AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Desenvolvimento e Controle de Circuitos Microfluídicos

Cristhiano da Costa Herrera

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. Wagner de Rossi

São Paulo
2018

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Desenvolvimento e Controle de Circuitos Microfluídicos

Cristhiano da Costa Herrera

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. Wagner de Rossi

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2018

Fonte de Financiamento: FAPESP

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

HERRERA, C. d. C. ***Desenvolvimento e Controle de Circuitos Microfluídicos***. 2018. 147 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Herrera, Cristhiano da Costa
Desenvolvimento e Controle de Circuitos Microfluídicos / Cristhiano da Costa Herrera; orientador Wagner de Rossi. -- São Paulo, 2018.
147 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2018.

1. Circuitos Microfluídicos. 2. Laser de femtossegundos. 3. PDMS. 4. BK7. I. Rossi, Wagner de, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Cristhiano da Costa Herrera

Título: Desenvolvimento e Controle de Circuitos Microfluídicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: 14/12/2018.

Presidência (Orientador)

Prof. Dr.: Wagner de Rossi

Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Eduardo Landulfo

Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Ardson dos Santos Vianna Júnior

Instituição: Departamento de Engenharia Química - Escola Politécnica Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Pedro Roberto Goulart

Instituição: Instituto Federal de São Paulo - IFSP Julgamento: Aprovado

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Wagner de Rossi por toda a sua atenção, compreensão, orientação e amizade, fundamental para todo o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos pesquisadores do CLA, Dra. Sônia Lícia Baldochi, Dra. Martha Simões Ribeiro, Dr. Ricardo Elgul Samad, Dr. Marcus Paulo Raele, Dr. Anderson Zanardi de Freitas e Dra. Denise Maria Zezell pelas colaborações.

Agradeço ao Dr. Patrick Jack Spencer do Centro de Biotecnologia pela imensa colaboração com os insumos e assessoria nos testes de imuno-ensaio ELISA.

Agradeço ao Dr. Ardson dos Santos Vianna Júnior da Escola Politécnica de Engenharia Química e ao seu aluno de Doutorado José Carlos Gonçalves Peres pela colaboração e parceria na simulação do circuito microfluídico para síntese de nanocristais luminescentes que permitiu um melhor entendimento do comportamento dos fluxos dos reagentes e um estreitamento nas relações de amizade.

Agradeço à aluna de mestrado Thayná Amorim, orientada pela Dra. Sônia Baldochi, que passou muito tempo realizando ensaios com o microcircuito para síntese de nanocristais em minha companhia.

Agradeço ao aluno de mestrado Antônio Gomes pela imensa colaboração, contribuindo muito para o sucesso desse trabalho.

Agradeço ao aluno de pós-Doutorado Paulo Guanabara pelas colaborações e amizade.

Agradeço aos técnicos de Laboratório Mecânico do CLA, Marcos e Paulinho que auxiliaram na confecção de vários dispositivos e peças que permitiram alcançar o sucesso almejado.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro ao Projeto Temático.

Quero deixar também um agradecimento especial à minha irmã Cristina e meu cunhado Américo pelos anos que pernoitei na casa deles durante o período de estudos e pesquisas.

Por último um agradecimento muito especial à minha esposa Joceli e minha filha Vanessa pela compreensão relativa aos infinitos dias passados longe de casa durante o período do Doutorado.

RESUMO

HERRERA, Cristhiano d. C. **Desenvolvimento e Controle de Circuitos Microfluídicos**, 2018, 147p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN - CNEM/SP. São Paulo.

A primeira etapa do projeto foi realizar testes para usinagem controlada e otimizada de vidro ótico de borosilicato (BK7) por laser de femtossegundos. Parâmetros como energia, pulsos sobrepostos e a variação da posição focal foram investigados para controle da taxa de remoção do material e extensão da cratera ablacionada. Especial atenção foi dada à condição física e topográfica da superfície resultante da usinagem para torná-la menos rugosa e evitar a retenção de reagentes que possam contaminar e alterar as reações pretendidas. Microcanais, microválvulas, microbombas, misturadores, microrreatores, aquecedores e outros componentes foram desenvolvidos para compor sistemas microfluídicos. Os microcanais construídos sobre a superfície de vidro BK7 vedados por uma lâmina de polidimetilsiloxano (PDMS) são a base dos sistemas microfluídicos. O controle de fluxo de reagentes é feito por miniválvulas pneumáticas controladas por um microcontrolador Arduino através de uma plataforma Labview. Este trabalho mostra os componentes desenvolvidos e dois sistemas microfluídicos criados. O primeiro contém um circuito capaz de replicar ensaios imunoenzimáticos (ELISA) com um custo muito menor de insumos. O segundo é um sistema para a produção de nanocristais fluorescentes de $NaYF_4$ especialmente utilizados como marcadores em imagens de sistemas biológicos.

Palavras-chave: sistemas microfluídicos, PDMS, BK7, laser de femtossegundos.

ABSTRACT

HERRERA, Cristhiano d. C. **Development and Control of Microfluidic Circuits**, 2018, 147p. Thesis (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEM/SP. São Paulo.

The first stage of the project was to perform tests for controlled and optimized machining of borosilicate optical glass (BK7) by femtosecond laser**.** Parameters such as energy, number of overlapped pulses, and the focal position variation were investigated for a better extraction of material. Microchannels, microvalves, micropumps, mixers, reactors, heaters and other components were developed to compose applied microfluidic systems. Microchannels built on the surface of BK7 glass sealed by a polydimethylsiloxane (PDMS) sheet form the basis of the microfluidic circuits. The reagents flow control is done by pneumatic mini-valves controlled by an Arduino microcontroller through a Labview platform. This work shows the components developed and two microfluidic systems created. The first contains a microfluidic circuit capable of replicating enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) with a much lower cost of materials. The second has a microfluidic circuit for the production of NaYF4 fluorescent nanocrystals specially used as markers in images of biologic systems**.**

Key-words: microfluidic systems, PDMS, BK7, femtosecond laser.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
2 OBJETIVOS 22
3 REVISÃO DA LITERATURA 23
3.1 Histórico da Microfluídica 23
3.2 Aspectos teóricos da Microfluídica 24
3.2.1 Características físicas do regime microfluídico 24
3.2.2 Equações físicas do fluxo em regime microfluídico 26
3.2.3 Solução analítica de Navier-Stokes 27
3.2.3.1 Fluxo de Poiseuille 27
3.2.3.2 Fluxo de Poiseuille em seções retangulares 29
3.3 Interação da radiação de pulsos laser com a matéria 33
3.3.1 Mecanismos de Absorção 35
3.3.2 Mecanismos de Ablação a Laser 37
3.3.2.1 Pulsos Longos 38
3.3.2.2 Pulsos Ultracurtos 40
3.3.2.2.1 Ablação não Térmica - Efeito Coulomb 42
3.3.2.2.2 Ablação Térmica - Explosão de Fase 43
3.3.2.2.3 Efeito de Incubação 43
3.3.2.2.4 Estruturas Periódicas Superficiais Produzidas por Laser (LIPSS) 44
3.3.3 Limiar de Ablação 46
3.3.3.1 Método D-SCAN 48
3.3.4 Propagação e focalização de feixes gaussianos 50
3.4 Microfluídica e Aplicações 53
3.4.1 Plataforma ELISA 53
3.4.2.1 Difração de Raios-X 56
3.4.2.2 Método de Rietveld 57
4 PARTE EXPERIMENTAL 58
4.1 Usinagem a laser com pulsos ultracurtos. 58
4.1.1 Estação de usinagem 1 58
4.1.2 Estação de usinagem 2 59
4.2 Estação de controle de pressão e fluxo 61

4.3 Circuitos microfluídicos 62
4.4 Componentes microfluídicos 64
4.4.1 Conectores 64
4.4.2 Microválvula 65
4.4.3 Microbomba 67
4.4.4 Sistema de aquecimento 72
4.4.4.1 Sistema de aquecimento global 72
4.4.4.2 Sistema de aquecimento localizado 74
4.5 Sistemas Microfluídicos 75
4.5.1 Microcircuito para teste ELISA 75
4.5.2 Microcircuitos para a síntese de nanocristais 79
4.5.2.1 Microcircuito para análise de fluxos 79
4.5.2.2 Microcircuito CHIP1 80
4.5.2.3 Microcircuito CHIP2 80
4.5.2.4 Microcircuito CHIP3 81
4.6 Simulador de fluxo - Microcircuito para síntese de nanocristais .. 83
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 85
5.1 Usinagem a laser em vidro BK7 com pulsos ultracurtos 85
5.1.1 Usinagem na Estação 1 85
5.1.2 Usinagem na Estação 2 89
5.2 Componentes microfluídicos 92
5.2.1 Conectores 92
5.2.2 Microválvula 93
5.2.2.1 Dispositivo para determinar a relação pressão x flexão do PDMS 94
5.2.3 Microbomba 99
5.2.4 Controle de temperatura 101
5.2.4.1 Sistema de aquecimento global 101
5.2.4.2 Sistema de aquecimento localizado 104
5.2.4.2.1 Texturização do elemento aquecedor - LIPSS 104
5.2.4.2.2 Dispositivo para medida de temperatura e comprovação do sistema 106
5.3 Sistemas Microfluídicos 112
5.3.1 Sistema para teste ELISA 112
5.3.2 Sistema para síntese de nanocristais 116

5.3.2.1 Análise teórica do fluxo nos microcanais 117
5.3.2.2 Valores de fluxo obtidos por simulação 118
5.3.2.3 Medidas de fluxo para o primeiro circuito construído 120
5.3.2.4 Comparação entre fluxos calculados, simulados e medidos 120
5.3.2.3 Resultados da síntese de nanopartículas 122
5.4 Simulador de fluxo - Microcircuito para síntese de nanocristais 132
6 CONCLUSÕES 134
7 TRABALHOS FUTUROS 136
8 TRABALHOS PUBLICADOS 137
9 PATENTE 138
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 139

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Medidas das vazões geradas pela microbomba..... 100

Tabela 2 - Comparativo entre os fluxos obtidos por cálculo, simulação e por medidas
no microcircuito da Figura 76..... 121

Tabela 3 - Parâmetros de síntese de NaYF4:Yb:Er utilizando-se o CHIP1 e resultados observados na análise dos dados de Difração de raio-X pelo método de Rietveld..... 124

Tabela 4 - Parâmetros de síntese de NaYF4:Yb:Er utilizando-se o CHIP2 e resultados observados na análise dos dados de Difração de raio-X pelo método de Rietveld..... 126

Tabela 5 - Parâmetros de síntese de NaYF4:Yb:Er utilizando-se o CHIP3 e resultados observados na análise dos dados de Difração de raio-X pelo método de Rietveld..... 129

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Fluxo de Poiseuille em um canal com seção transversal arbitrária no plano yz..... 27
Figura 2 - Microcanal retangular com profundidade h e largura w..... 29
Figura 3 - Linhas de contorno da velocidade vx(y,z) na seção transversal de um canal retangular..... 30
Figura 4 - Vários mecanismos de ablação a laser..... 37
Figura 5 - Ablação originada por pulsos longos..... 40
Figura 6 - Ablação originada por pulsos ultracurtos..... 42
Figura 7 - MEV de LIPSS gerados com baixa fluência no aço inoxidável austenítico ASTM F138..... 45
Figura 8 - Método D-SCAN - A amostra é transladada simultaneamente na direção z+ e y+..... 48
Figura 9 - Desenho esquemático do perfil gerado pela movimentação da amostra pelo método D-SCAN..... 49
Figura 10 - Traços de D-scan realizados em vidro óptico BK7 com pulsos de 152 fs e energia de 207μJ para diferentes sobreposições N, onde são mostradas as posições de medição de ρmax..... 50
Figura 11 - Propagação de um feixe gaussiano..... 51
Figura 12 - Estação 1 de Microusinagem a laser..... 59
Figura 13 - Estação 2 de Microusinagem a laser..... 60
Figura 14 - Mesa CNC XYZ..... 60
Figura 15 - Componentes da estação de trabalho para controle de pressão e fluxo..... 61
Figura 16 - Estação de Trabalho..... 62
Figura 17 - Esquema de montagem do circuito microfluídico..... 63
Figura 18 - Sistema microfluídico montado..... 63
Figura 19 - Conector inserido na parte usinada..... 64
Figura 20 - Esquema de funcionamento da microválvula *ON/OFF*..... 65
Figura 21 - Microválvula em canal de 200 μm, placa de vidro inferior..... 66
Figura 22 - Microválvula em canal de 200 μm, placa de vidro superior..... 66

Figura 23 - Microválvula montada com PDMS entre as placas de vidros superior e inferior..... 67
Figura 24 - Esquema da microbomba por efeito peristáltico..... 68
Figura 25 - Usinagem da microbomba no canal inferior..... 68
Figura 26 - Usinagem da microbomba no canal superior..... 69
Figura 27 - Microbomba montada com PDMS entre as placas de vidros superior e inferior..... 69
Figura 28 - Circuito da microbomba por efeito peristáltico..... 70
Figura 29 - Microbomba com sequência em três passos..... 70
Figura 30 - Microbomba com sequência em quatro passos..... 71
Figura 31 - Microbomba com sequência em cinco passos..... 71
Figura 32 - Peça de cobre para aquecimento..... 72
Figura 33 - Peça de alumínio para aquecimento..... 73
Figura 34 - Dispositivos utilizados para aquecimento global de microcircuitos.. 73
Figura 35 - Ilustração do sistema de aquecimento localizado..... 75
Figura 36 - Circuito microfluídico para teste ELISA..... 76
Figura 37 - Sistema de armazenamento dos reagentes..... 77
Figura 38 - Primeiro microcircuito construído para síntese de nanocristais..... 79
Figura 39 - Microcircuito para síntese de nanocristais - CHIP1..... 80
Figura 40 - Microcircuito para síntese de nanocristais - CHIP2..... 81
Figura 41 - Microcircuito para síntese de nanocristais - CHIP3..... 82
Figura 42 - Vista isométrica do primeiro microcircuito adaptado para simulação da síntese de nanocristais..... 83
Figura 43 - Vista isométrica do microcircuito CHIP1 adaptado para simulação da síntese de nanocristais..... 84
Figura 44 - Profundidade alcançada x Número de pulsos para diferentes Energias e diferentes velocidades de varredura. 86
Figura 45 - MEV da usinagem em vidro BK7 com uma passagem..... 87
Figura 46 - MEV do microcanal usinado com polarização circular..... 88
Figura 47 - Perfilometria ótica de um canal usinado com parâmetros otimizados - Estação 1..... 88
Figura 48 - MEV do fundo do microcanal com polarização linear..... 90
Figura 49 - MEV do microcanal usinado para alojar o terminal..... 90
Figura 50 - MEV com detalhes da região circular usinada no vidro de controle. 91

Figura 51 - Perfilometria ótica de um canal usinado com parâmetros otimizados - Estação 2..... 91
Figura 52 - Conector para sistemas microfluídicos com pressões de no máximo 10 psi..... 93
Figura 53 - Conector para sistemas microfluídicos com pressões acima de 10 psi..... 93
Figura 54 - Esquema da microválvula onde o diâmetro do furo no vidro superior define o quanto o PDMS flexiona em função da pressão exercida pelo líquido contido no microcanal do vidro inferior..... 94
Figura 55 - Componentes do dispositivo para medida de flexão do PDMS..... 95
Figura 56 - Vista inferior e superior do dispositivo para medida da flexão do PDMS..... 95
Figura 57 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 2 psi..... 96
Figura 58 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 4 psi..... 96
Figura 59 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 6 psi..... 97
Figura 60 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 8 psi..... 97
Figura 61 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 10 psi..... 98
Figura 62 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 12 psi..... 98
Figura 63 - Painel frontal do controle de microbomba - Plataforma Labview..... 99
Figura 64 - Escala milimétrica para leitura do deslocamento do líquido na mangueira..... 100
Figura 65 - Controle de temperatura *ON-OFF* para 110 ºC.....101
Figura 66 - Controle de temperatura PID para 110 ºC..... 102
Figura 67 - Controle de temperatura ON-OFF e PID para 110 ºC. 102
Figura 68 - Aquecimento global à 60 °C do sistema microfluídico para síntese de nanocristais.....103
Figura 69 - Aquecimento global à 80 °C do sistema microfluídico para síntese de nanocristais..... 103
Figura 70 - Retângulos coloridos sobre a superfície do aço inoxidável ASTM F138 produzido pela formação de LIPSS. Aumento da sobreposição de pulsos da região 1 para a 8..... 104
Figura 71 - Microscopia Eletrônica da região 1 irradiada. Os LIPSS apresentam uma linearidade..... 105

Figura 72 - Microscopia Eletrônica da região 8 irradiada. Ao aumentar a taxa de sobreposição dos pulsos os LIPSS perdem a linearidade, adquirindo características granulares..... 105
Figura 73 - Espectro de reflexão da luz nas regiões 1 e 8. Na região 8 com maior taxa de sobreposição de pulsos a absorção da luz fica acima de 90% (reflexão < 10%)..... 106
Figura 74 - Disco de aço inoxidável colado na pastilha cerâmica..... 107
Figura 75 - Vista ampliada do disco de aço inox colado na pastilha cerâmica... 107
Figura 76 - Disco de aço inoxidável com face texturizada inserido na pastilha cerâmica..... 108
Figura 77 - Vista ampliada do disco de aço inoxidável texturizado inserido na pastilha cerâmica..... 108
Figura 78 - Arranjo de espelhos para focalizar o feixe na peça a ser aquecida e aumentar o diâmetro do feixe no ponto focal..... 109
Figura 79 - Câmera Termográfica Thermacam SC3000 - FLIR utilizada para medidas de temperatura..... 109
Figura 80 - Medidas de temperatura com irradiação do laser pelo lado polido Medidas feitas com câmera térmica..... 110
Figura 81 - Medidas de temperatura com irradiação do laser pelo lado polido e pelo lado texturizado utilizando termopar tipo K..... 111
Figura 82 - Painel frontal Labview para controle das entradas dos reagentes no sistema microfluídico para teste ELISA..... 112
Figura 84 - Coloração imediatamente após a injeção da solução de ortofenildiamina..... 114
Figura 85 - Coloração após decorridos 20 min da injeção da solução de ortofenildiamina..... 114
Figura 86 - Coloração após decorridos 20 min da injeção da solução na placa de poços..... 115
Figura 87 - Painel frontal Labview para controle das entradas dos reagentes no sistema microfluídico para síntese de nanocristais..... 116
Figura 88 - Ilustração do primeiro microcircuito construído para síntese de nanocristais..... 117
Figura 89 - Vazão em um canal retangular reto com comprimento igual ao..... 118

Figura 90 - Vista isométrica do microcircuito adaptado para simulação de fluxos..... 119
Figura 91 - Fluxo obtido por simulação para o circuito da Figura 90..... 119
Figura 92 - Fluxo de água através do primeiro microcircuito construído em função da pressão externa utilizada para empurrá-la..... 120
Figura 93 - Gráfico comparativo entre Calculado, Simulado e Medido..... 121
Figura 94 - Projeto básico do circuito microfluídico para síntese de nanocristais - CHIP1..... 123
Figura 95 - Resultado gráfico da análise pelo método de Rietveld do difratograma da amostra 1#CHIP1..... 124
Figura 96 - Projeto básico do circuito microfluídico para síntese de nanocristais - CHIP2..... 125
Figura 97 - Resultado gráfico da análise pelo método de Rietveld do difratograma da amostra 2#CHIP2..... 127
Figura 98 - Projeto básico do circuito microfluídico para síntese de nanocristais - CHIP3..... 128
Figura 99 - Resultado gráfico da análise pelo método de Rietveld da amostra 6#CHIP3..... 130
Figura 100 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostra obtida no CHIP3..... 131
Figura 101 - Desenho do primeiro microcircuito proposto para síntese de nanocristais. O mesmo não foi usinado porque o simulador de fluxo indicou que curvas circulares promovem uma melhor mistura..... 132
Figura 102 - Desenho do primeiro circuito usinado para síntese de nanocristais..... 133

LISTA DE ABREVIATURAS

(^{18}F-FDG)	fluor-desoxi-glicose (^{18}F)
BK7	vidro ótico de borosilicato
CB	Centro de Biotecnologia
CFD	Dinâmica de Fluidos Computacional
CLA	Centro de Lasers e Aplicações
DRX	Difração de Raios-X
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
LIPSS	Estruturas Periódicas Superficiais Produzidas por Laser
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NC(s)	nanocristal ou nanocristais
OCT	Tomografia por Coerência Ótica
ON-OFF	liga-desliga
PDMS	polidimetilsiloxano
PET	Tomografia por Emissão de Positron
PI	Proporcional e Integral
PID	Proporcional, Integral e Derivativo
psi	libras por polegada quadrada (pounds per square inch)
ZTA	Zona Termicamente Afetada

LISTA DE SÍMBOLOS

Re	número de Reynolds
ρ	densidade
v	velocidade
D_H	diâmetro hidráulico
η	viscosidade dinâmica do fluido
A	área da seção transversal do microcanal
P	perímetro da seção transversal do microcanal
w	largura do microcanal
h	altura ou profundidade do microcanal
t	tempo
p	pressão
∇p	gradiente de pressão
f_b	força por unidade de volume agindo no corpo (forças gravitacionais)
v	viscosidade cinemática do fluido
L	comprimento do microcanal
Q	vazão ou taxa de fluxo
l_T	comprimento de difusão térmica no material
D_T	difusividade térmica do material
τ_ℓ	largura temporal do pulso laser
l_α	profundidade de penetração ótica do material
α	coeficiente de absorção ótica do material
Δh	espessura da camada ablacionada por pulso
N	número de pulsos laser sobrepostos
F_{th}	fluência de limiar de ablação
$F_{th}(1)$	fluência de limiar de ablação para um único pulso laser
$F_{th}(N)$	fluência de limiar de ablação para N pulsos laser sobrepostos
$F_{th}(\infty)$	fluência de limiar de ablação para infinitos pulsos laser sobrepostos
k	coeficiente de incubação do material
F_0	fluência no ponto focal
D_c	diâmetro da cratera ablacionada pelo feixe laser
w_0	raio do feixe laser no ponto focal

E_0	energia do feixe laser
ρ_{max}	raio da dimensão transversal máxima do perfil obtido na superfície da amostra pelo método D-SCAN
ϑ_3	função elíptica do terceiro tipo, teta de Jacobi
v_y	velocidade de translação transversal da amostra
f_R	taxa de repetição do laser
Θ	divergência do feixe laser
Θ_∞	divergência do feixe laser no infinito
z	distância em relação ao ponto focal da lente
$w(z)$	raio do feixe laser a uma distância z do ponto focal da lente
λ	comprimento de onda do feixe laser
M^2	fator de qualidade
f	comprimento focal da lente
D_L	diâmetro do feixe incidente sobre a lente
d_{min}	diâmetro do feixe no ponto focal
D_0	diâmetro do feixe laser no ponto focal
$D(z)$	diâmetro do feixe laser a uma distância z do ponto focal da lente
Δz	variação da profundidade obtida pela usinagem
θ	ângulo de inclinação das paredes laterais dos microcanais em relação ao topo dos mesmos

1 INTRODUÇÃO

Microfluídica é a área do conhecimento em que se processam ou se manipulam pequenas quantidades de fluidos, volumes da ordem de microlitros, nanolitros ou ainda menores, utilizando canais com dimensões de dezenas a centenas de micrometros [1]. A produção de dispositivos com canais destas dimensões tem permitido a redução de custos com matérias primas e permitido fabricar sistemas complexos com alguns centímetros quadrados [2].

Sistemas microfluídicos permitem a manipulação de volumes muito baixos de produtos químicos em aplicações biológicas; produtos estes que podem ser caros ou particularmente raros, permitindo uma redução de custo muito grande [3, 4]. O tempo dos experimentos também pode ser drasticamente reduzido, caindo de horas para minutos, para imunoensaios típicos. Além disso, erros advindos de manipulações manuais podem ser evitados, obtendo-se assim, maior reprodutibilidade e controle destas manipulações [5].

A integração de microssistemas está permitindo o desenvolvimento de dispositivos médicos e biológicos e realçam que a integração em um único *chip*, conhecido como *Lab-on-a-Chip* (LOC), de sensores, atuadores, processadores de sinais e comunicação sem fio permitem uma medicina personalizada com diagnóstico precoce e aplicações terapêuticas, bem como o acompanhamento de seres vivos [5].

Várias aplicações com circuitos microfluídicos têm sido relatadas realçando as vantagens desta tecnologia. Uma das aplicações relatadas é o teste ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), um ensaio de imunoabsorção enzimática que permite a detecção de anticorpos específicos no plasma sanguíneo. Este teste é usado no diagnóstico de várias doenças que induzem a produção de imunoglobulinas. Entre as doenças passíveis de diagnóstico pelo teste, estão várias doenças infecciosas, uma vez que a maioria dos agentes patológicos desencadeia a produção de imunoglobulinas [6].

O teste ELISA convencional envolve um protocolo trabalhoso e tedioso que muitas vezes resulta em erros e resultados inconsistentes. O processo requer uma série de misturas (reacional / de incubação) e passos de lavagem, que

podem levar de muitas horas a até dois dias para efetuar um ensaio, devido aos longos tempos de incubação de cada passo [7].

Nanocristais (NCs) têm despertado interesse como marcadores em imagens de sistemas biológicos por apresentarem várias vantagens em relação aos biomarcadores fluorescentes convencionais. Algumas destas vantagens são: redução da autofluorescência; maior penetração da luz; não causam foto-danos em organismos vivos e aumentam a resolução espacial das imagens. Para aplicação eficiente destes materiais, é importante que os mesmos tenham alta eficiência quântica luminescente, a qual pode ser otimizada através da manipulação do tamanho do NC, da concentração de íons de terras-raras, da co-dopagem e da escolha do material hospedeiro [8].

Sistemas microfluídicos oferecem uma solução para estes desafios e têm um papel cada vez mais importante na síntese de nanocristais, pois microambientes térmicos e estequiométricos altamente controlados podem ser obtidas no processo de síntese [8].

A Tomografia por Emissão de Positron (*Positron Emission Tomography* - PET) é um tipo altamente sensível de imagiologia médica, não invasiva, para medição específica e quantitativa da atividade bioquímica. Ele é usado em pacientes para diagnose de câncer ou Alzheimer, para monitoração do tratamento do câncer, visualização das respostas imunes, e muitas outras aplicações clínicas e de pesquisa [9]. A imagem obtida pelo PET requer a emissão de um isótopo. O fluor-desoxi-glicose (^{18}F-FDG) tem sido o compósito mais amplamente utilizado para a detecção de tumores cerebrais e sistêmicos, e relata-se que a magnitude da sua absorção pode indicar o grau do tumor [10]. Mais de 1 milhão de doses para diagnose foram produzidas nos Estados Unidos em 2004 e um número similar no resto do mundo [11]. A meia-vida curta de 110 minutos deste biomarcador coloca uma restrição significativa de apenas algumas horas para a sua produção e a injeção do produto no paciente [12].

Um sistema microfluídico pode manipular pequenos volumes de fluidos em microcanais. Muitas reações biológicas e sínteses químicas podem ser melhoradas, a transferência de massa e calor são muito rápidas, assim tanto o consumo de reagentes como o tempo de processo ou reação é significativamente reduzido, tornando atrativo a utilização de um sistema microfluídico para a

produção do radioisótopo (^{18}F-FDG), pois a quantidade necessária para um único paciente é extremamente diminuta [13].

Os circuitos microfluídicos descritos podem ser feitos com a usinagem por pulsos de laser ultracurtos com qualidade superior às obtidas por pulsos de nanossegundos [14-18]. Pulsos de femtossegundos produzem uma difusão insignificante de calor no material resultando em uma zona termicamente afetada (ZTA) reduzida em torno do ponto de laser [19-21] assegurando geometrias precisas.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste em desenvolver sistemas microfluídicos usinados em vidro BK7 através de pulsos laser de femtossegundos para aplicações específicas nas áreas químicas e biológicas e todo o sistema de controle de forma a permitir a automação de processos.

Para atingir o objetivo algumas etapas foram definidas:

- ✓ Realizar experimentos de usinagem utilizando laser com pulsos ultracurtos, visando obter a topografia da superfície dos microcanais com menor rugosidade a fim de se evitar a retenção de reagentes que possam contaminar e alterar as reações previstas nas várias pesquisas.
- ✓ Desenvolver componentes microfluídicos básicos como: conectores, microválvulas *ON/OFF*, microbombas, microrreatores e aquecedores para uso em sistemas microfluídicos.
- ✓ Desenvolver o controle de fluxo de fluidos através de miniválvulas pneumáticas utilizando microcontrolador Arduino e plataforma Labview.
- ✓ Produzir um sistema microfluídico para teste ELISA com o intuito de diminuir o volume dos reagentes utilizados, melhoria na eficiência da reação e redução nos tempos de reação e incubação.
- ✓ Construir um sistema microfluídico para produção e controle de tamanho de nanocristais luminescentes $NaYF_4:Y_b/E_r$.
- ✓ Desenvolver componentes necessários para a produção de um sistema microfluídico que viabilize a produção do radioisótopo (^{18}F-FDG).

3 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção, são apresentados um histórico da microfluídica, aspectos teóricos relevantes ao desenvolvimento da pesquisa e alguns conceitos envolvidos na microusinagem a laser.

3.1 Histórico da Microfluídica

O campo da microfluídica tem sua origem inspirada em quatro fontes: análise molecular, biodefesa, biologia molecular e microeletrônica.

As origens distantes da microfluídica estão nos métodos microanalíticos - cromatografia em fase gasosa (GPC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE) - que, em formato capilar, revolucionaram a análise química. Com o sucesso desses métodos, parecia óbvio desenvolver novos formatos mais compactos e versáteis para eles, e procurar outras aplicações de métodos de microescala em química e bioquímica [1].

A segunda contribuição para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos veio após o fim da guerra fria porque as armas químicas e biológicas representavam grandes ameaças militares e terroristas. Para combater essas ameaças, o Departamento de Defesa dos Estados Unidos (DARPA, *Defense Advanced Research Projects Agency*) - apoiou uma série de programas na década de 1990 ao desenvolvimento de sistemas microfluídicos para servir como detectores de ameaças químicas e biológicas [1].

A terceira força motivadora veio do campo da biologia molecular. A explosão da genômica a partir da década de 1980, seguido pelo advento de outras áreas de microanálise relacionados com a biologia molecular, tal como o sequenciamento genético, possibilitou a criação de métodos de análise com maior rendimento e maior sensibilidade. A microfluídica ofereceu abordagens para superar estes problemas [1].

A quarta contribuição foi na microeletrônica. A expectativa era de que a fotolitografia e tecnologias associadas, que tinham sido tão bem sucedidas na microeletrônica e em sistemas microeletromecânicos (MEMS), seriam diretamente aplicáveis à microfluídica. Alguns dos primeiros trabalhos em fluídica fez, de fato, o uso de silício e de vidro, mas estes materiais foram sendo substituídos por

plásticos. O silício, em particular, é opaco à luz visível e ultravioleta, portanto não pode ser utilizado com os métodos convencionais de detecção ópticos. Além disso, o vidro e o silício não têm todas as propriedades necessárias para trabalhar com células vivas especialmente permeabilidade a gases. Esses materiais rígidos foram substituídos por elastômeros por serem transparentes, flexíveis e baratos facilitando a fabricação dos componentes necessários para os sistemas de microanálise, especialmente bombas e válvulas [1].

Mais recentemente, pesquisadores desenvolveram métodos alternativos baseados em litografia para fabricar projetos microfluídicos. Estes métodos, que usam o polidimetilsiloxano (PDMS) como material principal, são simples e baratos e podem ser construídos em um ambiente de laboratório. A flexibilidade mecânica do PDMS o torna apropriado para a fabricação de componentes que são frequentemente necessários para o controle de fluxos gerados por pressão. O uso de válvulas controladas pneumaticamente e bombas peristálticas tem permitido a integração de centenas de elementos funcionais sobre um *chip* microfluídico [22].

3.2 Aspectos teóricos da Microfluídica

Microfluídica refere-se às tecnologias de manipulação de fluidos em que pelo menos uma dimensão dos microcanais é menor que 1mm e os volumes internos são menores que 100µl [22] . Nesta seção são abordados os aspectos físicos e técnicos dos sistemas microfluídicos.

3.2.1 Características físicas do regime microfluídico

As equações básicas de escoamento de fluidos e transferência de massa são as mesmas, tanto no regime microfluídico como nos sistemas macroscópicos. No entanto existem várias características importantes que distinguem a dinâmica em microestruturas daquelas que são comuns em sistemas macroscópicos. Como as características dimensionais do fluxo (volume e área da seção dos canais) decrescem, a importância das forças que agem sobre o volume do fluido, como a gravidade, diminui em relação às forças que agem nas superfícies, como a tensão superficial. A importância relativa das forças inerciais sobre as forças viscosas agindo sobre o fluido também diminuem [22]. A razão das forças inerciais para as viscosas é expressa como o número de *Reynolds* (*Re),* como indicado na equação (3.1).

$$Re = \frac{\rho v D_H}{\eta} \tag{3.1}$$

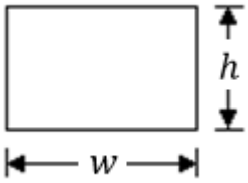
onde ρ (kg/m^3) é a densidade do fluido, v (m/s) é a velocidade do fluido, D_H(m) é o diâmetro hidráulico característico do fluxo e η (kg/ms) é a viscosidade dinâmica do fluido.

O diâmetro hidráulico D_H é dado por [23]:

$$D_H = \frac{4A}{P} \tag{3.2}$$

onde *A* é a área da seção transversal do canal e *P* é o perímetro dessa seção. Esta equação deve ser usada quando a seção do microcanal não é circular. No caso da seção ser circular o diâmetro hidráulico coincide com o diâmetro da seção.

No caso de microcanais retangulares temos:



$$A = wh \tag{3.3}$$

$$P = 2(w + h) \tag{3.4}$$

$$D_H = \frac{4A}{P} = \frac{2wh}{w + h} \tag{3.5}$$

O fluxo em microcanais da ordem de 50µm para velocidades aceitáveis e realizáveis é caracterizado por um baixo número de *Reynolds*. Para *Re* < 100 os fluxos são laminares em vez de turbulentos. Diferentes fluidos em um fluxo laminar se intermisturam somente por difusão porque não há vórtices espontâneos carregando massa e momento entre eles. Esta característica dos fluxos laminares permite o controle espacial da solução com o fluxo, mas retarda a mistura e a transferência eficiente de massa nas fronteiras entre os mesmos [2].

Nas longas e estreitas geometrias dos microcanais, o fluxo é predominantemente uniaxial: os movimentos são todos paralelos às paredes dos microcanais. A significância de fluxos uniaxiais é que todo transporte de quantidade de movimento, massa e calor na direção normal ao fluxo é provocado por mecanismos moleculares: viscosidade molecular, difusibilidade molecular e condutividade térmica [2].

