films as working electrodes. **Fig. S6 a** shows the voltammetric profiles obtained.

For the exposed Ti/Au films, capacitive currents of 230 nA were detected. For the PDMS-coated film, meanwhile, it was not seen any measurable capacitive current, or at least, no current larger than 3.0 nA, which is the lower limit-range of the potentiostat (10 nA at full scale).

Fig. S6 Cyclic voltammograms of 0.2 mol L⁻¹ phosphate solution (pH 8.0) employing Ti/Au films exposed and insulated by 50- μ m-thickness PDMS as working electrode **(a)** and Cr/Al films insulated by different thickness of SiO₂ as working electrodes **(b)**.

SiO₂-coated electrodes

The semiconcentric electrodes were insulated by a SiO₂ nano-thin film. The ideal thickness was studied by testing the insulation degree of Cr/Al films using SiO₂ in different thicknesses, namely: 100, 150, and 200 nm (at the microchannel top/center). The voltammetry profiles recorded for different thickness of SiO₂ are illustrated in **Fig. S6 b**.

For 100 and 150 nm SiO₂ we could still observe capacitive currents in the order of 40 and 20 nA, respectively. For 200 nm, meanwhile, any capacitive current at levels larger than 5 nA were observed; such value is below the lower limit-range of the potentiostat.

As consequence of the electric insulation tests, the thicknesses of 50 μ m (PDMS) and 200 nm (SiO₂, in the microchannel center) were adopted for insulation of the planar and semiconcentric electrodes, respectively, in the fabrication of the C⁴D_C microchips.

Flow analysis procedure:

The signals were recorded flowing either water or saline solution by two external syringe pumps through the microfluidic channels. First, water was circulated for approximately 5 min for signal stabilization. Once a stable signal was obtained, samples were introduced generating a potential change on the receiving electrode. Next, water was added resulting in a decrease of the signal nearly to its initial value. The analytical responses recorded in this study were associated to the signal difference after stabilization of the signal from the sample and its baseline (water) values. All measurements were taken at $20\ \mu\text{L min}^{-1}$ flow rate, 90 s sampling time, and at room temperature. In this study we actuated manually the syringe-pumps. Nevertheless, for higher precision assays, software-controlled valves could be employed. Finally, micropipette tips were used as reservoirs for buffer and sample solutions, which were fixed by epoxy glue on the substrate.

Optimization of the C^4D parameters:

To achieve an optimized performance for each electrode configuration, we used LiClO_4 standards ($1.0\ \text{mmol L}^{-1}$, 0.5 , and $0.3\ \mu\text{mol L}^{-1}$ for $\text{C}^4\text{D}_\text{P}$, $\text{C}^4\text{D}_\text{S}$, and $\text{C}^4\text{D}_\text{C}$, respectively) in flow analyses to select the optimum transduction parameters of frequency (kHz) and excitation voltage (V_p). In this case, signal-to-noise (S/N) ratios were achieved in function of the frequency under different voltage values. The sensitivity measured for $\text{C}^4\text{D}_\text{P}$, $\text{C}^4\text{D}_\text{S}$, and $\text{C}^4\text{D}_\text{C}$ microchips using LiClO_4 was calculated based on $\text{S/N ratio} = 3$. For construction of the calibration curves, five measurements for each concentration level were accomplished. Regarding the repeatability analyses, analytical signals were obtained using four microdevices at different days and by different operators; five measurements were performed for each microchip.

Fig. S7 depicts the S/N ratios in function of frequency under different voltage values. The behavior recorded to all electrodes is quite similar to that reported in literature for conventional

capillary⁹ and microchip electrophoresis.¹⁰ As can be seen in this figure, there is a maximum S/N ratio indicating the optimum operating frequency. Additionally, this maximum increased and shifted to lower frequencies as V_{p-p} increased. The optimum frequencies obtained were smaller for electrodes containing greater area. This fact is in agreement to the related theory.¹ The highest values were 10 (C^4D_P), 5 (C^4D_S), and 2 kHz (C^4D_C). Regarding to the excitation voltage, its optimum value was 10.0 V_{p-p} for all microchips.

Fig. S7 Optimization of the C^4D parameters. Variations of the S/N ratio in function of frequency under different potentials using C^4D_P (a), C^4D_S (b), and C^4D_C (c) microchips to 1,000.0, 0.5, and 0.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ LiClO_4 standards, respectively. The optimum operating frequency is highlighted for each potential. The colors specified in (a) for the different peak-to-peak potentials are the same in (b) and (c). Conditions: 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ flow rate and 90 s salt-injection time.

Analytical calibration curves:

For construction of the calibration curves, five measurements for each concentration level were accomplished. The achieved results are shown in **Fig. S8**.

Fig. S8 Sensitivity test. Calibration curves achieved for LiClO_4 standards using $\text{C}^4\text{D}_\text{P}$ (a), $\text{C}^4\text{D}_\text{S}$ (a,b), and $\text{C}^4\text{D}_\text{C}$ (a,b) microchips. In figure (a), the logarithm was applied to signal and concentration in order to visualize all the obtained curves. Conditions: $20 \mu\text{L min}^{-1}$ flow rate, 90 s salt-injection time, 10 ($\text{C}^4\text{D}_\text{P}$), 5 ($\text{C}^4\text{D}_\text{S}$), and 2 kHz ($\text{C}^4\text{D}_\text{C}$) in frequency and 10 V_p potential.

Repeatability test:

The $\text{C}^4\text{D}_\text{C}$ presented satisfactory intra-chip precision and repeatability levels. Such parameters were evaluated by flow analyses with 25 nmol L^{-1} LiClO_4 in water employing $\text{C}^4\text{D}_\text{C}$ microchips. **Fig. S9** shows the average analytical signals obtained with four microdevices at different days and by different operators; each microchip performed five measurements. The experimental was carried out as described in **Fig. S8**, with the same conditions for flow and detection settings. The relative standard deviations (RSDs) shown in **Table S1** indicate that the microfabrication process and, thus, the developed device presented good precision and repeatability.

Fig. S9 Average signals obtained for 25 nmol L⁻¹ LiClO₄ using C⁴D_C microchips at different days and by different operators (distinct color sets). Conditions: 20 μL min⁻¹ flow rate, 90 s sampling time, 2 kHz frequency, and 10 V_{P-P} potential.

Table S1 RSDs for intra-chip precision and the repeatability of the method. Data refer to the signals obtained for 25 nmol L⁻¹ LiClO₄ using C⁴D_C microchips in different days (n = 5). Conditions: same as shown in **Fig. S8**

	<i>Intra-chip precision (%)</i> [†]	<i>Repeatability (%)</i> [‡]
Microdevice 1	7.7 and 6.4	-
Microdevice 2	14.3 and 7.7	-
Microdevice 3	12.6 and 9.7	-
Microdevice 4	8.4 and 13.3	-
-	-	13.7

[†] Calculated regarding the data achieved for each microchip in two different analysis days;

[‡] Overall variability calculated from all obtained signals – repetitions for different chips in different days.

Calculation of the capacitances:

Capacitance of the planar electrode/PDMS/solution system

The capacitance (*C*) represents the ability of a system in accumulating charges (*q*) under a given applied potential (*V*). Mathematically:¹¹

$$C = \frac{q}{V} \quad (1)$$

In C⁴D there is no faradaic current so that the electrode/dielectric/solution systems present behavior similar to a capacitor. The planar electrode is characterized as a parallel plate capacitor. Considering the Gauss's law to mathematical description of C . When the plates (electrode and solution in C⁴D) are very close to each other, we can neglect the edge effect of the electric field. Therefore, the electric field will be linear throughout the Gaussian surface. In this case, the capacitance for the planar electrode (C_P) is given by:¹¹

$$C_P = \frac{\epsilon_{PDMS} \epsilon_o A_P}{d_P} \quad (2)$$

being ϵ_{PDMS} the dielectric constant of the PDMS membrane that insulates the electrode, ϵ_o the permittivity constant of the free space (8.85 pF m⁻¹), A_P the area of the planar electrode, and d_P the distance between electrode and solution representing, thus, the thickness of the PDMS dielectric.

Capacitance of the semiconcentric electrode/SiO₂/solution system

For calculation of the capacitance (C_S) in this situation, seven capacitors connected in parallel are considered for characterization of the semiconcentric electrode/SiO₂/solution system as shown in **Fig. S10**.

Based on **Fig. S10**, C_S will be given by:

$$C_S = \sum_{i=1}^7 C_i \quad (3)$$

Fig. S10 Capacitors representing the semiconcentric electrode/SiO₂/solution system.

Assuming symmetry between the left and right parts of the capacitor, we have that: $C_1 = C_7$, $C_2 = C_6$, and $C_3 = C_5$. Other contour conditions taken into account include: *i*) electric field linear throughout all detection cell, *ii*) thickness of the dielectric constant for each capacitor, and *iii*) distribution of the thin films (electrode and SiO₂) in the etched microchannel as a geometry in which $C_1/C_4/C_7$ and $C_2/C_3/C_5/C_6$ can be characterized by parallel plate and cylindrical capacitors, respectively (see **Figure 2** in the main text and **Fig. S9**). Thereby, neglecting the roughness of the electrode and dielectric surfaces, we will have:¹¹

$$C_1 = \frac{\epsilon_{SiO_2} \epsilon_o A_1}{d_1}, \quad C_1 = C_7 \quad (4)$$

$$C_2 = \frac{2\pi}{n} \epsilon_{SiO_2} \epsilon_o \frac{L}{\ln\left(\frac{d_2 - a}{a}\right)}, \quad C_2 = C_6 \quad (5)$$

$$C_3 = \frac{2\pi}{m} \varepsilon_{SiO_2} \varepsilon_o \frac{L}{\ln\left(\frac{d_3 - a}{a}\right)}, \quad C_3 = C_5 \quad (6)$$

$$C_4 = \frac{\varepsilon_{SiO_2} \varepsilon_o A_4}{d_4} \quad (7)$$

being ε_{SiO_2} the dielectric constant of the SiO_2 film that insulates the electrode, A_i/d_i the parameters of area and dielectric thickness considered for each region of the capacitor shown in the **Fig. S10**, L the length of the external plate, and a the radius of the internal plate of the cylindrical capacitor. From the equations (4–7), the capacitance of the semiconcentric electrode/ SiO_2 /solution system will be:

$$C_S = \frac{2\varepsilon_{SiO_2} \varepsilon_o A_1}{d_1} + \frac{4\pi}{n} \varepsilon_{SiO_2} \varepsilon_o \frac{L}{\ln\left(\frac{d_2 - a}{a}\right)} + \frac{4\pi}{m} \varepsilon_{SiO_2} \varepsilon_o \frac{L}{\ln\left(\frac{d_3 - a}{a}\right)} + \frac{\varepsilon_{SiO_2} \varepsilon_o A_4}{d_4} \quad (8)$$

As can be observed in equation (8), C_S increases linearly with the electrode area ($A \propto L$, being $A = 2\pi rL$). On the other hand, the contribution of the dielectric thickness for the changes in the capacitance is more pronounced; C_S increases with the reduction of the natural logarithm of the thickness for C_2 , C_3 , C_5 , and C_6 . Additionally, this change is linear for C_1 , C_4 , and C_7 .

Capacitance of the concentric electrode/ SiO_2 /solution system

As shown in **Fig. S3**, the capacitance related to the concentric electrode/ SiO_2 /solution system (C_C) is given by:

$$C_C = C_P + C_S \quad (9)$$

Substituting (2) and (8) in (9):

$$C_C = \frac{\epsilon_{PDMS}\epsilon_o A_P}{d_P} + \frac{2\epsilon_{SiO_2}\epsilon_o A_1}{d_1} + \frac{4\pi}{n}\epsilon_{SiO_2}\epsilon_o \frac{L}{\ln\left(\frac{d_2-a}{a}\right)} + \frac{4\pi}{m}\epsilon_{SiO_2}\epsilon_o \frac{L}{\ln\left(\frac{d_3-a}{a}\right)} + \frac{\epsilon_{SiO_2}\epsilon_o A_4}{d_4} \quad (10)$$

LOD values described in literature using C⁴D and pressure-driven flow:

Table S2 LOD values reported in literature for methods based on C⁴D and pressure-driven flow

Separation Method	Analytes and Samples	Dielectric [†]	LOD (μmol L ⁻¹) [‡]	Reference
<i>Gas diffusion</i>	Total inorganic carbon	1,333.5 μm PTFE*	0.6	12
	Total inorganic carbonate	5 μm polyimide	19	13
	Calcium carbonate in cement	600 μm PEEK*	2.5	14
	Ammonium in rainwater	170 μm fused-silica	0.8	15
	Inorganic carbon in estuary	600 μm Teflon	120	16
<i>HPLC</i>	Peptides	340 μm fused-silica	0.04	17
	Proteins	340 μm fused-silica	0.21	17
	Fatty acids in vegetable oils	110 μm fused-silica	352 x 10 ³	18
	Fatty acids in vegetable oils	110 μm fused-silica	1.1	19
	Organic acids	675 μm fused-silica	0.7	20
<i>Ion chromatography</i>	Inorganic anions	215 μm fused-silica	12	21
	Inorganic cations in water samples	500 μm PEEK	0.15	22
	Inorganic cations in water samples	290 μm fused-silica	0.8	23
	Inorganic anions	240 μm fused-silica	1.2	24

[†] The thicknesses of each dielectric film are presented at μm unit;

[‡] Only the lower obtained values are shown;

* Abbreviations: polytetrafluoroethylene, PTFE, and polyether ether ketone, PEEK.

References:

1. W. K. T. Coltro, R. S. Lima, T. P. Segato, E. Carrilho, D. P. de Jesus, C. L. do Lago, J. A. F. da Silva, *Anal. Met.*, 2012, **4**, 25.