Para baixo Re, a não linearidade associada com a equação de Navier-Stokes estão ausentes. Um fluxo incompressível uniaxial para um baixo Re é governado por:

$$\frac{\partial v_x}{\partial t} = \frac{\eta}{\rho} \nabla^2 v_x - \frac{1}{\rho} \frac{dp}{dx} + \frac{1}{\rho} f_b \tag{3.6}$$

onde v_x é a velocidade axial no canal, η é a viscosidade, ρ é a densidade, p é a pressão e f_b é a força por unidade de volume agindo no fluido, conhecida como força do corpo (interações gravitacionais ou eletromagnéticas). A condição nas paredes é v_x = 0. Na equação (3.6) o gradiente de pressão e as forças do corpo atuam como fontes de movimento do fluido e a propagação desse movimento através da difusibilidade do fluido ocorre com uma difusão constante de $v = \eta / \rho$, chamada de viscosidade cinemática. Como a difusibilidade molecular e a difusibilidade térmica, a viscosidade v tem sua origem na dinâmica e em interações moleculares que transferem movimento ao fluido [2].

3.2.2 Equações físicas do fluxo em regime microfluídico

Os métodos mais comuns para impulsionar fluxos em microcanais são: (1) gradiente de pressão aplicado via reservatórios externos; (2) fluxos por pressão gerados por bombas peristálticas no projeto e (3) campos elétricos aplicados externamente. Capilaridade, acústica, vácuo na saída, diferença de altura e forças magnéticas também são usadas para mover fluidos em microcanais. Em fluxos gerados por pressão, que é a técnica utilizada nos sistemas microfluídicos construídos neste trabalho, a velocidade do fluxo v é dada por:

$$v \cong \frac{{D_H}^2 \nabla p}{\eta} \tag{3.7}$$

onde ∇p é o gradiente de pressão aplicado para manter uma dada velocidade de fluxo; o gradiente de pressão requerido cresce rapidamente com o estreitamento dos canais. Em fluxos gerados por pressão, a velocidade do fluxo varia de zero na parede para o seu valor máximo no meio do canal. Esta variação comanda a solução ao longo da direção do fluxo, no entanto esta dispersão é desfavorável para transportar estreitas bandas de solução como em uma separação química [22].

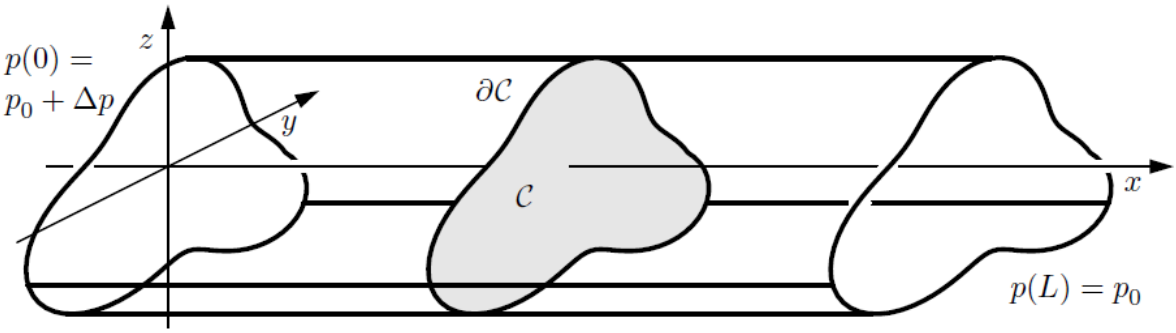
3.2.3 Solução analítica de Navier-Stokes

Nesta seção serão apresentadas as equações de Navier-Stokes para um fluxo laminar em microcanais para velocidade e vazão num aspecto geral (Fluxo de Poiseuille) e uma solução específica para microcanais retangulares.

3.2.3.1 Fluxo de Poiseuille

O primeiro estudo do estado estacionário do fluxo de Poiseuille considera uma secção transversal de forma arbitrária, tal como ilustrado na Figura 1. Apesar de não ser analiticamente solucionável, este exemplo, no entanto, fornece-nos uma forma estrutural da solução para o campo de velocidade [24].

Figura 1 - Fluxo de Poiseuille em um canal com seção transversal arbitrária no plano yz.



Fonte: BRUSS, H., 2008.

O canal é paralelo ao eixo x, e é suposto ser a translação invariante nessa direção. A área de secção transversal constante no plano yz é denotada C, onde a borda ∂ de *C* é denotada ∂C. A diferença de pressão constante Δp é mantida ao longo de um trecho de comprimento L do canal, isto é, $p(0) = p_0 + \Delta p$ e $p(L) = p_0$. A força gravitacional é equilibrada por um gradiente de pressão hidrostática na direção vertical. Estas duas forças são, portanto, deixadas de fora no tratamento do problema. A translação invariante do canal na direção x combinada com a desconsideração das forças no plano yz implica a existência de um campo de velocidade independente de x, enquanto que apenas a componente x pode ser diferente de zero $v(r) = v_x(y;z)\, e_x$. Consequentemente $(v.\nabla)\, v = 0$ e a equação de Navier Stokes no estado estacionário se torna:

$$v(r) = v_x(y;z)\, e_x \tag{3.8}$$

$$0 = \eta\, \nabla^2 v_x(y;z)\, e_x \; - \; \nabla p \tag{3.9}$$

Uma vez que os componentes y e z do campo de velocidade são zero segue que $\partial p_y = 0$ e $\partial p_z = 0$ e consequentemente a pressão depende de x, $p(r) = p(x)$. Usando este resultado, a componente x da equação de Navier Stokes fica:

$$\eta\left[\partial_y^2 + \partial_z^2\right] v_x(y,z) = \partial_x p(x) \tag{3.10}$$

Conforme o exposto por Bruss [24].

Aqui é visto que o lado esquerdo da equação é função de *y* e *z* enquanto o lado direito da equação é uma função de *x*. A única solução possível é aquela em que os dois lados da equação de Navier-Stokes chegam à mesma constante. Entretanto, um gradiente de pressão $\partial_x p(x)$ implica que a pressão deve ser uma função linear de *x*, e usando as condições marginais para a pressão tem-se:

$$p(r) = \frac{\Delta p}{L}\,(L - x) + p_0 \tag{3.11}$$

Com isto chega-se à equação diferencial de segunda ordem que $v_x(y, z)$ deve estar no domínio *C* dado e condições marginais sem escorregamento nas paredes do canal descritas como ∂C,

$$[\partial_y^2 + \partial_z^2]\, v_x\,(y,z) = -\frac{\Delta p}{\eta L}\,, \qquad para\ (y,z) \in C \tag{3.12a}$$

$$v_x(y,x) = 0, \qquad para\ (y,z) \in \partial C \tag{3.12b}$$

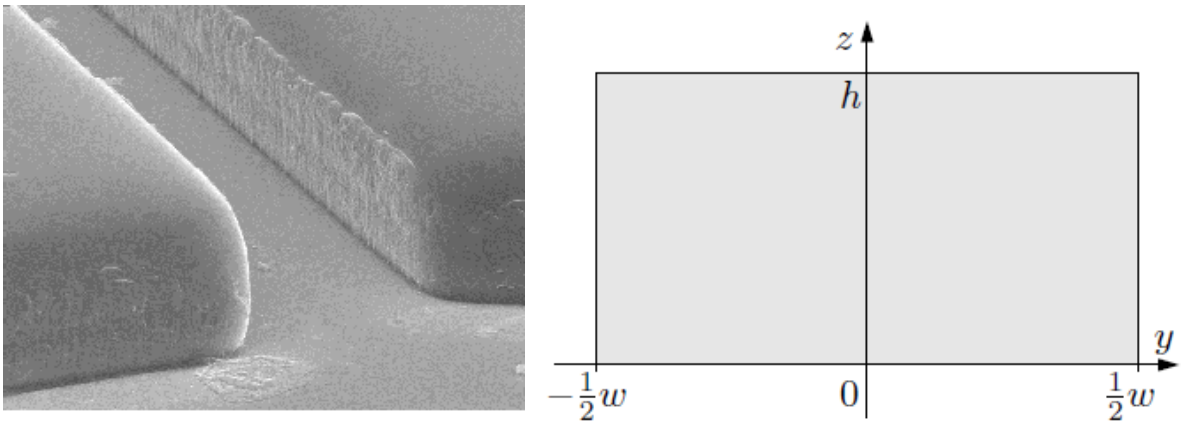
Uma vez determinada a velocidade é possível calcular a taxa de fluxo, ou vazão Q, que é definida como o volume de líquido que circula no canal pela unidade de tempo.

$$Q = \int_C v_x\,(y,z) dy\, dz \tag{3.13}$$

3.2.3.2 Fluxo de Poiseuille em seções retangulares

O fluxo em canais com seções retangulares é estudado aqui em particular porque todos os sistemas microfluídicos montados e estudados foram projetados com esse tipo de geometria. Considerando a Figura 2 que ilustra um canal retangular tem-se:

Figura 2 - Microcanal retangular com profundidade h e largura w.



Fonte: BRUSS, H., 2006.

Segundo Bruss [24] para microcanais retangulares construídos em circuitos microfluídicos, a equação de Navier-Stokes e as condições marginais são:

$$[\partial_y^2 + \partial_z^2]\, v_x\,(y,z) = -\frac{\Delta p}{\eta L}\,, \qquad para \quad -\frac{1}{2}\,w < y < \frac{1}{2}\,w\,, \;\; 0 < z < h\,, \tag{3.14a}$$

$$v_x(y,x) = 0, \qquad para \;\; y = \pm\frac{1}{2}w, \qquad ou\; z = 0, \qquad ou\; z = h \tag{3.14b}$$

Começando pela expansão de todas as funções do problema em séries de Fourier ao longo do eixo vertical z, onde as condições marginais são: $v_x(y;0)$ = $v_x(y;h)$= 0. São usados apenas os termos proporcionais a $\sin\left(n\pi\frac{z}{h}\right)$, onde n é um inteiro positivo. A expansão de Fourier dos termos constantes do lado direito da equação (3.14a), contendo apenas os termos inteiros de ordem ímpar são:

$$-\frac{\Delta p}{\eta L} = -\frac{\Delta p}{\eta L}\,\frac{4}{\pi}\sum_{n,ímpar}^{\infty}\frac{1}{n}\,\sin\left(n\pi\frac{z}{h}\right) \tag{3.15}$$

Os coeficientes $f_n(y)$ da expansão de Fourier na coordenada z da velocidade são constantes em z, mas em y são dadas pela função:

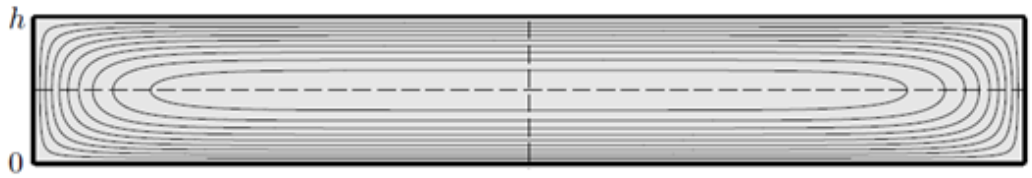
$$v_x(y,z) = \sum_{n=1}^{\infty} f_n\,(y)\ \sin\left(n\pi\frac{z}{h}\right) \tag{3.16}$$

Inserindo estas séries no lado esquerdo da equação (2.14a) tem-se:

$$\left[\partial_y^2 + \partial_z^2\right] v_x(y,z) = \sum_{n=1}^{\infty}\left[f_n^{''}(y) - \frac{n^2\pi^2}{h^2}\ f_n(y)\right]\ \sin\left(n\pi\frac{z}{h}\right) \tag{3.17}$$

As linhas de contorno da velocidade para o problema de fluxo de Pouseuille em um canal retangular é mostrada na Figura 3.

Figura 3 - Linhas de contorno da velocidade vx(y,z) na seção transversal de um canal retangular.



Fonte: BRUSS, H., 2006.

A solução do problema deve satisfazer que para todos os valores de n o enésimo coeficiente do termo da pressão na equação (3.15), deve igualar o enésimo coeficiente do termo da velocidade na equação (3.17). As funções $f_n(y)$ são dadas por:

$$f_n(y) = 0, \qquad para\ n\ par \tag{3.18a}$$

$$f_n^{''}(y) - \frac{n^2\pi^2}{h^2}\ f_n(y) = -\frac{\Delta p}{\eta L}\ \frac{4}{\pi}\ \frac{1}{n}\ , \qquad para\ n\ ímpar \tag{3.18b}$$

Para determinar $f_n(y)$, sendo n ímpar, é preciso resolver a equação diferencial não homogênea de segunda ordem (3.18b). Uma solução geral pode ser escrita como:

$$f_n(y) = f_n^{não\ homog}(y) + f_n^{homog}(y) \tag{3.19}$$

onde $f_n^{não\ homog}(y)$ é uma solução particular da equação não homogênea e $f_n^{homog}(y)$ é uma solução para a equação homogênea (onde o lado direito é colocado igual a zero). É fácil encontrar uma solução particular da equação (3.18b). Para simplificar adota-se a função $f_n^{não\ homog}(y) = \text{const}$, resultando na equação algébrica,

$$f_n^{não\ homog}(y) = \frac{4h^2\Delta p}{\pi^3\eta L}\frac{1}{n^3}\ , \qquad para\ n\ impar \tag{3.20}$$

A solução geral da equação homogênea,

$$f_n''(y) - \frac{n^2\pi^2}{h^2}\ f_n(y) = \ 0$$

é a combinação linear

$$f_n^{homog}(y) = A\cosh\left(\frac{n\pi}{h}y\right) + \ B\sinh\left(\frac{n\pi}{h}y\right) \tag{3.21}$$

A solução $f_n(y)$ que satisfaz as condições marginais sem escorregamento $f_n\left(\pm\frac{1}{2}w\right) = 0$ é

$$f_n(y) = \frac{4h^2\Delta p}{\pi^3\eta L}\frac{1}{n^3}\left[1 - \frac{\cosh\left(n\pi\frac{y}{h}\right)}{\cosh\left(n\pi\frac{w}{2h}\right)}\right]\ , \qquad para\ n\ ímpar, \tag{3.22}$$

o que leva à equação final do fluxo *Poisuille* em um canal retangular,

$$v_x(y,z) = \frac{4h^2\Delta p}{\pi^3\eta L}\sum_{n=ímpar}^{\infty}\frac{1}{n^3}\left[1 - \frac{\cosh\left(n\pi\frac{y}{h}\right)}{\cosh\left(n\pi\frac{w}{2h}\right)}\right]\sin\left(n\pi\frac{z}{h}\right) \tag{3.23}$$

A vazão Q é encontrada pela integração,

$$Q = 2\int_0^{\frac{1}{2}w} dy\int_0^h dz\ v_x\,(y,z) \tag{3.24a}$$

$$Q = \frac{4h^2\Delta p}{\pi^3\eta L}\sum_{n,ímpar}^{\infty}\frac{1}{n^3}\frac{2h}{n\pi}\left[w - \frac{2h}{n\pi}\tanh\left(n\pi\frac{w}{2h}\right)\right] \tag{3.24b}$$

$$Q = \frac{8h^3 w\Delta p}{\pi^4 \eta L} \sum_{n,ímpar}^{\infty} \left[\frac{1}{n^4} - \frac{2h}{\pi w}\frac{1}{n^5}\tanh\left(n\pi\frac{w}{2h}\right)\right] \tag{3.24c}$$

$$Q = \frac{h^3 w\Delta p}{12\eta L}\left[1 - \sum_{n,ímpar}^{\infty} \frac{1}{n^5}\frac{192}{\pi^5}\frac{\mathrm{h}}{\mathrm{w}}\tanh\left(n\pi\frac{w}{2h}\right)\right], \tag{3.24d}$$

onde

$$\sum_{n,ímpar}^{\infty} \frac{1}{n^4} = \frac{\pi^4}{96}$$

Conforme Bruus [24] um resultado com muito boa aproximação pode ser obtido no limite $\frac{h}{w} \to 0$ de um canal raso e largo, onde $\frac{h}{w}\tanh n\pi\frac{w}{2h} \to \frac{h}{w}\tanh\infty = \frac{h}{w}$, e Q fica:

$$Q \approx \frac{h^3 w\Delta p}{12\eta L}\left[1 - \frac{192}{\pi^5}\frac{h}{w}\sum_{n,ímpar}^{\infty}\frac{1}{n^5}\right] \tag{3.25a}$$

$$Q = \frac{h^3 w\Delta p}{12\eta L}\left[1 - \frac{192}{\pi^5}\frac{31}{32}\zeta(5)\frac{h}{w}\right] \tag{3.25b}$$

$$\boldsymbol{Q \approx \frac{h^3 w\Delta p}{12\eta L}\left[1 - 0{,}630\frac{h}{w}\right]} \qquad para\ \ h < w \tag{3.25c}$$

Aqui é usada a função zeta de Riemann, $\zeta(x) = \sum_{n=1}^{\infty}\frac{1}{n^x}$,

$$\sum_{n,ímpar}^{\infty}\frac{1}{n^5} = \sum_{n=1}^{\infty}\frac{1}{n^5} - \sum_{n,par}^{\infty}\frac{1}{n^5} = \zeta(5) - \sum_{k=1}^{\infty}\frac{1}{(2k)^5} = \zeta(5) - \frac{1}{32}\zeta = \frac{31}{32}\zeta(5) \tag{3.26}$$

Segundo Bruus [24] um resultado aproximado da equação (3.25c) para Q é muito bom. Para o pior caso, o quadrado com h = w, o erro é de 13%, enquanto já para uma razão de h = w/2, o erro é menor que 0,2%.

3.3 Interação da radiação de pulsos laser com a matéria

Uma das principais vantagens do laser como ferramenta para o processamento de materiais é a capacidade de controlar com precisão onde e em que taxa a energia é depositada no material. Este controle é exercido através da seleção adequada dos parâmetros do laser para obter a modificação desejada do material [25]. O uso eficiente de lasers na usinagem de materiais é impossível sem um conhecimento das leis fundamentais que regem a interação do laser com a matéria [26].

Para remover um átomo de um sólido por meio de um pulso de laser, deve-se fornecer energia além da energia de ligação desse átomo. Assim, para ablacionar a mesma quantidade de material com um pulso curto, deve-se aplicar uma intensidade de laser maior, aproximadamente na proporção inversa à duração do pulso [15]. Por exemplo, a ablação a laser com pulsos de 100 fs requer uma intensidade na faixa de 10^{13} - 10^{14} W/cm^2, enquanto o pulso de 30-100 ns ablaciona o mesmo material nas intensidades ~ 10^8 - 10^9 W/cm^2.

Altas intensidades de laser permitem que altas densidades de excitação sejam geradas, termicamente ou não-termicamente [27]. Durante um pulso laser, o tempo para que a energia de excitação provoque efeitos térmicos depende do tipo de material e dos parâmetros do laser; depois que o pulso laser termina, estes efeitos térmicos dependem somente do tipo de material. Em metais, a luz é quase exclusivamente absorvida por elétrons da banda de condução dentro de uma fina camada de, tipicamente, 10 nm (transições intra-bandas). O tempo entre as colisões elétron-elétron, τ_e, é da ordem de 10^{-14} a 10^{-12} s (10 fs a 1 ps). Os tempos de relaxação elétron-fônon, τ_{e-ph}, são muito mais longos, devido à grande diferença entre as massas de elétrons e de íons. Dependendo da força do acoplamento elétron- fônon, encontra-se entre 10^{-12} s e 10^{-10} s. Nos não-metais, as excitações eletrônicas inter-bandas podem durar muito mais, variando de, tipicamente, 10^{-12} a 10^{-6} s. Excitações de estados eletrônicos localizados associados a defeitos, impurezas ou superfícies podem ter um tempo de vida ainda mais longo.

Para o processamento fototérmico, a resposta do material pode ser explicada como resultado de temperaturas elevadas. Portanto, é importante poder modelar o fluxo de calor dentro de um material. A evolução temporal e espacial do

campo de temperatura dentro de um material é governada pela equação do calor. Em certos casos, é possível adotar hipóteses simplificadoras que podem ser aplicadas para permitir soluções analíticas mais simples. Uma quantidade importante que sai desses tratamentos simplificados é o comprimento de difusão térmica l_T [25, 27]:

$$l_T \approx 2\sqrt{D_T \tau_\ell} \tag{3.27}$$

onde D_T é a difusividade térmica do material e τ_ℓ é a largura temporal do pulso laser. Considera-se o comprimento de difusão térmica como uma medida de quanto a energia se espalha durante a irradiação do laser.

Outra quantidade importante é a profundidade de penetração óptica l_α que é dada por:

$$l_\alpha = \frac{1}{\alpha} \tag{3.28}$$

onde α é o coeficiente de absorção óptica do material.

A dimensionalidade do fluxo de calor é caracterizada pelo tamanho relativo de l_T e outras grandezas características como o raio do feixe laser sobre a superfície do material, w, a profundidade de penetração óptica, l_α, a espessura do substrato, h_s, etc. Se, por exemplo, $l_T \gg w \; e \; l_T \gg l_\alpha$, é preciso considerar a propagação do calor em três dimensões. Por outro lado, para absorção moderada com $l_\alpha \leq l_T \; e \; l_T \ll w$, o fluxo de calor lateral pode ser ignorado e a distribuição de temperatura na direção z é obtida a partir da equação de calor unidimensional [27].

A ablação por laser pulsado permite suprimir amplamente a dissipação da energia de excitação além do volume que é ablacionado durante o pulso. Para pulsos de nanossegundos, isto é realizado se a espessura da camada ablacionada por pulso, Δh, for da ordem do comprimento de difusão térmica l_T, ou da profundidade de penetração óptica, l_α, dependendo de qual é maior, ou seja:

$$\Delta h \approx \max\,(l_T, l_\alpha) \tag{3.29}$$

Com pulsos ultracurtos, os mecanismos de ablação, que são de menor relevância ou que não estão de todo presentes na ablação a laser de

nanossegundo tornam-se cada vez mais importantes. Estes incluem a absorção óptica não-linear dentro do substrato, efeitos de não-equilíbrio relacionados a excitações eletrônicas e/ou vibracionais, ionização multifotônica e avalanche, explosão de Coulomb e fenômenos relacionados por aquecimento supercrítico [27].

3.3.1 Mecanismos de Absorção

O coeficiente de absorção, que pode ser derivado da função dielétrica do material e condutividade, determina a absorção de luz em função da profundidade. No entanto, os mecanismos específicos pelos quais a absorção ocorre dependerão do tipo de material. Em geral, os fótons serão acoplados aos estados vibratórios ou eletrônicos disponíveis no material, dependendo da energia do fóton. Em isolantes e semicondutores, a absorção da luz do laser ocorre predominantemente através de excitações ressonantes, como transições de elétrons da banda de valência para a banda de condução (transição interbanda) ou dentro das bandas (transição intersubbanda). Esses estados eletrônicos excitados podem então transferir energia para fônons da rede. Fótons com energia abaixo do *gap* da banda do material não serão absorvidos (a menos que haja outros estados de impureza ou defeito para acoplar, ou se houver absorção multifotônica). Tais energias correspondem tipicamente a frequências de luz abaixo do ultravioleta para isolantes e abaixo do visível ao espectro infravermelho para semicondutores. Entretanto, o acoplamento ressonante para os fônons óticos de alta freqüência na região do infravermelho próximo é possível em alguns casos [25].

Nos metais, a absorção óptica é dominada pelos elétrons livres através de mecanismos como a radiação de freamento (*bremsstrahlung*) [28]. A energia é subseqüentemente transferida para fônons de rede por colisões. A refletividade e a absorção para freqüências de luz abaixo da freqüência do plasma são altas porque os elétrons no metal filtram o campo elétrico da luz. No entanto, acima da frequência do plasma, a refletividade e a absorção caem drasticamente porque os elétrons não conseguem responder rápido o suficiente para filtrá-lo [29]. Além disso, os estados eletrônicos ou vibracionais que estão associados a defeitos, impurezas ou fenômenos de superfície, como espalhamento de elétrons difusos, podem ser excitados [25].

O tempo que leva para que os estados eletrônicos excitados transfiram energia para fônons e se tornem térmicos depende do material específico e dos mecanismos específicos dentro dos materiais. Para a maioria dos metais, este tempo de estabilização térmica é da ordem de 10^{-10} ~ 10^{-12} s, enquanto que nos não-metais, há significativamente mais variação nos mecanismos de absorção e o tempo de estabilização térmica pode ser de até 10^{-6} s. Polímeros e materiais dielétricos estão tipicamente na extremidade mais lenta dessa faixa. Defeitos e estados eletrônicos confinados podem desempenhar um papel significativo na desaceleração desse tempo de estabilização térmica [25].

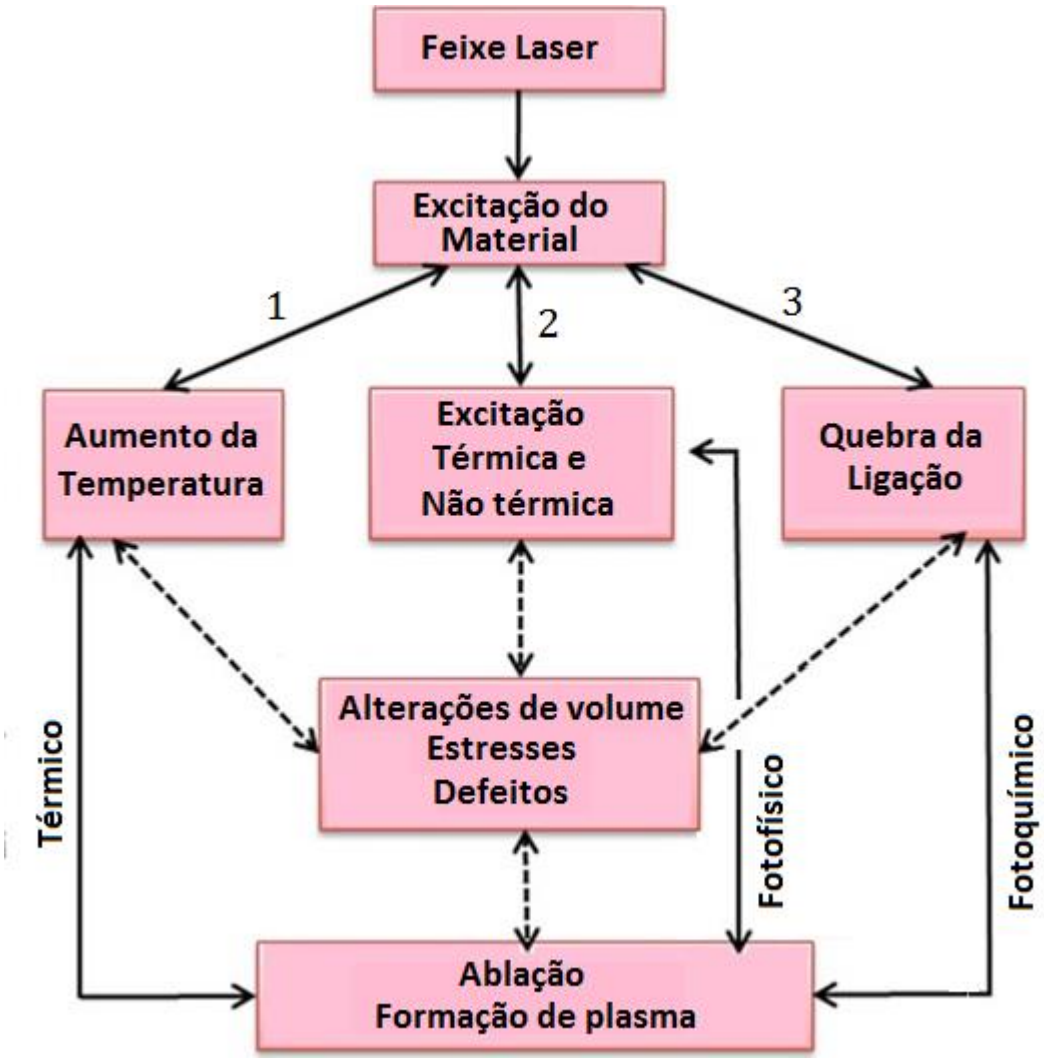
Quando a taxa de excitação induzida por laser é baixa em comparação com a taxa de estabilização térmica, os detalhes dos estados transitórios excitados eletronicamente não são significativos. Em vez disso, pode-se considerar a energia do laser absorvida como sendo diretamente transformada em calor. Tais processos são chamados de fototérmicos e a resposta do material pode ser tratada de maneira puramente térmica. Por exemplo, o processamento a laser de metais ou semicondutores com tempos de pulso de laser que são lentos (> ns) é tipicamente caracterizado por mecanismos fototérmicos [25].

Quando a taxa de excitação induzida por laser é alta em comparação com a taxa de estabilização térmica, grandes excitações podem se acumular nos estados intermediários. Estas energias de excitação podem ser suficientes para romper diretamente as ligações (foto-decomposição). Este tipo de modificação de material não térmico é tipicamente referido como processamento fotoquímico. Durante o processamento puramente fotoquímico, a temperatura do sistema permanece relativamente inalterada. A irradiação de polímeros com luz laser de pequeno comprimento de onda (ultra-violeta), onde a energia dos fótons é da ordem da energia de ligação química, é um exemplo de processamento fotoquímico. Da mesma forma, os pulsos de laser de femtossegundos ultrarrápidos podem permitir o processamento fotoquímico de metais e semicondutores [28]. Entretanto, mesmo nesses casos, é possível (e provável) que modificações térmicas ocorram após os estados excitados se transformarem em fônons de rede. Materiais que exibem mecanismos térmicos e não térmicos são tipicamente referidas como fotofísico [25].

3.3.2 Mecanismos de Ablação a Laser

A ablação durante o processamento do laser refere-se à remoção do material devido a interações térmicas e/ou fotoquímicas (não térmicas). O mecanismo de ablação a laser é afetado principalmente pelos parâmetros do laser, propriedades do material e ambiente de trabalho. As interações entre o feixe laser e o material durante a ablação são complexas e podem envolver a interação entre processos térmicos e fotoquímicos, muitas vezes referidos como processos fotofísicos [27, 30]. A Figura 4 apresenta os vários mecanismos de ablação a laser.

Figura 4 - Vários mecanismos de ablação a laser.



Fonte: Adaptado de DARWISH, S.M.H. *et al.*, 2017.

Observando a Figura 4, diferentes mecanismos de interação e realimentação envolvem a ablação por laser pulsado. A ablação pode ser com base apenas na ativação térmica (caminho 1), na quebra de ligação química

direta (ablação fotoquímica, caminho 3) ou em uma combinação de ambas (ablação fotofísica, caminho 2) [27].

Durante a ablação térmica, a energia de excitação é rapidamente convertida em calor, resultando em aumento de temperatura. Este aumento de temperatura pode causar a ablação do material por vaporização de superfície ou espalação (devido a tensões térmicas). Mecanismos de ablação térmica dominam a remoção de material durante a microusinagem de metais e cerâmicas. A ablação fotoquímica domina a remoção de material durante a microusinagem de polímeros, embora alguns dos polímeros também possam ser eficazmente eliminados pelo mecanismo de ablação térmica. Uma das considerações importantes durante a interação laser-material durante a ablação é o tempo de relaxação térmica (τ), que está relacionado com a dissipação do calor durante a irradiação do pulso do laser. Os dois parâmetros importantes que determinam a facilidade com que a ablação pode ser iniciada são o coeficiente de absorção e a difusividade térmica. Grande valor do coeficiente de absorção e pequeno valor da difusividade térmica geralmente proporcionam uma alta eficiência de ablação de um material. A ablação do material usando pulsos ultracurtos (tempo de pulso menor que o tempo de relaxação térmica) é melhor que os pulsos mais longos (tempo de pulso maior que o tempo de relaxação térmica), onde a energia absorvida será dissipada no material circundante por processos térmicos. Os pulsos ultracurtos produzem uma intensidade de pico muito alta gerando uma quantidade de elétrons excitados muito grande antes da difusão térmica, proporcionando alta eficiência e precisão ao processo sem degradação térmica significativa (fusão, respingos, recristalização, etc.) na região circundante [30].

3.3.2.1 Pulsos Longos

Denomina-se pulso longo aquele no qual a duração do pulso laser é maior do que o tempo de difusão do calor no material processado. Para trabalhos de microusinagem, a difusão de calor na região circunvizinha de onde se está usinando é indesejável e aumenta a imprecisão do processo.

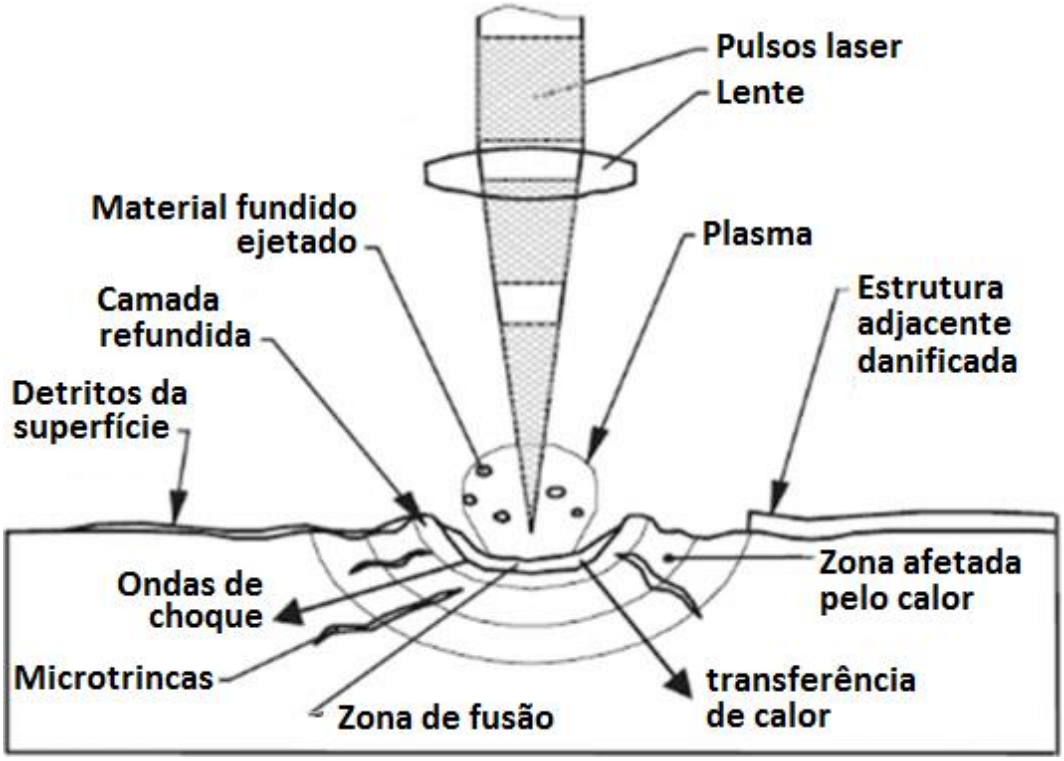
Na interação de pulsos longos (maior que algumas dezenas de picossegundos), se considera que o processo de dano ou ablação envolve o aquecimento dos elétrons na banda de condução pela radiação incidente e a transferência dessa energia para a rede. A transferência se dá num processo de

quase equilíbrio entre a temperatura dos elétrons e da rede, ocorrendo durante todo o tempo de interação do pulso laser com o material. Se a difusão do calor via corrente eletrônica ou via fônons na rede cristalina não for suficiente para dissipar o calor absorvido, a ablação ocorre devido à transformação de fase do material dielétrico e simples evaporação. Se não houver energia suficiente o material é sublimado [31].

A ablação por laser é a remoção de material de um substrato por absorção direta de energia laser [25]. A ablação depende das propriedades ópticas do feixe laser, da configuração do sistema laser, dos parâmetros de trabalho, da blindagem do plasma, da posição da amostra em relação ao plano focal e às propriedades mecânicas, ópticas e térmicas do material do substrato. Quando as radiações do laser atingem a superfície do substrato, os elétrons no substrato ficam excitados pelos fótons do laser, essa energia absorvida gera um calor significativo, que é transferido para as regiões adjacentes do material em intervalos de picosegundos, resultando em alta temperatura. A temperatura chega a valores tão altos que leva o material ao estado de fusão ou vaporização. Quando a densidade eletrônica na banda de condução chega a um certo valor, o material absorve energia dos fótons suficiente para iniciar a ablação. A densidade de energia que leva a esta densidade eletrônica crítica é denominada como fluência de limiar do laser.

A intensidade do laser pode ser aumentada reduzindo o ponto focal, aumentando a potência do laser ou reduzindo a largura temporal do pulso laser. Após o substrato atingir o ponto de fusão, uma fase líquida aparece na forma de uma camada fina na zona de interação localizada. A temperatura da fase líquida sobe rapidamente pelos pulsos de entrada subsequentes para alcançar o estado de evaporação (estado de plasma). Isto produz uma alta pressão que é comumente denominada pressão de recuo [30]. A pressão de recuo comprime o líquido da zona de interação e ejeta o material para fora conforme ilustração da Figura 5.

Figura 5 - Ablação originada por pulsos longos.



Fonte: Adaptado de DARWISH, S.M.H. *et al.*, 2017.

O rápido aumento da temperatura amplifica ainda mais a magnitude da pressão de recuo em uma faixa de centenas de MPa. A pressão de recuo exerce carga de impacto na superfície do substrato que gera ondas na superfície. Isto é comumente conhecido como propagação de ondas de choque. A onda de choque desloca localmente os grãos da superfície na região afetada pelo choque. Devido a esses deslocamentos e carga de impacto da onda de choque, a rigidez da superfície do material alvo é aumentada [30].

3.3.2.2 Pulsos Ultracurtos

Apenas duas décadas após o laser ter sido inventado, a duração do pulso mais curto produzido encolheu seis ordens de magnitude, passando do regime de nanossegundos para o regime de femtossegundos [32]. A crescente utilização de sistemas utilizando pulsos de laser de femtossegundos para processamento de material é baseada nas vantagens que eles oferecem em comparação com pulsos laser de nanossegundos [14-18].

O interesse pela ablação como um processo tornou-se importante recentemente com a introdução de pulsos de laser ultracurtos. Esses pulsos podem fornecer energia a uma taxa que o material só pode absorver evaporando ou sendo ejetado. Assim, o material é removido, deixando muito pouco material afetado pelo calor. Esses lasers tornaram-se uma forma de máquina-ferramenta que pode operar em estruturas muito finas, causando muito pouco dano químico ou mecânico [21].

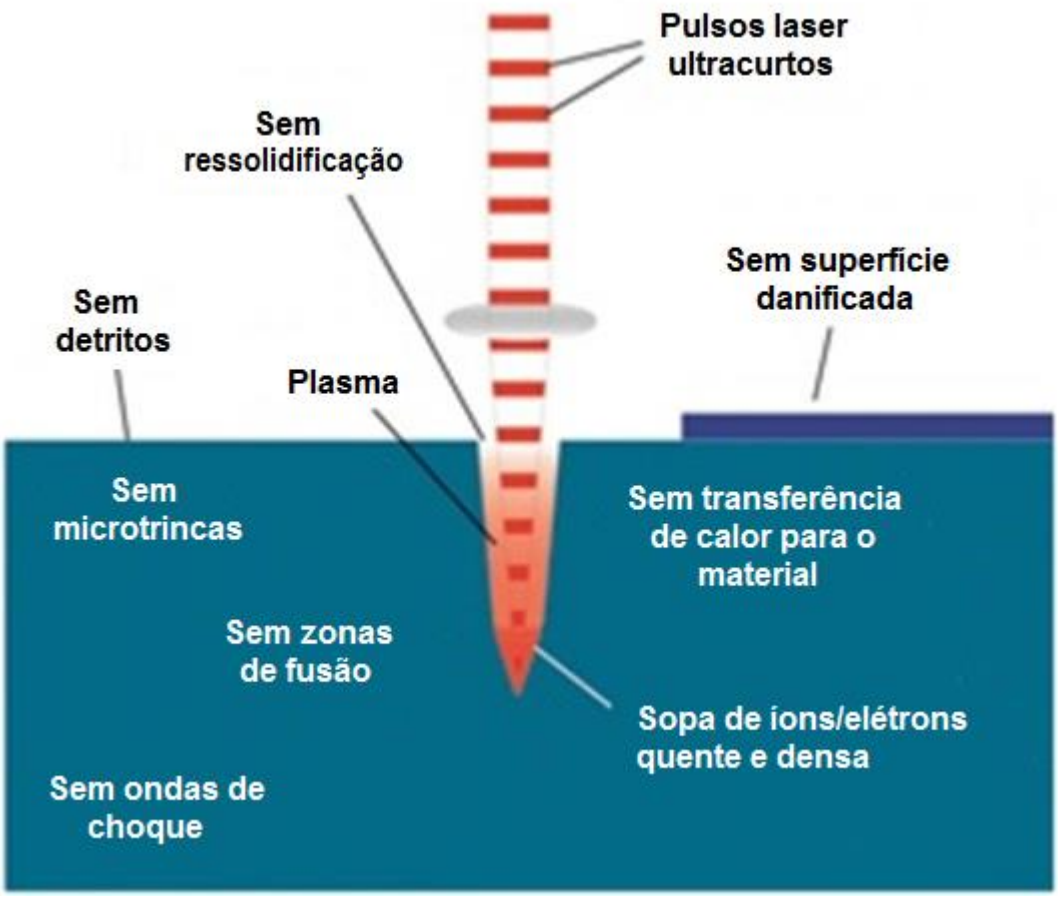
Embora a maioria das aplicações industriais utilizem pulsos de nanossegundos (ns), vários estudos mostram as vantagens dos pulsos de femtossegundo (fs) para a microestrutura processada. Mais importantes são as geometrias de furos mais precisos e o menor dano devido à transferência de calor, resultando em uma área afetada termicamente reduzida em torno do ponto de laser [20].

Experimentos em micro-usinagem de uma ampla gama de materiais por pulsos ultracurtos mostraram que eles asseguram uma difusão insignificante do calor no material e ausência de plasma durante o pulso do laser. Como conseqüência, o limiar de ablação diminui em comparação com pulsos de nanossegundos, de modo que a usinagem com precisão de submicrons se torna possível com a minimização da zona afetada pelo calor [19].

As aplicações para tal ferramenta estão sendo reconhecidas lentamente. Nunca foi possível trabalhar com tanta limpeza e precisão, exceto por meio de ataque químico. O ataque químico tem seu próprio conjunto de problemas e é limitado a materiais em que pode ser usado. Assim, a ablação a laser tem um crescente nicho de mercado em aplicações cirúrgicas, litografia, fabricação de dispositivos micro-ópticos e eletrônicos, marcação, corte, gravação e limpeza [21].

Lasers de femtossegundos, além da melhor qualidade de feixe e potência de pico, permitem um processo de corte por ablação a frio de qualidade extremamente alta, em vez de um processo de ejeção por fusão que ocorrem normalmente com o uso de pulsos de nanossegundos [33]. A Figura 6 ilustra o processo de ablação utilizando pulsos ultracurtos.

Figura 6 - Ablação originada por pulsos ultracurtos.



Fonte: Adaptado de HYPSH, S. e SHANON, G., 2014.

3.3.2.2.1 Ablação não Térmica - Efeito Coulomb

A explosão Coulombiana em processos de ablação com laser de fs é guiada por mecanismos eletrônicos, normalmente em rápidas transições estruturais (transformações de fase não térmicas) e emissão não térmica de cargas e partículas neutras. A remoção de material ocorre em algumas camadas atômicas (poucos nanometros). O conceito de explosão Coulombiana é baseado no fato de que, devido à emissão fotoelétrica, a superfície irrradiada acumula uma grande carga positiva e a força de repulsão excede a forças de ligação da rede, resultando na desintegração de uma camada da superfície. A quebra das ligações interatômicas e a desintegração ocorrem após a densidade de cargas positivas atingir um valor limiar [31].

O fato do limiar de intensidade para que ocorra a explosão Coulombiana em metais e semicondutores ser muito maior que os seus limiares

de ablação térmica (devido à mobilidade dos elétrons na superfície) faz com que a aplicação do regime de explosão Coulombiana em que não existe efeito térmico seja restrito apenas aos materiais dielétricos. No caso dos metais existe a região de baixa e alta fluência, na qual existe pouca ou grande zona afetada pelo calor [31].

3.3.2.2.2 Ablação Térmica - Explosão de Fase

A energia de excitação para provocar efeitos térmicos é descrita pelo tempo de relaxação τ_T. Para um processo térmico em materiais sólidos $\tau_T \ll \tau_R$, onde τ_R caracteriza o tempo necessário para rearranjos estruturais de átomos ou moléculas dentro da superfície [27]. Se os efeitos da radiação laser apresentarem um tempo $\tau_T \ll \tau_R$, esse feixe será simplesmente uma fonte de calor para o material e não provocará rearranjos estruturais de átomos ou moléculas.

A explosão térmica ocorre quando o material é aquecido acima de uma temperatura crítica. Isto pode ocorrer quando pulsos ultracurtos são usados e o material sendo usinado se expande para liberação da energia armazenada. Esse fenômeno é conhecido como explosão de fase. No caso de pulsos ultracurtos, o aquecimento do material, decorrente da transferência da energia dos elétrons para a rede, ocorre numa taxa que depende do tempo de relaxação elétron-fônon. Este rápido aquecimento permite que ocorra a transformação de fase do material de uma forma não convencional. Diferentes mecanismos são associados à remoção de material pelo aquecimento através de pulsos ultracurtos, como explosão de fase, espalação e fragmentação. A existência de vários mecanismos de ablação pode ser entendida pela taxa de expansão do material aquecido e o subsequente resfriamento [31].

3.3.2.2.3 Efeito de Incubação

Em um material, o limiar de ablação dos pulsos ultracurtos pode depender da presença de defeitos, dopantes, impurezas, etc., que modificam a densidade eletrônica local [34].

O efeito de incubação está relacionado à diminuição do limiar de ablação (F_{th}) do material pela interação de pulsos sobrepostos [9] . Ao incidir em uma região previamente irradiada o pulso laser encontra uma região já modificada

(com defeitos produzidos pelos pulsos anteriores) e com limiar de ablação menor do que em uma região sem irradiação alguma [31, 35]. Esse efeito é cumulativo até a ocorrência de uma saturação.

Ao se levar em conta o efeito de incubação a equação que relaciona o limiar de ablação $F_{th}(N)$ provocado em função do número de pulsos sobrepostos N, com relação ao limiar de ablação para um único pulso $F_{th}(1)$ descrito por [9] é:

$$F_{th}(N) = F_{th}(1)\, N^{k-1} \tag{3.30}$$

onde k é o coeficiente de incubação que caracteriza o grau de incubação do material. Para $k = 1$ o limiar de ablação é independente do número de pulsos N e a incubação é ausente.

Um outro modelo que se mostra mais adequado para os materiais dielétricos, descrito por [35, 36], é:

$$F_{th}(N) = F_{th}(\infty) + [F_{th}(1) - F_{th}(\infty)]\, e^{-k(N-1)} \tag{3.31}$$

onde $F_{th}(1)$ e $F_{th}(\infty)$ são limiares de ablação para um único pulso e infinitos pulsos respectivamente.

3.3.2.2.4 Estruturas Periódicas Superficiais Produzidas por Laser (LIPSS)

Na ablação em regime de baixa fluência, a irradiação na superfície promove uma retirada muito sutil de material, alterando as características de camadas micrométricas nessas superfícies. Um dos efeitos mais conhecidos é a formação de ondulações com períodos correspondentes a uma distância pouco menor que o comprimento de onda do laser utilizado. Essas ondulações são conhecidas por LIPSS.

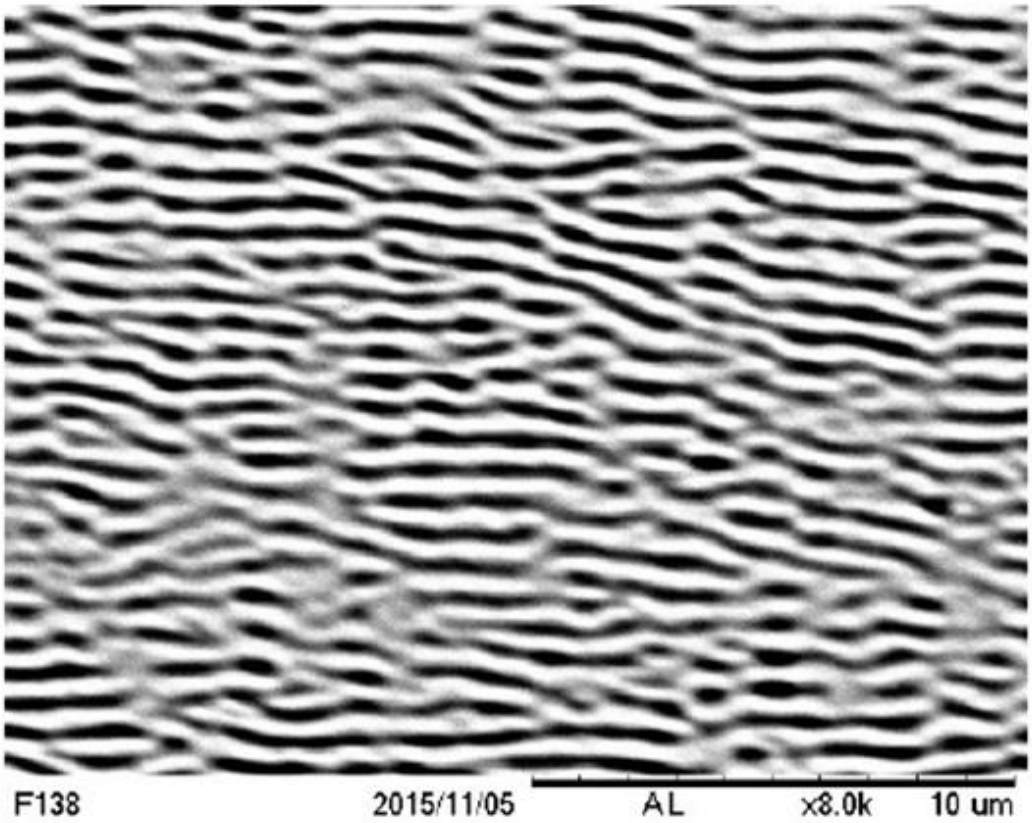
A formação de LIPSS foi observada pela primeira vez por Birnbaum após a irradiação com laser de rubi (que não é de pulso ultracurto) de vários materiais semicondutores e desde então, este tipo de estruturas tem sido gerado em uma ampla variedade de materiais [37-40]. LIPSS são fenômenos universais que podem ser observados em praticamente qualquer material após a irradiação por feixes de laser linearmente polarizados, particularmente ao usar pulsos ultracurtos com durações na faixa de picosegundos a femtossegundos [37, 39].

Vários parâmetros experimentais são importantes para a geração e controle de LIPSS. Com relação aos períodos dos LIPSS, o comprimento de onda de irradiação λ, o ângulo de incidência θ, a fluência de pico laser θ_0 (em J/cm^2) e o número de pulsos laser N aplicados ao mesmo ponto são os parâmetros chave, enquanto a polarização controla a direção dos LIPSS [37].

Os LIPSS formados por lasers de femtossegundos são comumente produzidos por múltiplos pulsos em regime de fluência levemente superior ao limiar de ablação [41, 42].

Na Figura 7 pode-se observar esse efeito obtido com a usinagem por pulsos de femtossegundos em baixa fluência no aço inoxidável austenítico ASTM F138.

Figura 7 - MEV de LIPSS gerados com baixa fluência no aço inoxidável austenítico ASTM F138.



Fonte: Adaptado de SILVA, L.G., 2017.

Ageev *et al.* mostram aplicações de LIPSS induzidas por pulsos de laser para coloração da superfície do aço inoxidável propondo sua utilização para proteção contra falsificação e marcação de produtos de aço e outros metais [43].

Ahsan *et al.* mostram que modificações de superfície nanoestruturadas induzidas por laser de femtossegundos podem melhorar significativamente a absorção óptica de várias superfícies metálicas [44]. Estas nanoestruturas são produzidas após a incidência de um excesso de pulsos sobre uma superfície que já apresenta a estrutura de LIPSS. Nas alterações de cores produzidas por LIPSS, mostram que a superfície preta e a superfície amarela escura exibem uma redução significativa na refletividade em comparação com outras cores produzidas na superfície do aço inoxidável e em relação à cor original do mesmo.

O efeito do ângulo de incidência do feixe laser de femtosegundo na produção de LIPSS em metais foi estudado por Hwang *et al* [45]. Os ângulos de incidência do feixe de laser variaram de 0° a 80° com uma etapa incremental de 5°. Variações na energia do pulso do laser foram feitas para manter a fluência nas superfícies da amostra constante para todos os ângulos de incidência.

3.3.3 Limiar de Ablação

Ao incidir sobre a superfície de um material, um pulso laser ultracurto focalizado pode ou não causar ablação. A ablação só vai ocorrer se a densidade de energia (fluência) utilizada estiver acima de um valor limiar F_{th} que é característico para cada tipo de material processado [46]. Acima deste valor de limiar, o volume ejetado aumenta com a fluência de uma maneira exponencial. Para um feixe laser com perfil espacial Gaussiano, a relação entre a fluência F_0 utilizada e o diâmetro D_c da cratera ablacionada pelo pulso laser é dada por [35]:

$$F_0 = F_{th} \exp\left(\frac{{D_c}^2}{2\, w_0^2}\right) \tag{3.32}$$

que também pode ser expressa por [34, 46]:

$${D_c}^2 = 2w_0^2 \ln\left(\frac{F_0}{F_{th}}\right) \tag{3.33}$$

onde w_0 é o raio do feixe no ponto focal, F_0 é a fluência no ponto focal e F_{th} é a fluência de limiar para a qual começa a haver dano na superfície. Esta relação se

mantém até que a densidade de energia atinja um ponto onde o excesso de elétrons livres gerados na banda de condução é tão grande que boa parte deles retorna ao estado fundamental transferindo a energia em forma de calor para a rede. Neste ponto ocorre fusão e processos térmicos passam a ser os maiores responsáveis pela ejeção de material. Assim, o uso destas altas fluências, também leva à ocorrência de zona afetada pelo calor, material ressolidificado e rebarbas [46].

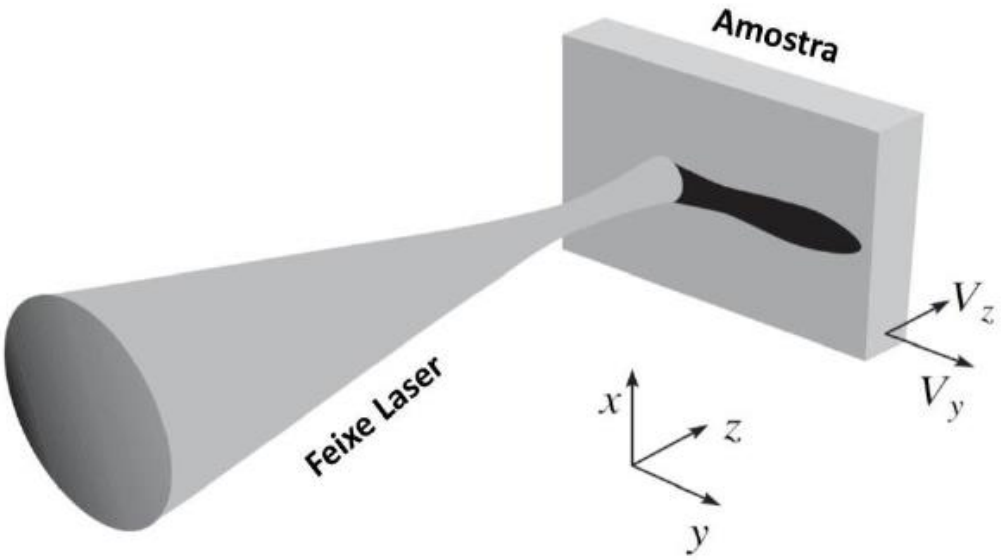
Para que o processo de usinagem tenha mais precisão e para evitar efeitos térmicos, é preciso conhecer o valor de fluência F_{th} acima do qual estes processos térmicos começam a ocorrer [46]. Isto é feito através da construção de um gráfico de fluência F_{th} pelo diâmetro ao quadrado ${D_c}^2$ da cratera ablacionada. Assim, em princípio, para uma usinagem de precisão bastaria manter a fluência em um nível abaixo daquele onde os processos térmicos começam a ocorrer. Na realidade, o processo é mais complicado, e este valor limite de fluência diminui em função da sobreposição, em um único ponto espacial, do número N de pulsos. É importante destacar que o valor limite de fluência diminui em função da sobreposição de pulsos. Isto acontece porque uma região pré-irradiada por um pulso laser, tem sua estrutura eletrônica modificada, principalmente pela criação de defeitos como os centros de cor. Estes defeitos introduzem níveis de energia entre a banda de valência e a banda de condução, facilitando a ejeção de elétrons e diminuindo o valor de limiar de ablação. Neste processo ocorre um acúmulo de defeitos com aumento do número N de pulsos sobrepostos até que se atinja uma saturação. Assim, o valor de limiar de ablação diminui com N até atingir um valor mínimo que se mantém independente da quantidade de pulsos a partir deste ponto.

Para uma usinagem de precisão, onde uma sobreposição grande de pulsos é necessária, é preciso escolher os parâmetros de processo de maneira a evitar efeitos térmicos e também conhecer a relação entre o diâmetro D da “cratera ablacionada”, a fluência F_{th} utilizada e o número N de pulsos sobrepostos. Pelo método tradicional proposto por Liu [47], normalmente utilizam-se marcações individuais sobre a superfície do material de interesse com variação de F_{th} e de N. Contudo, este processo é muito trabalhoso e demorado. Neste trabalho foi utilizado o método D-SCAN.

3.3.3.1 Método D-SCAN

O método D-SCAN foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Centro de Lasers e Aplicações (CLA) e é utilizado para encontrar o valor da fluência limiar de ablação F_{th}, para pulsos ultracurtos. O procedimento experimental consiste em irradiar a superfície do material com um feixe laser variando-se simultaneamente suas posições longitudinal e transversal ao mesmo tempo [34, 46, 48, 49], de uma posição antes da cintura do feixe, onde não há ablação, para uma posição após a parada da ablação. Desta forma, um perfil simétrico com dois lóbulos será gravado na superfície da amostra. Se o perfil gravado não apresentar dois lóbulos, a medição deve ser repetida com uma energia de pulso maior ou com uma lente com diâmetro focal menor. A Figura 8 ilustra a movimentação simultânea nos eixos y e z [49].

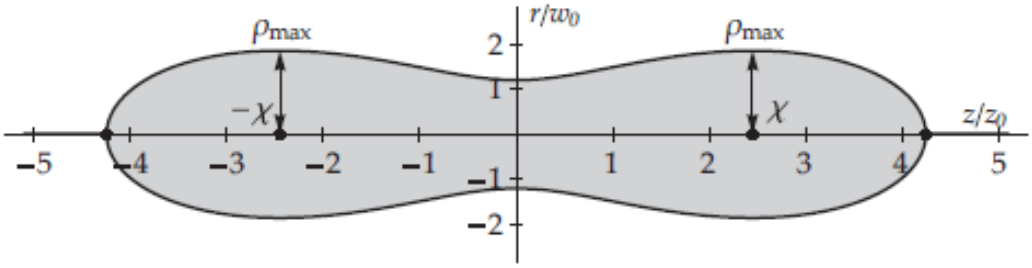
Figura 8 - Método D-SCAN - A amostra é transladada simultaneamente na direção z+ e y+. A mancha preta na amostra é o dano provocado pelo feixe laser.



Fonte: Adaptado de SAMAD, R. E. *et al.*, 2006.

O processo é repetido várias vezes, variando-se o número de pulso N sobrepostos através da variação entre a velocidade v_y e da taxa de repetição dos pulsos f_R. O resultado deste processo, para cada condição, é uma ranhura com a geometria característica da Figura 9 que mostra o desenho do perfil gerado na amostra.

Figura 9 - Desenho esquemático do perfil gerado pela movimentação da amostra pelo método D-SCAN.



Fonte: Adaptado de SAMAD, R. E. *et al.*, 2006.

É possível mostrar [49] que, quando não existem efeitos térmicos significativos e o experimento é realizado acima da intensidade crítica do material, a fluência limiar de ablação é dada por [34]:

$$F_{th} = \frac{1}{e\pi} \frac{E_0}{\rho_{max}^2} \cong 0{,}117 \frac{E_0}{\rho_{max}^2} \tag{3.34}$$

onde E_0 é a energia do pulso e ρ_{max} é metade da dimensão transversal máxima do perfil obtido na amostra.

Para explicar os efeitos da incubação, a variação da sobreposição de pulsos N é considerada como a razão entre a soma das intensidades produzidas em $(\chi\,, \rho_{max})$ por cada pulso que atinge a amostra durante seu movimento, e a intensidade gerada pelo pulso centralizado em $(\chi\,, 0)$. Sob esta hipótese, pode ser mostrado que:

$$N = \vartheta_3\left(0\,, e^{-\left(\frac{v_y}{f_R\,\rho_{max}}\right)^2}\right) \tag{3.35}$$

onde ϑ_3 é a função elíptica do terceiro tipo, teta de Jacobi, f_R é a taxa de repetição do laser e v_y é a velocidade de translação transversal da amostra.

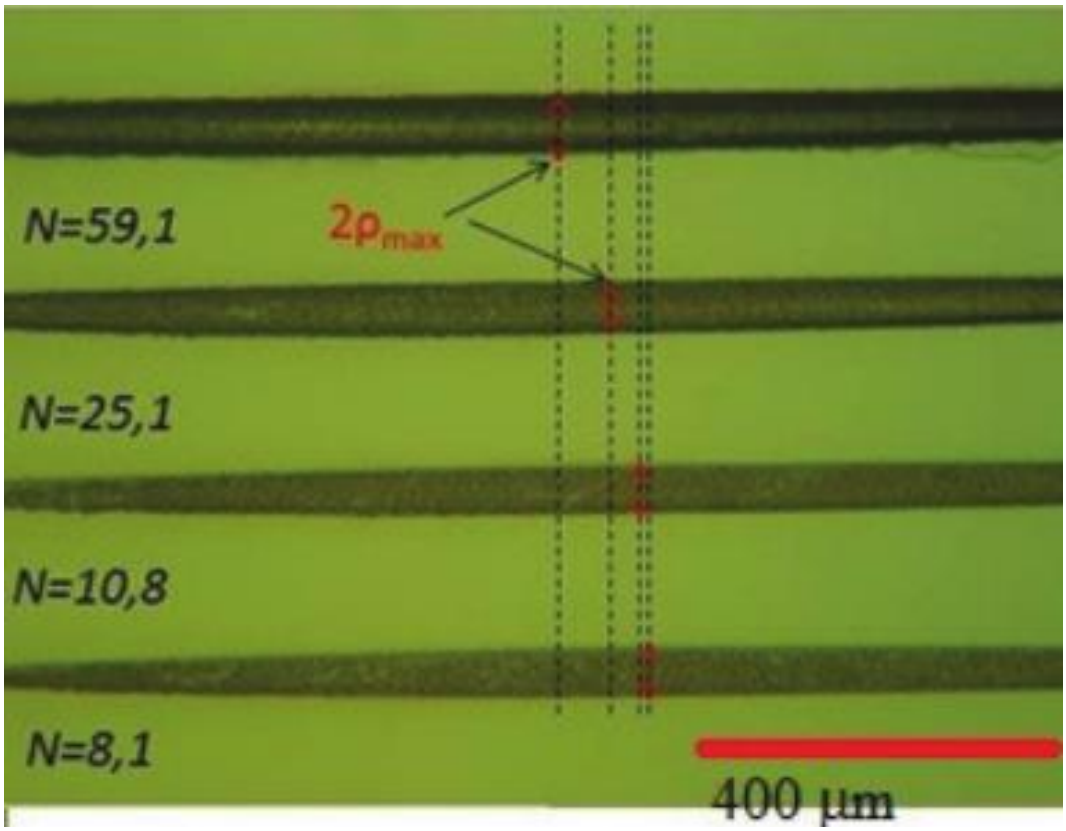
Para altas taxas de repetição e baixas velocidades de translação, a Equação (3.35) pode ser aproximado para:

$$N = \sqrt{\pi}\,\frac{f_R\,\rho_{max}}{v_y} \approx 1{,}8\,\frac{f_R\,\rho_{max}}{v_y} \qquad para\ \frac{v_y}{f_R\,\rho_{max}} \approx 0 \tag{3.36}$$

O número N representa apenas pulsos nas imediações, já que pulsos relativamente distantes dessa posição não contribuem para o processo de ablação. Devido ao movimento relativo, a sobreposição N é diferente da usada no método tradicional, mas reproduz muito mais fielmente a situação real que ocorre durante a usinagem.

A Figura 10 mostra as ranhuras, com lóbulos antes e depois do ponto focal obtidas em vidro óptico BK7.

Figura 10 - Traços de D-scan realizados em vidro óptico BK7 com pulsos de 152 fs e energia de 207μJ para diferentes sobreposições N, onde são mostradas as posições de medição de ρmax.

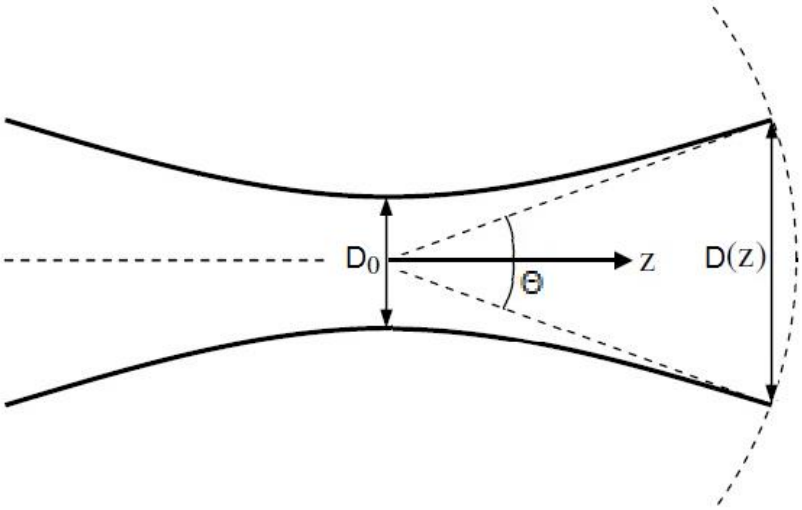


Fonte: Adaptado de ROSSI, W. d. *et al.*, 2012.

3.3.4 Propagação e focalização de feixes gaussianos

Um feixe de laser diverge por difração de seu valor inicial a partir da cintura de diâmetro D_0 a uma taxa crescente, como mostrado na Figura 11, e atinge um valor máximo apenas no infinito. O máximo valor é a divergência no infinito $\Theta_{0\infty}$.

Figura 11 - Propagação de um feixe gaussiano.



Fonte: Adaptado de STEEN, W. M., 2010.

Se uma lente focar este feixe, vai formar uma nova cintura de diâmetro D_1 e divergir para um valor máximo no infinito de $\Theta_{1\infty}$ onde

$$D_0.\Theta_{0\infty} = D_1.\Theta_{1\infty} = constante \tag{3.35}$$

Esta constância do produto $D.\Theta$ presente no sistema com óptica livre de aberração permite o cálculo do diâmetro do feixe e a profundidade de foco [21].

Para usar esta propriedade deve-se definir um fator de qualidade comparando a divergência atual do feixe Θ_{act}, com a divergência de um feixe gaussiano com o mesmo tamanho de cintura Θ_r. Considere uma cavidade laser ressonante gerando uma divergência de Θ_{act} e tendo um feixe com raio na cintura W_0,. A mesma cavidade deveria dar uma divergência do feixe gaussiano Θ_{Gauss}, e raio na cintura w_0.

A equação que descreve a evolução do raio de um feixe gaussiano, conforme ele se propaga, é dada por:

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2}\right)^2} \tag{3.36}$$

onde $w(z)$ é o raio do feixe para uma distância z cuja origem do eixo se encontra na cintura de raio w_0 para um feixe de comprimento de onda λ.

Em um campo distante onde $z \rightarrow$ grande tem-se,

$$\left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2}\right)^2 \gg 1 \tag{3.37}$$

e $\Theta_{Gauss} = \frac{w(z)}{z} = \frac{\lambda}{\pi w_0}$, de onde pode-se ver que $\Theta_{Gauss}.w_0 = \frac{\lambda}{\pi}$ = constante.

Usando a mesma equação, a divergência Θ_r, de um feixe gaussiano com o mesmo raio de cintura W_0 do feixe atual é dada por:

$$\Theta_r = \frac{\lambda}{\pi W_0} \tag{3.38}$$

Definindo a razão $M = \frac{\Theta_{act}}{\Theta_{Gauss}} = \frac{W_0}{w_0}$ então tem-se:

$$\Theta_{Gauss} = \frac{\lambda}{\pi w_0} = \frac{\lambda}{\pi \frac{W_0}{M}} = \frac{M\lambda}{\pi W_0} \tag{3.39}$$

e

$$\Theta_{act} = M.\Theta_{Gauss} = \frac{M^2\lambda}{\pi W_0} \tag{3.40}$$

lembrando que $\Theta_r = \frac{\lambda}{\pi W_0}$, temos que $\Theta_{act} = M^2.\Theta_r$, ou seja:

$$M^2 = \frac{\Theta_{act}}{\Theta_r} \tag{3.41}$$

O fator de qualidade M^2 permite que feixes reais de ordem maior que uma gaussiana possam ser tratados como feixes gaussianos usando um comprimento de onda modificado, $M^2\lambda$. Conhecendo M^2 várias características do feixe podem ser calculadas.

Aplicando para uma lente tem-se:

$$\Theta_{act} = \frac{D_L}{2f} \quad \text{e} \quad \Theta_r = \frac{\lambda}{\pi W_0} = \frac{2\lambda}{\pi d_{min}} \tag{3.42}$$

$$M^2 = \frac{\Theta_{act}}{\Theta_r} = \frac{D_L}{2f}.\frac{\pi d_{min}}{2\lambda} = \frac{\pi D_L d_{min}}{4f\lambda} \tag{3.43}$$

assim,

$$\boldsymbol{d_{min} = \frac{4M^2 f\lambda}{\pi D_L}} \tag{3.44}$$

onde d_{min} é o diâmetro do feixe no ponto focal e D_L é o diâmetro do feixe incidente sobre a lente.