2. R. S. Lima, M. H. O. Piazzetta, A. L. Gobbi, U. P. Rodrigues-Filho, P. A. P. Nascente, W. K. T. Coltro, E. Carrilho, *Lab Chip*, 2012, **12**, 1963.
3. J. A. F. da Silva, C. L. do Lago, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4339.
4. NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database. 05 June 2006. Produced by Wagner, C. D.; Naumkin, A. V.; Kraut-Vass, A.; Allison, J. W.; Powell, C. J.; Rumble, J. R. Available in: <http://srdata.nist.gov/xps/selectEnergyType.aspx>, accessed in March 2012.
5. H. Randhawa, *Thin Solid Films*, 1991, **196**, 329.
6. S. Fiorilli, P. Rivolo, E. Descrovi, C. Ricciardi, L. Pasquardini, L. Lunelli, L. Vanzetti, C. Pederzoli, B. Onida, E. Garrone, *J. Colloid Interf. Sci.*, 2008, **321**, 235.
7. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons: New York, 2001.
8. T. P. Segato, W. K. T. Coltro, A. L. J. Almeida, M. H. O. Piazzetta, A. L. Gobbi, L. H. Mazo, E. Carrilho, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 2526.
9. J. A. F. da Silva, N. Guzman, C. L. do Lago, *J. Chromatogr. A*, 2002, **942**, 249.
10. W. K. T. Coltro, J. A. F. da Silva, E. Carrilho, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 2260.
11. D. Halliday, R. Resnick, J. Walker, *Fundamentals of Physics*, New York: Ed. John Wiley & Sons, 6th ed., 2001.
12. Hoherčáková, Z.; Opekar, F. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *551*, 132–136.
13. Hoherčáková, Z.; Opekar, F.; Štulík, K. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1924–1930.
14. Sereenonchai, K.; Teerasong, S.; Chan-Eam, S.; Saetear, P.; Choengchan, N.; Uraisin, K.; Amornthammarong, N.; Motomizu, S.; Nacapricha, D. *Talanta* **2010**, *81*, 1040–1044.
15. Braz, H. L.; Ito, D. T.; da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L.; Pedrotti, J. J. *Electroanalysis* **2011**, *23*, 2594–2600.
16. Pencharee, S.; Faber, P. A.; Ellis, P. S.; Cook, P.; Intaraprasert, J.; Grudpan, K.; McKelvie, I. D. *Anal. Methods* **2012**, *4*, 1278–1283.
17. Kubáň, P.; Hauser, P. C. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1176*, 185–191.
18. Makahleh, A.; Saad, B.; Siang, G. H.; Saleh, M. I.; Osman, H.; Salleh, B. *Talanta* **2010**, *81*, 20–24.
19. Makahleh, A.; Saad, B. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *694*, 90–94.
20. Mark, J. J. P.; Coufal, P.; Opekar, F.; Matysik, F. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 1669–1676.
21. Riordáin, C. Ó.; Gillespie, E.; Connolly, D.; Nesterenko, P. N.; Paull, B. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1142*, 185–193.
22. Kubáň, P.; Pelcová, P.; Kubáň, V.; Klakurkova, L.; Dasgupta, P. K. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 2745–2753.
23. Kiplagat, I. K.; Kubáň, P.; Pelcová, P.; Kubáň, V. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 5116–5123.
24. Zhang, Z.; Li, D.; Liu, X.; Subhani, Q.; Zhu, Y.; Kang, Q.; Shen, D. *Analyst* **2012**, *137*, 2876–2883.

ANEXO V

**Glass/PDMS hybrid microfluidic device integrating vertically aligned
SWCNTs to ultrasensitive electrochemical determinations**

Cite this: *Lab Chip*, 2012, 12, 1959–1962

www.rsc.org/loc

COMMUNICATION

Glass/PDMS hybrid microfluidic device integrating vertically aligned SWCNTs to ultrasensitive electrochemical determinations†

Fernando Cruz Moraes,^a Renato Sousa Lima,^{ab} Thiago Pinotti Segato,^{ab} Ivana Cesarino,^a Jhanisus Leonel Melendez Cetino,^c Sergio Antonio Spinola Machado,^a Frank Gomez^c and Emanuel Carrilho^{*ab}

Received 9th February 2012, Accepted 20th April 2012

DOI: 10.1039/c2lc40141j

This communication reports a promising platform for rapid, simple, direct, and ultrasensitive determination of serotonin. The method is related to integration of vertically aligned single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) in electrochemical microfluidic devices. The required microfabrication protocol is simple and fast. In addition, the nanomaterial influenced remarkably the obtained limit-of-detection (LOD) values. Our system achieved a LOD of 0.2 nmol L⁻¹ for serotonin, to the best of our knowledge one of the lowest values reported in the literature.

Glass/elastomer hybrid microfluidic platforms with integrated electrochemical detectors are powerful analytical tools. Their main advantages include: (i) low cost; (ii) chemical inertia; (iii) optical transparency; (iv) thermal, mechanical, and chemical stability; (v) automation capacity, and; (vi) easy microfabrication. In addition, they offer high values of reproducibility and sensitivity.^{1–3} Glass is widely used for the deposition of metallic thin films, which act as electrodes.⁴ Poly(dimethylsiloxane) (PDMS), in turn, is the elastomer most frequently used to fabricate microstructures. PDMS has a high heat distortion temperature (200 °C) and low surface energy (20 erg cm⁻²), making it the elastomer of choice for microfabrication processes. This polymer can be easily patterned *via* soft lithography and sealed against many flat surfaces, reversibly or irreversibly, facilitating the integration of valves, pumps, reactors, and detectors in chips.⁵ Additionally, transparency and gas permeability are useful properties for cell culture assays. Finally, the adsorption/absorption of hydrophobic small molecules onto/into the porous structure of the PDMS allows its use in microextraction techniques. Nevertheless, this phenomenon can change the concentration of analyte in the sample and the experimental outcomes at other applications. Some methods that aim to reduce the effects of the adsorption and absorption in PDMS channels can be found in the literature.^{6,7}

Recent papers reported the use of non-aligned carbon nanotubes (CNTs), multi- (MWCNTs) and single-walled (SWCNTs) carbon nanotubes, in electrochemical microdevices for flow analysis.^{8–13} This platform was applied also in a capillary electrophoresis (CE) microchip.^{14,15} Applications in electrophoretic systems, meanwhile, exhibit drawbacks related to interferences between the electric fields of detection and separation.⁴ CNT is a nanomaterial broadly used for the development of detectors and sensors.^{16–18} Such compounds aggregate advantages which can improve the selectivity and sensitivity of the analytical method. Their main characteristics include: (i) high area/volume ratio (electrocatalytic activity); (ii) good thermal and chemical stabilities; (iii) conducting (ideal for nanoscale electrodes)¹⁹ or semiconducting (excellent for nanoscale field effect transistors)²⁰ behavior; and (iv) high surface area.¹⁸ The performance of electrochemical CE microchips with different electrode substrates covered by MWCNTs and SWCNTs was evaluated by Pumera *et al.*²¹ CNTs-modified electrodes displayed the best signal/noise (S/N) ratio and resolution when compared with a bare electrode, reflecting the electrocatalytic power and the increase of the surface area by this nanomaterial.

A potential alternative in improving the electronic characteristics of the CNTs is the use of vertically aligned carbon nanotubes using single-stranded DNA (ssDNA) as an anchor group. Different articles described procedures for alignment of CNTs; these reports showed that the detectors/sensors integrating aligned CNTs exhibit fast electronic transfer, electrocatalysis, and high sensitivity in electrochemical assays.^{22,23}

This communication describes a rapid, simple, portable, direct, and ultrasensitive approach to electrochemical determination of serotonin in a glass/PDMS microfluidic device with vertically aligned SWCNTs. Serotonin is the major neurotransmitter in the brain and alterations of its levels in humans can be related to some diseases such as Alzheimer's, infantile autism, sleeping disorders, depression, and bulimia.^{24,25} Different techniques have been used to quantify this neurotransmitter, including indirect (LC-MS and CE-LIF) and direct methods, which consist of electrochemical sensors/detectors.^{24–29} The main interferents for serotonin in electrochemical analysis are dopamine, ascorbic acid, and uric acid. In this context, CNTs provide many active sites that enhance the sensitivity and resolution (in terms of oxidation potential) in voltammetry. Thus, it becomes unnecessary to modify the surface

^aInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil. E-mail: emanuel@iqsc.usp.br; Fax: +55 16 3373 9975; Tel: +55 16 3373 9441

^bInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, Campinas, Brazil

^cCalifornia State University Los Angeles, Los Angeles, CA, USA

† Published as part of a themed issue in collaboration with the III International Workshop on Analytical Miniaturization and NANOTECHNOLOGIES, Barcelona, 2012.

of CNTs, to pre-treat the sample, or to use separation techniques for specific determinations of serotonin in complex matrices such as biological samples.²⁹ Considering these implications, we developed a SWCNTs-based voltammetric system in order to achieve a high-throughput tool for serotonin assay. Additionally, the method contemplates inherent advantages associated with microfluidic, hybrid microchips, and vertically aligned SWCNTs.

The fabrication of the microdevices involved the following main steps: (i) sputtering deposition of the electrodes (Ti/Au) on a flat glass bottom, (ii) molding of the PDMS microchannels by soft lithography, (iii) sealing of the glass/PDMS device irreversibly, and (iv) immobilizing of the SWCNTs *in situ* over a working electrode. More details about steps (i)–(iii) can be found in ref. 30 and 31. Fig. 1 illustrates the microchip layers (Fig. 1a) and a photo of the resulting device (Fig. 1b), showing the Au thin films functioning as working (WE), counter (CE), and pseudo-reference electrodes (RE). The microfluidic channels were shaped in a Y-configuration (two inlets and one outlet) with 250 μm width and 50 μm height, whereas the electrodes presented 1.0 mm of width and spacing.

The SWCNTs immobilization was carried out as follows. Prior to the modification of the Au surface, 100 mg SWCNTs (98% purity, NanoLab, Waltham, MA, USA) synthesized by thermal chemical vapor deposition were mixed with 100 mL $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (3 : 1, v/v) solution for 12 h aiming to promote the CNTs functionalization.³² The SWCNTs were then filtered through a Millipore Nylon[®] filter membrane. The resulting nanotubes were continuously washed using distilled water until the pH of the filtrate was neutral. In the sequence, SWCNTs were dried overnight in a vacuum oven at 120 $^\circ\text{C}$. The formation of the ssDNA/SWCNT hybrid on Au surface was based on the work of Zheng *et al.*³³ (thiol-terminated ssDNA with the following sequence 5-HS-TGG-GGT-TTA-TGG-AAA-TTG-GAA-3' was purchased from SinapseBiotecnologia, São Paulo, Brazil). First, ssDNA wraps the CNTs by π - π interactions, which involve aromatic rings of the ssDNA molecule nucleotide

bases and the hydrophobic side of CNTs; the hydrophilic (sugar-phosphate) of ssDNA is left exposed to interactions with the medium. The formed ssDNA/SWCNTs hybrid is then assembled on the Au surface by spontaneous adsorption of thiol groups. For this, 1.0 mg functionalized SWCNTs was mixed with 500 μL of 1.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ssDNA solution. The latter was prepared in 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer solution (PBS) containing 10% sodium chloride (v/v). Next, the mixture was sonicated using an ultrasonic horn probe and then centrifuged at 7000 rpm; each process took 45 min. Finally, the supernatant solution was collected and then pumped into the microfluidic channel until it reached the detection zone on WE (Fig. 1b). Self-assembled monolayers (SAMs) consisting of ssDNA/SWCNT were formed after 24 h in a refrigerated room at 4 $^\circ\text{C}$.

The morphological characteristics of the electrodes were examined by atomic force microscopy (AFM) using a model Nanosurf EasyScan 2 AFM System (Nanosurf AG, Switzerland). The measurements were carried out with non-contact/tapping mode, long cantilever. Fig. 1c displays a typical image of the gold surface, which was shown to be flat and smooth. Based on Au surface topography analyses, the root mean square (RMS) roughness was 1.5 nm. Fig. 1d shows the WE after alignment procedure of the SWCNTs. In this image, we observed that the SWCNTs were vertically aligned and bundled. The RMS roughness was 55 nm whereas the SWCNTs average height was equal to 123.9 nm with relative standard deviation (RSD) of 11.8%.

Flow analyses were carried out in order to assess the electrochemical behaviour of the serotonin, study the interference level of the ascorbic (AA) and uric (UA) acids, and quantify serotonin standards by chronoamperometry. The device has two inlets and one outlet (for waste) vias as shown in Fig. 1b. Measurements of the current were performed in real time while either buffer or analyte solution was flowing through the microfluidic channels (in cyclic voltammetry (CV) the measurements were performed under stationary flow). Two external syringe pumps model NE-300 (New Era Pump Systems Inc., Farmingdale, NY, USA) were used.

The electrochemical behavior of serotonin at the Au/ssDNA/SWCNT electrode was evaluated in solution containing 0.1 mol L^{-1} PBS (pH 6.0) and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ serotonin. The experiments were carried out by CV using a scan rate of 50 mV s^{-1} and differential pulse voltammetry (DPV), with an amplitude of 100 mV and a step potential equal to 2 mV. All electrochemical measurements were performed using a model PGSTAT 30 Autolab electrochemical system (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands) equipped with PGSTAT-12 and GPES software (Eco Chemie). The results are presented in Fig. 2.

As verified in Fig. 2a, the Au/ssDNA/SWCNT electrode exhibited a well-defined oxidation peak at a potential value of +400 mV. This peak is attributed to an irreversible oxidation of the hydroxyl group present in the aromatic ring of the serotonin forming ketone species.³⁴ The Au/ssDNA/SWCNT surface caused a shift of 140 mV in the oxidation potential of serotonin to a less positive value when compared to the bare Au electrode (+540 mV). Additionally, the oxidation on such a catalytic surface showed a 3-fold increase in peak current compared to the unmodified one. The shift in the potential value and the increase in the current peak reflect, respectively, the electrocatalytic activity and the increase of the electroactive surface area by the aligned

Fig. 1 Microfluidic device and morphologic characterization of the working electrode. Schematic diagram of the layers that compose the microchip (a), photo of the device (b), and AFM images of the unmodified Au electrode (c) and Au modified with SWCNTs surfaces (d). WE, CE, and RE are working (containing the SWCNTs), counter, and pseudo-reference electrodes, respectively, and PBS is phosphate buffer solution.

Fig. 2 Electrochemical characterization of the system (a) and study of interferents (b). CV and DPV (inset) experiments for Au (gray lines) and Au/ssDNA/SWCNT (blue lines) electrodes in solution containing 0.1 mol L⁻¹ PBS (pH 6.0) and 100 μmol L⁻¹ serotonin (a). DPV experiments for Au/ssDNA/SWCNT electrodes in solution with 0.1 mol L⁻¹ PBS (pH 6.0), concentrations of ascorbic acid (AA) and uric acid (UA) fixed at 10 μmol L⁻¹, and sequential additions of serotonin standards in the following concentrations: 10, 50, and 100 μmol L⁻¹ (b). Conditions: 50 mV s⁻¹ scan rate (CV), 100 mV amplitude (DPV), 2 mV step potential (DPV).

SWCNTs. Such properties make the Au/ssDNA/SWCNT hybrid a promising setup for serotonin detection as discussed below.

The interference of AA and UA is one of the main problems in the electrochemical determination of serotonin in biological fluids. In this sense, the significance of the interference of these species in the electrooxidation process of the serotonin on the Au/ssDNA/SWCNT surface was evaluated. The experiments were carried out using DPV with optimized parameters (see below) in solutions with 0.1 mol L⁻¹ of PBS (pH 6.0), concentrations of AA and UA fixed at 10 μmol L⁻¹, and sequential additions of 10, 50, and 100 μmol L⁻¹ serotonin. Fig. 2b shows some of the results. It can be noted that, even at equal concentrations of AA, UA, and serotonin, there is no overlap of the serotonin oxidation peak with AA and UA peaks in the voltammetric profile. Instead, with the increase in the concentration of serotonin, the procedure yielded totally separated responses for all species, indicating thus that the Au/ssDNA/SWCNT electrode is adequate to be used for selective determination of serotonin in the presence of AA and UA.