O diâmetro do feixe D, para qualquer distância z, ao longo do caminho, a partir da cintura do feixe é dado pela equação básica de propagação:

$$\boldsymbol{D(z) = D_0 \sqrt{1 + \left(\frac{4M^2\lambda z}{\pi D_0^2}\right)^2}} \tag{3.45}$$

3.4 Microfluídica e Aplicações

A biotecnologia está cada vez mais presente em um grande número de ensaios, tais como análises de DNA ou de medicamentos, o rastreio dos doentes, e sínteses combinatórias. Todos esses procedimentos exigem manipulação de fluidos. Whitesides e Stroock [2] enfatizam que o número de experimentos cresceu e os dispositivos utilizados para a sua realização diminuíram de tamanho, a estratégia de "menor é melhor" começou a transformar o mundo dos fluidos como transformou o mundo da eletrônica. O interesse em circuitos microfluídicos tem sido amplamente motivado por aplicações, e as dimensões e os fluidos são determinados por estas aplicações.

Entre as aplicações descritas na literatura algumas despertaram maior interesse para o presente trabalho e são aqui descritas.

3.4.1 Plataforma ELISA

A introdução de enzimas como marcadores de anticorpos abriu novas possibilidades para testes de antiglobulina [50]. O teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é um ensaio imuno-enzimático, que usa anticorpos específicos para detectar antígenos/anticorpos em uma amostra. O complexo que contém o anticorpo é visualizado pelo acoplamento da enzima ao anticorpo. A adição de um substrato ao complexo enzima-anticorpo-antígeno resulta em um produto colorido permitindo uma fácil visualização e detecção da presença do antígeno.

O microtitulador de 96 poços é um dispositivo bem estabelecido para efetuar ensaios de imunoabsorção enzimática que permitem a detecção de

anticorpos específicos. No entanto, o teste ELISA baseado em placa de poços tem algumas desvantagens [51]. Cada etapa de reação requer de 50 a 100 µl de volume do reagente e entre cada etapa de incubação requer um intervalo de 1 a 8 hs para uma resposta satisfatória. Com a tecnologia de microfluídica é possível obter algumas vantagens em relação à placa de poços, tais como: baixo consumo de reagentes, melhoria na eficiência da reação e redução nos tempos de reação e incubação [3, 5, 7].

Camargo *et al*, há quatro décadas atrás, relatam ensaios ELISA para detecção de Toxoplasmose em placas de poços e mostram a vantagem da detecção por mudança de cor em relação à utilização de microscopia de fluorescência [50]. Naot *et al* realizaram ensaios ELISA por um método diferente e reforçaram a vantagem em relação à microscopia de fluorescênica [52].

Com o advento da tecnologia de microfluídica, muitos relatos de ensaios ELISA para doenças infecciosas têm inspirado pesquisas utilizando sistemas microfluídicos. Novo *et al.* relatam a utilização da microfluídica para detectar toxinas em vinhos e cervejas através do teste ELISA integrando microcanais em PDMS e fotodiodos [53]. Hoegger *et al*. construíram um microcircuito descartável para uma rápida determinação do teor de ácido fólico em produtos alimentícios pelo método ELISA [54].

Constantini *et al.* apresentam um sistema lab-on-chip, que combina uma rede microfluídica de vidro-polidimetilsiloxano e uma série de fotossensores de silício amorfo para o diagnóstico e acompanhamento da doença celíaca [55]. Celíaca é uma doença inflamatória crônica do intestino delgado que afeta indivíduos geneticamente suscetíveis. Nesta doença o fator etiológico crítico foi identificado como a ingestão de glúten encontrada em grãos de trigo, cevada, centeio e triticale. Após a ingestão dessas proteínas, os sintomas apresentados pelos pacientes afetados por esta doença podem ser graves, portanto, o diagnóstico e o tratamento devem ser rápidos. O procedimento desenvolvido permite um tempo de análise total inferior a metade do tempo de análise requerido pelo imunoensaio ELISA padrão.

Herrmann *et al.* desenvolveram um microcircuito que baseia-se na separação física da fase de formação de complexos imunes e da fase de reação enzimática em duas redes independentes de microcanais. Este sistema utiliza um

protocolo que permitiu obter curvas padrão para a quantificação de um modelo de anticorpo em cerca de 30 minutos [56].

Chin *et al.* construíram um microcircuito que reproduz todas as etapas do teste ELISA e coletaram centenas de amostras humanas em Ruanda [57]. O chip teve excelente desempenho no diagnóstico do HIV usando apenas 1 ul de sangue total não processado e uma capacidade de diagnosticar simultaneamente o HIV e a sífilis com sensibilidades e especificidades que rivalizam com as dos testes de referência de bancada.

3.4.2 Síntese de nanocristais

A imagem molecular usando espectroscopia de fotoluminescência é uma técnica importante em bioquímica e biologia molecular. É bem conhecido que os tecidos biológicos têm uma “janela de transparência óptica” na faixa de infravermelho próximo de 700-1100 nm. As nanopartículas de conversão ascendente de energia possibilitam a conversão de radiação próxima ao infravermelho para a região do visível através do processo ótico não-linear nos nanocristais [58]. A utilização de nanopartículas como marcadores biológicos tem se mostrado um excelente substituto para os tradicionais agentes de contraste utilizados no mapeamento molecular por imagens.

Comumente, nanopartículas ou nanocristais são sintetizados quimicamente, em lotes de pequeno volume. Contudo, este tipo de síntese, em muitos casos, tende a não ter reprodutibilidade e apresenta dificuldade de produção [8]. O composto $NaYF_4$, sendo uma matriz hospedeira bastante eficiente para íons de terras raras como Y/Er e Yb/Tm tende a minimizar esses problemas. Devido à elevada eficiência deste composto, esforços estão sendo direcionados para o desenvolvimento de métodos mais eficientes e menos complexos para a síntese de nanocristais.

Yi et al. relatam a preparação de nanopartículas de conversão ascendente de NaYF4: Yb, Er pelo método de co-precipitação [59, 60]. A síntese utiliza um complexo terra-rara - ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em uma solução vigorosamente agitada de NaF para produzir um processo homogêneo de nucleação. O tamanho médio das partículas é ajustável de 37 a 166 nm, variando a quantidade de EDTA. A transformação da fase cúbica para a hexagonal é feita por processo térmico com temperaturas entre 400 e 600 ºC.

A Microfluídica tem avançado na pesquisa biológica e química, em particular através da integração de técnicas analíticas com manipulação de células, ensaios bioquímicos e síntese química [61]. A utilização da microfluídica possibilita uma série de vantagens em relação aos processos químicos convencionais, incluindo controle intenso de transferência de calor e massa, menor consumo de reagente e integração de sensores para monitoramento [62-64]. Mais recentemente, sistemas microfluídicos têm sido usados para produzir nanopartículas com excelente controle do tamanho da partícula, composição e morfologia [61, 63, 65].

Liu *et al.* relatam em 2011 pela primeira vez a síntese de nanocristais NaYF4: Yb^{3+}, Er^{3+} por fluxo contínuo em um sistema microfluídico [8]. Dois passos sequenciais de temperatura foram empregados, um com temperatura de 180 ºC para nucleação e outro com temperatura de 110 ºC para promover o crescimento dos nanocristais. Os nanocristais preparados exibiram emissões verdes e vermelhas sob excitação do laser de diodo de 974 nm.

Publicações recentes relatam que a conversão ascendente baseadas em nanocristais de $NaYF_4$ dopados com íons lantanídeos trivalentes, onde o Yb^{3+} é usado como sensitizador e o Eb^{3+} ou o Tm^{3+} são usados como ativadores no visível são os melhores candidatos para aplicações biológicas, e a fase β (hexagonal) apresenta maior eficiência de conversão ascendente em relação à fase α (cúbica) [60, 66-68].

3.4.2.1 Difração de Raios-X

A difração de raios-X (DRX) é uma ferramenta usada para identificar a estrutura atômica e molecular de um cristal, na qual os átomos cristalinos fazem com que um feixe de raios-X incidentes se difrate em direções específicas. Ao medir os ângulos e intensidades desses feixes difratados, um cristalógrafo pode produzir uma imagem tridimensional da densidade de elétrons dentro do cristal [69]. A partir dessa densidade eletrônica, as posições médias dos átomos no cristal podem ser determinadas, bem como suas ligações químicas, sua desordem e várias outras informações.

As intensidades de pico são determinadas pela distribuição de átomos dentro da rede. Consequentemente, o padrão de difração de raios-X é a impressão digital de arranjos atômicos periódicos em um dado material [70]. Este

método é capaz de fornecer informações quantitativas das fases cristalinas presentes na amostra.

3.4.2.2 Método de Rietveld

Rietveld foi pioneiro na utilização de computador no tratamento de dados de difração. Criou o conhecido Método de Rietveld [71] de refinamento de parâmetros envolvidos em um experimento de difração com policristais. Basicamente, é feita uma comparação entre as contagens observada e calculada, a partir de um modelo, em cada posição angular medida; então se refinam parâmetros para minimizar a diferença entre tais contagens. São calculadas as intensidades das reflexões considerando o fator de espalhamento dos átomos presentes, suas posições na célula unitária e as operações de simetria da estrutura cristalina. Um modelo estatístico de distribuição é usado como perfil das reflexões calculadas. O método tem se difundido graças à distribuição livre do programa de refinamento e, mais recentemente, às evoluções nas possibilidades de modelagem e de coleta de dados [72].

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Usinagem a laser com pulsos ultracurtos.

Neste trabalho foram utilizados dois sistemas de usinagem, aqui chamados de estação 1 e de estação 2. Ambas foram usadas nas confecções dos sistemas microfluídicos e são aqui descritas.

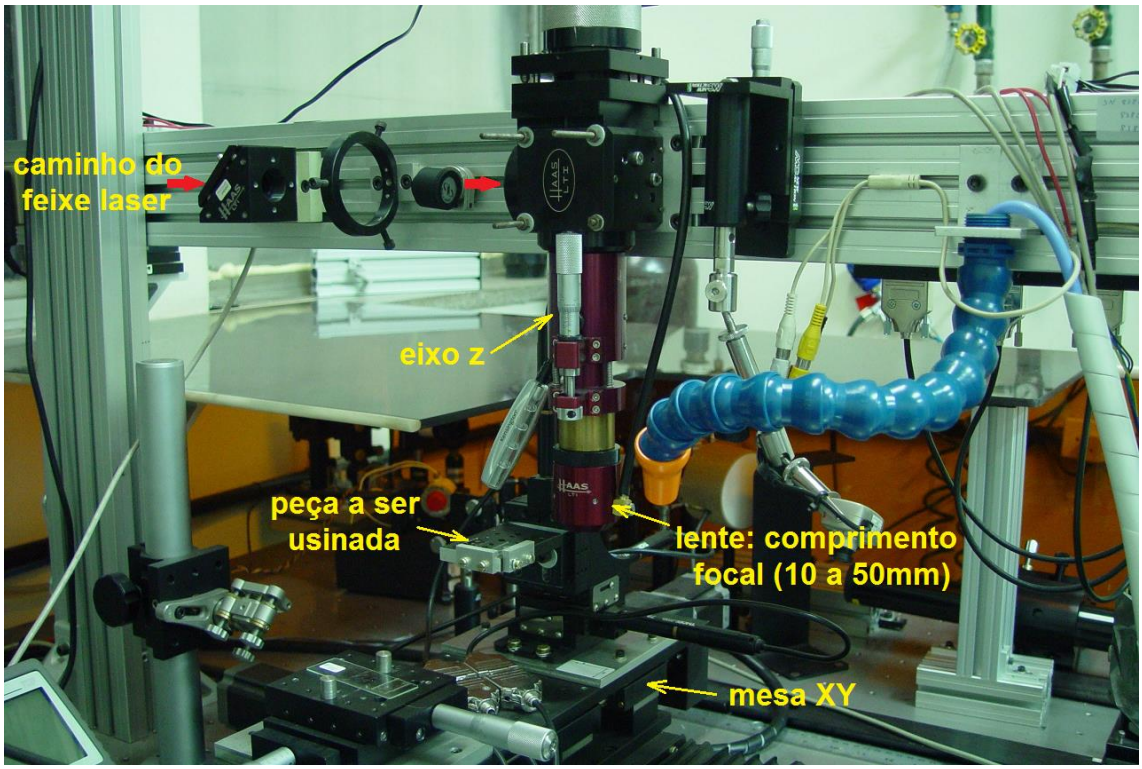
4.1.1 Estação de usinagem 1

Para a construção dos circuitos microfluídicos utilizou-se, inicialmente, uma estação de trabalho, com sistema de movimentação e controle, desenvolvida dentro do IPEN capaz de usinar estruturas com dimensões da ordem de poucos micrometros utilizando laser de pulsos ultracurtos. A estação utiliza o feixe de um laser de Titânio-Safira amplificado de femtossegundos, que se encontra em um outro laboratório, distante cerca de 30 metros da estação de usinagem. Ele é guiado por espelhos até a entrada desta estação de usinagem. O sistema laser utiliza o método de amplificação por varredura de frequência (Femtopower Compact Pro CE-Phase HP/HR da marca Femtolasers) e gera pulsos de 25 fs centrados em 785 nm com 37 nm de largura de banda, com taxa de repetição máxima de 4 KHz e energia máxima por pulso de 800 µJ.

Na estação de trabalho o feixe é focalizado sobre a peça a ser usinada por lentes com comprimentos focais diversos. O sistema conta com um estágio de deslocamento de dois eixos XY, com precisão de 300 nm, controlado por um computador através de programação CNC integrada ao software Labview. Um terceiro eixo Z, com controle manual, faz parte do sistema. A integração permite a movimentação segundo um desenho pré-determinado e possibilita a utilização de diversos sistemas de controle tais como: energia do feixe de laser, taxa de repetição, abertura e fechamento de um obturador.

Na Figura 12 é mostrada a estação de trabalho 1 utilizada para efetuar as microusinagens a laser.

Figura 12 - Estação 1 de Microusinagem a laser.



Fonte: autor da tese.

4.1.2 Estação de usinagem 2

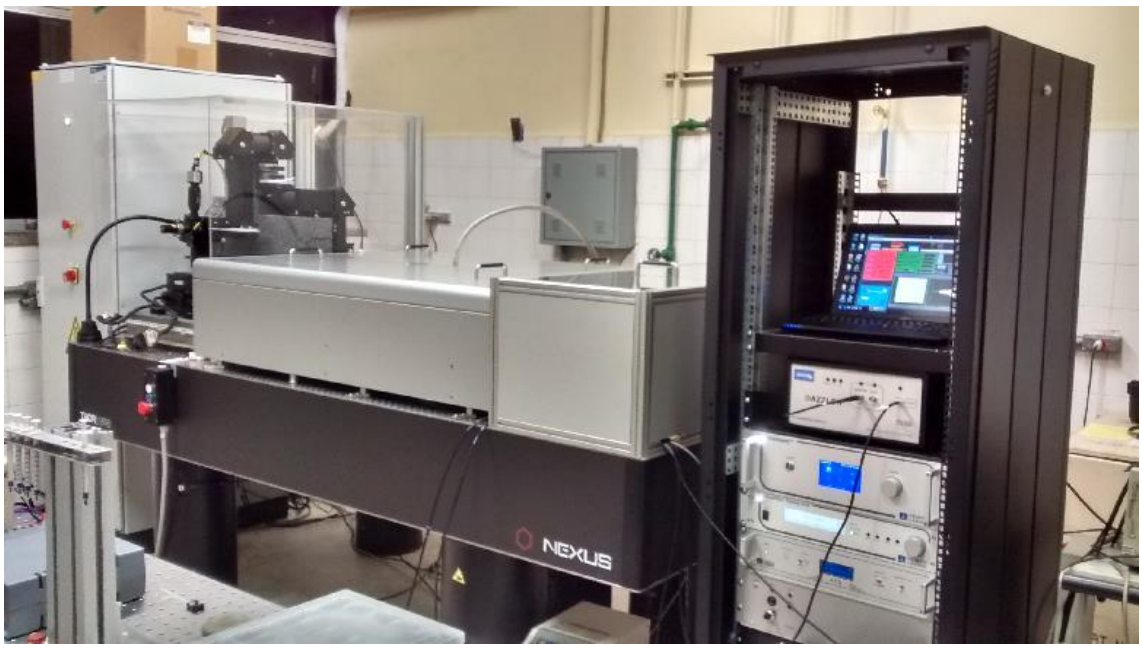
Nesta estação, o laser e o sistema de movimentação e controle estão todos em uma mesma mesa óptica, dando muito mais precisão, reprodutibilidade e controle ao processo. Aqui, o gerador de pulsos laser de femtossegundos também é um laser de titânio safira, modelo “Element PRO 400” da Femtolasers Produktions GmbH, com emissão polarizada centrada em 800 nm, largura temporal de 10 fs, energia por pulso de aproximadamente 6 nJ e taxa de repetição de 85 MHz.

Este feixe é injetado em um sistema amplificador multi-passo de um estágio, também de titânio-safira modelo “Femtopower Double 10 kHz”, da Femtolasers. Após passar por este amplificador, o feixe ainda apresenta polarização vertical, mas com energia de aproximadamente 200 μJ e taxa de repetição de 10 kHz.

O feixe amplificado é então injetado no sistema opto-mecânico modelo “PRJ0221-Femtolasers” da *Lasea Laser Engineering Applications*. Neste sistema, o feixe é levado até a lente de focalização, a qual produz um ponto focal sobre a superfície da amostra processada. Esta amostra é colocada sobre um estágio

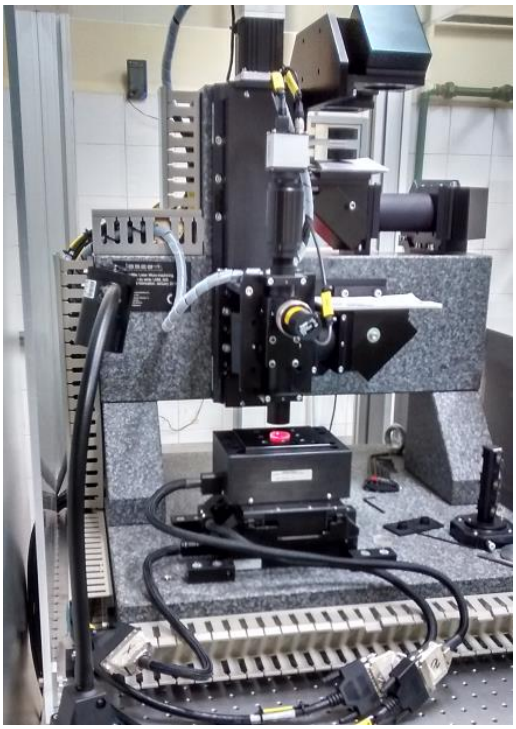
translador de três eixos, com precisão nanométrica e controlado por programação ISO de códigos G. O sistema ainda incorpora monitor de energia, controle da taxa de repetição, visor da área processada e possibilita a expansão espacial do feixe em até 5 vezes. A Figura 13 mostra o sistema e a Figura 14 ilustra a mesa CNC.

Figura 13 - Estação 2 de Microusinagem a laser.



Fonte: autor da tese.

Figura 14 - Mesa CNC XYZ.

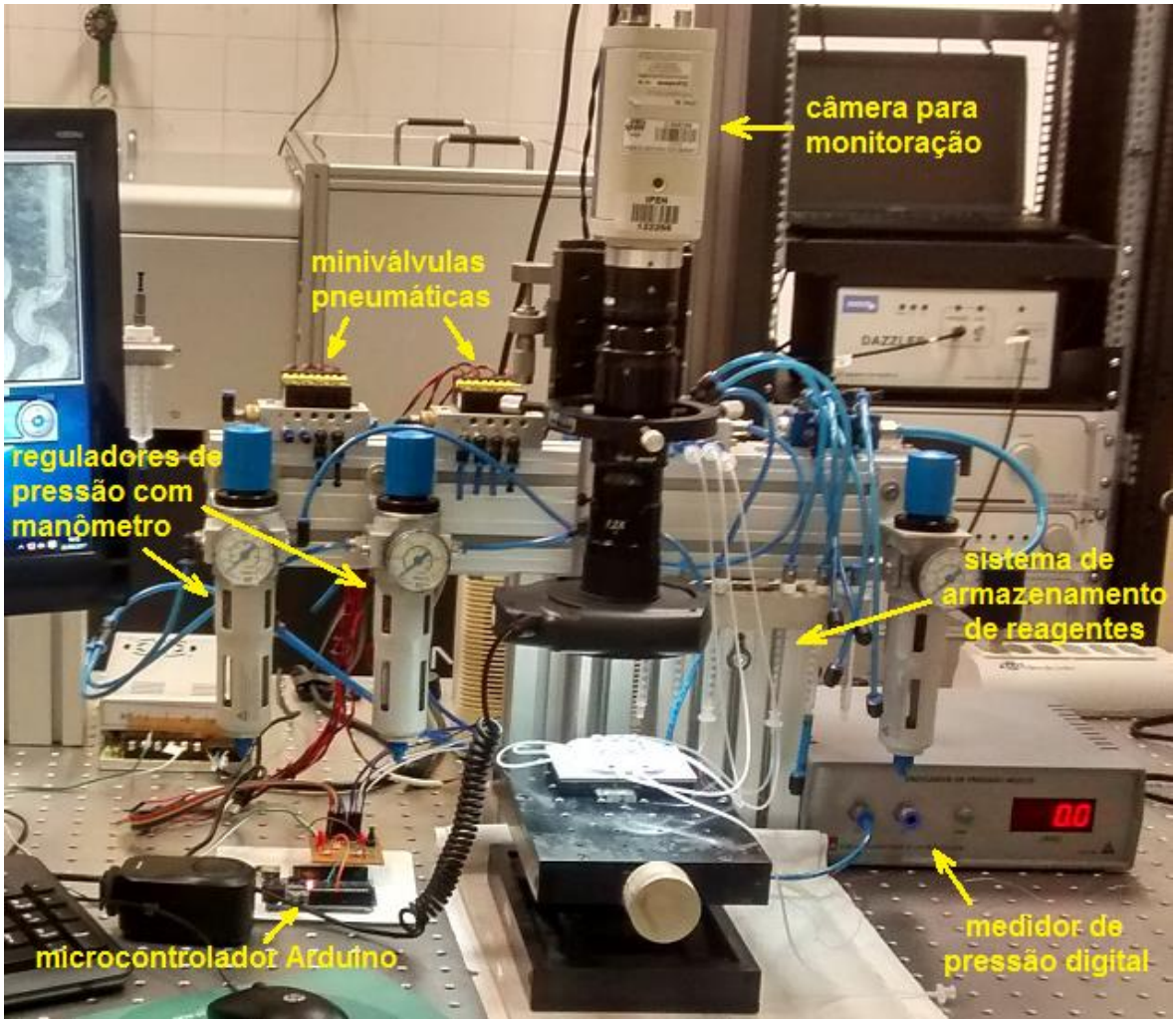


Fonte: autor da tese.

4.2 Estação de controle de pressão e fluxo

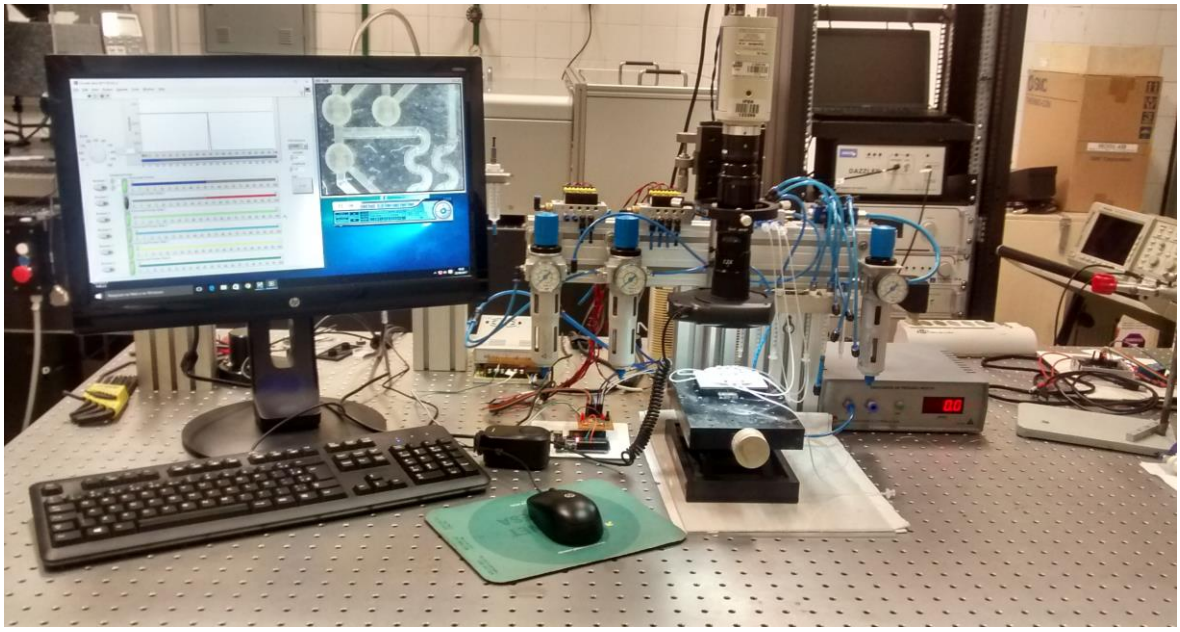
Para teste dos microcircuitos desenvolvidos montou-se uma estação de trabalho para controle e injeção de líquidos que conta com entrada de ar pressurizado, três unidades de tratamento do ar contendo filtro, desumidificador e controle de pressão com manômetro para leitura, miniválvulas pneumáticas, sistema de armazenamento dos reagentes, medidor de pressão digital, sistema de aumento acoplado ao computador para monitoração, uma placa microcontrolada Arduino e uma placa para drenar a corrente consumida pelas miniválvulas pneumáticas. A Figura 15 ilustra os componentes descritos e a Figura 16 mostra a estação de controle acoplada a computador. A programação de controle é feita através de *software* Labview.

Figura 15 - Componentes da estação de trabalho para controle de pressão e fluxo.



Fonte: autor da tese.

Figura 16 - Estação de Trabalho.



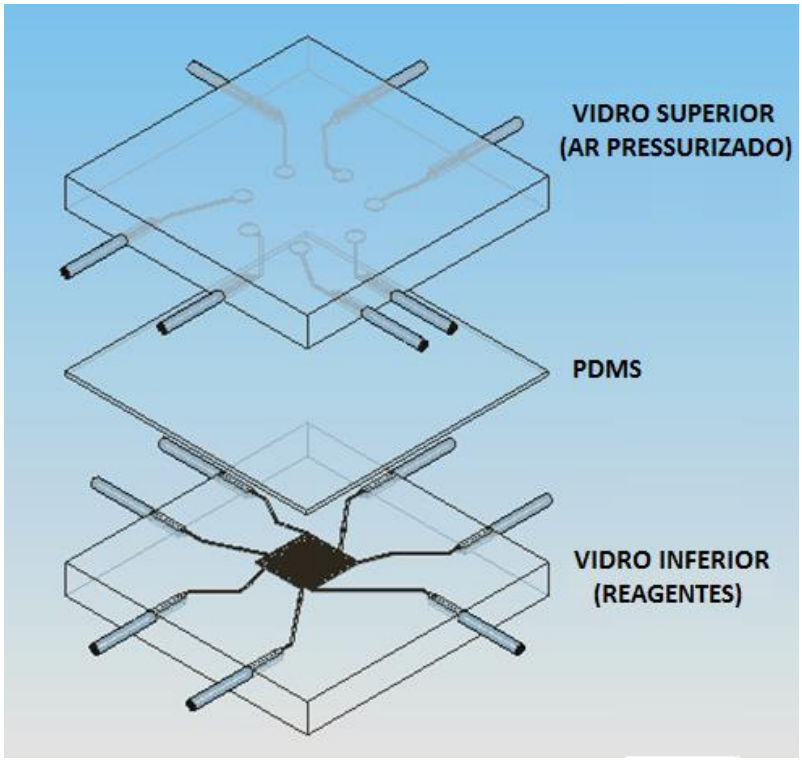
Fonte: autor da tese.

4.3 Circuitos microfluídicos

Os circuitos microfluídicos são constituídos por duas placas de vidros contendo microcanais usinados. Os materiais onde os microcanais são usinados são placas de 25 mm por 25 mm, com 3 mm de espessura de vidro ótico BK7 (borosilicato). A placa inferior é destinada à passagem dos líquidos que farão parte da reação e a superior é destinada ao controle dos fluxos desses reagentes. Nas entradas e saídas desses microcanais são colados conectores construídos com tubos de aço inoxidável que, acoplados a mangueiras permitem a entrada e saída dos reagentes, bem como a introdução de ar pressurizado para controle do fluxo desses reagentes.

As placas de vidros são montadas uma sobre a outra com as superfícies usinadas separadas por uma película de polidimetilsiloxano (PDMS) de 300 µm de espessura , um polímero bastante flexível. Na Figura 17 ilustra-se o esquema de montagem do circuito microfluídico.

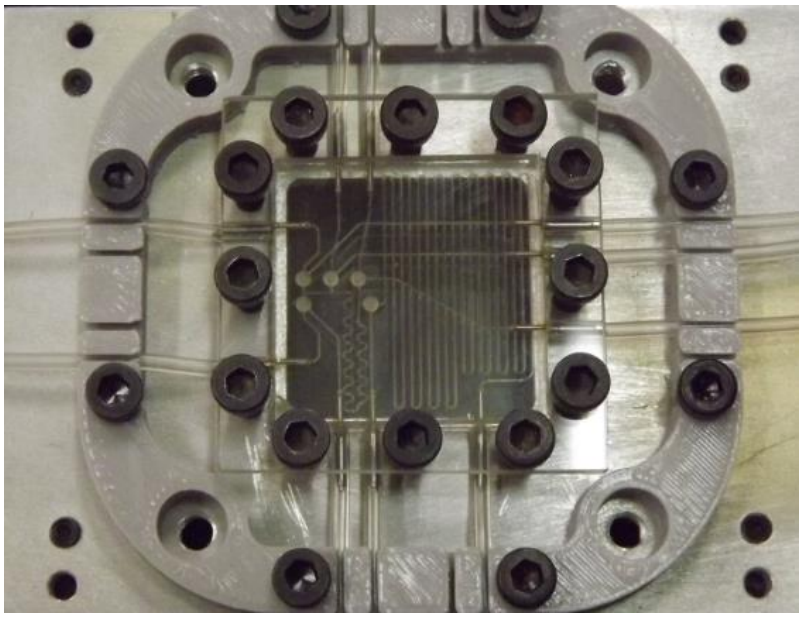
Figura 17 - Esquema de montagem do circuito microfluídico.



Fonte: autor da tese.

O circuito é então montado sobre uma base de alumínio contendo uma peça plástica construída em impressora 3D para fixar as mangueiras e evitar esforço nas conexões. Uma placa de acrílico é colocada sobre os vidros para fixá-los na base formando o sistema microfluídico completo ilustrado na Figura 18.

Figura 18 - Sistema microfluídico montado.



Fonte: autor da tese.

4.4 Componentes microfluídicos

Os componentes microfluídicos desenvolvidos e incorporados aos sistemas microfluídicos, bem como os materiais utilizados são descritos a seguir.

4.4.1 Conectores

Os reagentes líquidos são injetados nos microcanais através de mangueiras flexíveis com 0,79 mm de diâmetro interno e 2,15 mm de diâmetro externo, acopladas a conectores feitos de tubos de aço inoxidável. Estes conectores foram confeccionados com tubos de três diâmetros diferentes, cortados com laser de femtossegundos, e inseridos uns dentro dos outros formando uma espécie de funil com diâmetro interno variando de 0,3 mm até 0,8 mm. O tubo mais fino (diâmetro interno = 0,26 mm, externo = 0,46mm) cortado com 9 mm de comprimento é inserido na cavidade usinada no vidro BK7 que possui um comprimento de 3 mm onde é colado com cola à base de resina epoxi, marca Araldite. Um segundo tubo (diâmetro interno = 0,51 mm, externo = 0,80 mm) com comprimento de 5 mm é colado sobre a parte externa do primeiro tubo. Um terceiro tubo (diâmetro interno = 0,94 mm, externo = 1,27 mm) com comprimento de 5 mm é colado sobre a parte externa do segundo tubo. Todas as colagens são feitas com o auxílio de um microscópio. Um conector pode ser visto na Figura 19.

Figura 19 - Conector inserido na parte usinada.

Fonte: autor da tese.

4.4.2 Microválvula

A microválvula desenvolvida consiste de microcanais usinados na placa de vidro inferior que são interrompidos. Os líquidos a serem injetados são empurrados com uma pequena pressão controlada por reguladores de pressão externos ao circuito. Os circuitos de controle construídos na placa de vidro superior recebem ou não ar pressurizado de miniválvulas pneumáticas acionadas por um microcontrolador Arduino. Entre as placas de vidros é colocada uma película de 300 µm de PDMS. Na Figura 20 é ilustrado o esquema de funcionamento da microválvula.

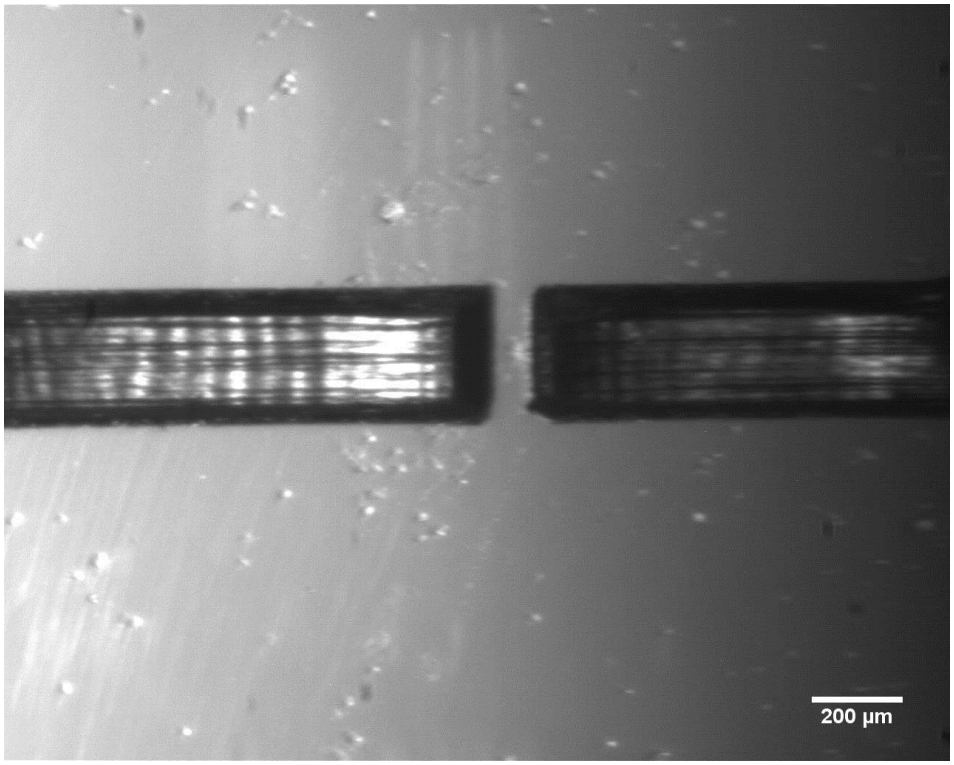
Figura 20 - Esquema de funcionamento da microválvula *ON/OFF*.

Fonte: autor da tese.