Before the chronoamperometric determination of serotonin standards, some experimental parameters (sample and carrier flow rate and potential) were optimized. The influence of the applied potential in the amperometric detection was investigated in order to maximize the analytical signal and to improve the sensitivity of the method. The following working potential values were investigated: +0.2, +0.3, +0.4, +0.5, and +0.6 V. The transient signal of the current has a maximum value at +0.4 V indicating the best operating potential; therefore +0.4 V was chosen as the working potential for the subsequent studies. The effect of the sample flow rate, ranging from 5.0 to 30.0 μL min⁻¹ on the analytical signal, was evaluated by injecting (5 s) 100 μmol L⁻¹ serotonin solution in 0.1 mol L⁻¹ PBS (pH 6.0). The flow rate of the carrier (0.1 mol L⁻¹ PBS, pH 6.0) was fixed at 5.0 μL min⁻¹. The transient signal of the current increased with the sample flow rate in the studied range so that the optimal flow rate was of 30.0 μL min⁻¹. Using the same solution and injection time, the effect of the carrier flow rate was also investigated in a range from 5.0–30.0 μL min⁻¹ with the sample flow rate kept constant at 5.0 μL min⁻¹. The current decreased with increase of the carrier flow rate in the studied range. Thus, the optimal carrier flow rate was 5.0 μL min⁻¹.

Using the optimized conditions as previously described, chronoamperometry was used to investigate the electrochemical response as a function of the analyte concentration. In this study, microfluidic devices containing Au and Au/ssDNA/CNTs as the working electrodes were employed. Serotonin standards were used for construction of the calibration curves as shown in Fig. 3a. We performed three measurements for each concentration level. Fig. 3b presents the signals recorded for the Au/ssDNA/CNTs electrode, which correspond to the current peak of serotonin oxidation.

The analytical signals exhibited a linearity range from the limits-of-detection (LOD) up to 10.0 μmol L⁻¹ for both Au ($R^2 = 0.9969$) and Au/ssDNA/SWCNT ($R^2 = 0.9991$) electrodes. The detectability levels were remarkably influenced by the use of SWCNTs: LODs equal to 11.8 (Au) and 0.2 nmol L⁻¹ (Au/ssDNA/SWCNTs) were determined using 3σ/slope ratio (σ is the standard deviation of the mean current for 10 chronoamperograms of the blank). The calculations proceeded according to the recommendations of IUPAC.³⁵ The 0.2 nmol L⁻¹ LOD is 25 times lower than previous values reported in the literature (5.0 nmol L⁻¹), obtained by a SWCNT-modified glassy carbon electrode.²⁹ The effect of the aligned SWCNTs can be further evaluated from the values of the analytical sensitivity, which were almost three times higher with Au/ssDNA/SWCNT (4.54 nA μmol⁻¹ L) than that obtained with the unmodified Au surface (1.33 nA μmol⁻¹ L).

Serotonin has been determined by several techniques, which integrate separation methods—such as liquid chromatography^{36–38} and capillary electrophoresis³⁹—or direct assays using potentiometry^{27,29,40} and sensor-based applications.^{41,42} In general, as verified in Table 1, our set up shows a LOD lower than those reported in the literature even when a preconcentration step was employed.

The inter-assay precision (microfabrication reproducibility) of the Au/ssDNA/SWCNTs microdevice was measured from five experiments on different days. Prior to each experiment, the electrode surfaces were rinsed thoroughly with double-distilled water. Then, seven injections of 100 μmol L⁻¹ serotonin in 0.1 mol L⁻¹ PBS (pH 6.0) were performed for each microchip. The RSD was calculated as 2.3%. In addition, intra-assay precision tests were performed from ten injections of that same solution. The RSD was found to be 1.7%. Finally, the analytical frequency of the

Fig. 3 Chronoamperometric determinations of serotonin standards. Analytical calibration curves obtained in microfluidic devices integrating the Au (gray circles) and Au/ssDNA/CNTs (blue circles) electrodes (a) and signals associated with the Au/ssDNA/CNTs electrode (b). Conditions: solution containing 0.1 mol L⁻¹ PBS (pH 6.0) and serotonin standards. Potential, injection time, and sample-carrier flow rate are the same as described in Fig. 2.

Table 1 Comparison of a few reported values for LOD of serotonin

Detector	LOD (nmol L ⁻¹)	Reference
Potentiometry (using MWCNT-modified glassy carbon electrode)	500	27
Potentiometry (using SWCNT-modified glassy carbon electrode)	100	29
HPLC-mass spectrometry	18.2	37
CE with microwave extraction, sample stacking, and preconcentration	7.9	39
Potentiometry (using modified indium tin oxide electrode)	0.1	40
Potentiometry (using Au/polypyrrole-modified glassy carbon electrode)	1.0	41
Electrochemical sensor (using cyclodextrin)	200	42
Microfluidic device with aligned SWCNTs	0.2	This work

Au/ssDNA/SWCNTs microfluidic device for serotonin detection was calculated in 55 determinations per hour.

The use of vertically aligned SWCNTs in an electrochemical microfluidic device demonstrated to be a promising alternative to improve electrochemical determination of important biomarkers such as serotonin. Regarding the use of Au as the working electrode in chronoamperometry measurements, the Au/ssDNA/SWCNTs system improved the analytical sensitivity almost three fold. There are a number of advantages in using glass/elastomer microfluidic platforms with electrochemical detectors, including: (i) low cost; (ii) easy microfabrication; (iii) automation capacity; (iv) good analytical frequency; (v) reproducibility, and; (vi) increased sensitivity.

Financial support for this project was provided by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Grants Nr 2010/08559-9, 2010/11049-2, 2010/11567-3, and 2010/038013-4), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant 476523/2009-5), and the National Science Foundation (NSF) that offers regular exchange of North American students between Brazil and USA. The authors would like to thank Angelo L. Gobbi and Maria H. O. Piazzetta for their assistance with the microfabrication process. Laboratório Nacional de Nanotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) is also recognized for its support.

References

- 1 F. Sassa, K. Morimoto, W. Satoh and H. Suzuki, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 1787.
- 2 N. H. Moreira, A. L. J. Almeida, M. H. O. Piazzetta, D. P. de Jesus, A. Deblire, A. L. Gobbi and J. A. F. da Silva, *Lab Chip*, 2009, **9**, 115.
- 3 D. Qin, Y. N. Xia and G. M. Whitesides, *Nat. Protoc.*, 2010, **5**, 491.
- 4 W. K. T. Coltro, R. S. Lima, T. P. Segato, E. Carrilho, D. P. de Jesus, C. L. do Lago and J. A. F. da Silva, *Anal. Methods*, 2012, **4**, 25.
- 5 H. Becker and C. Gärtner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 89.
- 6 M. W. Toepke and D. J. Beebe, *Lab Chip*, 2006, **6**, 1484.
- 7 J. K. Kallio and P. J. Kallio, *IEEE Eng. Med. Biol. Sci.*, 2006, **1**, 2688.
- 8 A. G. Crevillén, M. Ávila, M. Pumera, M. C. González and A. Escarpa, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 7408.
- 9 N. V. Panini, G. A. Messina, E. Salinas, H. Fernández and J. Raba, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, **23**, 1145.
- 10 A. G. Crevillén, M. Pumera, M. C. González and A. Escarpa, *Lab Chip*, 2009, **9**, 346.
- 11 L. Yang, M. Li, Y. Qu, Z. Dong and W. J. Li, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 3198.
- 12 C. Karuwan, A. Wisitsoraat, T. Maturos, D. Phokharatkul, A. Sappat, K. Jaruwongrunsee, T. Lomas and A. Tuantranont, *Talanta*, 2009, **79**, 995.
- 13 C. C. Hong, C. Y. Wang, K. T. Peng and I. M. Chu, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 3620.
- 14 M. Pumera, X. Llopis, A. Merkoci and S. Alegret, *Microchim. Acta*, 2006, **152**, 161.
- 15 G. Chen, *Talanta*, 2007, **74**, 326.
- 16 A. Qureshi, W. P. Kang, J. L. Davidson and Y. Gurbuz, *Diamond Relat. Mater.*, 2009, **18**, 1401.
- 17 O. A. Sadik, A. O. Aluoch and A. Zhou, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 2749.
- 18 I. Cesarino, F. C. Moraes and S. A. S. Machado, *Electroanalysis*, 2011, **23**, 2586.
- 19 D. Krapf, B. M. Quinn, M. Y. Wu, H. W. Zandbergen, C. Dekker and S. G. Lemay, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 2531.
- 20 I. Heller, J. Männik, S. G. Lemay and C. Dekker, *Nano Lett.*, 2009, **9**, 377.
- 21 M. Pumera, A. Merkoçi and S. Alegret, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 1274.
- 22 C. Hu, Y. Zhang, G. Bao, Y. Zhang, M. Liu and Z. L. Wang, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 20072.
- 23 S. Viswanathan, H. Radecka and J. Radecki, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 2772.
- 24 S. Park, J. Park, E. Cho, J. Hwang and T. Ohsaka, *Res. Chem. Intermed.*, 2006, **32**, 595.
- 25 A. Abbaspour and A. Noori, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 4674.
- 26 H. Inokuchi, D. Kato, A. Ueda and O. Niwa, *Electroanalysis*, 2011, **23**, 827.
- 27 A. Babaei and M. Babazadeh, *Electroanalysis*, 2011, **23**, 1726.
- 28 M. Moriarty, A. Lee, B. O'Connell, A. Kelleher, H. Keeley and A. Furey, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 2481.
- 29 S. K. Kim, S. R. Bae, M. S. Ahmed, J. You and S. Jeon, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2011, **32**, 1215.
- 30 T. P. Segato, W. K. T. Coltro, A. L. J. Almeida, M. H. O. Piazzetta, A. L. Gobbi, L. H. Mazoand and E. Carrilho, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 2526.
- 31 R. S. Lima, T. P. Segato, A. L. Gobbi, W. K. T. Coltro and E. Carrilho, *Lab Chip*, 2011, **11**, 4148.
- 32 F. C. Moraes, M. F. Cabral, L. H. Mascaro and S. A. S. Machado, *Surf. Sci.*, 2011, **605**, 435.
- 33 M. Zheng, A. Jagota, E. D. Semke, B. A. Diner, R. S. Mclean, S. R. Lustig, R. E. Richardson and N. G. Tassi, *Nat. Mater.*, 2003, **2**, 338.
- 34 A. Babaei and M. Babazadeh, *Electroanalysis*, 2011, **23**, 1726.
- 35 Analytical Methods Committee, *Analyst*, 1987, **112**, 199.
- 36 R. R. González, R. F. Fernández, J. L. Vidal, A. G. Frenich and M. L. Pérez, *J. Neurosci. Methods*, 2011, **198**, 187.
- 37 M. Moriarty, A. Lee, B. O'Connell, A. Kelleher, H. Keeley and A. Furey, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 2481.
- 38 J. A. Caris, A. R. Chaves and M. E. C. Queiroz, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, **23**, 57.
- 39 H. Huang, Z. Chen and X. Yan, *J. Sep. Sci.*, 2012, **35**, 436.
- 40 M. Z. H. Khan, T. Nakanishi and T. Osaka, *Sens. Lett.*, 2011, **9**, 1849.
- 41 J. Li and X. Q. Lin, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **596**, 222.
- 42 A. Abbaspour and A. Noori, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 4674.

ANEXO VI

Glass/SU-8 Microchip for Electrokinetic Applications

Renato Sousa Lima^{1,2,3}
Paulo Augusto Gomes
Carneiro Leão^{2,3}
Alessandra Maffei
Monteiro^{2,3}
Maria Helena de Oliveira
Piazzetta¹
Angelo Luiz Gobbi¹
Luiz Henrique Mazo²
Emanuel Carrilho^{2,3}

¹Laboratório Nacional de
Nanotecnologia, Centro
Nacional de Pesquisa em
Energia e Materiais, Campinas,
SP, Brazil

²Instituto de Química de São
Carlos, Universidade de São
Paulo, São Carlos, SP, Brazil

³Instituto Nacional de Ciência e
Tecnologia em Bioanalítica,
Campinas, SP, Brazil

Received April 9, 2013
Revised June 18, 2013
Accepted June 30, 2013

Short Communication

Glass/SU-8 microchip for electrokinetic applications

In this communication, we describe the fabrication and electric characterization of a hybrid glass/SU-8 microchannels for high-performance electrokinetic applications. The bonding process employed SU-8 film as intermediate layer with reduced baking times; all the procedure took less than 50 min (only about 10 min disregarding the cleaning and dehydration steps). Additionally, further steps to improve the adhesion of the substrate to the SU-8 were not needed. The developed configuration aggregates the advantages of both substrates, including (i) simple fabrication techniques; (ii) high compatibility for integration of microelectromechanical, optical, and electrochemical components (SU-8); (iii) high and stable electroosmotic mobility (μ_{EO}); and (iv) satisfactory heat dissipation capacity (glass). Electroosmotic mobilities were measured as a function of the pH using the current monitoring method, whereas the heat dissipation capacity was investigated through Ohm's law plots for both glass and glass/SU-8 microchips. The measured μ_{EO} values were similar for both microdevices, with mobilities of the order of $4.0\text{--}4.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 4–12 pH range using phosphate buffer (10 and 20 mmol/L). The heat dissipation assays were carried out in microchannels filled with 20 mmol/L phosphate buffer. A considerable Joule heating was observed only at electric field strengths greater than 580 V cm^{-1} in hybrid glass/SU-8 microdevices, representing a substantial increase of 48% when compared to all SU-8 microdevices.

Keywords:

Bonding / Microfabrication / Photoresist

DOI 10.1002/elps.201300167

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Microdevices integrating CE are a potential platform for microfluidics applications, especially for biomolecular assays in proteomics and metabolomics research. This platform provides simple, effective, small-in-volume, and high-resolution separations. Glass is the most used material in the fabrication of CE chips [1]. Vitreous substrates carry important advantages, including (i) optical transparency, (ii) chemical inertia, (iii) high and stable electroosmotic mobility (μ_{EO}), and (iv) good thermal conductivity ($\kappa = 1.5 \text{ W mK}^{-1}$) [2]. The latter allows the application of high electric field strengths ($>600 \text{ V cm}^{-1}$) without formation of temperature gradient — a negligible Joule heating, contributing for fast separations.

Correspondence: Professor Emanuel Carrilho, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13.566-590, São Carlos, SP, Brazil
E-mail: emanuel@iqsc.usp.br

Abbreviations: MEM, microelectromechanical; PEB, post-exposure baking

The complexity and costs of the glass patterning processes allowed polymers to emerge like an alternative material in microfabrication technologies [3]. Polymer-based microchips allow easy integration of microelectromechanical (MEM), optical, and electrochemical components. This is a key factor concerning the development of micro-total analysis systems (μTAS) and point-of-care systems [4]. On the other hand, permeability, elasticity, absorption, adsorption, swelling in organic media, and thermal expansion coefficient (α) list as parameters interfering in the analytical processing of polymers [5–7]. Their α is typically one order of magnitude greater than the values for metals and silicon-based substrates [4], which produces thermal stress and it can generate cracking, shrinkage, or even delamination of the polymer structures over such surfaces. Additionally, a low and unstable μ_{EO} as well as poor levels of κ limit the application of polymeric devices in CE analysis [8]. A poor thermal conductivity generates Joule heating even at low electric fields, affecting

Colour Online: See the article online to view Figs. 1 and 2 in colour.

the current/voltage linearity. Accordingly, SU-8 photoresist has proven to be a promising material [8, 9].