Injetando-se ar pressurizado no circuito superior e, sendo essa pressão superior à pressão que empurra o líquido, a microválvula permanece fechada e não há fluxo do líquido. Ao contrário, retirando a pressão no circuito superior, a pressão exercida no líquido empurra o PDMS no sentido contrário, criando um caminho para a circulação do líquido. A intensidade da pressão no líquido e o tempo de chaveamento da miniválvula pneumática determinam a quantidade de fluxo do líquido.

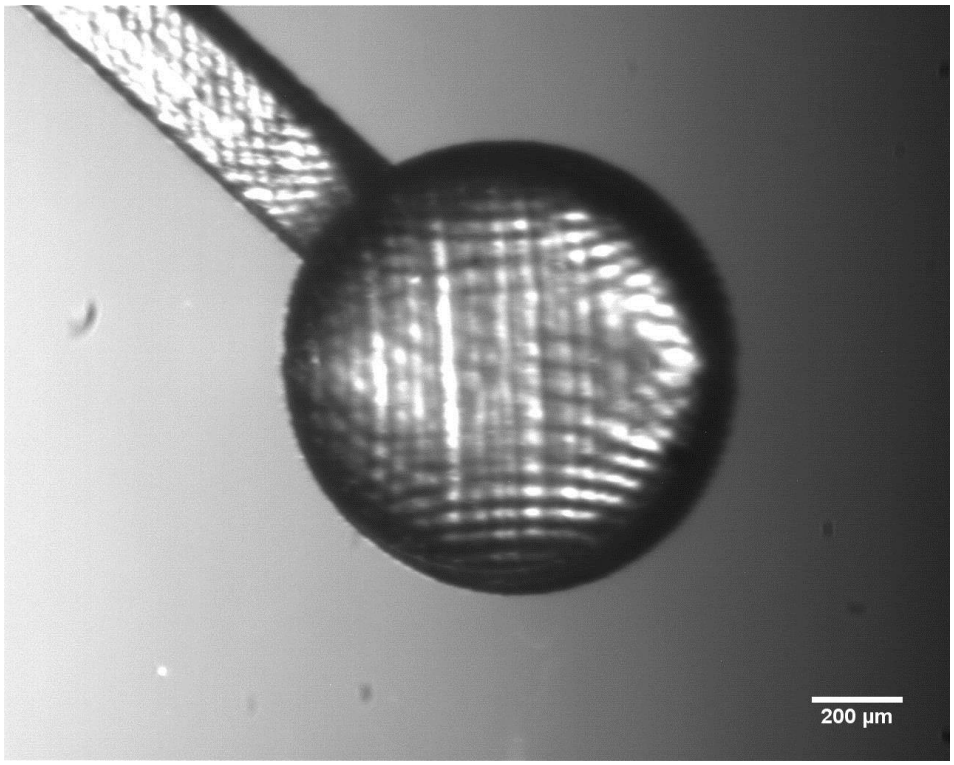
A Figura 21 mostra uma microválvula usinada na placa de vidro inferior. A parte da usinagem no canal superior para controle da microválvula é mostrada na Figura 22. A Figura 23 ilustra a microválvula montada com o PDMS entre as placas de vidros superior e inferior.

Figura 21 - Microválvula em canal de 200 µm, placa de vidro inferior.



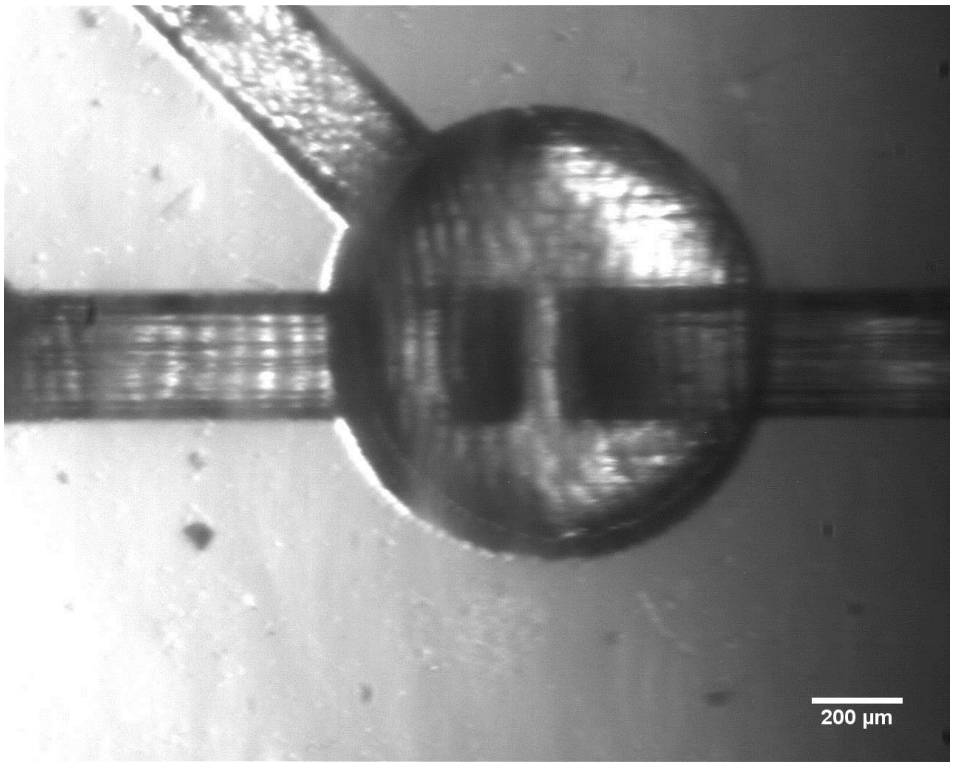
Fonte: autor da tese.

Figura 22 - Microválvula em canal de 200 µm, placa de vidro superior.



Fonte: autor da tese.

Figura 23 - Microválvula montada com PDMS entre as placas de vidros superior e inferior.

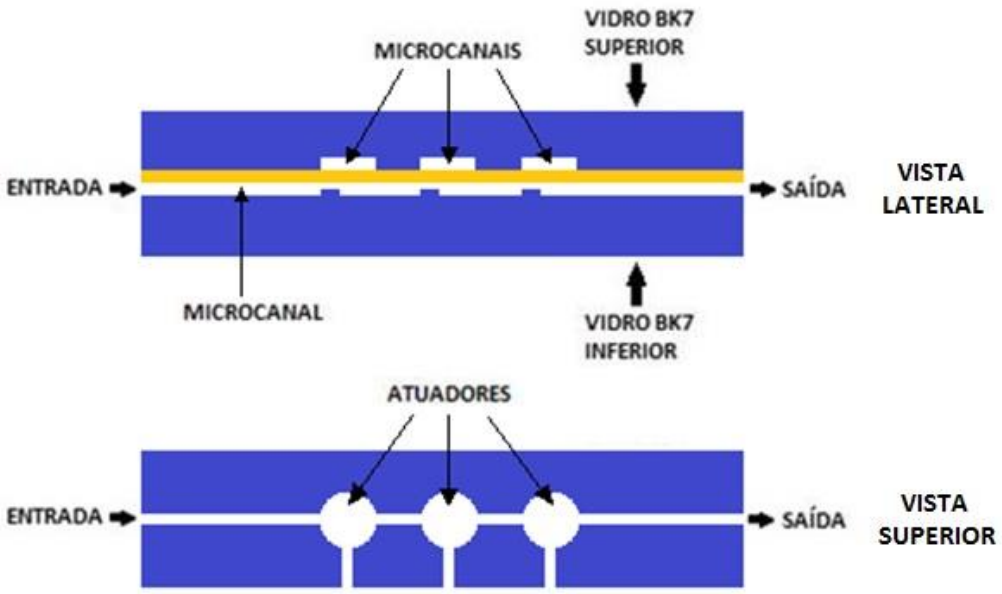


Fonte: autor da tese.

4.4.3 Microbomba

Em algumas aplicações onde não é possível empurrar o líquido com pressão, torna-se necessário a movimentação do mesmo com o uso de uma microbomba, como por exemplo, para acelerar a mistura de reagentes em um circuito fechado. O esquema da microbomba proposta é mostrado na Figura 24. Neste caso o circuito microfluídico inferior não é mais interrompido e para a movimentação do líquido é necessário que a pressão fornecida externamente ao circuito microfluídico superior produza a flexão do PDMS em três pontos distintos e, com uma sequência adequada a movimentação ocorre por efeito peristáltico.

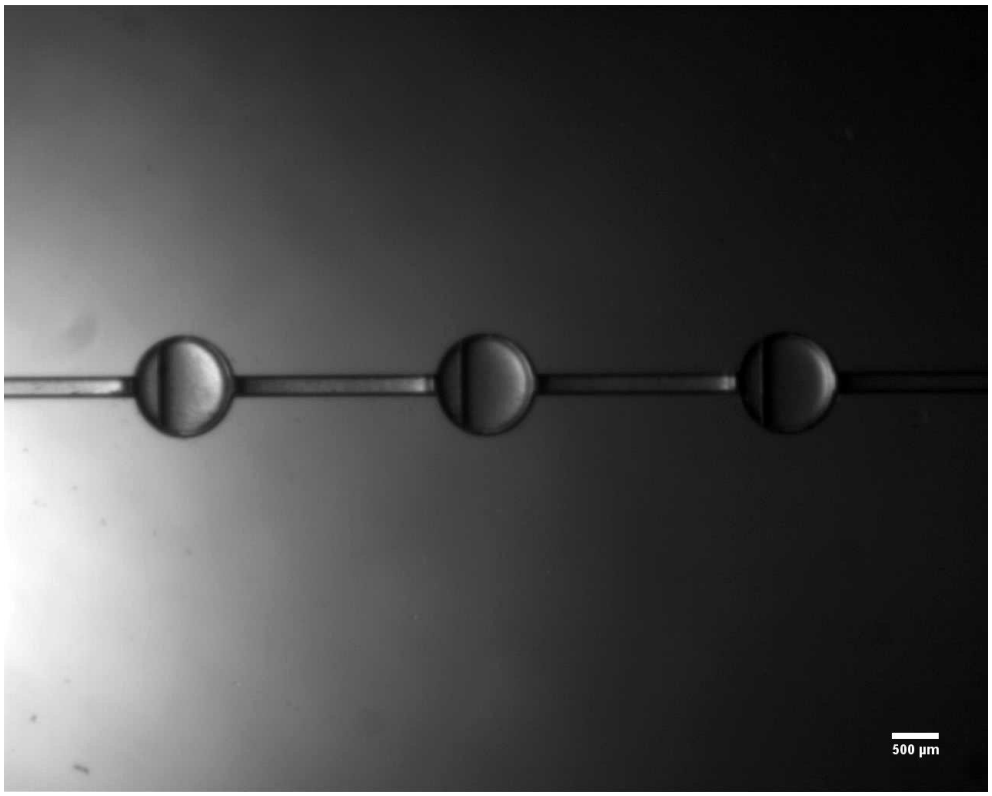
Figura 24 - Esquema da microbomba por efeito peristáltico.



Fonte: autor da tese.

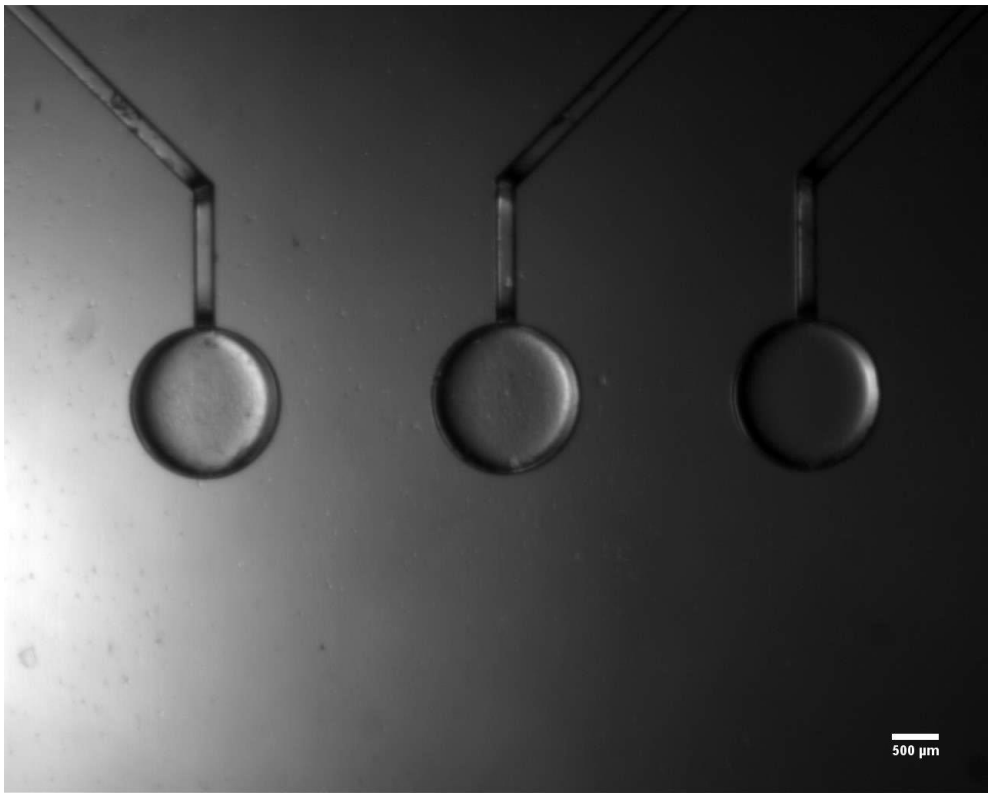
A Figura 25 mostra a usinagem na placa de vidro inferior e a Figura 26 mostra a usinagem na placa de vidro superior. A Figura 27 ilustra a microbomba montada com o PDMS entre as placas de vidros superior e inferior.

Figura 25 - Usinagem da microbomba no canal inferior.



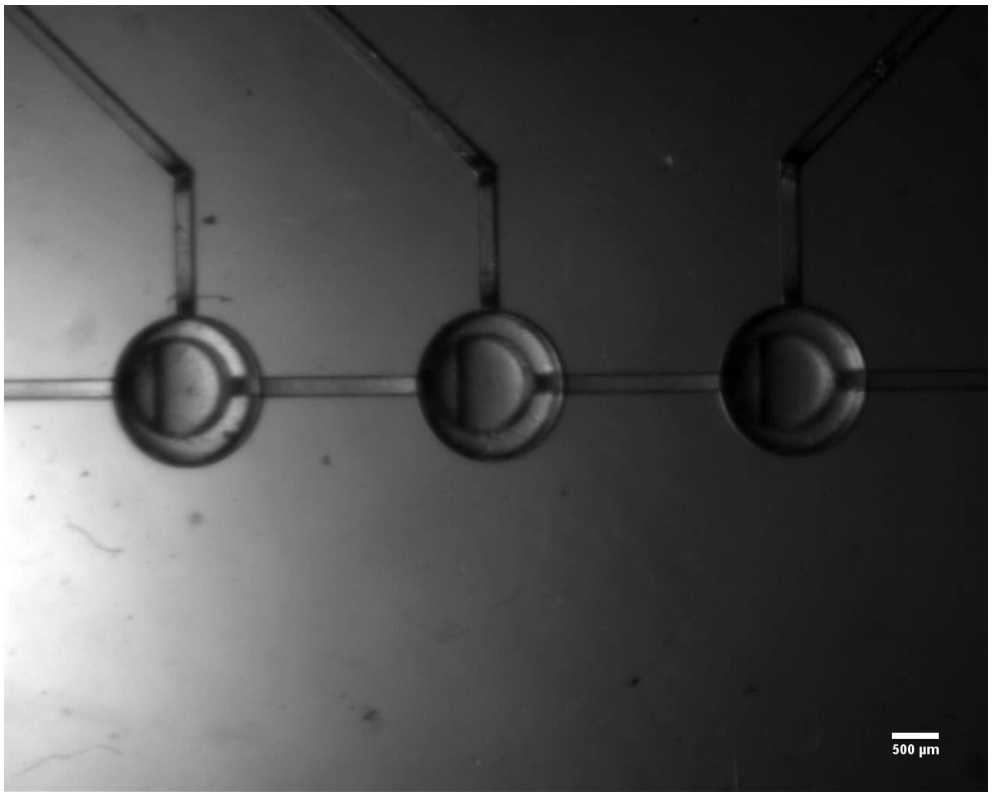
Fonte: autor da tese.

Figura 26 - Usinagem da microbomba no canal superior.



Fonte: autor da tese.

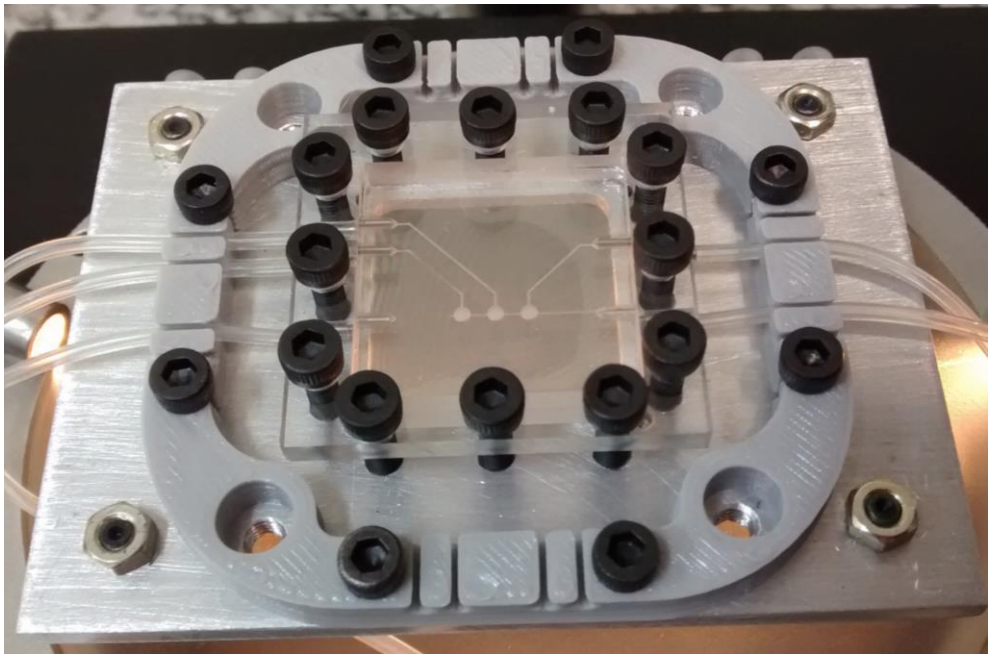
Figura 27 - Microbomba montada com PDMS entre as placas de vidros superior e inferior.



Fonte: autor da tese.

A microbomba construída para testes é mostrada na Figura 28.

Figura 28 - Circuito da microbomba por efeito peristáltico.

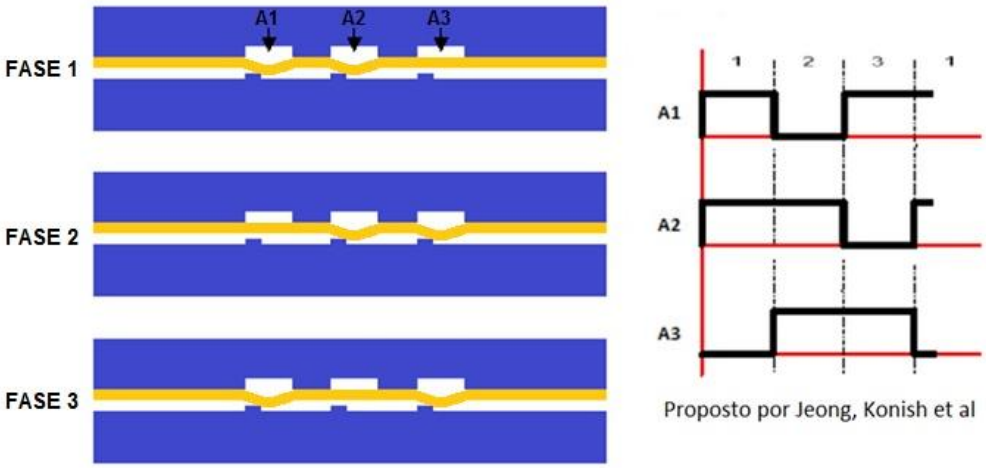


Fonte: autor da tese.

Da literatura tem-se que, três tipos de chaveamento são usados para gerar a movimentação do líquido.

A primeira sequência composta de três passos proposta por Jeong, Konish *et al* [73-76] é mostrada na Figura 29.

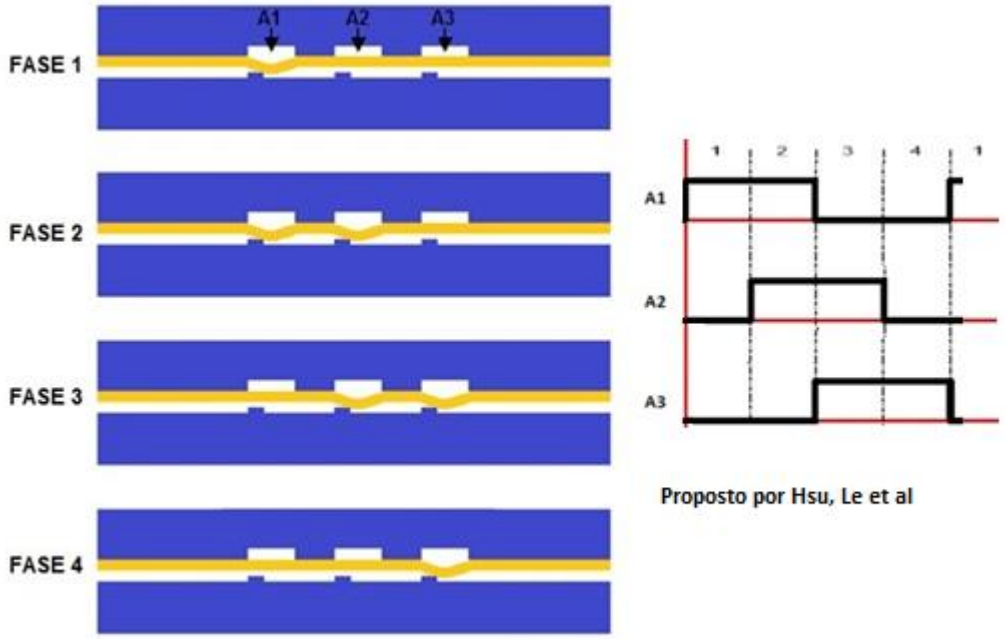
Figura 29 - Microbomba com sequência em três passos.



Fonte: autor da tese.

A segunda sequência composta de quatro passos proposta por Hsu, Le et al [77] é ilustrada na Figura 30.

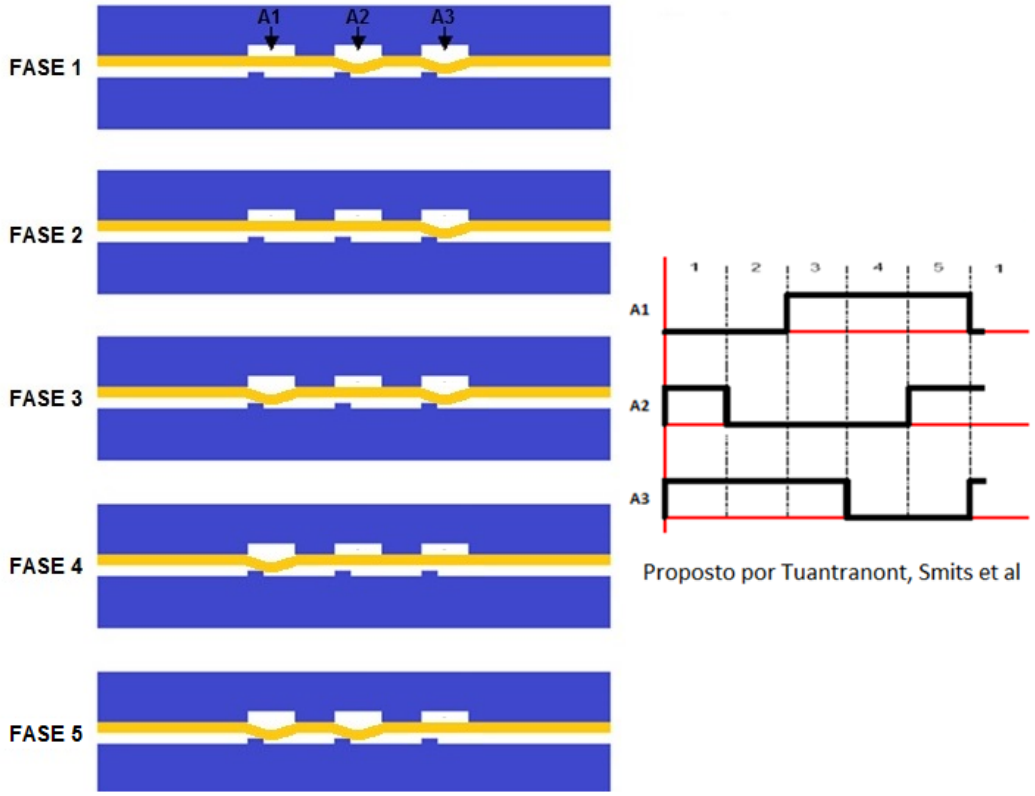
Figura 30 - Microbomba com sequência em quatro passos.



Fonte: autor da tese.

A terceira sequência composta de cinco passos proposta por Smits [78], Tuantranont *et* al [79] é mostrada na Figura 31.

Figura 31 - Microbomba com sequência em cinco passos.



Fonte: autor da tese.

4.4.4 Sistema de aquecimento

Devido à necessidade de aplicações específicas, foram desenvolvidos tanto um sistema de aquecimento global, onde todo o circuito microfluídico é aquecido, como um sistema para aquecimento localizado dentro do circuito microfluídico.

4.4.4.1 Sistema de aquecimento global

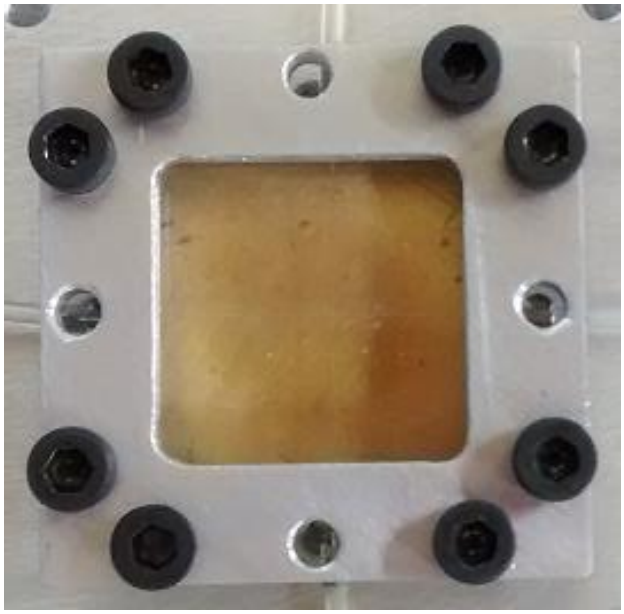
Para aquecimento global do sistema algumas peças foram criadas. Na Figura 32 mostra-se a peça de cobre criada, que acoplada por baixo em contato com o circuito microfluídico inferior onde circulam os líquidos, proporciona calor ao sistema.

Figura 32 - Peça de cobre para aquecimento.

Fonte: autor da tese.

Uma placa de alumínio, ilustrada pela Figura 33, substitui a placa de acrílico do sistema original quando há necessidade de aquecimento e a mesma ajuda na distribuição de calor pelo circuito microfluídico.

Figura 33 - Peça de alumínio para aquecimento.

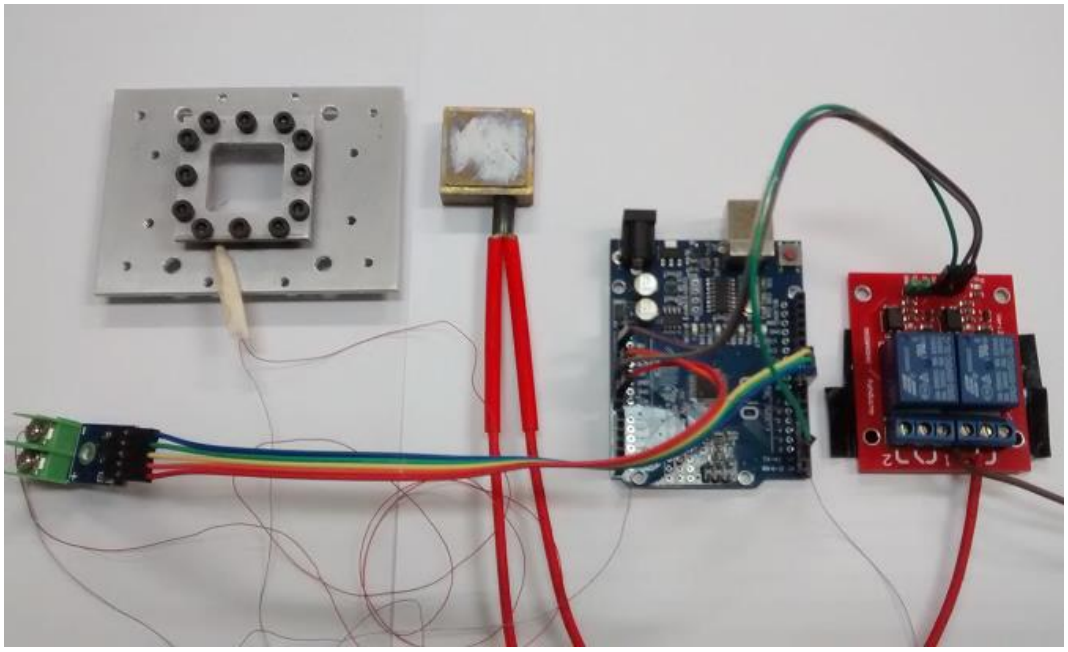


Fonte: autor da tese.

O sensor utilizado para medições de temperatura foi o termopar tipo K com faixa de medição de -50 ºC a 400 ºC.

Na Figura 34 são mostrados os componentes utilizados para aquecimento global.

Figura 34 - Dispositivos utilizados para aquecimento global de microcircuitos.



Fonte: autor da tese.

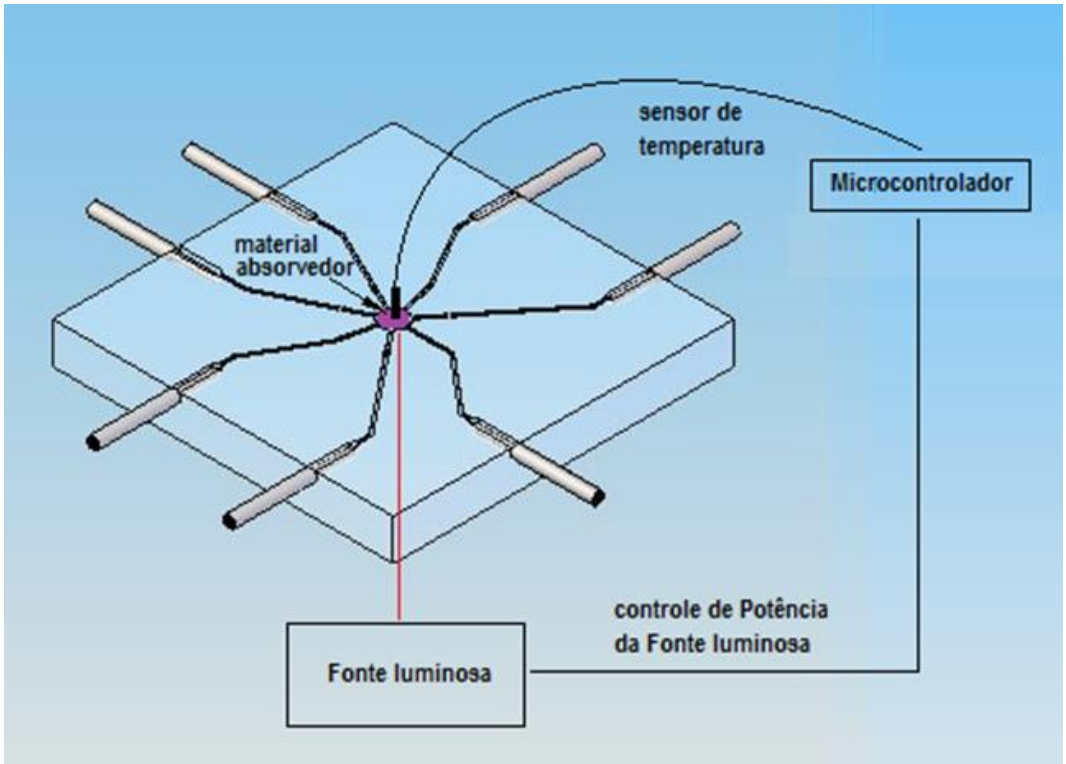
4.4.4.2 Sistema de aquecimento localizado

Um microrreator de um circuito microfluídico é um recipiente de pequeno volume, da ordem de algumas dezenas de microlitros, no qual ocorrem processos químicos ou bioquímicos de maneira controlada. Em algumas aplicações é desejável que essa reação ocorra à uma certa temperatura. Muitas vezes, também precisam de uma distribuição homogênea de temperatura e uma transferência de calor muito rápida entre a fonte de aquecimento, o elemento aquecedor e os fluídos do processo químico. O volume muito pequeno de um microrreator é, portanto, adequado a esta rápida transferência de calor, que geralmente leva a uma grande homogeneidade na temperatura do líquido em seu interior. Buscando atender essa necessidade foi desenvolvido o sistema de aquecimento aqui denominado “localizado”.

O aquecimento ocorre pela incidência de luz concentrada em uma superfície metálica de aço inoxidável, previamente tratada para absorver grande quantidade desta luz. O tratamento dessa superfície é feito com laser de pulsos ultracurtos, que geram estruturas microscópicas altamente absorvedoras de luz no intervalo de frequências entre o visível e o infravermelho próximo.

A lâmina absorvedora de luz é colocada no fundo do microrreator, com a superfície tratada voltada para baixo. A luz da fonte externa passa por uma lente e é então focalizada sobre a parte texturizada da lâmina que se aquece. Um sensor monitora a temperatura e o microcontrolador Arduino atua sobre o equipamento gerador da fonte luminosa controlando sua potência mantendo constante a temperatura desejada. Na Figura 35 ilustra-se o processo.

Figura 35 - Ilustração do sistema de aquecimento localizado.



Fonte: autor da tese.