SU-8 is an epoxy-based negative photoresist fundamental at photolithographic pattern transfers [2]. In addition, this resist has been used in the fabrication of microfluidic channels [10, 11], reactors [12], cantilevers [13, 14], photonic crystals [15, 16], solar [17] and fuel [18] cells, and microchip CE-ESI for MS [19, 20]. Other applications involve the integration of sensors [21, 22], electrochemical detectors [23], MEM components [24, 25], optical waveguides [26, 27], molecular filters [28], PCR analyzers [29, 30], chromatography separation phases [31, 32], and dielectrophoresis system [33]. The advantages of the SU-8 resist include (i) thermal stability; (ii) chemical inertia (resistance to organic, basic, and acid solutions); (iii) optical transparency under near-UV and visible light; (iv) sensitivity, contrast, and resolution to UV radiation; (v) biocompatibility; (vi) low glass transition temperature ($T_g = 64^\circ\text{C}$); (vii) compatibility with the techniques of thin film deposition, with a good coverage area; (viii) vertical sidewall profile, allowing lift-off processes; and (ix) a wide thickness range (from submicron scale to greater than 2 mm) can be achieved by a single spinning providing films with high aspect ratios (up to 190) [2]. Additionally, Sikanen et al. [8] reported in 2005 that SU-8 has surprisingly high and stable μ_{EO} values, as well as reverse behavior from cathodic to anodic flow at phosphate buffer $\text{pH} \leq 3$. Two years later, all-SU-8 microdevices exhibited glass-like electrophoretic performance in CE separation of peptides molecules [9]. A few reports have exploited the promising properties of the native SU-8 for CE systems [34–36]. However, SU-8 resist exhibits also some limitations, namely (i) autofluorescence, (ii) high thermal expansion coefficient, and (iii) low thermal conductivity (0.2 W mK^{-1}). Such features decrease the detection sensitivity in UV range, generate thermal stress, and reduce the separation speed, respectively [9]. In addition, all-SU-8 microchips present drawbacks related to the fabrication method [37–41], requiring a multilevel photolithography that defines the bottom, sidewall, and top surfaces in SU-8. Such protocol is laborious, including extended bakes and the release of the SU-8-coated sacrificial carriers after the bonding step. This releasing step is necessary to access the reservoirs that are recorded in the resist top surface. Hydrofluoric acid (HF) etching [38, 42], mechanical process using a carrier surface with low adhesion to SU-8 [10, 39, 43], and resist lift-off [40] list as some of the procedures employed for the releasing step in microfluidics. The etching-based release can take 12 h when using interfaces with high thermal stress [38].

In this communication, we describe an alternative procedure and combination of microchip substrate for electrokinetic applications. The microchannels consisted of glass (etched top layer) and SU-8 (planar bottom surface). Such platform combines the advantages of both substrates, keeping, e.g., a high and stable electroosmotic flow mobility. Likewise, problems related to glass (microfabrication complexity and hard incorporation of MEM, optical, and electrochemical components) and SU-8 (poor thermal conductivity) processing are solved. The characterization of hybrid glass/SU-8

microchips for electrokinetic applications is herein reported. The electroosmotic mobility and heat dissipation capacity in glass and glass/SU-8 microchannels were evaluated. In the first case, their values were obtained as a function of the pH using the current monitoring method. The heat dissipation, in turn, was investigated through Ohm's law plots by measuring the relationship among current and applied voltage. In addition, the sealing protocol was changed according to the procedures described in the literature. We employed an adhesive bonding containing (i) SU-8 film as intermediate layer, (ii) temperature above the resist T_g , (iii) reduced bake times, and (iv) native SU-8. Additional steps to improve substrate/SU-8 adhesion were not used. These steps could include (i) substrate oxidation in O_2 plasma [44], (ii) resist doping with hydrophilic species [45, 46], and (iii) coating with reactive silicone primers [2] or ultrathin Ti adhesion layers [47].

The microdevices are composed of two glass slides, namely (i) substrate integrating etched microchannels and drilled reservoirs and (ii) SU-8-coated planar layer. The microchannels were carved by photolithography and wet chemical etching (detailed in Supporting Information). The pattern transfer was carried out by using photolitho-based dark field masks and the AZ 4620 positive resist. Less expensive fabrication could be employed, like thermal transfer of toner laser-printed on a wax paper [48] and vinyl adhesive film containing the microchannel layout achieved by xurography [49]. In addition to the microfluidic channel, the etching step produced air-trapping zones in the glass as shown in Fig. 1. These structures minimized the formation of voided areas and bubbles during the contact among the microchip slides. Furthermore, such regions reduced the SU-8/glass contact surface, minimizing the stress effects so that crackings or delamination of the SU-8 films were not observed. This method based on air-trapping zones is very simple since it is carried out at the same time the microchannel recording. Alternatives with this procedure include (i) resist doping with SiO_2 nanoparticles [50], (ii) ultrasonic treatment [51], and (iii) low bake temperatures [52, 53]. The reservoirs, in turn, were fabricated with a diamond drill.

The recording of the microfluidic channels showed satisfactory repeatability levels. In this context, we can conclude that the dimension of the microchannels had no contribution to the comparative study of bonding strength and electric parameters for different microdevices. The

Figure 1. Images. Photo of the bonded microchip (A) and profilometry image of the microchannel and the air-trapping indents (B). m: microchannel; t: air-trapping; r: reservoir; S₁: glass slide coated by SU-8; S₂: glass slide incorporating m and t.

precision of the etching process was investigated by measuring the depth, width (at the opening of the microchannel), and root mean square values in ten slides of glass. Such parameters were obtained using profilometry in four distinct points for each slide. The average values were: $30.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (depth) and $122.2 \pm 3.6 \mu\text{m}$ (width). The RSDs for a same etched glass slide (intrachip precision) exhibited average values of 0.5% and 3.7% to depth and width, respectively. Additionally, the RSDs were 1.7% (depth) and 4.8% (width) considering the average dimensional parameters achieved for different slides (interchip precision). The overall root mean square roughness were of 0.45 ± 0.08 and $0.77 \pm 0.19 \text{ nm}$ at outside and inside the microchannel, respectively. Intra and interchip precisions were calculated as 2.2% and 4.0% at inside the microfluidic channel, respectively. Finally, the length of the microchannel (Fig. 1A) was 27 mm.

The steps of the bonding process are presented in Fig. 2. Initially, the glass slides were chemically cleaned by immersion in piranha solution ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1, v/v) for 10 min to remove organic impurities. After, the slides were dehydrated at 120°C on hot plate for 30 min. This procedure improved the glass/SU-8 adhesion by reducing the surface energy dispensing the use of reactive silicone primers like the 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane [2]. Such species react with silanol groups of the oxide by silylation, therefore, increasing the hydrophobic character of the slide surface. SU-8 formulation was coated over glass by spinning at 3000 rpm for 30 s resulting in $5.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ($n = 5$) thickness (Fig. 2A). The use of thin- and low-viscosity films as well as the dehydration of the glass slides ensured a good adhesion of the substrate to the SU-8 [31]. The soft bake was carried out in

a two-step process (Fig. 2B). In this step, the hot plates were horizontally adjusted since the gravity can affect the flatness of the coated films. Progressive temperature ramps were not employed. SU-8 was soft baked at 65°C for 1 min and after at 95°C for 2.5 min in order to reduce stress and eliminate solvent, respectively. Afterwards, the SU-8-coated glass was brought into contact with the substrate integrating microchannel, air-trapping areas, and reservoirs (Fig. 2C). This step was performed at 95°C for 2.5 min under a constant weight of 200 g.

This procedure eliminated the formation of voided areas and produced a slight filling of the microchannel as discussed next. Usually, the slides are pressed together manually or by tweezers [37]. Nevertheless, such methods show poor alignment precision and feasibility to ultra large-scale integration manufacturing. Both slides were heated to the same temperature so to avoid thermal stress. The bonding temperature of 95°C is greater than the T_g of the SU-8 (64°C) [54]. This is a key factor because the reduction in the resist viscosity, eliminating voided areas and, thus, raising the bonded regions. Nevertheless, we should highlight that excessive values of pressure and temperature contribute to the partial filling of the microchannel by the adhesive film. Such phenomenon occurs as a function of the very low viscosity of the resist that flows into the microchannels due to the pressure and capillary forces [38]. When thicker films are used, the filling effects are more pronounced. For a $50 \mu\text{m}$ SU-8 layer, e.g., the blocking of microchannels with depth less than $100 \mu\text{m}$ is verified at 68°C [55]. On the other hand, reduced levels of pressure and temperature produce voided areas, decreasing the bonding strength and affecting the microchannel

Figure 2. Microfabrication steps. (A) spinning deposition of SU-8 over a planar glass sheet; (B) first prebake at 65°C for 1 min then 95°C for 2.5 min; (C) second prebake at 95°C for 2.5 min compressing the resist-covered slide against glass substrate (with the microchannels and traps) under a weight of 200 g; (D) exposure of the microchip to UV light for 1.0 min in order to activate the polymerization photoinitiator; and (E) postbake step at 65°C for 1.0 min and 95°C for 1.0 min also to cross-linking the SU-8 intermediate layer. Insets: 1, amplified view of the glass slide in the spinner and 2, layers that compose the microchip. Before these steps, the slides were cleaned in $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (3:1, v/v) solution for 10 min and then dehydrated at 120°C for 30.0 min using thermal plate. SU-8 is a colorless polymer; the color adopted in this figure was just for aiding visualization.

Figure 3. Images of the microchannel and electric characterization for glass and hybrid glass/SU-8 microdevices. (A) SEM microscopy of the microchannel semispherical cross-section, (B) μ_{EO} with respect to the phosphate buffer pH (10 and 20 mmol/L for an electric field strength of 400 V cm^{-1}), and (C) Ohm's law plots using 20 mmol/L phosphate at pH 8.0. Inset: 1, amplified image related to the edge of the SU-8-coated slide, showing the resist layer over the glass ($5.2 \pm 0.2 \text{ }\mu\text{m}$, $n = 5$). S_1 and S_2 defined in Fig. 1. The voided areas observed between S_1 and S_2 in the image (A) are due to the mechanical cutting of the microdevice—used process to obtain that region. The symbols specified in (B) for glass and glass/SU-8 are true in (C) also.

structures. Continuing the bonding process, the microdevice was exposed to UV light for 1 min with a dose (incident energy) of 600 mJ cm^{-2} at 365 nm wavelength for photoactivation of the polymerization initiator, an onium salt (Fig. 2D). The cross-linking of the SU-8 adhesive film is temperature assisted [2]. This reaction was carried out during the postexposure baking (PEB) at 65°C for 1 min and then at 95°C for 1.0 min (Fig. 2E)—the reactions involved in the bonding procedure are illustrated in the Supporting Information Fig. 1. The extent of the exposure is crucial since short times result in not so dense cross-linked polymers. As a result, the diffusion of solvent molecules into the bulk SU-8 (this generates the swelling of the film) is favored during its development [56]. The PEB step, in turn, increases the adhesion, reduces the scumming, and improves the contrast and profile of the resist [2].

SEM images of the microchannel cross-section are depicted in Fig. 3A. As verified in this micrograph, only a 0.4% of the SU-8 adhesive is spread into the microchannel edge generating semispherical cross-sections. This fact is due to the pressure and temperature applied during the bonding process. In this case, the filling is a favorable phenomenon since the lateral edges in etched glass microchannels favor the retention of particulate matter.

Bonding strengths for five microchips were assessed using a HPLC pump by flowing water inside the microfluidic channels. Pressures values were measured at different flow rates—from 100 to $1200 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, which corresponded to pressures of 0.4–3.8 MPa (Supporting Information Fig. 2). The microchips did not show any leakage under the tested flow rate range. Over $1200 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, the pump/chip connections leaked. Consequently, a reduction in the pressure values from 3.8 to 1.4 MPa was observed. Based on investigations reported in the literature, SU-8-based bondings present bursting pressures of the order of 8.0–45 MPa [42, 43, 57]. Such values are higher than the achieved values when PDMS is used as intermediate layer (0.5 MPa) [58].

The electroosmotic mobility and the heat dissipation capacity depend on (i) roughness, dimension, and composition

of the microchannel walls as well as (ii) temperature, pH, and ionic strength of the electrolyte [59]. Because of the good repeatability of the etching process as described, the results of electric characterization can be attributed solely to the nature of the substrates that compose the microchip. In order to generate negatively charged groups on the walls, the microfluidic channels were initially rinsed with NaOH 0.1 mol/L for 30 min before any measurements. Afterwards, a cleaning step with deionized water and phosphate buffer was performed for 20 and 10 min, respectively. The latter intended to equilibrate the electric double layer and pH on the microchannel walls. Finally, all reservoirs were filled with the same buffer volume (100 μL) initiating, then, the tests of electric characterization of glass/SU-8 and all-glass microdevices. The surface preconditioning steps were attained by applying vacuum in the waste reservoirs.

The electroosmotic mobility values were obtained by the current-monitoring method with phosphate buffer over a wide pH range, from 4 to 12. Solutions were prepared using monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4) and dibasic disodium phosphate (Na_2HPO_4), whereas sodium hydroxide was employed to reach $\text{pH} \geq 9$. The measurements were conducted using alternated runs at two buffer concentrations, namely 10 and 20 mmol/L. Figure 3B shows the results that are in agreement with the literature [8]. Each point in the graphic is an average global μ_{EO} achieved for three microchips ($n = 4$). As expected, there was not an appreciable difference among the values measured for both microdevices since that glass and SU-8 exhibit similar μ_{EO} . Such difference was about 13% at pH 6—a similar percentage reported for all-glass and all-SU-8 microchannels [8]. In general, the polymers show μ_{EO} levels significantly lower than those on silica and glass walls. This fact arises from the differences of negative charge density; vitreous compounds have a greater ionization extent of the silanol groups [60]. On the other hand, the origin of the high μ_{EO} related to SU-8 surface has remained unsolved. Sikanen et al. [8] suggested that the SU-8 surface charges are due to (i) unreacted aliphatic hydroxyl or epoxy groups after the PEB and, in special, (ii) the hexafluoroantimonate (F_6Sb^-)

complex. The F_6Sb^- is an acid species and, if some is left on the surface of the channel after the activation of the reaction, this species would contribute to the EOF as well (Supporting Information Fig. 1). Based on confidence levels (95%) illustrated in Fig. 3B, it is also important to highlight that the glass/SU-8 microchannels presented stable electroosmotic mobilities.

Besides the reduction of the electrophoretic separation speed, Joule heating generation may negatively affect the magnitude and stability of the electroosmotic mobility [59]. In this context, the low heat dissipation capacity related to polymer-based microdevices is an important drawback in electrokinetic applications, including CE analyses and mass transport. The use of buffer solutions in low concentration, e.g., 10 mmol/L, allows the application of relatively high electric field strengths (E). However, high-resolution separations usually require buffers with ionic strength greater than 10 mmol/L. The thermal conductivity of the SU-8 is appreciably lower than of the glass; their values are 0.2 and 1.5 W mK⁻¹, respectively. This difference explains the poor heat dissipation of all-SU-8 microfluidic channels [8]. Assays using 20 mmol/L phosphate buffer showed to have a linearity deviation of the current/E relationship at E higher than 300 V cm⁻¹. Differently, considerable Joule heating was not observed at the investigated E values (≤ 700 V cm⁻¹) for glass microchannels. The obtained Ohm's law plots are shown in Fig. 3C, indicating the measured current data in function of the applied voltage for glass/SU-8 and all-glass microchips. Each value represents a global average current that was achieved for four microchips (real-time monitoring for 2 min). The Joule effect was negligible when operating in the straight region of the graphics; in this range, the Ohm's law is valid. The glass/SU-8 substrate improved effectively the heat dissipation into the microchannel with respect to all-SU-8 walls. Linearity deviation occurred at $E > 580$ V cm⁻¹, representing a substantial increase of 48% regarding the all-SU-8 microdevices [8]. In glass microchannels, an appreciable Joule heating was noted only at E values > 730 V cm⁻¹. Finally, based on the characterization results for different microchips shown in Fig. 3B and C, we can conclude that the bonding process presented a satisfactory repeatability.

The hybrid glass/SU-8 configuration demonstrated to be a promising alternative to the fabrication of microchips for CE analysis or mass transport. The latter is a very important application in nanofluidics. In this case, the most used transport phenomena are driven either by electrokinetic flow or pressure. Surface-mediated tools present drawbacks in nanoscale systems due to the large required pressure values as shown by the Hagen–Poiseuille equation. Electrokinetic techniques, on the other hand, can produce higher flow rates without excessive pressures through nanochannels. Thereby, such methods are the preferred alternative for driving fluids in nanofluidics [61]. In addition to the high-pressure values, the electrokinetic mass transport has better control on the movement of particles in nanoscale structures by changing the surface charge. This fact arises from the similarities be-

tween the extension of electric double layer, the dimensions of the cross-section of the nanochannels, and the size of the molecules, which range, in general, from 1 to 100 nm [62].

Our fabrication method did not generate voided areas or thermal stress. The latter was prevented by air-trapping zones, which were etched in the glass substrate at the same time of the microchannel recording. The method presents further advantages concerning the bonding, including velocity and compatibility with the ultra large-scale integration technologies. Such features are owing to the factors: (i) reduced bake times and absence of (ii) progressive temperature ramps or (iii) additional steps to improve the substrate/SU-8 adhesion. All the bonding process took less than 10 min (not taking into consideration the cleaning and dehydration steps). Many procedures described in the literature require, in average, a total processing time of more than 1 h [37], including the procedures based on thin films (5 μ m) [63]. Regarding the electric characterization tests, their results indicated a high and stable electroosmotic mobility for hybrid glass/SU-8 microchannels. Their μ_{EO} values were similar to those achieved for glass microchannels, changing from 4.0×10^{-4} to 4.5×10^{-4} cm² V⁻¹ cm⁻¹ at 4–12 pH range employing phosphate buffer. In addition, the heat dissipation capacity was appreciably increased (48%) with respect to all-SU-8 microdevices. Substantial Joule heating was observed only at $E > 580$ V cm⁻¹. Finally, the reported method represents a potential way to further the development of microchip CE with capacitively coupled contactless conductivity detection. Besides the highlights related to the fabrication method and the surface properties of glass and SU-8 previously cited, SU-8 resist has another aspects that are crucial to fabrication of high-performance capacitively coupled contactless conductivity detection in CE analyses. These aspects include (i) high dielectric strength (4.4 MV cm⁻¹) [64], (ii) a dielectric constant of 4.1 (<http://www.microchem.com/pdf/SU-8-table-of-properties.pdf>, accessed in February 2013) that is similar to plasma-coated SiO₂ films (4.2) [65] and greater than PDMS (2.7) [66], and (iii) nanoscale thicknesses can be achieved by spinning [37].

This work was supported financially by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP—Grant number 2010/08559-9) and Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq—Grant number 500421/2011-0). The Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) is recognized also for their support.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Shang, F., Guihen, E., Glennon, J. D., *Electrophoresis* 2012, 33, 105–116.
- [2] Madou, M. J., *Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology. Manufacturing Techniques for Microfabrication and Nanotechnology* Vol. 2, 3rd Ed., CRC Press, New York 2011.

- [3] Becker, H., Gärtner, C., *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, **390**, 89–111.
- [4] Xu, X., Zhang, S., Chen, H., Kong, J., *Talanta* 2009, **80**, 8–18.
- [5] Kuncova-Kallio, J., Kallio, P. J., *Conf. Proc. IEEE. Eng. Med. Biol. Soc.* 2006, **1**, 2486–2489.
- [6] Toepke, M. W., Beebe, D. J., *Lab Chip* 2006, **6**, 1484–1486.
- [7] Lee, J. N., Park, C., Whitesides, G. M., *Anal. Chem.* 2003, **75**, 6544–6554.
- [8] Sikanen, T., Tuomikoski, S., Ketola, R. A., Kostianen, R., Franssila, S., Kotiaho, T., *Lab Chip* 2005, **5**, 888–896.
- [9] Sikanen, T., Heikkilä, L., Tuomikoski, S., Ketola, R. A., Kostianen, R., Franssila, S., Kotiaho, T., *Anal. Chem.* 2007, **79**, 6255–6263.
- [10] Aracil, C., Perdignes, F., Moreno, J. M., Quero, J. M., *J. Micromech. Microeng.* 2010, **20**, 035008.
- [11] Salvo, P., Verplanck, R., Bossuyt, F., Latta, D., Vandecasteele, B., Liu, C., Vanfleteren, J., *Microfluid. Nanofluid.* 2012, **13**, 987–991.
- [12] Zizzari, A., Arima, V., Zacheo, A., Pascali, G., Salvadori, P. A., Perrone, E., Mangiullo, D., Rinaldi, R., *Microelectron. Eng.* 2011, **88**, 1664–1667.
- [13] Larsen, T., Keller, S., Schmid, S., Dohn, S., Boisen, A., *Microelectron. Eng.* 2011, **88**, 2311–2313.
- [14] Reddy, C. V. B., Khaderbad, M. A., Gandhi, S., Kandpal, M., Patil, S., Chetty, K. N., Rajulu, K. G., Chary, P. C. K., Ravikanth, M., Rao, V. R., *IEEE Trans. Nanotechnol.* 2012, **11**, 701–706.
- [15] Kuo, S. M., Huang, Y. W., Yeh, S. M., Lin, C. H., *Opt. Express* 2011, **19**, 18372–18379.
- [16] Tuyen, L. D., Wu, C. Y., Anh, T. K., Minh, L. Q., Kan, H. C., Hsu, C. C., *J. Exp. Nanosci.* 2012, **7**, 198–204.
- [17] Kim, K. J., Kima, Y. S., Bae, J. J., Kang, B. H., Yeom, S. H., Yuan, H., Kang, S. W., *Exp. Nanosci.* 2011, **95**, 1238–1242.
- [18] Esquivel, J. P., Senn, T., Hernández-Fernández, P., Santander, J., Lörger, M., Rojas, S., Löchel, B., Cané, C., Sabaté, N., *J. Power Forces* 2010, **195**, 8110–8115.
- [19] Sikanen, T., Tuomikoski, S., Ketola, R. A., Kostianen, R., Franssila, S., Kotiaho, T., *Anal. Chem.* 2007, **79**, 9135–9144.
- [20] Nordman, N., Sikanen, T., Moilanen, M. E., Aura, S., Kotiaho, T., Franssila, S., Kostianen, R., *J. Chromatogr. A* 2011, **1218**, 739–745.
- [21] Pang, C., Zhao, Z., Li, S., Du, L., Fang, Z., *Adv. Mat. Res.* 2009, **60–61**, 68–73.
- [22] Xue, N., Chang, S. P., Lee, J. B., *J. Micromech. Microeng.* 2012, **21**, 1338–1346.
- [23] Altuna, A., de la Prida, L. M., Bellistri, E., Gabriel, G., Guimera, A., Fernandez, L. J., *Biosens. Bioelectron.* 2012, **37**, 1–5.
- [24] Chao, T. Y., Hsu, M. C., Lin, C. D., Cheng, Y. T., *J. Micromech. Microeng.* 2011, **21**, 025010.
- [25] Rouabah, H. A., Park, B. Y., Zaouk, R. B., Morgan, H., Madou, M. J., Green, N. G., *J. Micromech. Microeng.* 2011, **21**, 035018.
- [26] Yang, B., Zhu, Y., Jiao, Y., Yang, L., Sheng, Z., He, S., Dai, D., *J. Lightwave Technol.* 2011, **29**, 2009–2014.
- [27] Aida, T., Tokuhara, T., Asahi, S., Hiroya, M., Hiroshi, K., *Microelectron. Eng.* 2012, **98**, 258–261.
- [28] Chang, C. J., Yang, C. S., Chuang, Y. J., Khoo, H. S., Tseng, F. G., *Nanotechnology* 2008, **19**, 365301.
- [29] Tsai, N. C., Sue, C. Y., *Biosens. Bioelectron.* 2006, **22**, 313–317.
- [30] El-Ali, J., Perch-Nielsen, I. R., Poulsen, C. R., Bang, D. D., Tefleman, P., Wolff, A., *Sens. Actuators A* 2004, **110**, 3–10.
- [31] Carlier, J., Arscott, S., Thonny, V., Fourrier, J. C., Caron, F., Camart, J. C., Druon, C., Tabourier, P., *J. Micromech. Microeng.* 2004, **14**, 619–624.
- [32] LeGac, C., Carlier, J., Camart, J. C., Cren-Olivé, C., Rolando, C., *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* 2004, **808**, 3–14.
- [33] Wang, Z., Hansen, O., Petersen, P. K., Rogeberg, A., Kutter, J. P., Bang, D. D., Wolff, A., *Electrophoresis* 2006, **27**, 5081–5092.
- [34] Castaño-Alvarez, M., Fernández-Abedul, M. T., Costa-García, A., Agirregabiria, M., Fernández, L. J., Ruano-López, J. M., Barredo-Presa, B., *Talanta* 2009, **80**, 24–30.
- [35] Chang, C. J., Yang, C. S., Lan, L. H., Wang, P. C., Tseng, F. G., *J. Micromech. Microeng.* 2010, **20**, 115031.
- [36] Shameli, S. M., Elbaken, C., Ou, J., Ren, C. L., Pawliszyn, J., *Electrophoresis* 2011, **32**, 333–339.
- [37] Abgrall, P., Conedera, V., Camon, H., Gue, A. M., Nguyen, N. T., *Electrophoresis* 2007, **28**, 4539–4551.
- [38] Tuomikoski, S., Franssila, S., *Sens. Actuators A* 2005, **120**, 408–415.
- [39] Agirregabiria, M., Blanco, F. J., Berganzo, J., Arroyo, M. T., Fullaondo, A., Mayora, K., Ruano-López, J. M., *Lab Chip* 2005, **5**, 545–552.
- [40] Sato, H., Matsumura, H., Keino, S., Shoji, S., *J. Micromech. Microeng.* 2006, **16**, 2318–2322.
- [41] Fu, C., Hung, C., Huang, H., *JPCS* 2006, **34**, 330–335.
- [42] Blanco, F. J., Agirregabiria, M., Garcia, J., Berganzo, J., Tijero, M., Arroyo, M. T., Ruano, J. M., Aramburu, I., Mayora, K., *J. Micromech. Microeng.* 2004, **14**, 1047–1056.
- [43] Steigert, J., Brett, O., Müller, C., Strasser, M., Wangler, N., Reinecke, H., Daub, M., Zengerle, R., *J. Micromech. Microeng.* 2008, **18**, 095013.
- [44] Mogensen, K. B., Al-Ali, J., Wolff, A., Kutter, J. P., *Appl. Opt.* 2003, **42**, 4072–4079.
- [45] Chen, Y. T., Lee, D., *J. Micromech. Microeng.* 2007, **17**, 1978–1984.
- [46] Carlier, J., Chuda, K., Arscott, S., Thomy, V., Verbeke, B., Coqueret, X., Camart, J. C., Druon, C., Tabourier, P., *J. Micromech. Microeng.* 2006, **16**, 2211–2219.
- [47] Dai, W., Lian, K., Wang, W. J., *Microsyst. Technol.* 2005, **11**, 526–534.
- [48] Coltro, W. K. T., Piccin, E., da Silva, J. A. F., do Lago, C. L., Carrilho, E., *Lab Chip* 2007, **7**, 931–934.
- [49] Santana, P. P., Segato, T. P., Carrilho, E., Lima, R. S., Dossi, N., Kamogawa, M. Y., Gobbi, A. L., Piazzeta, M. H., Piccin, E., *Analyst* 2013, **138**, 1660–1664.
- [50] Jiguet, S., Bertsch, A., Judelewicz, M., Hofmann, H., Renaud, P., *Microelectron. Eng.* 2006, **83**, 1966–1970.

- [51] Du, L. Q., Wang, Q. J., Zhang, X. L., *Sci. China Tech. Sci.* 2010, 53, 3006–3013.
- [52] Li, B., Liu, M., Chen, Q. F., *J. Microlith. Microfab.* 2005, 4, 043008.
- [53] Anhoj, T. A., Jorgensen, A. M., Zauner, D. A., Hübner, J., *J. Micromech. Microeng.* 2006, 16, 1819–1824.
- [54] Pfeifer, K., Fink, M., Gruetzner, G., Bleidiessel, G., Schulz, H., Scheer, H., *Microelectron. Eng.* 2001, 57–58, 381–387.
- [55] Tuomikoski, S., Franssila, S., *Phys. Scripta* 2004, T114, 223–226.
- [56] Zhou, Z., Huang, Q. A., Li, W. H., Lu, W., Zhu, Z., Feng, M., *IEEE Sensors* 2007, 1–3, 325–328.
- [57] Pan, C. T., Yang, H., Shen, S. C., Chou, M. C., Chou, H. P., *J. Micromech. Microeng.* 2002, 12, 611–615.
- [58] Beh, C. W., Zhou, W., Wang, T. H., *Lab Chip* 2012, 12, 4120–4127.
- [59] Baker, D. R., *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, New York 1995.
- [60] Coltro, W. K. T., Lunte, S. M., Carrilho, E., *Electrophoresis* 2008, 29, 4928–4937.
- [61] Prakash, S., Piruska, A., Gatimu, E. N., Bohn, P. W., Sweedler, J. V., Shannon, M. A., *IEEE Sens. J.* 2008, 8, 441–450.
- [62] Piruska, A., Gong, M., Sweedler, J. V., Bohn, P. W., *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1060–1072.
- [63] Helbo, B., Kristensen, A., Menon, A., *J. Micromech. Microeng.* 2003, 13, 307–311.
- [64] Melai, J., Salm, C., Smits, S., Visschers, J., Schimits, J., *J. Micromech. Microeng.* 2009, 19, 065012.
- [65] Kim, H. J., Shao, Q., Kim, Y-H., *Surf. Coat. Tech.* 2003, 171, 39–45.
- [66] Farcich, N. J., Salonen, J., Asbeck, P. M., *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 2008, 56, 2963–2971.