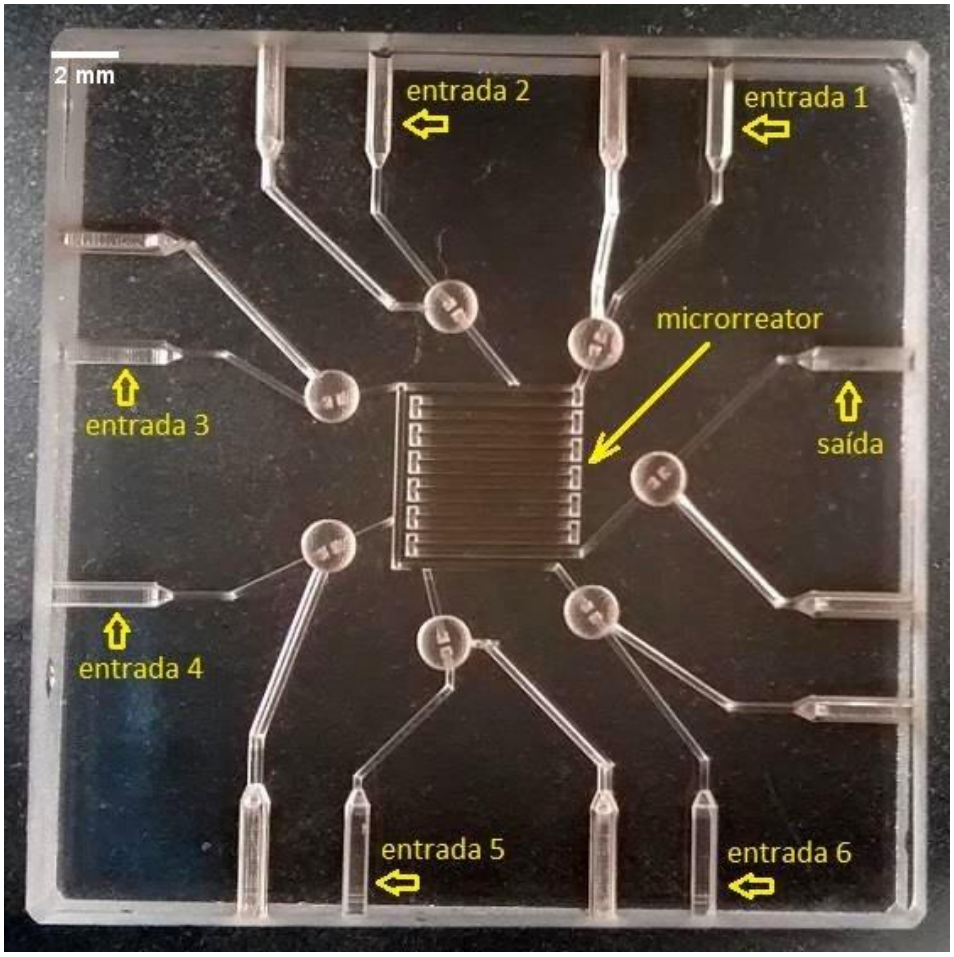
4.5 Sistemas Microfluídicos

A partir dos componentes desenvolvidos dois sistemas microfluídicos foram construídos, para aplicações específicas.

4.5.1 Microcircuito para teste ELISA

O microcircuito da Figura 36 foi criado para efetuar o teste ELISA. Inicialmente para detecção de antígenos presentes no veneno de cascavel e também no veneno de jararaca. Os microcanais têm 200 µm de largura e 100 µm de profundidade.

Figura 36 - Circuito microfluídico para teste ELISA.



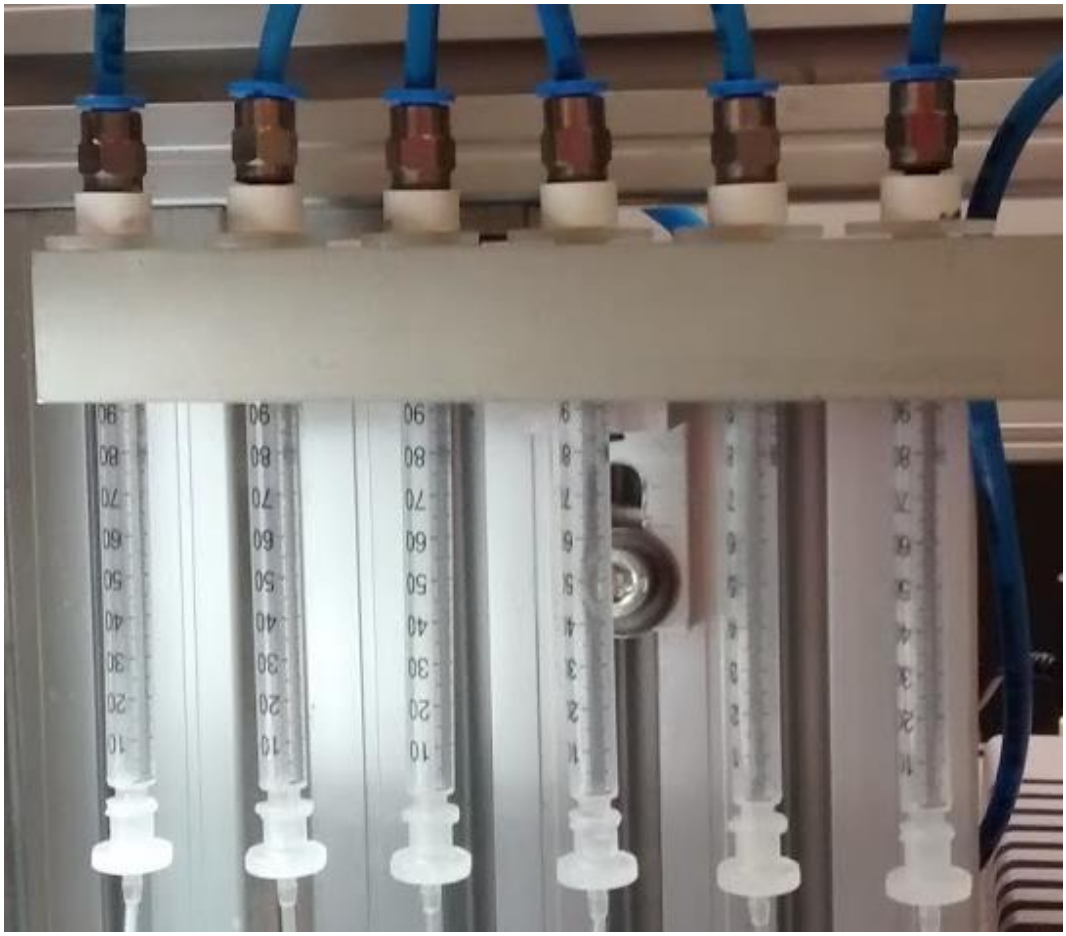
Fonte: autor da tese.

O circuito microfluídico construído na placa de vidro inferior é composto de seis microcanais de entradas, um microrreator e um microcanal de saída conforme indicado na Figura 36. As entradas possuem microválvulas *ON/OFF* que permitem selecionar o reagente, ou reagentes a serem levados ao microrreator. A saída possui uma microválvula *ON/OFF* que permite manter o líquido aprisionado dentro do microrreator.

O circuito de controle construído na placa de vidro superior recebe ou não ar pressurizado em suas entradas através de miniválvulas pneumáticas acionadas por um microcontrolador Arduino permitindo selecionar a abertura ou fechamento das microválvulas contruídas na placa de vidro inferior.

Os líquidos que compõem o teste ELISA são armazenados em seringas e são empurrados por ar pressurizado com pressão regulada através de um regulador com manômetro. A Figura 37 ilustra o sistema de armazenamento dos reagentes.

Figura 37 - Sistema de armazenamento dos reagentes.



Fonte: autor da tese.

A proposta de método para efetuar o teste ELISA em circuitos microfluídicos descrito abaixo foi adaptado do processo tradicional em placa de poços e serviu como ponto de partida para os ensaios em busca de: confiabilidade, redução do volume dos reagentes e redução nos tempos de incubação e reações.

Procedimento:

- Injetar através da entrada 1 o antígeno a ser testado (100 µg/ml diluído em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6). Colocar quantidade suficiente para que o reagente preencha todo o microrreator. Fechar o microrreator e deixar por 12 horas.
- Injetar através da entrada 6 a solução de TBS (solução salina tamponada com tris, pH 8) para remoção do antígeno não adsorvido. Passar quantidade proporcional a quatro vezes o volume do microrreator.

- Injetar através da entrada 2 a solução de bloqueio (leite desnatado 3% diluído em TBS) cuja finalidade é aderir em espaços do canal em que o antígeno não aderiu. Colocar quantidade suficiente para que o reagente preencha todo o microrreator. Fechar o microrreator e deixar por um período de 40 minutos.
- Fazer a lavagem com TBS, injetado através da entrada 6. Passar quantidade proporcional a quatro vezes o volume do microrreator.
- Injetar através da entrada 3 a solução contendo o anticorpo primário (soro antibotrópico do Butantã, diluído 1:5000 em TBS). Fechar o microrreator e deixar por um período de 40 minutos.
- Fazer a lavagem com TBS, injetado através da entrada 6. Passar quantidade proporcional a quatro vezes o volume do microrreator.
- Injetar através da entrada 4 a solução contendo o anticorpo secundário (1:5000, IgG anti-IgG de cavalo marcado com peroxidase). Fechar o microrreator e deixar por um período de 40 minutos.
- Fazer a lavagem com TBS, injetado através da entrada 6. Passar quantidade proporcional a quatro vezes o volume do microrreator.
- Para que ocorra a reação colorimétrica é necessário usar a solução de ortofenildiamina (1mg/ml em TBS contendo 0,15% de H_2O_2), que deve ser preparada na hora e injetada no circuito através da entrada 5. A mudança de cor da reação de transparente para amarelada indica a presença do antígeno. Não havendo mudança de cor é indicação da ausência do antígeno.

4.5.2 Microcircuitos para a síntese de nanocristais

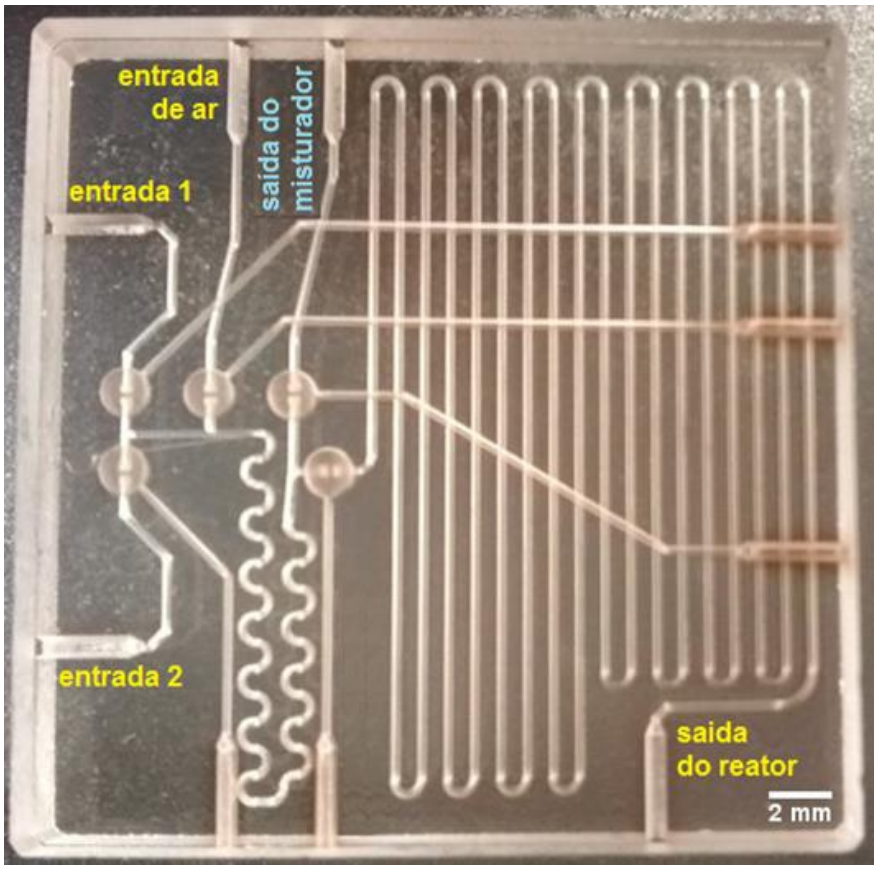
O objetivo dos microcircuitos é sintetizar o composto fluoreto $NaYF_4:Yb^{3+}:Er^{3+}$ na forma de nanocristais que são utilizados como marcadores em imagens de sistemas biológicos [8].

Quatro microcircuitos foram construídos. O primeiro foi utilizado apenas para testes de fluxo e experimentos com água. Os outros três microcircuitos construídos foram usados para a síntese. Todos são aqui descritos.

4.5.2.1 Microcircuito para análise de fluxos

O primeiro microcircuito foi usinado com microcanais de 200 µm de largura e 100 µm de profundidade. Possui três entradas, sendo duas delas para reagentes líquidos e a terceira para injeção de ar pressurizado com a finalidade de separar a mistura em porções. Possui uma sessão para mistura dos reagentes, uma serpentina para produzir um tempo de residência e duas saídas uma do misturador e outra do reator. A entrada do misturador é feita em forma de "T". A Figura 38 mostra o microcircuito que foi utilizado para testes de fluxo.

Figura 38 - Primeiro microcircuito construído para síntese de nanocristais.

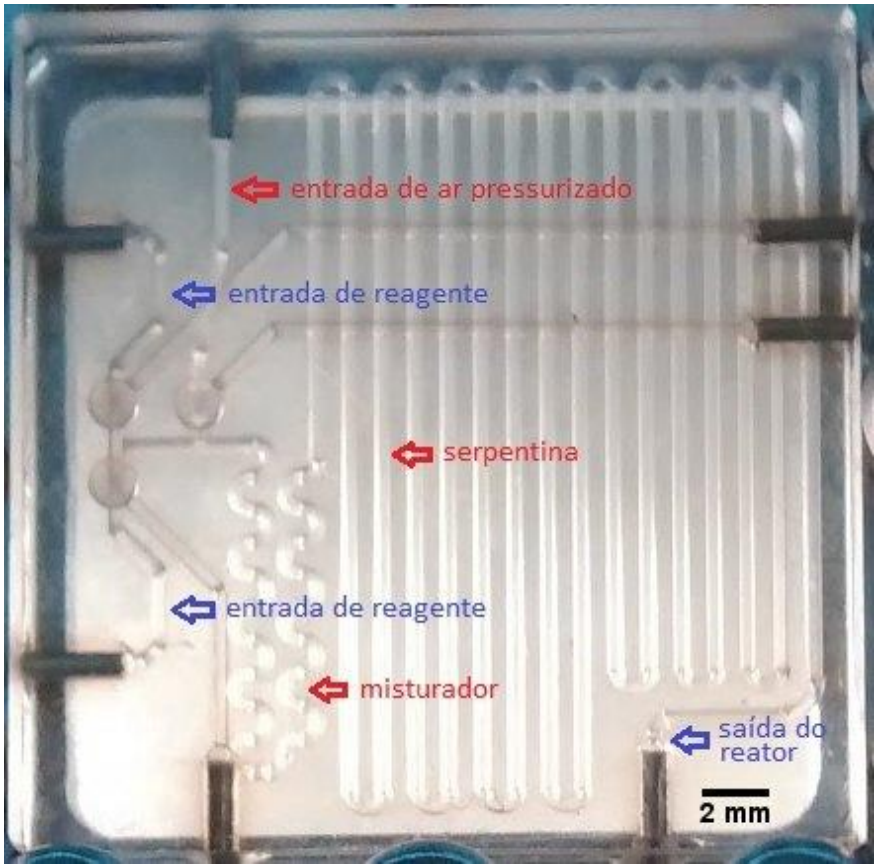


Fonte: autor da tese.

4.5.2.2 Microcircuito CHIP1

O microcircuito denominado “CHIP1” foi usinado com microcanais de 400 µm de largura e 200 µm de profundidade. Possui três entradas, sendo duas delas para reagentes líquidos e a terceira para injeção de ar pressurizado. Possui uma sessão para mistura dos reagentes, uma serpentina para produzir um tempo de residência e uma saída. A entrada do misturador é feita em forma de “T” A Figura 39 mostra o microcircuito do CHIP1.

Figura 39 - Microcircuito para síntese de nanocristais - CHIP1.

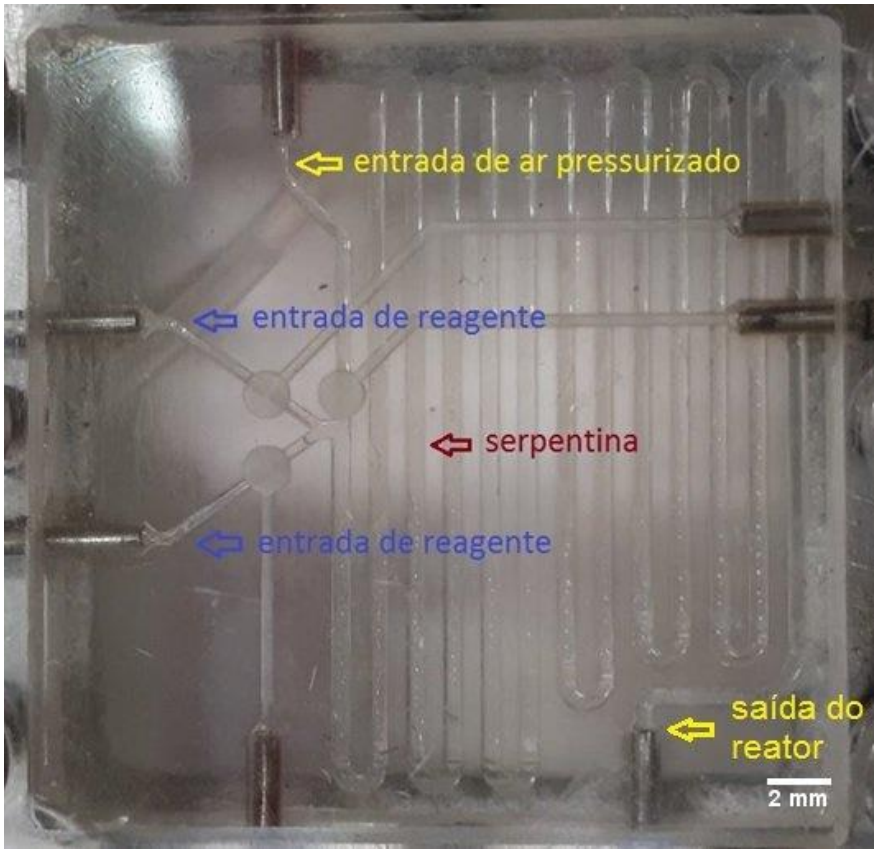


Fonte: autor da tese.

4.5.2.3 Microcircuito CHIP2

O segundo microcircuito construído, denominado de “CHIP2” os microcanais foram alargados de 200 para 600 µm e a profundidade passou de 100 para 300 µm. O misturador foi retirado porque houve formação de particulado já na entrada do mesmo e também a entrada foi modificada para a forma em “Y” em substituição a forma em “T” do CHIP1. A Figura 40 mostra o microcircuito do CHIP2.

Figura 40 - Microcircuito para síntese de nanocristais - CHIP2.

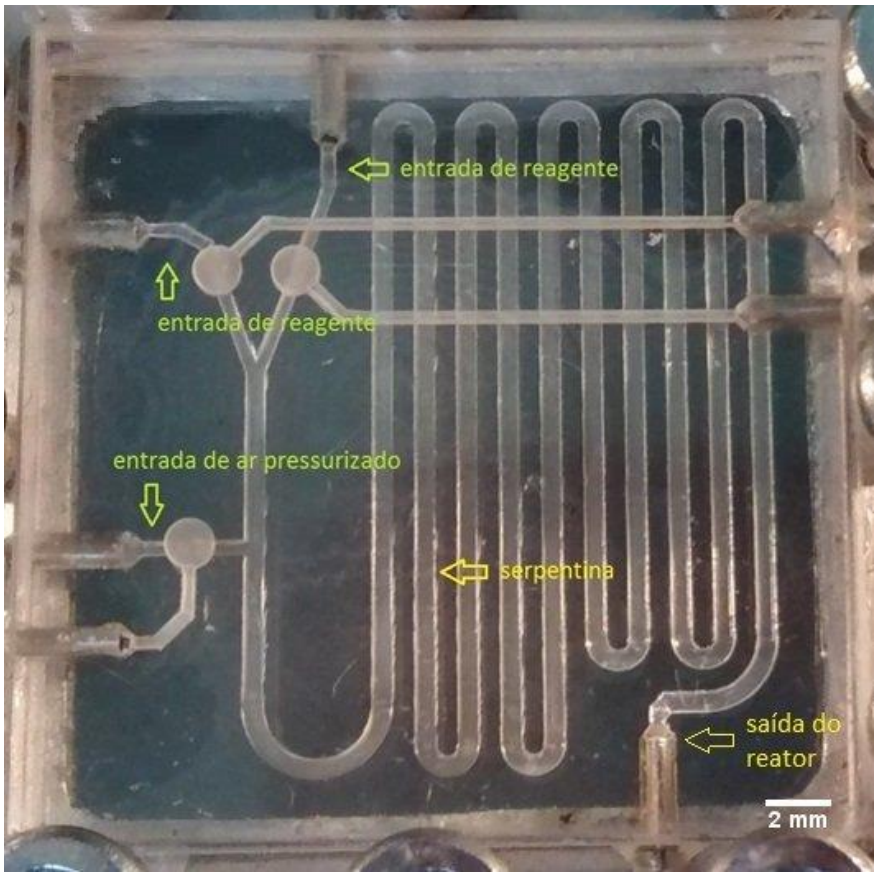


Fonte: autor da tese.

4.5.2.4 Microcircuito CHIP3

O terceiro microcircuito construído, denominado de “CHIP3”, onde a largura de 600 µm e a profundidade de 300 µm dos microcanais foram mantidas, porém o volume da serpentina foi reduzido, pois os microcanais foram reduzidos em comprimento. Esta modificação resultou em melhor vedação e consequentemente na ausência dos vazamentos detectados no CHIP2. A entrada dos reagentes foi mantida em forma de “Y” porém a entrada de ar pressurizado foi colocada num ponto onde a mistura já tenha percorrido um certo percurso dentro do microcanal. A Figura 41 mostra o microcircuito do CHIP3.

Figura 41 - Microcircuito para síntese de nanocristais - CHIP3.



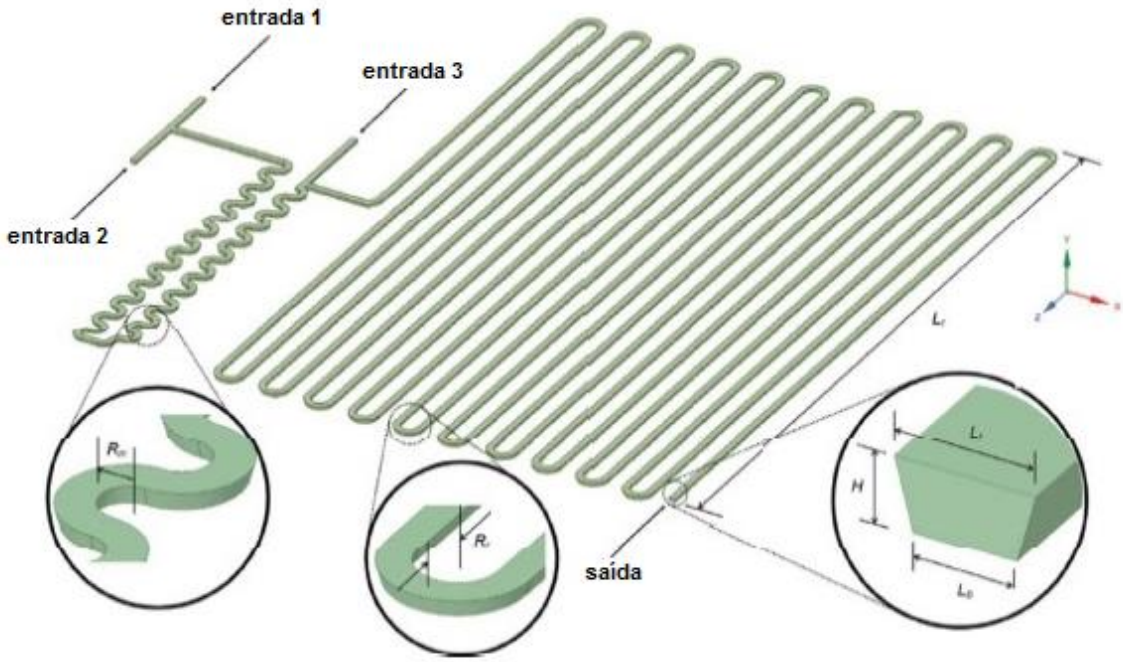
Fonte: autor da tese.

4.6 Simulador de fluxo - Microcircuito para síntese de nanocristais

Uma parceria foi feita com o Laboratório de Simulação e Controle de Processos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo e o microcircuito inicialmente desenvolvido para a síntese de nanocristais foi utilizado para simulações e caracterização utilizando a **Dinâmica de Fluidos Computacional** (**CFD**), que utiliza análise numérica e estruturas de dados para analisar fluxos de fluidos. O *software* utilizado foi o “Fluent” que efetua a discretização das equações de Navier-Stokes.

Na simulação as microválvulas do microcircuito original foram retiradas para facilitar a utilização do *software* e pela dificuldade de simular o comportamento das mesmas. A ideia é efetuar comparações entre os fluxos obtidos por simulação e os obtidos por medidas reais e fazermos um estudo futuro do efeito das microválvulas construídas nos microcircuitos sobre os fluxos dos reagentes. Para adaptar às necessidades de construção dos microcanais no *software* de simulação, o microcircuito foi redesenhado em forma de um tubo vazado com o mesma forma e mesmo volume interno do microcircuito real e a Figura 42 mostra o formato do microcircuito utilizado para simulação.

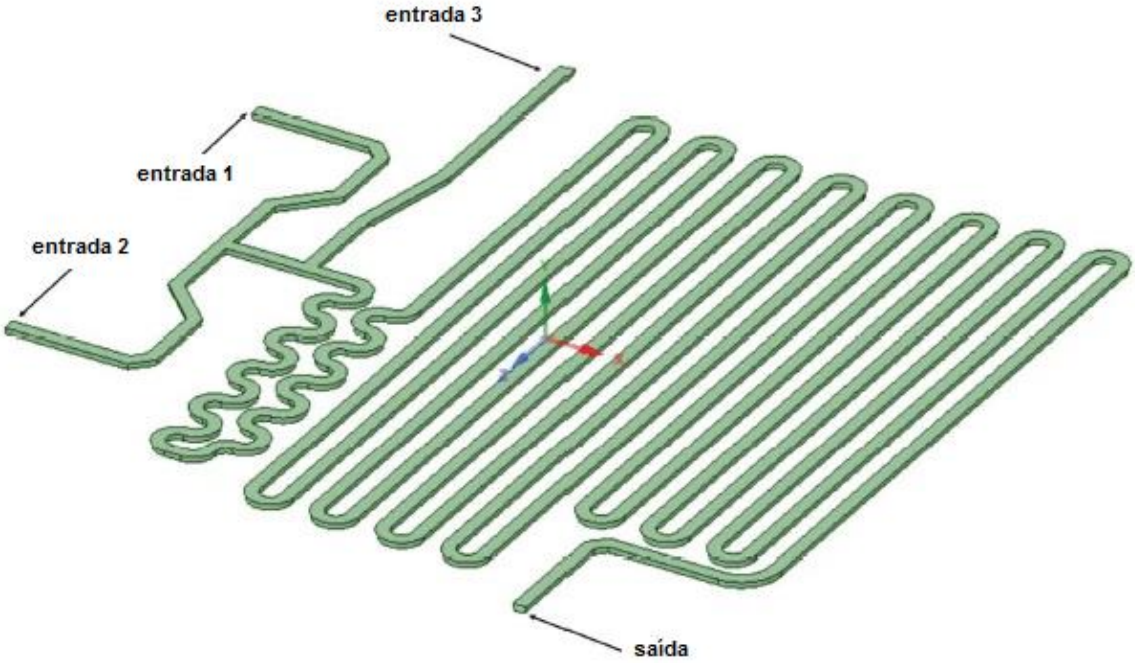
Figura 42 - Vista isométrica do primeiro microcircuito adaptado para simulação da síntese de nanocristais



Fonte: Adaptado de PERES, J. C. G. et al, 2018.

Devido a alguns problemas de fluxo encontrados nos primeiros testes com o primeiro microcircuito e com alguns resultados da simulação, tornou-se necessário alargar e aprofundar os microcanais para permitir um fluxo maior dos reagentes. Um segundo microcircuito com microcanais de 400 µm de largura e 200 µm de profundidade foi construído e também simulado por CFD e esse microcircuito foi denominado “CHIP1” . A Figura 43 mostra o novo formato do microcircuito.

Figura 43 - Vista isométrica do microcircuito CHIP1 adaptado para simulação da síntese de nanocristais



Fonte: Adaptado de PERES, J. C. G. et al, 2018.

Os resultados das simulações podem ser vistos em PERES *et al.* [80].

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Usinagem a laser em vidro BK7 com pulsos ultracurtos

Experimentos foram feitos para se obter os melhores parâmetros de usinagem para ambas as estações, já que a segunda estação só foi adquirida quando grande parte da pesquisa já havia sido feita. A utilização da nova estação se justifica devido à grande diferença tecnológica entre as mesmas e os benefícios advindos dessa tecnologia.

5.1.1 Usinagem na Estação 1

Com o equipamento descrito na Figura 12 realizou-se uma série de experimentos de usinagem a laser para criar uma carta de processo que permita a confecção adequada de circuitos microfluídicos em vidro BK7.

O feixe laser utilizado apresenta uma deformação (forma elíptica) representada por dois parâmetros M^2 diferentes para as direções x e y, que são: $M_x^2 = 2{,}6$ e $M_y^2 = 1{,}4$.

Para uma lente com comprimento focal f = 38 mm, e um diâmetro de feixe na entrada da lente entre 7 e 8 mm, o diâmetro teórico do feixe laser no ponto focal se torna (Eq. 3.44):

$$d_{min_x} = 12{,}5\ \mu m \quad \text{e} \quad d_{min_y} = 6{,}7\ \mu m$$

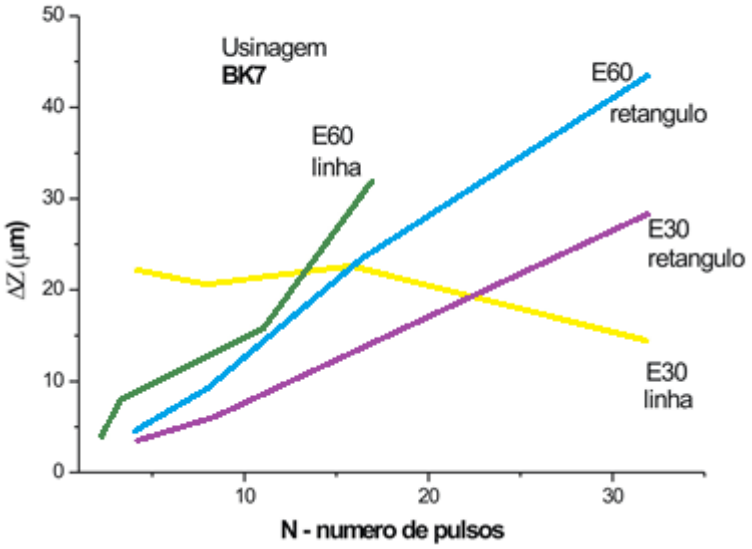
A área desta elipse é portanto: 65,7 μm^2.

Para uma energia por pulso típica de 60 μJ tem-se uma fluência de 0,9 x 10^2 J/cm^2, o que é cerca de 100 vezes maior que o limiar de ablação para o vidro. Isto, em princípio deve ser suficiente para a retirada de uma grande quantidade de material por pulso.

Para o caso de uma usinagem real, é necessário a sobreposição de diversos pulsos seguindo um caminho predeterminado. Aqui fica a questão da fração de sobreposição de pulsos que leve a uma otimização na remoção de material. A relação diâmetro do feixe, taxa de repetição e velocidade de deslocamento, determina o número de pulsos sobrepostos (Eq. 3.36).

Assim, o primeiro passo para a otimização da usinagem foi a determinação da quantidade de material retirado por pulso em função da energia por pulso e do número de pulsos sobrepostos. Isto foi feito para duas condições: a primeira para um único traço (linha) e a segunda através da varredura de uma área com traços paralelos (retângulo), com deslocamento lateral de 75% não do diâmetro estimado do pulso, mas da cratera média provocada por um pulso com energia de 60 µJ (D_c ~ 10,6 µm), sendo em ambas as condições utilizados os demais parâmetros fixos. O aumento do número de pulsos e o consequente aumento da profundidade foi obtido por varreduras subsequentes e sobrepostas. Isto foi feito com correção da posição focal. No gráfico da Figura 44 mostram-se os dados obtidos, onde Δz é a profundidade alcançada.

Figura 44 - Profundidade alcançada x Número de pulsos para diferentes Energias e diferentes velocidades de varredura.



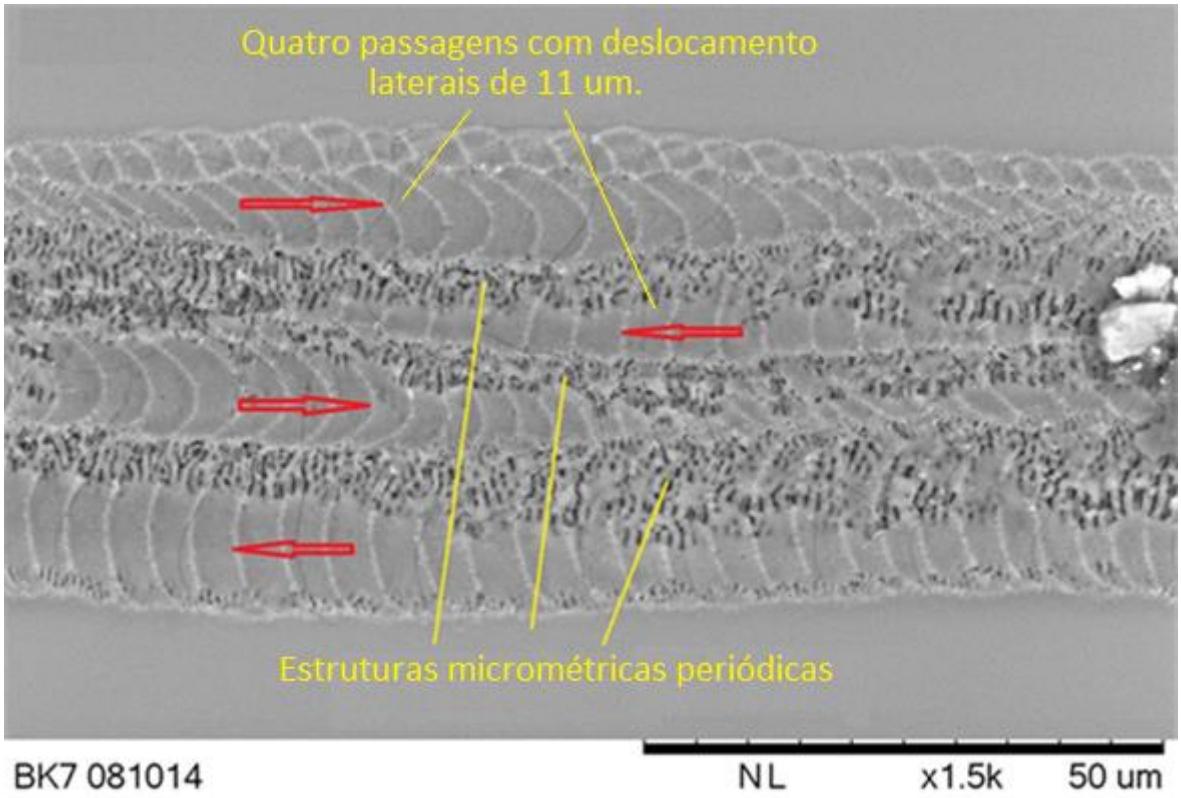
Fonte: autor da tese.