Supporting Information

Glass/SU-8 Microchip for Electrokinetic Applications

Renato S. Lima, Paulo C. Leão, Alessandra M. Monteiro, Maria H. O. Piazzetta, Angelo L.

Gobbi, Luiz H. Mazo, and Emanuel Carrilho

Table of Contents

■ CHEMICALS AND INSTRUMENTATION

■ MICROCHANNEL FABRICATION

■ FIGURES

■ CHEMICALS AND INSTRUMENTATION

Soda-lime glass wafers (26 x 76 x 1 mm) were purchased from Glass Técnica (São Paulo, Brazil). Hydrofluoric acid (HF) was acquired from Synth (Diadema, São Paulo, Brazil) whereas sodium hydroxide was supplied from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). SU-8 photoresist and propylene glycol monomethyl ether acetate (PGMEA, SU-8 developer) were purchased from Microchem Corporation (Newton, MA). For electric characterization measurements, buffer solutions were prepared at different pH values from monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4) and dibasic disodium phosphate (Na_2HPO_4) (Mallinckrodt, Xalostoc, Mexico). All solutions were prepared utilizing deionized water (Milli-Q, Millipore Corp., Bedford, MA) with resistivity no less than 18 M Ω cm.

The instruments used in the microfabrication process were: *i)* Karl Suss America Inc. MJB 3 UV 200 photoaligned (Waterbury, VT); *ii)* Headway Research Inc. EC101DT spinner (Garland, TX); and *iii)* Oerlikon Balzers BA510 sputter (Schaumburg, IL). Roughness mean square (RMS) values were estimated by a Veeco Dektak 2210 profilometer (Branson, MO) with 4- μm -resolution. Scanning electron microscopy (SEM) images of the cross section of the sealed microchannel were carried out in a FEI Inspect S 50 (Eindhoven, Netherlands). In order to improve the contrast in the SEM micrographs, the samples were previously metalized using a Balzers SCD 004 Sputter Coater (Wiesbaden-Nordenstadt, Germany). Finally, electrokinetically-driven flows into the microfluidic channels were performed using a bipolar single-channel highvoltage power supply (CZE 1000R, Spellman, Hauppauge, NY, USA). A computer equipped with

a National Instruments (NI) interface (USB-6009 model) was used to control of the power supply. Data acquisition was carried out through software written in LabVIEW®.

■ MICROCHANNEL FABRICATION

Photolitho-based dark field masks and the AZ 4620 positive resist were used to pattern transfer of the microchannels on glass slides by wet etching. The latter was performed sequentially with the solutions: *i)* 396 mL H₂O, 54 mL HF, and 270 g NH₄F for 14 min; *ii)* 150 mL H₂O, 150 mL HCl, and 150 mL HF for 3 min; and *iii)* HCl for 1 min under continuous stirring. Next, the slides were rinsed in excess acetone with aid of ultrasound bath, washed with deionized water, and then dried with N₂.

Figures

Figure S1. Chemical structures and reactions involved in the adhesive bonding process. SU-8 structure **(a)**, photoactivation of triphenyl-sulfonium hexafluoroantimonate, the cross-linking initiator at UV exposure, and **(c)** polymerization of the SU-8 resist during the PEB procedure.

Figure S2. Bonding strength test. In the range between 100 and 1200 $\mu\text{L min}^{-1}$, the pressure changed linearly with the flow rate applied into the microfluidic channel. Up to 1,200 $\mu\text{L min}^{-1}$, the pump/chip connections were broken with a consequent reduction of the measured pressure value.

SÚMULA CURRICULAR

Renato Sousa Lima

Renato Sousa Lima
Curriculum Vitae

Dezembro/2013

Formação acadêmica/titulação

- 2014 - Atual** Pós-Doutorado em Química.
Universidade Estadual Campinas/Campinas, UNICAMP, Brasil
Título: Microemulsificação: uma abordagem inédita para determinações *point-of-care*
Supervisor: Dr. Lauro Tatsuo Kubota
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2010 - 2013** Doutorado em Química.
Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
Título: Desenvolvimento de sistemas microfluídicos eletroquímicos ultrasensíveis, Ano de obtenção
Orientador: Dr. Emanuel Carrilho
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2008 - 2010** Mestrado em Química (Química Analítica).
Universidade de São Paulo/Instituto de Química de São Carlos, USP/IQSC, Brasil
Título: Biossensor Condutométrico Sem Contato em Microchip Contendo Ácido Fólico como Biorreceptor, Ano de obtenção
Orientador: Dr. Emanuel Carrilho
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2003 - 2008** Graduação em Química Industrial.
Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Joao Pessoa, Brasil
Título: Desenvolvimento de um Sistema em Escala Piloto para o Monitoramento Remoto e Contínuo da Qualidade de Águas
Orientador: Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2013 - 2013** Workshop em Microfluídica.
Laboratório Nacional de Nanotecnologia - CNPEM, LNNANO/CNPEM, Brasil
- 2012 - 2012** Workshop em Microfluídica.
Laboratório Nacional de Nanotecnologia - CNPEM, LNNANO/CNPEM, Brasil
- 2011 - 2011** Workshop em Microfluídica.
Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Brasil
- 2010 - 2010** Uso de XPS na caracterização de superfícies.
Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
- 2010 - 2010** Novos materiais poliméricos em sensores químicos.
Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
- 2010 - 2010** Problemas Sociais - Utopia ou Redução de Danos.
Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil

2010 - 2010	Aplicações de Microarranjos em Genômica. Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
2010 - 2010	Biossensores electroquímicos com DNA. Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
2010 - 2010	Development of Microfluidic Devices. Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
2009 - 2009	Quem disse que não existe Quím. Anal. em Harvard. Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
2009 - 2009	SPR em nanoestruturas para diagnóstico de câncer. Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, IQSC/USP, Brasil
2009 - 2009	Nucleation theory on nanostructured systems. Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
2009 - 2009	Organismos Geneticamente Modificados. Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em Workshop Nacional sobre Biossensores. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
2009 - 2009	Microfluidic paper for Neglected diagnostics. Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
2009 - 2009	Efeito da temperatura na dinâmica de osciladores. Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
2009 - 2009	Redução de CO ₂ para obtenção de combustíveis. Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, IQSC/USP, Brasil
2009 - 2009	Classical nucleation on nanostructured systems. Universidade de São Paulo/São Carlos, USP, Brasil
2008 - 2008	Curso de curta duração em Fabricação de Microdispositivos p/ Análise Química. Sociedade Brasileira de Química, SBQ, São Paulo, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Espectroscopia de emissão em ICP. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil <i>Palavras-chave: Química Analítica Instrumental, Espectroscopia, ICP</i>
2007 - 2007	Curso de curta duração em Disposit. Eletroquímicos para conversão de Energia. Sociedade Brasileira de Química, SBQ, São Paulo, Brasil <i>Palavras-chave: Físico-Química, Eletroquímica, Eletrodos</i>
2007 - 2007	Curso de curta duração em Sensores com Transdução Potenciométrica e Óptica. Encontro Nacional de Química Analítica, ENQA, Brasil <i>Palavras-chave: Eletroanalítica, Potenciometria, Espectrometria</i>
2007 - 2007	Curso de curta duração em Espectrometria de Abs. Atômica de Alta Resolução. Encontro Nacional de Química Analítica, ENQA, Brasil <i>Palavras-chave: Espectrometria, Espectrometria de Absorção Atômica, Fonte Contínua</i>
2005 - 2005	Analísadores em Fluxo. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, Brasil
2003 - 2005	Extensão universitária em Curso de Inglês. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, Brasil <i>Palavras-chave: Línguas, Inglês, Conversação</i>

2004 - 2004 Curso de curta duração em Primeira Semana da Tecnol. Química e de Alimentos.
Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Joao Pessoa, Brasil
Palavras-chave: Química Industrial, Tecnologia Química, Engenharia de Alimentos

Atuação profissional

1. Laboratório Nacional de Nanotecnologia - CNPEM - LNNANO/CNPEM

Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Pesquisador, Enquadramento funcional: Químico Pesquisador,
Carga horária: 45, Regime: Dedicação exclusiva

2. Universidade Estadual de Campinas/Instituto de Química - UNICAMP/IQ

Vínculo institucional

2014 - Atual Vínculo: Pesquisador Colaborador, Enquadramento funcional: Aluno de
Pós-Doutorado

3. Universidade de São Paulo/Instituto de Química de São Carlos - USP/IQSC

Vínculo institucional

2010 - 2013 Vínculo: Pesquisador Colaborador, Enquadramento funcional: Aluno de
Pós-Doutorado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2010 - 2013 Vínculo: Bolsista FAPESP, Enquadramento funcional: Aluno de Doutorado,
Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2010 - 2010 Vínculo: Monitoria, Enquadramento funcional: Monitor de disciplina
ministrada na graduação, Carga horária: 3, Regime: Parcial

2008 - 2010 Vínculo: Bolsista FAPESP, Enquadramento funcional: Aluno de Mestrado,
Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

4. Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Vínculo institucional

2005 - 2008 Vínculo: Bolsista CNPq, Enquadramento funcional: Aluno de Iniciação
Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva

5. Companhia de Águas e Esgotos da Paraíba - CAGEPA

Vínculo institucional

2004 - 2005 Vínculo: Bolsista em Laboratório, Enquadramento funcional: Estagiário,
Carga horária: 20, Regime: Parcial

Revisor de periódico

1. Electrophoresis (Weinheim. Print)

Vínculo

2012 - Atual

Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Processos de microfabricação
2. Microfluídica: Detectores e Sensores Eletroquímicos
3. Microfluídica: Métodos *Point-of-Care*

Prêmios e títulos

2012	Top ten most accessed articles in March, Analytical Methods Journal - RSC Publishing
2011	Projeto premiado em primeiro lugar na Olimpíada USP de Inovação, USP
2010	Trabalho premiado como melhor pôster na 20a Reunião Anual de Usuários (RAU) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP
2008	Graduação em Química Industrial, Universidade Federal da Paraíba
2008	Reconhecimento como melhor aluno no curso de Química Industrial do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, Conselho Regional de Química da Paraíba (CRQ-PB)
2004	Primeiro colocado no processo seletivo para admissão na Graduação em Química Industrial pelo Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba - CT/UFPB - em Abril de 2004,

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **Lima, Renato Sousa**, PIAZZETTA, MARIA HELENA DE OLIVEIRA, Gobbi, Angelo Luiz, Segato, Thiago Pinotti, CABRAL, MURILO FEITOSA, Machado, Sergio A. S., Carrilho, Emanuel
Highly sensitive contactless conductivity microchips based on concentric electrodes for flow analysis. **Chemical Communications** (London. 1996. Print). , v.XX, p.XXXX - , 2013.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1039/c3cc45797d]

2. **Lima, Renato Sousa**, LEÃO, PAULO AUGUSTO GOMES CARNEIRO, MONTEIRO, ALESSANDRA MAFFEI, DE OLIVEIRA PIAZZETTA, MARIA HELENA, Gobbi, Angelo Luiz, MAZO, LUIZ HENRIQUE, Carrilho, Emanuel

Glass/SU-8 Microchip for Electrokinetic Applications. **Electrophoresis** (Weinheim. Print). , v.XX, p.n/a - n/a, 2013.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1002/elps.201300167]

3. DA SILVA, EDUARDO RODRIGUES, Segato, Thiago Pinotti, Coltro, Wendell Karlos Tomazelli, **Lima, Renato Sousa**, Carrilho, Emanuel, MAZO, LUIZ HENRIQUE

Determination of glyphosate and AMPA on polyester-toner electrophoresis microchip with contactless conductivity detection. **Electrophoresis** (Weinheim. Print). v.34, p.1 - 5, 2013.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

4. PESSOA DE SANTANA, PHILLIPE, Segato, Thiago Pinotti, Carrilho, Emanuel, **Lima, Renato Sousa**, DOSSI, NICOLÒ, KAMOGAWA, MARCOS YASSUO, Gobbi, Angelo Luiz, PIAZZETA, MARIA HELENA, PICCIN, EVANDRO

Fabrication of glass microchannels by xurography for electrophoresis applications. **Analyst** (London. 1877. Print). v.138, p.1660 - 1664, 2013.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

5. **Lima, Renato Sousa**, Maria H. O. Piazzetta, Ângelo L. Gobbi, Ubirajara P. R. Filho, Pedro A. P. Nascente, Wendell K. T. Coltro, Carrilho, Emanuel

Contactless conductivity biosensor in microchip containing folic acid as bioreceptor. **Lab on a Chip** (Print). v.12, p.1963 - 1966, 2012.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Impresso

6. **Lima, Renato Sousa**, Moraes, Fernando C, Segato, Thiago Pinotti, Cesarino, Ivana, Melendez, Jhanisus, Machado, Sergio A. S., Gomez, Frank, Carrilho, Emanuel

Glass/PDMS hybrid microfluidic device integrating vertically aligned SWCNTs to ultrasensitive electrochemical determinations. **Lab on a Chip** (Print). v.12, p.1959 - 1962, 2012.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Impresso

7. Coltro, Wendell Karlos Tomazelli, **Lima, Renato Sousa**, Segato, Thiago Pinotti, Carrilho, Emanuel, de Jesus, Dosil Pereira, do Lago, Claudimir Lucio, da Silva, José Alberto Fracassi

Capacitively coupled contactless conductivity detection on microfluidic systems: ten years of development. **Analytical Methods** (Print). v.4, p.25 - 33, 2012.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1039/c1ay05364g]

8. **Lima, Renato Sousa**, Segato, Thiago Pinotti, Gobbi, Angelo Luiz, Tomazelli Coltro, Wendell Karlos, Carrilho, Emanuel

Doping of a dielectric layer as a new alternative for increasing sensitivity of the contactless conductivity detection in microchips. **Lab on a Chip** (Print). v.11, p.4148 - 4151, 2011.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

9. **Lima, Renato Sousa**, SANTOS, V. B., Thiago B. Guerreiro, ARAUJO, M. C. U., GAIAO, E. N.

Um sistema microcontrolado para o monitoramento on-line, in situ e remoto de pH, condutividade e temperatura de águas. **Química Nova**. v.34, p.135 - 139, 2011.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Vários

10. Alexandre Fonseca, Ivo M. Raimundo Júnior, ROHWEDDER, J. J. R., **Lima, Renato Sousa**, ARAUJO, M. C. U.

A microfluidic device with integrated fluorimetric detection for flow injection analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.396, p.715 - , 2010.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

11. GAMBARRA NETO, F. F., Glimaldo Marino, ARAUJO, M. C. U., Roberto Kawakami Harrop Galvão, Márcio J. C. Pontes, MEDEIROS, E. P., **Lima, Renato Sousa**.

Classification of edible vegetable oils using square wave voltammetry with multivariate data analysis. **Talanta** (Oxford). v.77, p.1660 - 1666, 2009.

Palavras-chave: Vegetable oil, Square wave voltammetry, Soft Independent Modelling of Class Analogy, Linear Discriminant Analysis, Successive Projections Algorithm

Áreas do conhecimento : Eletroanalítica, Quimiometria

Setores de atividade : Saúde e Serviços Sociais

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://laqa@quimica.ufpb.br]

12. GAIAO, E. N., Sérgio Ricardo B. dos Santos, SANTOS, V. B., **Lima, Renato Sousa**, ARAUJO, M. C. U.

An inexpensive, portable and microcontrolled near infrared LED-photometer for screening analysis of gasoline. **Talanta** (Oxford). v.75, p.792 - 796, 2008.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://laqa@quimica.ufpb.br]

13. Luciano F. Almeida, Maria G. R. Vale, Morgana B. Dessuy, Márcia M. Silva, **Lima, Renato Sousa**, SANTOS, V. B., Paulo H. D. Diniz, ARAUJO, M. C. U.

A flow-batch analyzer with piston propulsion applied to automatic preparation of calibration solutions for Mn determination in mineral waters by ET AAS. **Talanta** (Oxford). v.73, p.906 - 912, 2007.

Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: [http://laqa@quimica.ufpb.br]

14. GAMBARRA NETO, F. F., **Lima, Renato Sousa**, Wellington S. Lira, Glimaldo Marino, ARAUJO, M. C. U., MEDEIROS, E. P., Valberes B. Nascimento

Biamperometric Determination of Tetracycline in Pharmaceuticals. **Analytical Letters**. v.40, p.3070 - 3079, 2007.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Vários. Home page: [http://laqa@quimica.ufpb.br]

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. MORAES, F., **Renato S. Lima.**, CESARINO, I., CARRILHO, E., MACHADO, S. A. S.

Electrochemical Detection of Serotonin Using a Microfluidic Device Integrating Vertically Aligned CNTs In: 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2012, Prague.

3rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry. , 2012.

Referências adicionais : República Tcheca/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

2. Luciano F. Almeida, Francisco Antônio C. Andrade, Renato S. Lima., ARAUJO, M. C. U., Fagundes, Y. N. M.

Um Analisador em Fluxo-Batelada com Propulsão a Pistão (PFBA) para Determinação de Metais Pesados em Microemulsões de Gasolina por GF AAS In: 31 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia.

31 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2008.

Palavras-chave: PFBA, Metais Pesados, Microemulsões de Gasolina

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://laqa@quimica.ufpb.br]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. LEAO, P. C., **Lima, Renato Sousa**, Luiz H. Mazo, Carrilho, Emanuel

Transformando condutometria sem contato (C4D) em um sistema de detecção altamente sensível para microsistemas In: 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013, Águas de Lindóia.

Química sem fronteira. , 2013.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2. Thiago P. Segato, Renato S. Lima., Nathan V. de Castro, José A. F. da Silva, Emanuel Carrilho

Liquid Electrodes for Contactless Conductivity Detection in Microchip: Fabrication, Characterization and Analytical Performance In: LabAutomation2011, 2011, Palm Springs-USA.

LabAutomation2011, Where Science, Technology and Industry Come Together. , 2011.

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

3. Renato S. Lima., Wendell K. T. Coltro, Ubirajara P. R. Filho, Thiago P. Segato, Emanuel Carrilho

Biossensor condutométrico sem contato em microchip contendo ácido fólico como biorreceptor In: Workshop de pós-graduação: A nova pós-graduação do IQSC, 2010, São Carlos.

Workshop de pós-graduação: A nova pós-graduação do IQSC. , 2010.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

4. Renato S. Lima., Ubirajara P. R. Filho, Pedro A. P. Nascente, Maria H. O. Piazzetta, Ângelo L. Gobbi, Vinícius L. Pimentel, Wendell K. T. Coltro, Emanuel Carrilho

Caracterização de Processos de Silanização em Superfície de SiO₂ por MEV, XPS e AFM para Construção de Biossensores In: 20ª Reunião Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, 2010, Campinas-SP.

20ª Reunião Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. , 2010.

Referências adicionais : Brasil/Português.

5. Renato S. Lima., Thiago P. Segato, Luiz H. Mazo, Emanuel Carrilho

Dielectric Layer Doping: A New Alternative for Increasing Sensitivity of Contactless Conductivity Detection in Microchips In: 16th Latin-American Symposium LACE 2010, 2010, Florianópolis-SC.

16th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Cappillary Electrophoresis and Microchip Technology. , 2010.

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

6. Thiago P. Segato, Renato S. Lima., Wendell K. T. Coltro, Emanuel Carrilho
Dopagem da camada dielétrica: Uma nova alternativa para aumento de sensibilidade da detecção condutométrica sem contato em microchips In: Workshop de pós-graduação: A nova pós-graduação do IQSC, 2010, São Carlos.

Workshop de pós-graduação: A nova pós-graduação do IQSC. , 2010.

Referências adicionais : Brasil/Português.

7. Thiago P. Segato, Renato S. Lima., Nathan V. de Castro, José A. F. da Silva, Emanuel Carrilho
Liquid Electrodes for Contactless Conductivity Detection in Microchip In: 16th Latin-American Symposium LACE 2010, 2010, Florianópolis-SC.

16th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Cappillary Electrophoresis and Microchip Technology. , 2010.

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

8. Renato S. Lima., Maria H. O. Piazzetta, Ângelo L. Gobbi, Emanuel Carrilho, Wendell K. T. Coltro, Ubirajara P. R. Filho, Pedro A. P. Nascente
Microchips de PDMS/SiO₂/Vidro Contendo Detecção Condutométrica Sem Contato: Estudo de Configurações e Geometrias dos Eletrodos In: 20a Reunião Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, 2010, Campinas-SP.

20a Reunião Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. , 2010.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

9. Renato S. Lima., Ubirajara P. R. Filho, Pedro A. P. Nascente, Wendell K. T. Coltro, Emanuel Carrilho
Caracterização de Processos de Silanização em Superfície de SiO₂ por MEV e XPS para construção de Biossensores In: 15 Encontro Nacional de Química Analítica e 3 Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador.

15 Encontro Nacional de Química Analítica e 3 Congresso Iberoamericano de Química Analítica. , 2009.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

10. Wendell K. T. Coltro, Thiago P. Segato, Renato S. Lima., Claudimir L. do Lago, Emanuel Carrilho
Fabricação de Microsistemas Analíticos Usando Toner Pigmentado In: 15 Encontro Nacional de Química Analítica e 3 Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador.

15 Encontro Nacional de Química Analítica e 3 Congresso Iberoamericano de Química Analítica. , 2009.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

11. Alexandre Fonseca, Ivo M. Raimundo Júnior, Renato S. Lima., ARAUJO, M. C. U.
Avaliação do Uso de um Microcontrolador Programável para a Automação de um Sistema de Análise por Injeção em Fluxo Miniaturizado In: 14 Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa.

Ciências e Tecnologias Analíticas: uma abordagem multidisciplinar da Química Analítica. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [http://afonseca@qim.unicamp.br]

12. Flaviane M. S. Cabral, ARAUJO, M. C. U., Renato S. Lima., Alexandre Fonseca, Ivo M. Raimundo Júnior
Desenvolvimento de um Microsistema para Análise de Fármacos In: XV Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 2007, João Pessoa.

XV Encontro de Iniciação Científica da UFPB. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [http://laqa@quimica.ufpb.br]

13. Renato S. Lima., Silva, A. V. F., SANTOS, V. B., GAIAO, E. N., Luciano F. Almeida, ARAUJO, M. C. U.
Desenvolvimento de um Sistema para o Monitoramento Remoto e Contínuo de Parâmetros Físico-Químicos da Qualidade de Águas In: 30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.

30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [http://laqa@quimica.ufpb.br]

14. Paulo H. D. Diniz, Cunha, F. A. S., Renato S. Lima., Thiago B. Guerreiro, Edvan C. Silva, ARAUJO, M. C. U., Valdomiro L. Martins
Determinação de Paracetamol usando um Luminômetro Flow-Batch e Quimiluminescência In: 14 Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa.

Ciências e Tecnologias Analíticas: uma abordagem multidisciplinar da Química Analítica. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [<http://laqa@quimica.ufpb.br>]

15. Valdomito L. Martins, Luciano F. Almeida, Renato S. Lima., Renato A. N. Andrade, Francisco Antônio C. Andrade, Thiago B. Guerreiro, Paulo H. D. Diniz, Wellington S. Lira, ARAUJO, M. C. U.

O Uso de uma Placa de Som para Aquisição de Sinais Analógicos Oriundos de Instrumentos Analíticos In: 14 Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa.

Ciências e Tecnologias Analíticas. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [<http://laqa@quimica.ufpb.br>]

16. GAMBARRA NETO, F. F., Renato S. Lima., Márcio J. C. Pontes, Glimaldo Marino, MEDEIROS, E. P., ARAUJO, M. C. U.

Screening Analysis de Óleos Vegetais usando Voltametria de Onda Quadrada e Quimiometria In: 14 Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa.

Ciências e Tecnologias Analíticas: uma abordagem multidisciplinar da Química Analítica. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [<http://laqa@quimica.ufpb.br>]

17. SANTOS, V. B., Renato S. Lima., Paulo H. D. Diniz, Luciano F. Almeida, ARAUJO, M. C. U., Maria G. R. Vale, Morgana B. Dessuy, Márcia M. Silva

Um Analisador em Fluxo Batelada com Propulsão a Pistão para Determinação de Manganês em Água Mineral por GF AAS In: 30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.

30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [<http://laqa@quimica.ufpb.br>]

18. Renato S. Lima., Alexandre Fonseca, Renato A. N. Andrade, SANTOS, V. B., Ivo M. Raimundo Júnior, ARAUJO, M. C. U.

Um Analisador FIA Miniaturizado com Detecção Biamperométrica para Determinação de Fármacos In: 14 Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa.

Ciências e Tecnologias Analíticas: uma abordagem multidisciplinar da Química Analítica. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [<http://renato-quimica@hotmail.com>]

19. Paulo H. D. Diniz, SANTOS, V. B., Renato S. Lima., Moreira, P. N. T., Dantas E. O., Martins V. L., Silva E. C., ARAUJO, M. C. U., Cunha, F. A. S.

Um Analisador Flow-Batch para Medidas por Quimiluminescência In: 30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.

30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [<http://laqa@quimica.ufpb.br>]

20. SANTOS, V. B., Renato S. Lima., NASCIMENTO, E. C. L., Sérgio Ricardo B. dos Santos, Wallace Duarte Frago, Walter M. de Azevedo, ARAUJO, M. C. U.

Um pHMetro Óptico em Fluxo baseado em um Filme de Polianilina para Análise de Águas Minerais In: 14 Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa.

Ciências e Tecnologias Analíticas: uma abordagem multidisciplinar da Química Analítica. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [<http://laqa@quimica.ufpb.br>]

21. NASCIMENTO, E. C. L., GAIAO, E. N., SANTOS, V. B., Renato S. Lima., K.B.FREITAS, S., ARAUJO, M. C. U.

Screening Analysis para Controle de Qualidade em Gasolinas Tipo C usando Espectrometria NIR e Quimiometria In: XIV Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 2006, João Pessoa.

Centenário do 14 BIS. , 2006.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

22. SANTOS, V. B., GAIAO, E. N., Renato S. Lima., SOUSA, A. S., NASCIMENTO, E. C. L., K.B.FREITAS, S., ARAUJO, M. C. U.

Um Fotômetro NIR para Controle de Qualidade de Gasolinas Tipo C In: XIV Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 2006, João Pessoa.

Centenário do 14 BIS. , 2006.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [<http://laqa@quimica.ufpb.br>]

23. GAIAO, E. N., SANTOS, V. B., SOUSA, A. S., NEGOCIO, Y. F., Renato S. Lima., NASCIMENTO, E. C. L., ARAUJO, M. C. U.

Desenvolvimento de um fotômetro NIR para monitoramento da qualidade de combustíveis In: XIII Encontro Nacional de Química Analítica / I Congresso Íbero-Americano de Química Analítica, 2005, Niterói-RJ.

XIII Encontro Nacional de Química Analítica / I Congresso Íbero-Americano de Química Analítica. , 2005.

Palavras-chave: Adulteração, Combustível, Fotômetro

Áreas do conhecimento : Química, Instrumentação Analítica, Espectroscopia

Setores de atividade : Administração Pública, Defesa e Seguridade Social, Atividades de Assessoria e Consultoria Às Empresas, Ensaios de Materiais e de Produtos; Análise de Qualidade

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro. Home page: [http://edvaldo.nobrega@gmail.com]

24. GAMBARRA NETO, F. F., Renato S. Lima., Wellington S. Lira, Glimaldo Marino, MEDEIROS, E. P., ARAUJO, M. C. U.

Determinação de Tetraciclina usando um sistema FIA Biamperométrico In: XIII Encontro Nacional de Química Analítica / I Congresso Íbero-Americano de Química Analítica, 2005, Niterói-RJ.

XIII Encontro Nacional de Química Analítica / I Congresso Íbero-Americano de Química Analítica. , 2005.

Palavras-chave: Biamperometria, Fármacos, FIA

Áreas do conhecimento : Eletroanalítica, Instrumentação Analítica, Eletroquímica

Setores de atividade : Administração Pública, Defesa e Seguridade Social, Ensaios de Materiais e de Produtos; Análise de Qualidade, Atividades de Assessoria e Consultoria Às Empresas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

25. K.B.FREITAS, S., NASCIMENTO, E. C. L., GAIAO, E. N., SANTOS, V. B., SOUSA, A. S., Renato S. Lima., ARAUJO, M. C. U.

Screening Analysis para Verificação de Adulteração em Combustíveis usando Espectrometria NIR e Métodos Quimiométricos In: XIII Encontro Nacional de Química Analítica / I Congresso Íbero-Americano de Química Analítica, 2005, Niterói.

XIII Encontro Nacional de Química Analítica / I Congresso Íbero-Americano de Química Analítica. , 2005.