Do gráfico acima, e como esperado, tem-se que a energia maior retira mais material, e o mesmo acontece com o aumento do número de pulsos sobrepostos. Assim, em princípio, as usinagens devem utilizar a maior energia e a maior taxa de repetição disponível pelo sistema. Contudo, verifica-se que estas condições, onde a retirada de material é mais eficiente, provoca danos severos tanto na superfície usinada quanto abaixo dela. Além disto, uma alta sobreposição de pulsos N significa uma baixa velocidade de processo, o que também não é interessante. Assim, e por estes motivos, chegou-se à conclusão que uma boa

relação entre velocidade de processo e eficiência na remoção de material corresponde a um valor de N = 4.

Com estas condições, foi feito então uma análise da estrutura da superfície usinada, onde microscopia eletrônica e perfilometria óptica foram realizadas para análise da topografia. Uma imagem típica obtida com Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é mostrada na Figura 45.

Figura 45 - MEV da usinagem em vidro BK7 com uma passagem.



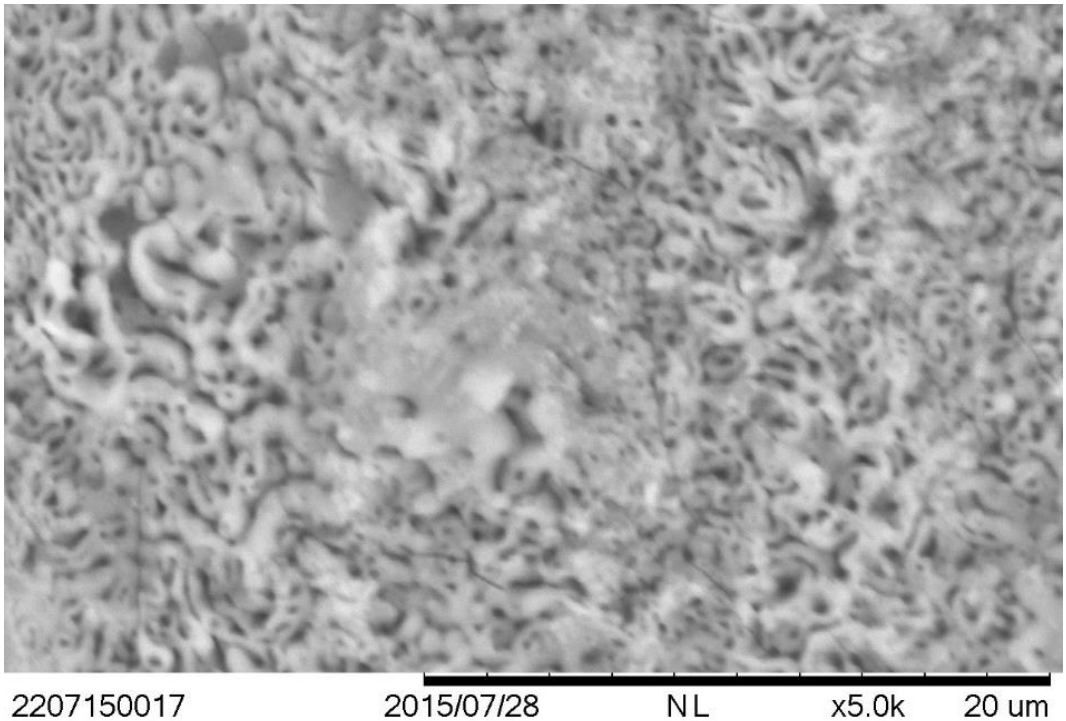
Fonte: autor da tese.

É possível ver uma série de defeitos produzidos na superfície usinada, como microfraturas, microtrincas e produção de microestrutura alinhada com relação à polarização.

A diminuição destes defeitos foi possível através da diminuição da fluência. Isto foi feito de duas maneiras simultâneas: com o aumento da largura temporal para 150 fs e com o aumento da área do ponto focal do feixe laser com o uso de uma lente de comprimento focal maior f = 50 mm.

As estruturas menores com alinhamento vertical verificadas na Figura 45 também deveriam ser mais uniformizadas, e para isto, a polarização linear foi alterada para circular. O resultado obtido é mostrado na Figura 46.

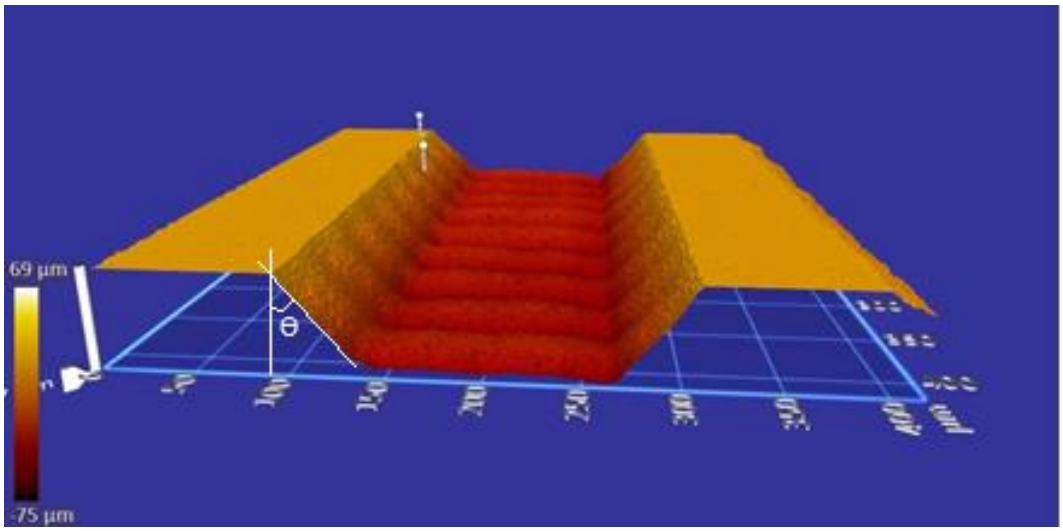
Figura 46 - MEV do microcanal usinado com polarização circular.



Fonte: autor da tese.

Com estes parâmetros “otimizados”, foram feitos inúmeros ensaios para produzir canais microfluídicos. Devido às características da usinagem as seções dos canais resultantes são trapezoidais. Era preciso definir a geometria do canal, como largura, profundidade, inclinação e acabamento da borda. Depois de muitos ensaios obteve-se uma inclinação máxima de Θ = 75°. Na Figura 47 mostra-se uma imagem de perfilometria ótica de um dos canais usinados.

Figura 47 - Perfilometria ótica de um canal usinado com parâmetros otimizados - Estação 1.



Fonte: autor da tese.

As Melhores condições para usinagem dos microcanais em BK7 foram então determinadas como sendo:

- Comprimento focal da lente: 50 mm (Doubleto);
- Energia: 60 µJ;
- Polarização: circular;
- Largura temporal: 150 fs;
- Velocidade: 10,5 mm/s;
- Taxa de repetição: 4 KHz;
- Diâmetro da ferramenta: 14 µm com sobreposição de 25%.

Nestas condições temos:

- Δz ~ 23 µm por passagem
- θ ~ 70 a 75°

5.1.2 Usinagem na Estação 2

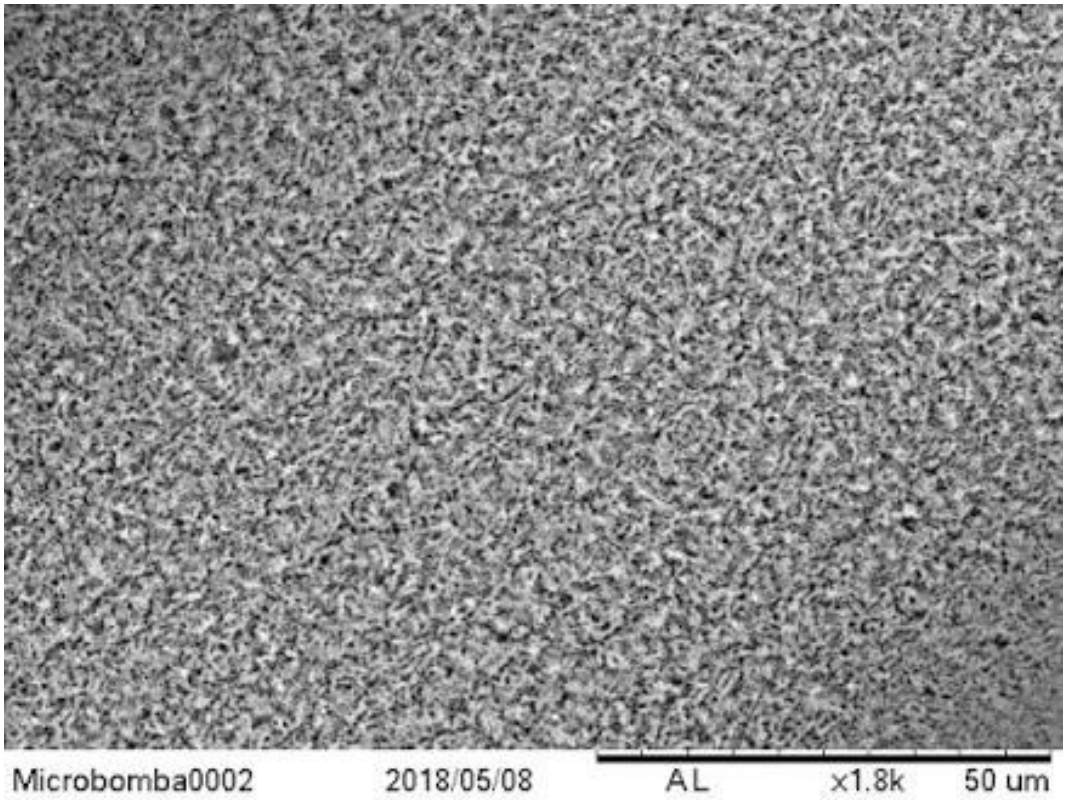
Para otimizar a usinagem na Estação 2 foi medido o diâmetro do feixe que chega à lente de focalização que foi de $D_L = 8{,}6\ mm$ e para esse sistema o fator de qualidade fornecido pelo fabricante é de $M^2 = 1{,}3$.

Para conhecer o diâmetro mínimo do feixe após passar pela lente escolhida para as usinagens em vidro BK7 que foi a de comprimento focal de 20 mm, utiliza-se a equação (3.44) que permite calcular o diâmetro do dano produzido no material no ponto focal. O valor obtido é:

$$d_{min} \cong 3{,}1\ \mu m$$

Estudos também foram feitos e os parâmetros otimizados para se obter uma menor rugosidade no fundo do microcanal e uma melhora na inclinação das paredes em relação às obtidas com a Estação 1. A Figura 48 ilustra uma imagem obtida no MEV do fundo de um microcanal usinado com parâmetros otimizados.

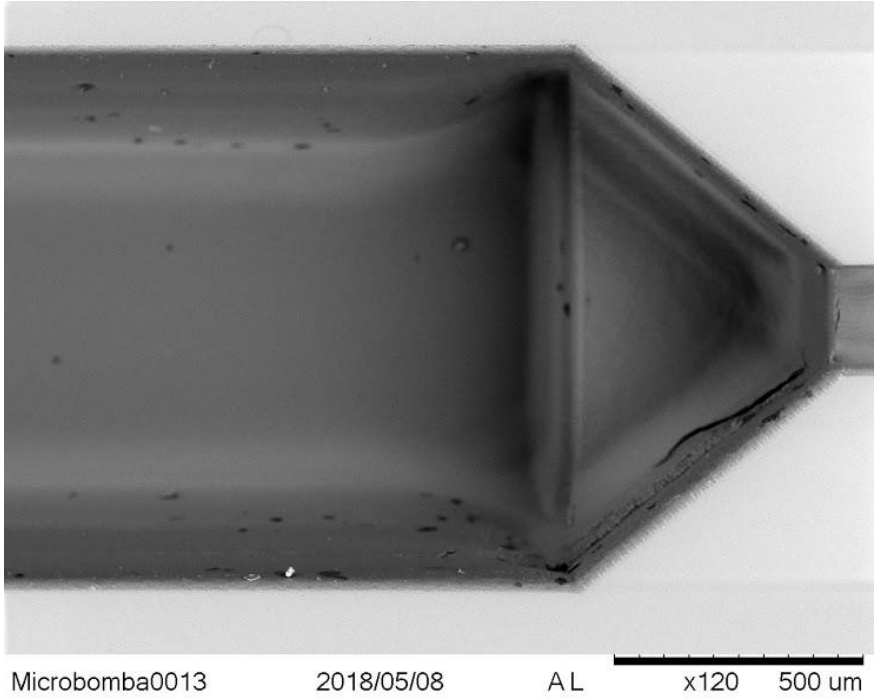
Figura 48 - MEV do fundo do microcanal com polarização linear.



Fonte: autor da tese.

A Figura 49 mostra detalhes da região onde são colados os terminais.

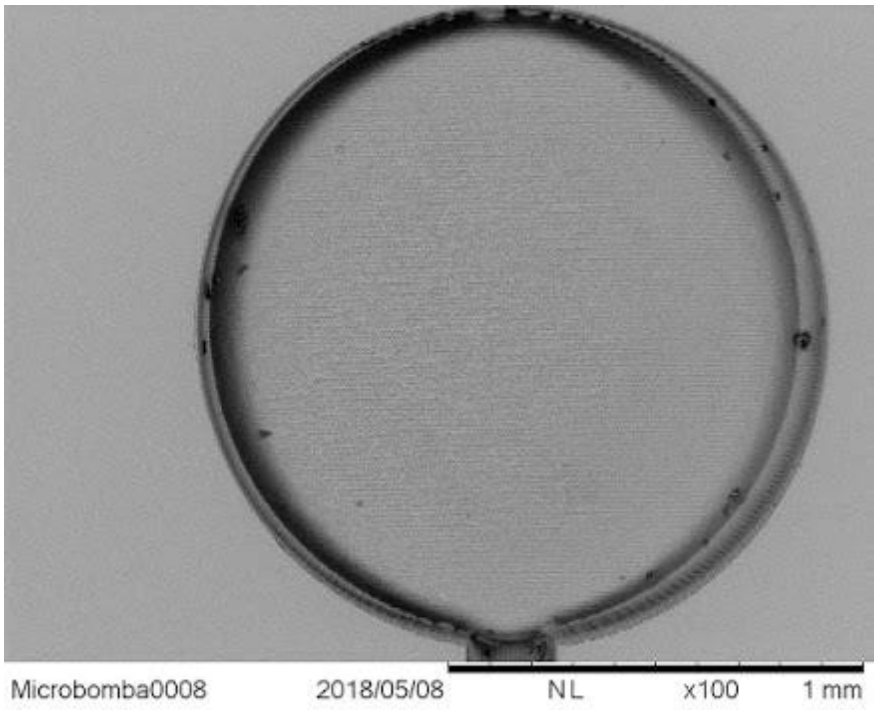
Figura 49 - MEV do microcanal usinado para alojar o terminal.



Fonte: autor da tese.

A Figura 50 mostra detalhes da região usinada no vidro de controle.

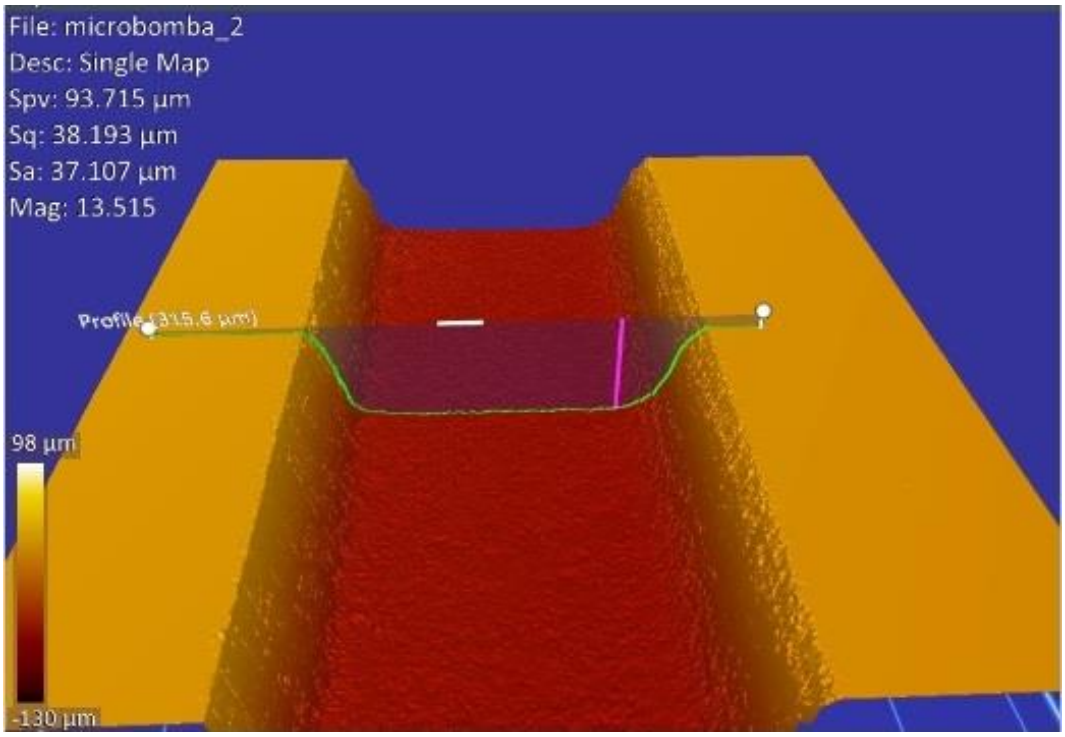
Figura 50 - MEV com detalhes da região circular usinada no vidro de controle.



Fonte: autor da tese.

A Figura 51 ilustra a perfilometria obtida com parâmetros otimizados.

Figura 51 - Perfilometria ótica de um canal usinado com parâmetros otimizados - Estação 2.



Fonte: autor da tese.

Os melhores resultados foram obtidos com os parâmetros abaixo:

- Comprimento focal da lente: 20 mm;
- Energia: 35 µJ;
- Polarização: linear;
- Largura temporal: 30 fs;
- Velocidade: 40 mm/s;
- Taxa de repetição: 10 KHz;
- Diâmetro da ferramenta: 6 µm com sobreposição de 25%.

Nestas condições temos:

- Δz ~ 10µm por passagem;
- θ > 85°

5.2 Componentes microfluídicos

Os componentes microfluídicos desenvolvidos foram ao longo das experiências sendo alterados ou aprimorados e os resultados são aqui apresentados

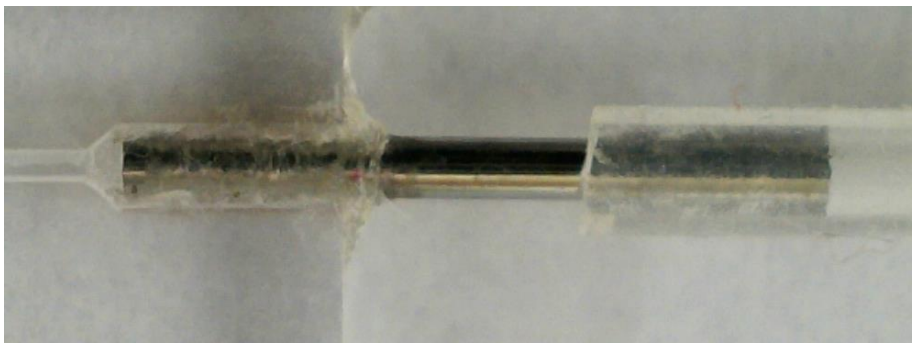
5.2.1 Conectores

Na construção do sistema microfluídico para produção de nanocristais, tornou-se necessário o alargamento dos microcanais de 200 µm para 400 µm devido à alta viscosidade dos reagentes envolvidos. Com esta alteração o tubo de aço mais fino usado nos conectores com diâmetro interno próximo de 200 µm foi eliminado e a geometria da usinagem foi alterada para receber um tubo com diâmetro externo de 800 µm e interno de 460 µm.

Adotou-se então utilizar apenas um único tubo como conector para todos os sistemas microfluídicos onde as pressões utilizadas para movimentar os reagentes sejam de até 10 psi, pois nestes casos o encaixe do conector na mangueira suporta bem a pressão sem que haja a ocorrência de vazamentos, uma vez que as mangueiras são apenas encaixadas e não coladas aos conectores. Para sistemas onde as pressões para movimentar os reagentes sejam superiores à 10 psi utiliza-se um segundo tubo de aço com diâmetro

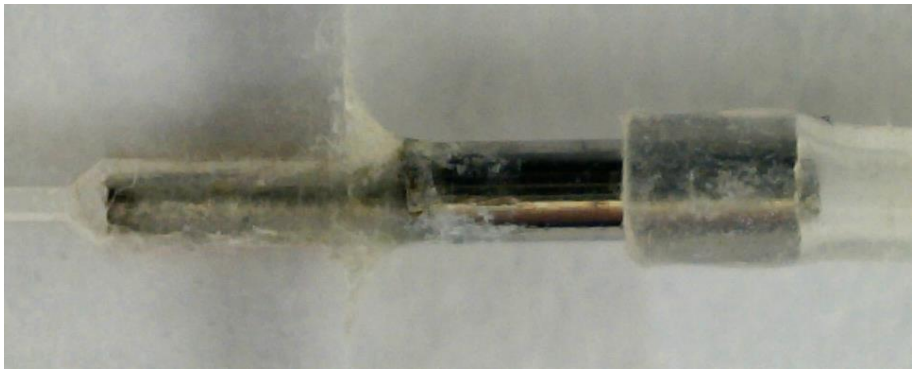
externo de 1,27 mm colado sobre o primeiro obrigando a mangueira a exercer uma pressão muito maior sobre o conector. Desta forma o sistema suporta pressões mais altas dos reagentes sem que ocorram vazamentos. Na Figura 52 e Figura 53 ilustram-se os dois tipos utilizados.

Figura 52 - Conector para sistemas microfluídicos com pressões de no máximo 10 psi.



Fonte: autor da tese.

Figura 53 - Conector para sistemas microfluídicos com pressões acima de 10 psi.



Fonte: autor da tese.

5.2.2 Microválvula

A microválvula ON/OFF ilustrada na Figura 24 é utilizada em todos os sistemas microfluídicos construídos e o controle de fluxo dos reagentes é feito através da abertura ou fechamento das miniválvulas pneumáticas acopladas externamente ao microcircuito. Tanto para fluxo contínuo como para fluxos pulsados o sistema mostra-se capaz de controlar fluxos da ordem de dezenas de nanolitros por minuto a centenas de microlitros por minuto.

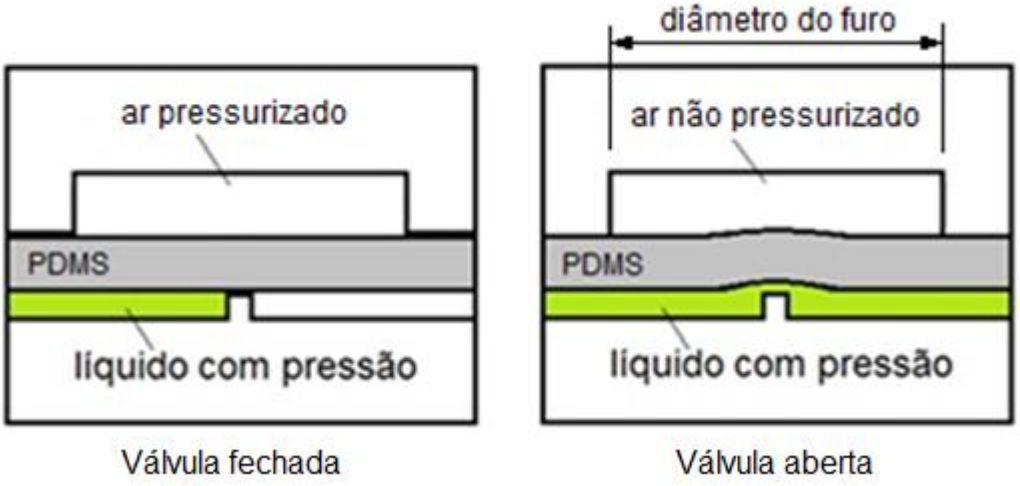
Para controle destas microválvulas através do microcontrolador Arduino é utilizada a programação em *Labview* que se mostra bastante prática e

flexível permitindo alterações de fluxo em tempo real. Os painéis de controle das microválvulas são ilustrados na aplicação para microbomba e nos sistemas microfluídicos desenvolvidos neste trabalho.

5.2.2.1 Dispositivo para determinar a relação pressão x flexão do PDMS

Antes de se usinar o microcircuito com a microválvula proposta na Figura 54, construiu-se um dispositivo para verificar a flexão do PDMS em função da pressão exercida pelo reagente, pressão essa fornecida externamente por miniválvula pneumática acoplada à entrada do microcanal que contém o reagente.

Figura 54 - Esquema da microválvula onde o diâmetro do furo no vidro superior define o quanto o PDMS flexiona em função da pressão exercida pelo líquido contido no microcanal do vidro inferior.



Fonte: autor da tese.

A Figura 55 mostra as peças que compõem o dispositivo onde foram feitos furos com diâmetros de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mm para verificar a flexão do PDMS através desses furos. A Figura 56 mostra duas vistas da peça montada onde a da esquerda mostra o conector de entrada da pressão e a da direita o lado da peça por onde o PDMS sofrerá uma flexão quando da entrada de pressão.

Figura 55 - Componentes do dispositivo para medida de flexão do PDMS.

Fonte: autor da tese.

Figura 56 - Vista inferior e superior do dispositivo para medida da flexão do PDMS.

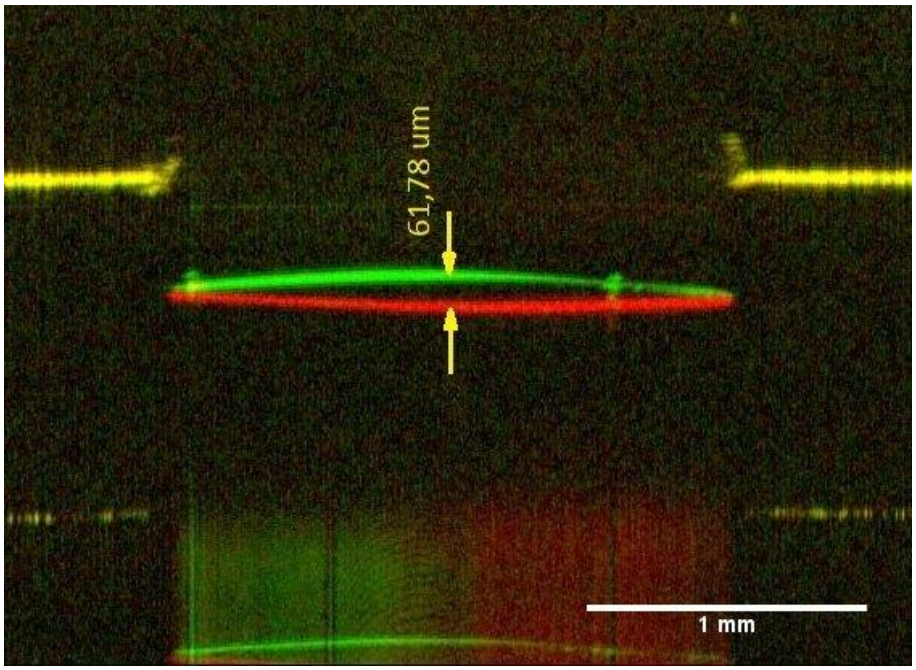
Fonte: autor da tese.

Para medidas da flexão do PDMS foram utilizadas imagens obtidas por OCT (Tomografia por Coerência Óptica) da marca Thorlabs e modelo 930 SR que utiliza reflexão da luz para traçar imagens.

Utilizando o dispositivo injeta-se ar pressurizado controlado por um regulador de pressão. Foram feitas medidas da flexão do PDMS para todos os diâmetros de 1 a 6mm com pressões de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 psi.

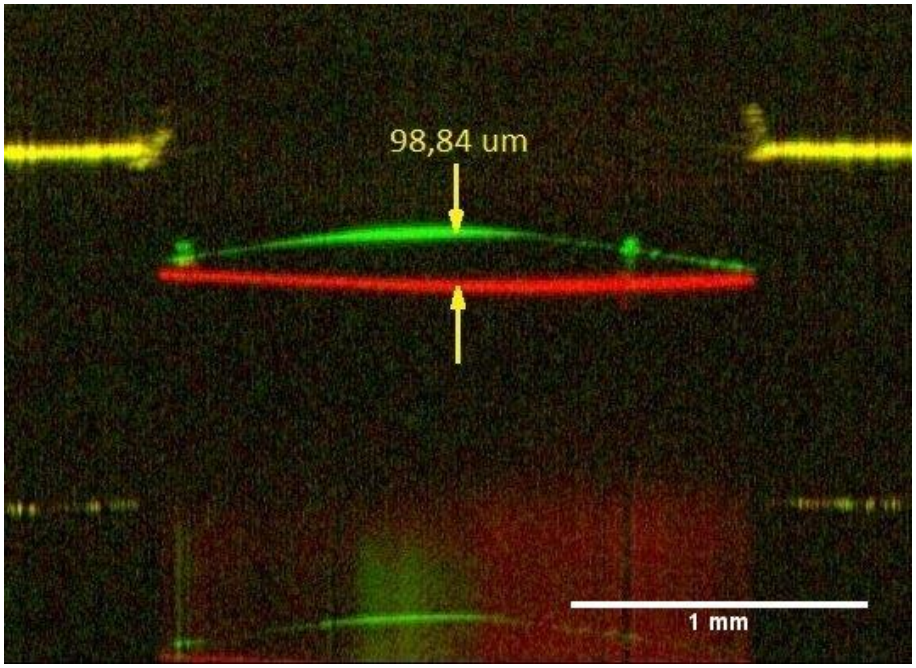
As Figuras 57 à 62 mostram imagens obtidas para o diâmetro de 2mm que já possibilita uma boa flexão para as necessidades de funcionamento da microbomba. Adotou-se usinar canais circulares com diâmetro de 1,5 mm e profundidade de 200 µm nos microcircuitos para controle das microválvulas e a espessura de 300 µm para o PDMS.

Figura 57 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 2 psi.



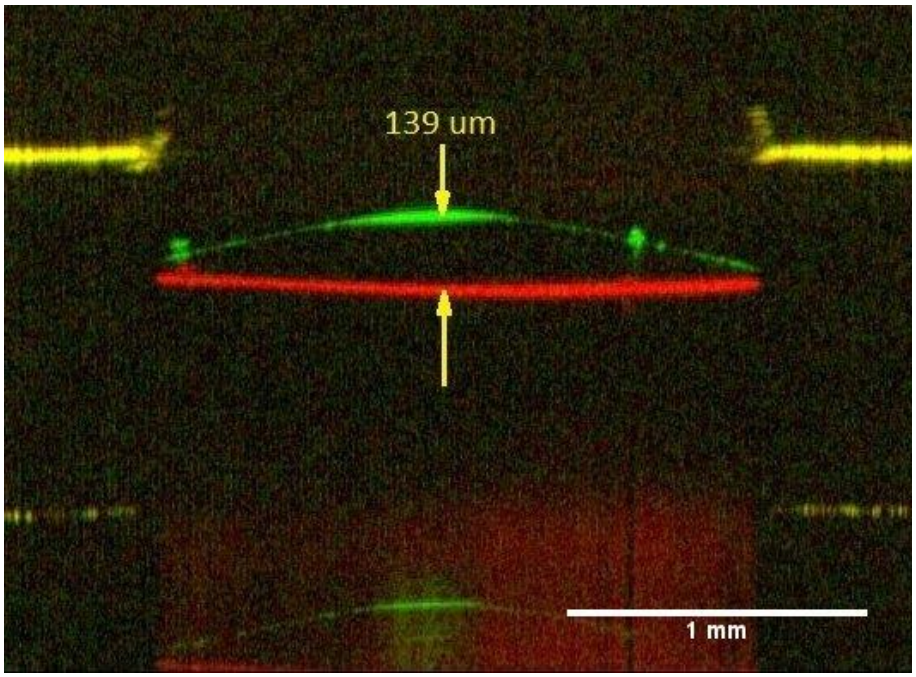
Fonte: autor da tese.

Figura 58 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 4 psi.



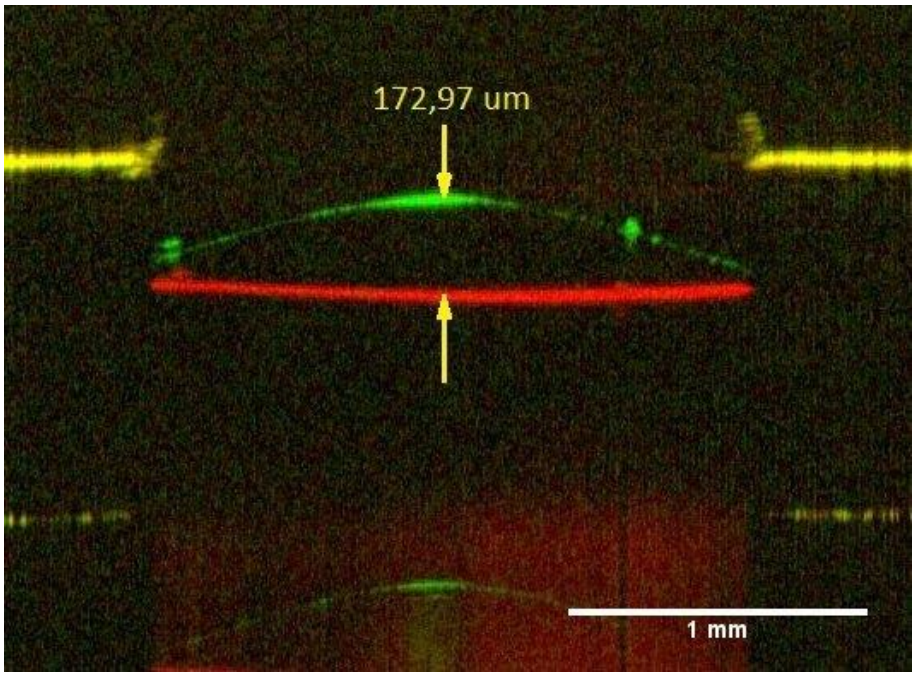
Fonte: autor da tese.

Figura 59 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 6 psi.