Palavras-chave: Screening Analysis, Gasolina, Adulteração

Áreas do conhecimento : Instrumentação Analítica, Espectroscopia, Química

Setores de atividade : Ensaios de Materiais e de Produtos; Análise de Qualidade, Fabricação de Outros Aparelhos e Instrumentos de Medida, Teste e Controle, Exceto Equipamentos Para Controle de Processos Industriais, Administração Pública, Defesa e Seguridade Social

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [http://laqa@quimica.ufpb.br]

Artigos em jornal de notícias

1. Lima, Renato Sousa, Carrilho, Emanuel

Biossensor fornece diagnóstico conclusivo de câncer. Diário da Saúde. , 2011.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: <http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=biossensor-diagnostico-conclusivo-cancer>

2. Lima, Renato Sousa, Carrilho, Emanuel

Biossensor fornece diagnóstico conclusivo de câncer. Blog do Abel. , 2011.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: <http://abeldomoemas.blogspot.com/2011/05/biossensor-fornece-diagnostico.html>

3. Lima, Renato Sousa, Carrilho, Emanuel

Mais precisão no diagnóstico de câncer. Arca Universal. , 2011.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: http://www.arcauniversal.com/qualidadedevida/saude/noticias/mais_precisao_no_diagnostico_de_cancer-5500.html?utm_source=feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%3A+conteudouniversal+%28Arca+Universal%29

4. Renato S. Lima., Wendell K. T. Coltro, Claudimir L. do Lago, Carrilho, Emanuel

Olimpíada USP de Inovação divulga projetos vencedores. Agência FAPESP. , 2011.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: <http://agencia.fapesp.br/14833>

5. Lima, Renato Sousa, Carrilho, Emanuel, Coltro, Wendell Karlos Tomazelli, Claudimir L. do Lago

Projeto do IQSC vence Olimpíada de Inovação da US. USP São Carlos. , 2011.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: http://www.saocarlos.usp.br/index.php?option=com_content&task=view&id=7914&Itemid=121

6. Lima, Renato Sousa, Carrilho, Emanuel, Coltro, Wendell Karlos Tomazelli, Claudimir L. do Lago

Projeto do IQSC vence Olimpíada de Inovação da USP. Informativo IQSC. , 2011.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: http://www.iqsc.usp.br/mostra_noticia?id=4037

7. Lima, Renato Sousa, Carrilho, Emanuel, Coltro, Wendell Karlos Tomazelli, Claudimir L. do Lago

Projeto do IQSC vence Olimpíada de Inovação da USP. São Carlos Agora. , 2011.

Referências adicionais : Brasil/Português. Home page:

<http://www.saocarlosagora.com.br/cidade/noticia/2011/11/24/24437/projeto-do-iqsc-v/>

8. **Lima, Renato Sousa**, Carrilho, Emanuel, Coltro, Wendell Karlos Tomazelli, Claudimir L. do Lago
Projeto do IQSC vence Olimpíada de Inovação da USP. São Carlos Oficial. , 2011.

Referências adicionais : [Brasil/Português](#). Meio de divulgação: [Vários](#). Home [page:](#)
http://www.saocarlosocial.com.br/noticias/?n=Projeto+do+IQSC+vence+Olimpiada+de+Inovacao+da+USP_A4GDPPAPYE

9. **Lima, Renato Sousa**, Wendell K. T. Coltro, Claudimir L. do Lago, Carrilho, Emanuel
Resultado das Olimpíadas USP de Inovação. Revista Online Pesquisa FAPESP. , 2011.

Referências adicionais : [Brasil/Português](#). Meio de divulgação: [Meio digital](#). Home [page:](#)
<http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=71789&bd=2&pg=1&lg=>

10. Renato S. Lima., Emanuel Carrilho

Sistema fornece diagnóstico mais conclusivo de câncer. São Carlos Agora. , 2011.

Referências adicionais : [Brasil/Português](#). Meio de divulgação: [Vários](#). Home [page:](#)
<http://www.saocarlosagora.com.br/cidade/noticia/2011/05/31/18330/sistema-fornece-diagnostico-mais-conclusivo-de-cancer/>

11. Renato S. Lima., Emanuel Carrilho

Sistema fornece diagnóstico mais conclusivo de câncer. Agência USP de Notícias. , 2011.

Referências adicionais : [Brasil/Português](#). Meio de divulgação: [Vários](#). Home [page:](#) <http://www.usp.br/agen/?p=59522>

12. **Lima, Renato Sousa**, Carrilho, Emanuel

Sistema fornece diagnóstico mais conclusivo de câncer. São Carlos USP. , 2011.

Referências adicionais : [Brasil/Português](#). Meio de divulgação: [Vários](#). Home [page:](#)
http://www.saocarlos.usp.br/index.php?option=com_content&task=view&id=5853&Itemid=186

13. **Lima, Renato Sousa**, Carrilho, Emanuel

Sistema fornece diagnóstico mais conclusivo de câncer. Biblioteca de Medicina - UFF. , 2011.

Referências adicionais : [Brasil/Português](#). Meio de divulgação: [Vários](#). Home [page:](#)
<http://bibliotecamedicinauff.blogspot.com/2011/06/sistema-fornece-diagnostico-mais.html>

14. **Lima, Renato Sousa**, Carrilho, Emanuel

Sistema fornece diagnóstico mais conclusivo de câncer. Enfermagem & Saúde. , 2011.

Referências adicionais : [Brasil/Português](#). Meio de divulgação: [Vários](#). Home [page:](#)
<http://www.enfermagemesaude.com.br/noticias/3760/sistema-fornece-diagnostico-mais-conclusivo-de-cancer>

15. Renato S. Lima., Alexandre Fonseca, ARAUJO, M. C. U., Ivo M. Raimundo Júnior

Laboratório desenvolve na UFPB microsistema para identificar medicamentos e outras drogas. Agência de Notícias UFPB. , 2007.

Referências adicionais : [Brasil/Português](#). Meio de divulgação: [Meio digital](#). Home [page:](#)
http://www.agencia.ufpb.br/vernoticias.php?pk_noticia=4241

Artigos em revistas (Magazine)

1. **Lima, Renato Sousa**, Wendell K. T. Coltro, Claudimir L. do Lago, Carrilho, Emanuel

Biossensores detectam o câncer. Pesquisa FAPESP. , p.17 - 17, 2012.

Referências adicionais : [Brasil/Português](#). Meio de divulgação: [Impresso](#)

Apresentação de trabalho e palestra

1. Renato S. Lima., Emanuel Carrilho

Contactless Conductivity Biosensor in Microchip Containing Folic Acid as Bioreceptor, 2011.
(Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : [Brasil/Inglês](#). Meio de divulgação: [Meio digital](#); Cidade: Natal-RN; Evento: International Conference Nanoscale Materials and Devices for Energy Conversion, Storage, and Biosensors

2. Renato S. Lima., Thiago P. Segato, Emanuel Carrilho

Pesquisas Recentes Realizadas no Grupo BioMicS Envolvendo Detecção Condutométrica Sem Contato em Microchips, 2010. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : [Brasil/Português](#). Meio de divulgação: [Outro](#); Cidade: Águas de Lindóia; Evento: II Workshop do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica; Inst.promotora/financiadora: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica (INCT)

3. Renato S. Lima., ARAUJO, M. C. U.

Desenvolvimento de Instrumentação Analítica para o Controle de Qualidade Remoto de Águas, 2007.
(Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: laqa@quimica.ufpb.br; Local: Universidade Federal da Paraíba - Campus I - PB; Cidade: João Pessoa; Evento: XV Encontro de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal da Paraíba

4. Renato S. Lima., ARAUJO, M. C. U.

Desenvolvimento de um Sistema em Escala Piloto para Monitoramento Remoto e Contínuo da Qualidade de Águas, 2006. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Instrumentação, Monitoramento, Água

Áreas do conhecimento : Instrumentação Analítica, Programação, Circuitos Eletrônicos

Setores de atividade : Ensaios de Materiais e de Produtos; Análise de Qualidade, Fabricação de Outros Aparelhos e Instrumentos de Medida, Teste e Controle, Exceto Equipamentos Para Controle de Processos Industriais, Fabricação de Aparelhos e Equipamentos de Telecomunicação

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: laqa@quimica.ufpb.br; Local: Universidade Federal da Paraíba - Campus I - PB; Cidade: João Pessoa; Evento: XIV Encontro de Iniciação Científica da UFPB; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal da Paraíba

5. Renato S. Lima., ARAUJO, M. C. U.

Desenvolvimento de Sistemas Automáticos em Fluxo com Detecção Amperométrica e Biamperométrica para Análise de Medicamentos, 2005. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Biamperometria, Fármacos, FIA

Áreas do conhecimento : Instrumentação Analítica, Eletroanalítica, Espectroscopia

Setores de atividade : Ensaios de Materiais e de Produtos; Análise de Qualidade, Desenvolvimento de Produtos Tecnológicos Voltados Para A Saúde Humana, Cuidado À Saúde das Pessoas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: laqa@quimica.ufpb.br; Local: Espaço Cultural; Cidade: João Pessoa; Evento: XIII Encontro de Iniciação Científica da UFPB; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal da Paraíba

Produção técnica

Processos ou técnicas sem registro ou patente

1. Renato S. Lima, Ângelo L. Gobbi, Carrilho, Emanuel

Microdispositivo com eletrodos concêntricos e seu processo de produção, 2013, patente, titulares: USP e CNPEM.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2. Renato S. Lima, Maria H. O. Piazzetta, Ângelo L. Gobbi

Improving the quality of the adhesive bonding process, 2013, memorando técnico, CNPEM.

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso. Home page: <http://intranet.cnpem.org.br/formularios/Inf/NotaTecnica/DB/2131/MeT%20-%20Air-Trappings.pdf>

3. Renato S. Lima, Maria H. O. Piazzetta, Ângelo L. Gobbi, Carrilho, Emanuel

Selagem adesiva de sacrifício: fabricação simples e rápida de microdispositivos, 2013, patente, titulares: USP e CNPEM.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

4. Renato S. Lima, Leandro Y. Shiroma, Ângelo L. Gobbi

Microemulsificação: uma alternativa potencial para determinações analíticas, 2013, patente, titulares: USP e Petrobras.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Demais produções técnicas

1. Anderson Fiamingo, Renato S. Lima.

Determinação de Biomarcadores Tumoriais, 2010. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: <http://www.gpeqsc.com.br/casos/caso14.php>

2. Renato S. Lima.

Pré-avaliador de projetos científicos da Feira de Ciências e Engenharia (FEBRACE) da USP, 2010. (Outra produção técnica)

Referências adicionais : Brasil/Português.

Inovação

Processos ou técnicas sem registro ou patente

1. **Renato S. Lima**, Ângelo L. Gobbi, Carrilho, Emanuel

Microdispositivo com eletrodos concêntricos e seu processo de produção, 2013, patente, titulares: USP e CNPEM.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2. **Renato S. Lima**, Maria H. O. Piazzetta, Ângelo L. Gobbi

Improving the quality of the adhesive bonding process, 2013, memorando técnico, CNPEM.

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso. Home page: <http://intranet.cnpem.org.br/formularios/Inf/NotaTecnica/DB/2131/MeT%20-%20Air-Trappings.pdf>

3. **Renato S. Lima**, Maria H. O. Piazzetta, Ângelo L. Gobbi, Carrilho, Emanuel

Selagem adesiva de sacrifício: fabricação simples e rápida de microdispositivos, 2013, patente, titulares: USP e CNPEM.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

4. **Renato S. Lima**, Leandro Y. Shiroma, Ângelo L. Gobbi

Microemulsificação: uma alternativa potencial para determinações analíticas, 2013, patente, titulares: USP e Petrobras.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Workshop de pós-graduação: A nova pós-graduação do IQSC**, 2010. (Outra)

Biossensor condutométrico sem contato em microchip contendo ácido fólico como biorreceptor.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Workshop de pós-graduação: A nova pós-graduação do IQSC**, 2010. (Outra)

Dopagem da camada dielétrica: Uma nova alternativa para aumento de sensibilidade da detecção condutométrica sem contato em microchips.

3. Apresentação Oral no(a) **II Workshop do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica**, 2010. (Seminário)

Pesquisas Recentes Realizadas no Grupo BioMicS Envolvendo Detecção Condutométrica Sem Contato.

4. Apresentação Oral no(a) **31 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008. (Congresso)

Um Analisador em Fluxo-Batelada com Propulsão a Pistão para Determinação de Metais Pesados em Microemulsões de Gasolina por GF AAS.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **14 Encontro Nacional de Química Analítica**, 2007. (Congresso)

Avaliação do Uso de um Microcontrolador Programável para a Automação de um Sistema de Análise por Injeção em Fluxo Miniaturizado.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV Encontro de Iniciação Científica da UFPB**, 2007. (Encontro)

Desenvolvimento de um Microsistema para Análise de Fármacos.

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007. (Congresso)
Desenvolvimento de um Sistema para o Monitoramento Remoto e Contínuo de Parâmetros Físico-Químicos de Qualidade de Águas.
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **14 Encontro Nacional de Química Analítica**, 2007. (Congresso)
Determinação de Paracetamol usando um Luminômetro Flow-Batch e Quimiluminescência.
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **14 Encontro Nacional de Química Analítica**, 2007. (Congresso)
O uso de Placa de Som para Aquisição de Sinais Analógicos oriundos de Instrumentos Analíticos.
10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **14 Encontro Nacional de Química Analítica**, 2007. (Congresso)
Screening Analysis de Óleos Vegetais usando Voltametria de Onda Quadrada e Quimiometria.
11. Apresentação de Poster / Painel no(a) **30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007. (Congresso)
Um Analisador em Fluxo Batelada com Propulsão a Pistão para Determinação de Manganês em Água Mineral por GF AAS.
12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **14 Encontro Nacional de Química Analítica**, 2007. (Congresso)
Um Analisador FIA Miniaturizado com Detecção Biamperométrica para Determinação de Fármacos.
13. Apresentação de Poster / Painel no(a) **30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007. (Congresso)
Um Analisador Flow-Batch para Medidas por Quimiluminescência.
14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **14 Encontro Nacional de Química Analítica**, 2007. (Congresso)
Um pHMetro Óptico em Fluxo baseado em um Filme de Polianilina para Análise de Águas Minerais.
15. **II Workshop do Projeto 0081/05-1 CAPES-PROCAD/Instrumentação e Metodologias Espectroanalíticas**, 2007. (Simpósio)
.
16. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIV Encontro de Iniciação Científica da UFPB**, 2006. (Encontro)
Screening Analysis para Controle de Qualidade em Gasolinas Tipo C usando Espectrometria NIR e Quimiometria.
17. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIV Encontro de Iniciação Científica da UFPB**, 2006. (Encontro)
Um Fotômetro NIR para Controle de Qualidade de Gasolinas Tipo C.

Citações

Web of Science Total de citações: 104; Total de trabalhos : 14; Data : 22/10/2013; Fator H: 6;
Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:
Lima RS

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	14
Jornais de Notícias.....	15
Revistas (Magazines).....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	27
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra).....	1
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	1
Apresentações de trabalhos (Simpósio).....	3
Demais produções bibliográficas.....	1

Produção técnica

Processos ou técnicas (analítica).....	2
Processos ou técnicas (instrumental).....	1
Desenvolvimento de material didático ou instrucional.....	1
Outra produção técnica.....	1

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	10
Participações em eventos (seminário).....	1
Participações em eventos (simpósio).....	1
Participações em eventos (encontro).....	3
Participações em eventos (outra).....	2