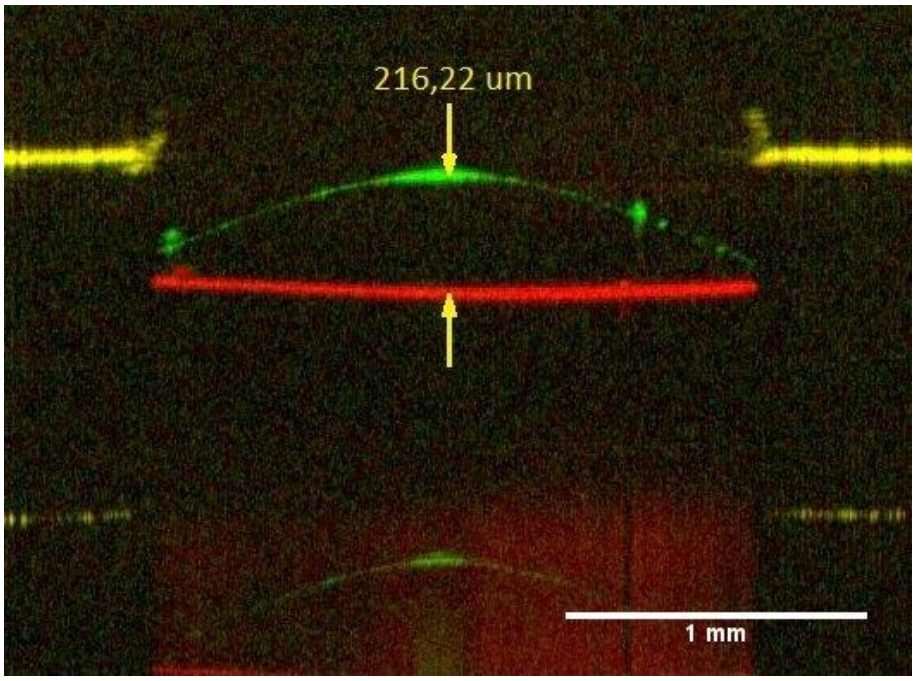
Fonte: autor da tese.

Figura 60 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 8 psi.



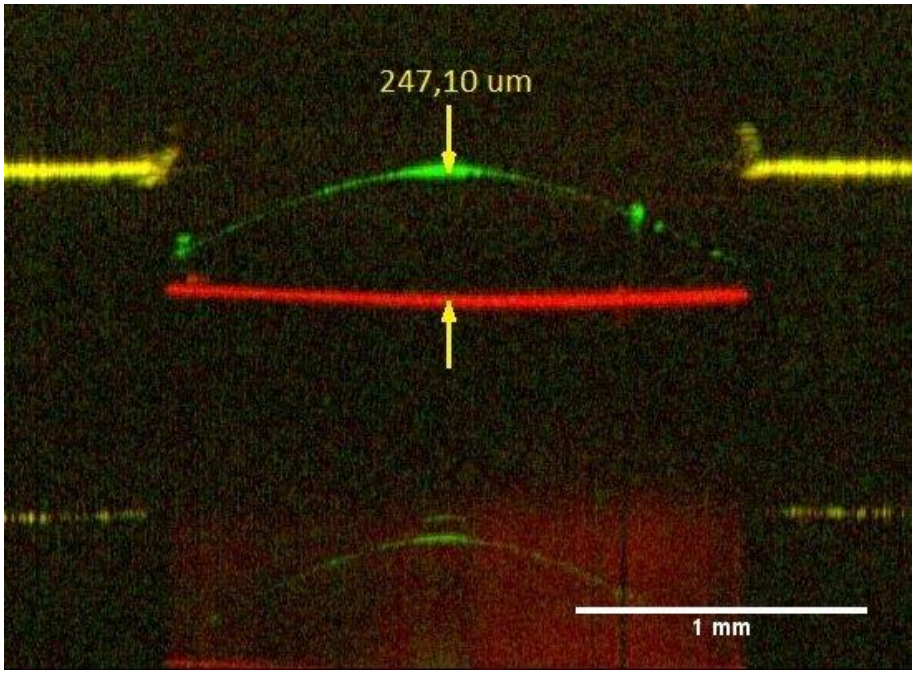
Fonte: autor da tese.

Figura 61 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 10 psi.



Fonte: autor da tese.

Figura 62 - Flexão do PDMS para furo de 2mm com pressão de 12 psi.



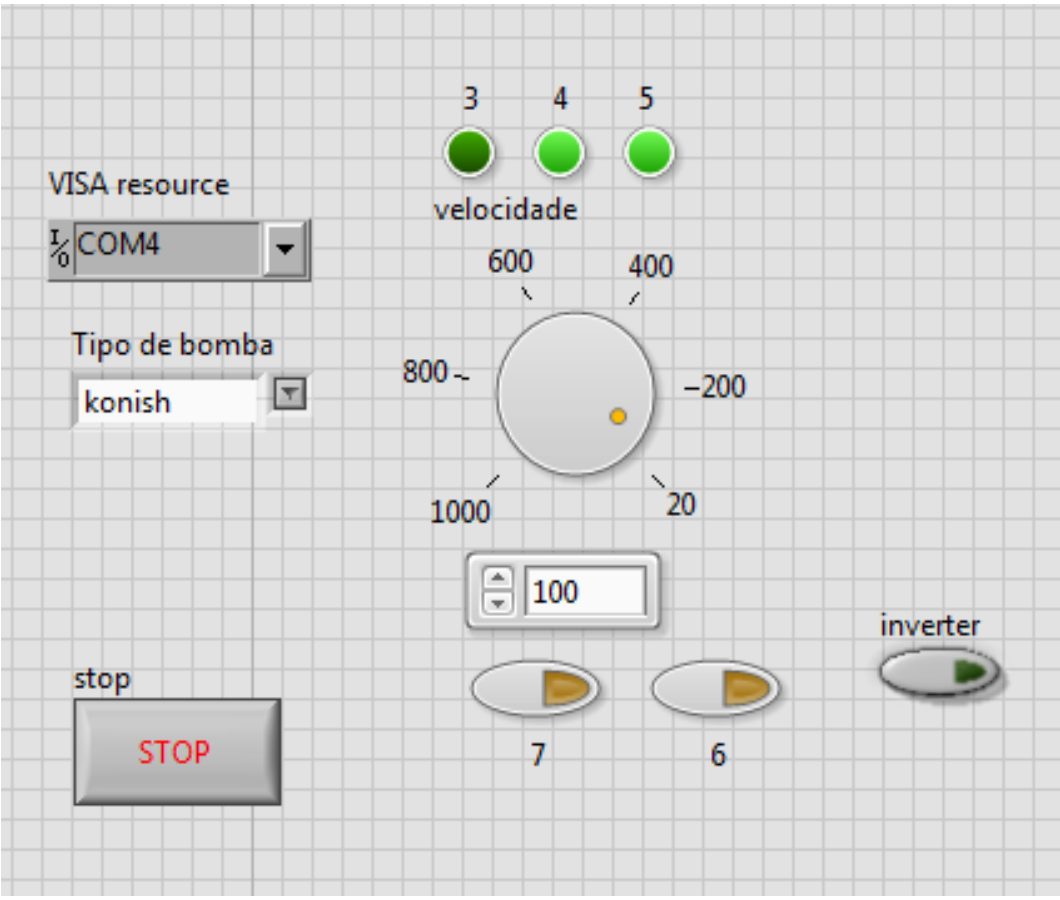
Fonte: autor da tese.

5.2.3 Microbomba

A partir dos tipos de chaveamentos usados para funcionamento da microbomba, mostrados nas Figuras 29 a 31, vários ensaios foram feitos para definir qual tipo apresentaria um melhor desempenho.

A Figura 63 ilustra o painel frontal de controle em *Labview* para manipulação da microbomba. É possível selecionar o tipo de chaveamento a ser utilizado (Konish, Hsu ou Smits), o tempo de chaveamento em milissegundos e é possível inverter o sentido do fluxo, caso necessário. Lembrando que Konish corresponde a três passos, Hsu quatro passos e Smits cinco passos.

Figura 63 - Painel frontal do controle de microbomba - Plataforma Labview.



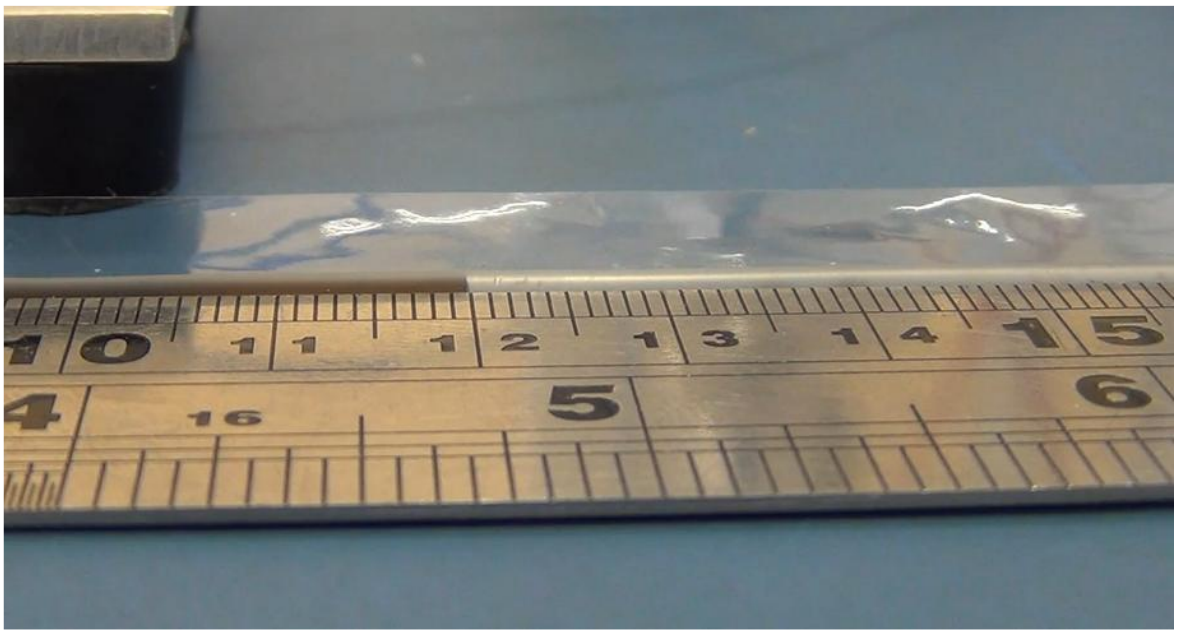
Fonte: autor da tese.

Para efetuar medidas de vazões pela atuação da microbomba, utilizou-se uma escala milimétrica disposta ao lado da mangueira acoplada à saída do circuito microfluídico. Conhecendo o diâmetro interno dessa mangueira é possível obter uma relação entre o percurso do líquido, medido através da escala

milimétrica, e o volume deslocado dentro de em um período de tempo cronometrado obtendo-se a vazão do sistema.

A Figura 64 mostra uma imagem do dispositivo criado para medir o deslocamento do líquido dentro da mangueira.

Figura 64 - Escala milimétrica para leitura do deslocamento do líquido na mangueira.



Fonte: autor da tese.

A Tabela 1 mostra os dados das vazões obtidos para os três tipos de chaveamento citados anteriormente para um período de chaveamento de 300 ms entre cada microválvula.

Tabela 1 - Medidas das vazões geradas pela microbomba.

	Valores medidos						Valor médio	Desvio padrão
Três passos (µl/min)	4,14	6,17	4,24	4,85	6,54	5,92	5,31	1,03
Quatro passos (µl/min)	9,08	9,16	8,31	6,54	8,10	8,68	8,31	0,96
Cinco passos (µl/min)	7,10	6,58	9,71	6,14	6,63	7,24	7,24	1,28

Fonte: autor da tese.

Pelas medidas efetuadas é possível notar que o chaveamento com quatro passos gera uma maior vazão e menor desvio padrão.

5.2.4 Controle de temperatura

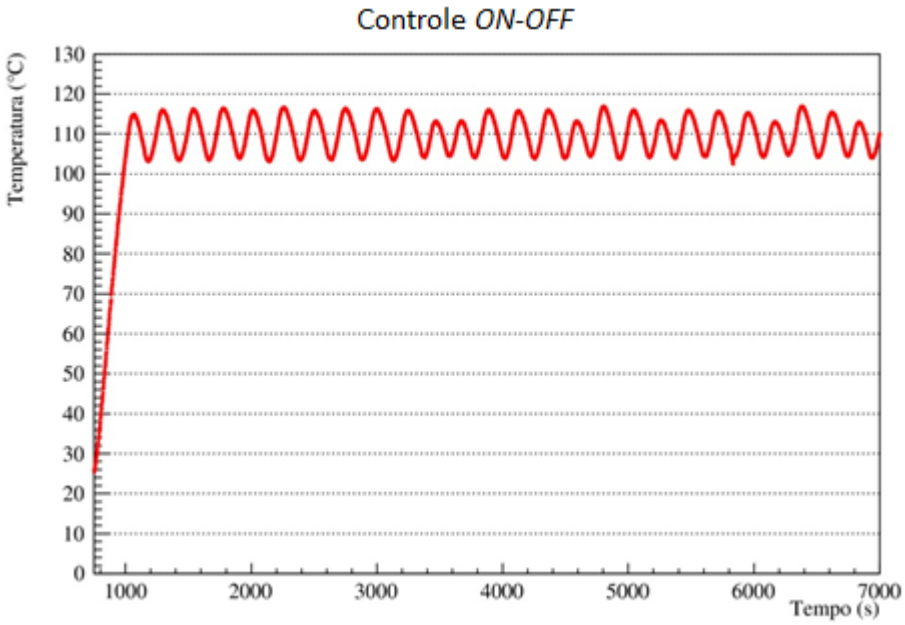
Para o aquecimento de circuitos microfluídicos dois sistemas foram utilizados. O sistema de aquecimento global onde todo o circuito microfluídico é aquecido e o sistema de aquecimento localizado onde apenas parte do circuito é aquecido.

5.2.4.1 Sistema de aquecimento global

Alguns circuitos microfluídicos necessitam reações com temperaturas onde o tempo de resposta para se chegar à temperatura desejada não é tão crítica. Nestes casos foram utilizados um sistema para controle de temperatura global utilizando os componentes descritos na Figura 34, permitindo manter todo o circuito microfluídico à uma temperatura constante.

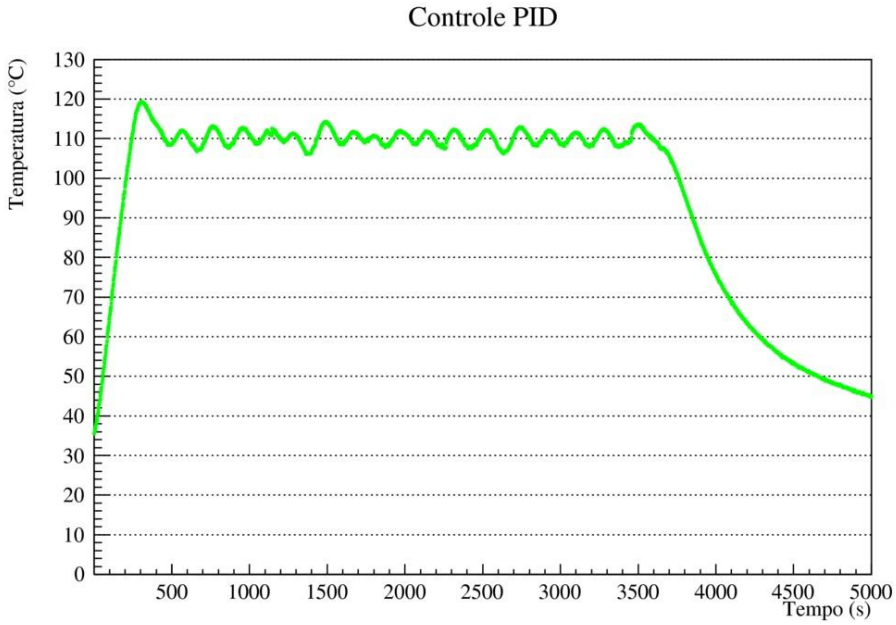
Resultados de um controle liga-desliga (*ON-OFF*) e um controle Proporcional, Integral e Derivativo (PID) para uma temperatura de 110 ºC são mostrados na Figura 65 e Figura 66. Um gráfico comparativo entre os dois resultados é apresentado na Figura 67. Enquanto o controle *ON-OFF* apresentou um desvio de $\pm$ 7 ºC do valor desejado, o controle PID reduziu o desvio para $\pm$ 2 ºC melhorando o controle.

Figura 65 - Controle de temperatura *ON-OFF* para 110 ºC.



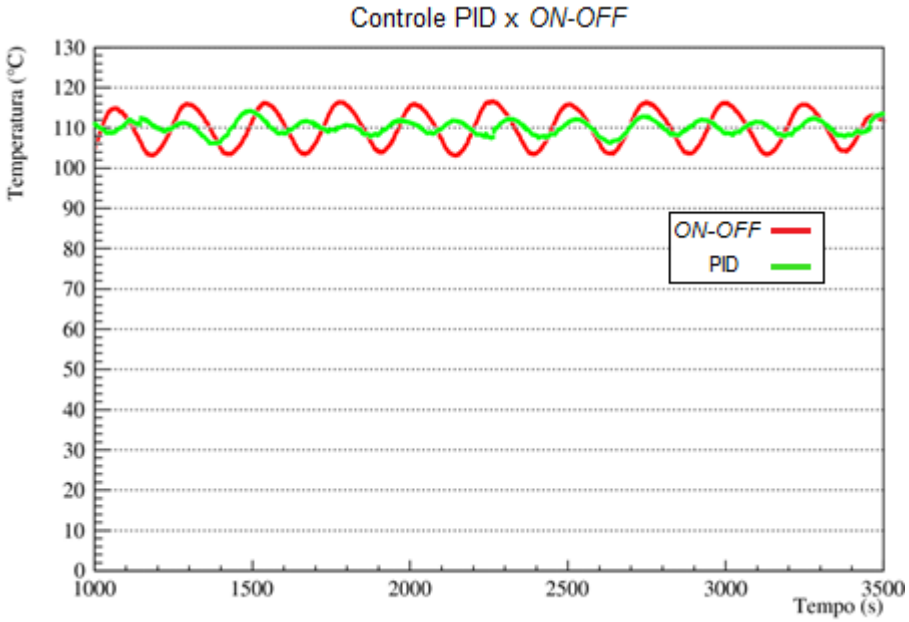
Fonte: autor da tese.

Figura 66 - Controle de temperatura PID para 110 ºC.



Fonte: autor da tese.

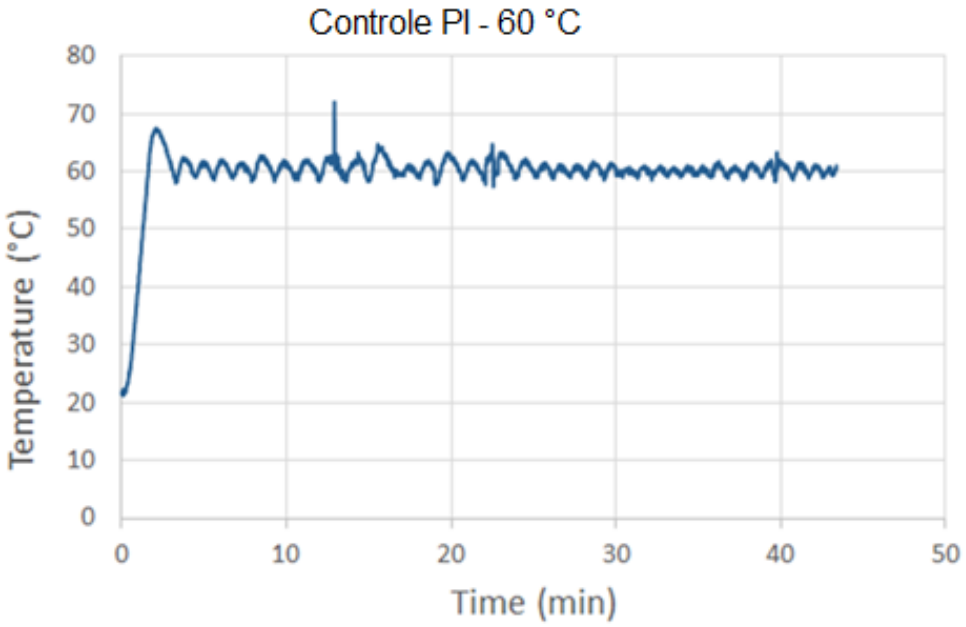
Figura 67 - Controle de temperatura *ON-OFF* e PID para 110 ºC.



Fonte: autor da tese.

O sistema para síntese de nanocristais utilizou várias temperaturas para coleta de amostras e a Figura 68 mostra o gráfico de temperatura de um dos ensaios efetuados. Neste ensaio foi utilizado um controle Proporcional e Integral (PI) para manter a temperatura a 60 °C. A média dos valores foi de 60,64 °C com um desvio padrão de 1,39 °C.

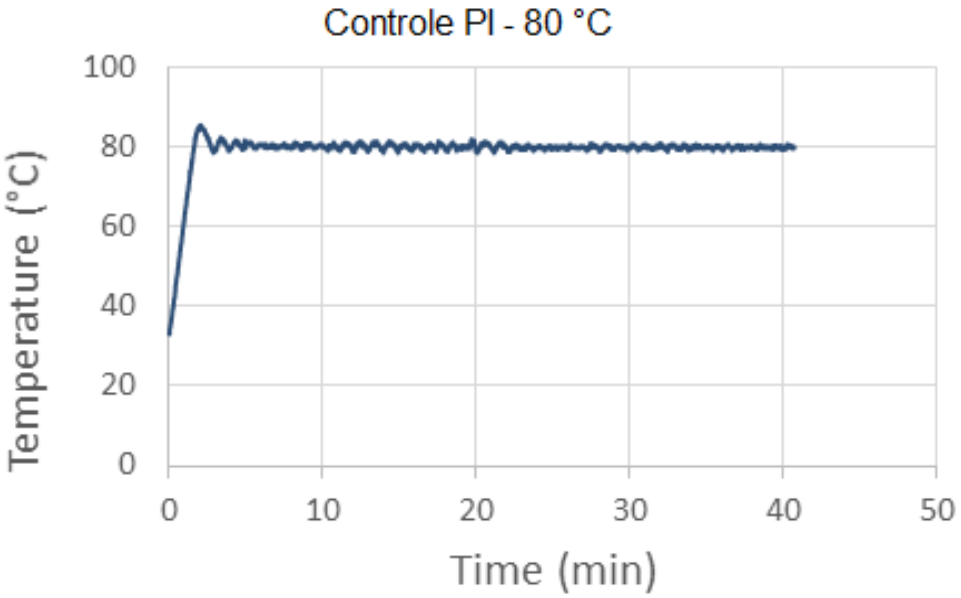
Figura 68 - Aquecimento global à 60 °C do sistema microfluídico para síntese de nanocristais.



Fonte: autor da tese.

Para um dos ensaios feitos com temperatura de 80 °C, utilizando um controle PI, o gráfico obtido é ilustrado na Figura 69. A média dos valores foi de 80,19 °C com um desvio padrão de 0,81 °C.

Figura 69 - Aquecimento global à 80 °C do sistema microfluídico para síntese de nanocristais.



Fonte: autor da tese.

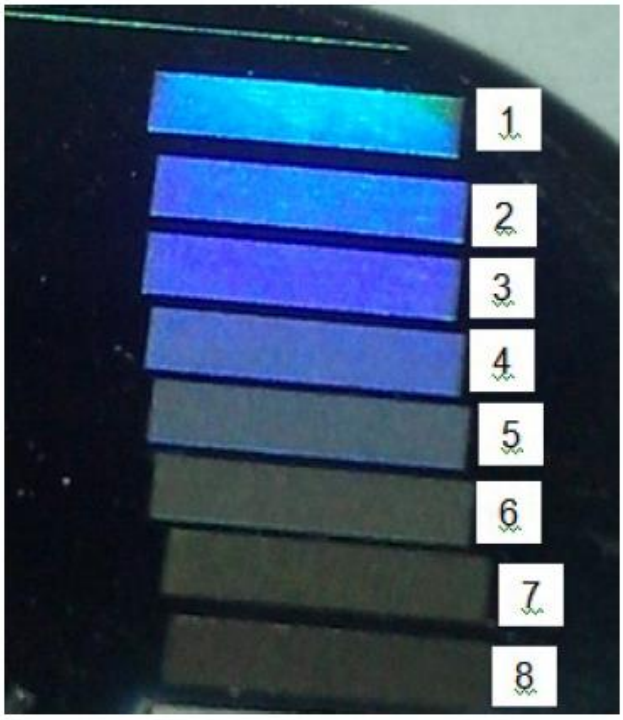
5.2.4.2 Sistema de aquecimento localizado

Para sistemas microfluídicos onde a temperatura da reação necessita ser alcançada rapidamente foi desenvolvido o sistema de aquecimento localizado.

5.2.4.2.1 Texturização do elemento aquecedor - LIPSS

Este sistema utiliza uma chapa de aço inoxidável austenítico ASTM F138 com espessura de 100 µm, texturizada em uma das faces por feixe laser de femtossegundos para absorver luz, e cujo processo de texturização foi desenvolvido e descrito por SILVA [81]. O escurecimento da chapa de aço inoxidável é obtido com um excesso de sobreposição de pulsos além daquele necessário para produção de LIPSS. Esta sobreposição maior acarreta uma desfiguração dos LIPSS, criando estruturas nanométricas pontiagudas com picos e vales muito pronunciados que aprisionam as ondas eletromagnéticas que, normalmente seriam refletidas pelo material. A Figura 70 mostra placas de aço inox texturizadas com LIPSS (as coloridas) e com excesso de pulsos que destruíram os LIPSS (as placas escuras). Onde houve uma maior sobreposição de pulsos a região irradiada tornou-se preta, ou seja, absorvedora de luz.

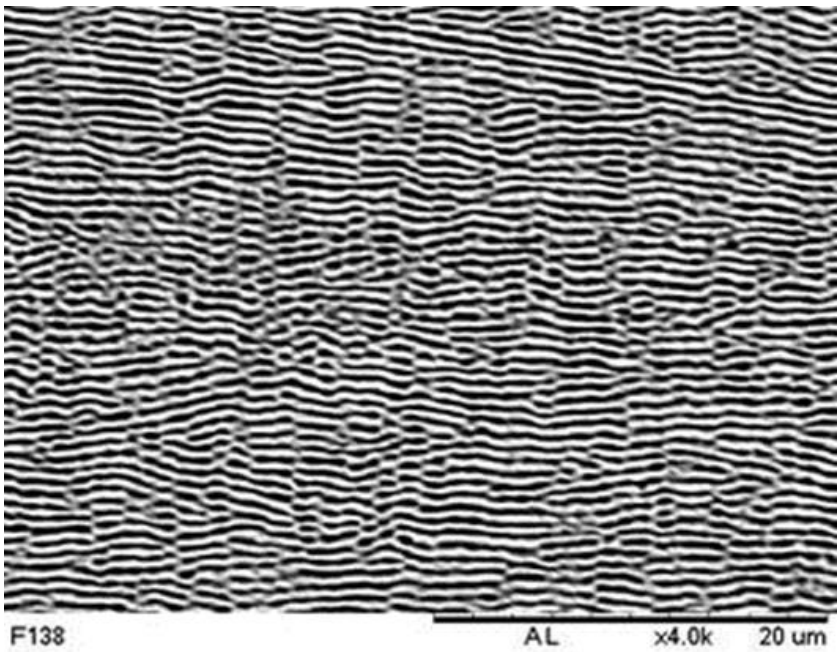
Figura 70 - Retângulos coloridos sobre a superfície do aço inoxidável ASTM F138 produzido pela formação de LIPSS. Aumento da sobreposição de pulsos da região 1 para a 8.



Fonte: SILVA, L.G., 2017.

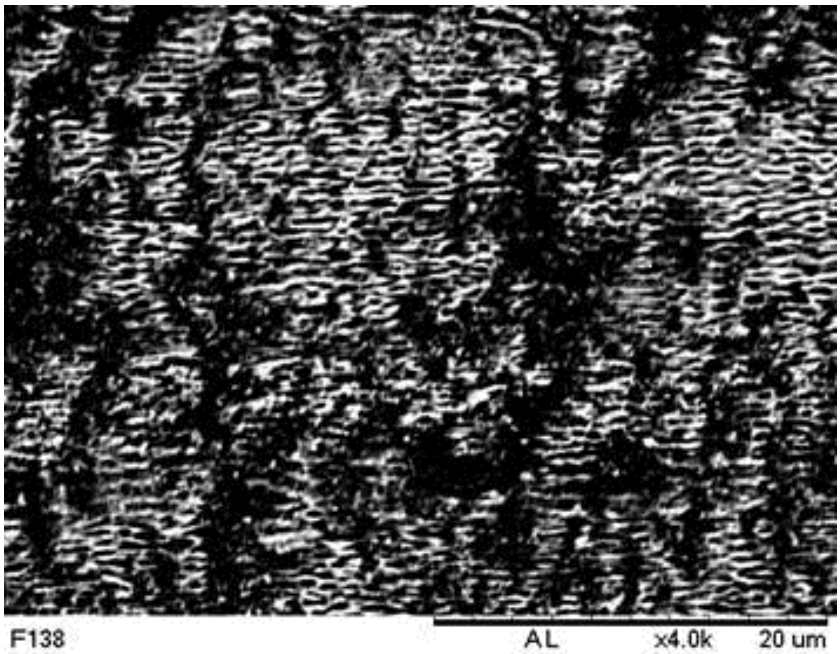
A Figura 71 mostra a Microscopia Eletrônica obtida da região 1 e a Figura 72 da região 8, que são as regiões com menor e maior taxa sobreposicão de pulsos.

Figura 71 - Microscopia Eletrônica da região 1 irradiada.
Os LIPSS apresentam uma linearidade.



Fonte: SILVA, L.G., 2017.

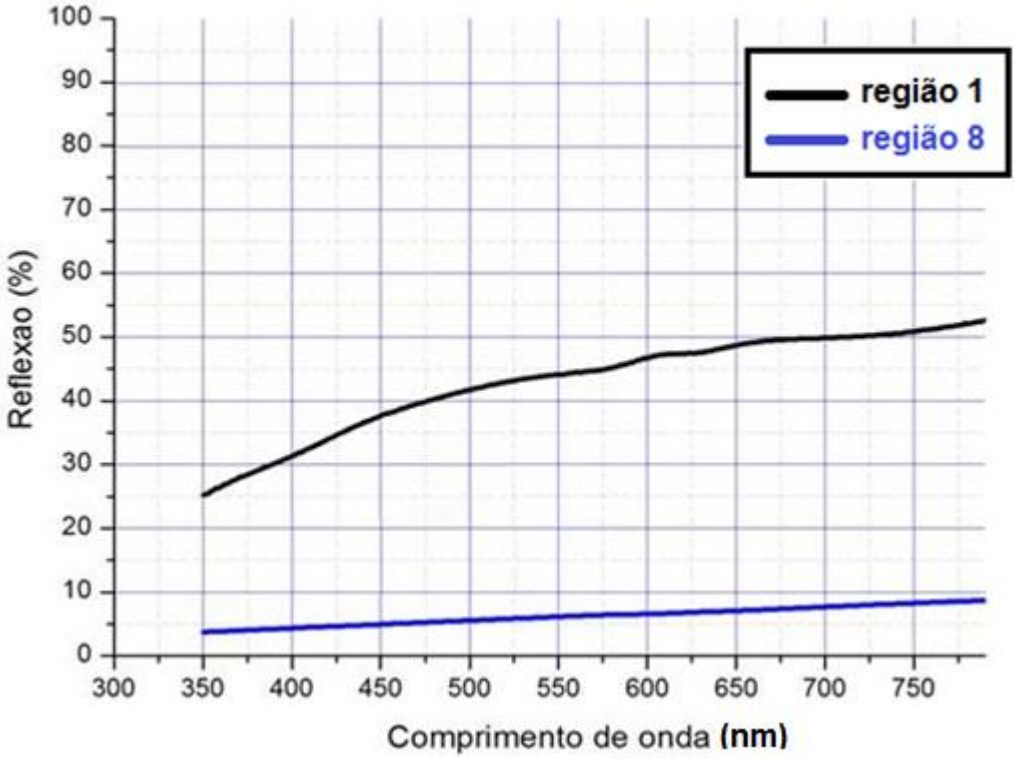
Figura 72 - Microscopia Eletrônica da região 8 irradiada.
Ao aumentar a taxa de sobreposição dos pulsos os LIPSS perdem a linearidade, adquirindo características granulares.



Fonte: SILVA, L.G., 2017.

A Figura 73 mostra o espectro de reflexão da luz para as duas regiões 1 e 8 que apresentam a menor e a maior absorção respectivamente.

Figura 73 - Espectro de reflexão da luz nas regiões 1 e 8.
Na região 8 com maior taxa de sobreposição de pulsos a absorção da luz fica acima de 90% (reflexão < 10%).



Fonte: Adaptado de SILVA, L.G., 2017

É possível notar que dentro da faixa da luz visível (400 a 750 nm), a absorção na região 8 fica acima de 92% e que a texturização efetuada atende ao objetivo desejado.

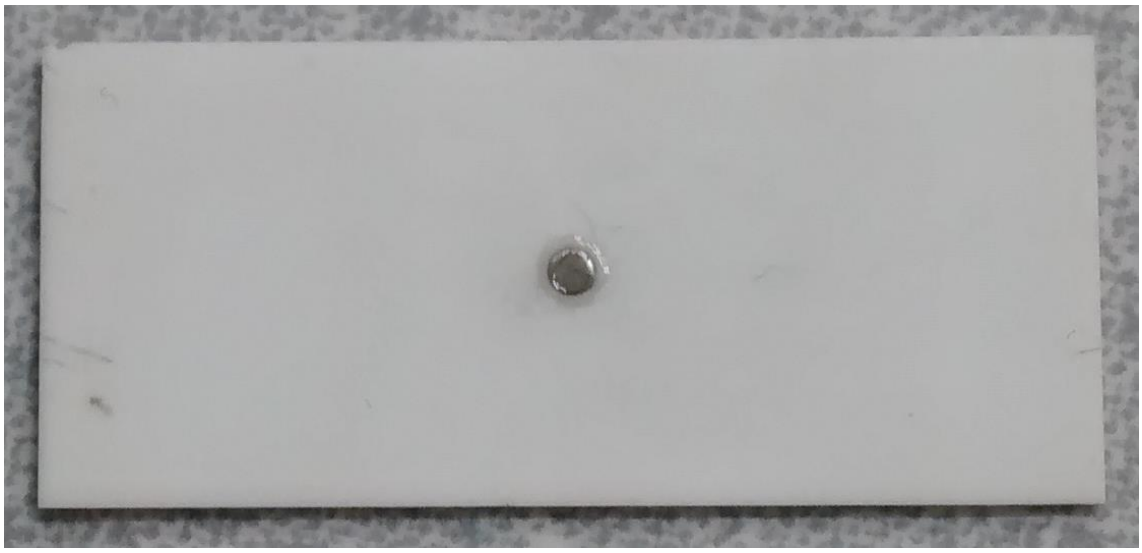
5.2.4.2.2 Dispositivo para medida de temperatura e comprovação do sistema

Inicialmente para teste do sistema, uma pastilha de aço inoxidável austenítico ASTM F138 foi texturizada com os parâmetros da região 8 definidos por SILVA [81] .

Através do laser de femtossegundos foi feito um furo passante de 1,5 mm numa pastilha cerâmica de 34 mm por 15mm, com espessura de 600 µm. A seguir um pequeno disco do aço inoxidável ASTM F138 com texturização em uma das faces foi cortado com diâmetro de 1,5 mm também utilizando o feixe laser de femtossegundos. O disco foi inserido no orifício da pastilha cerâmica e colado

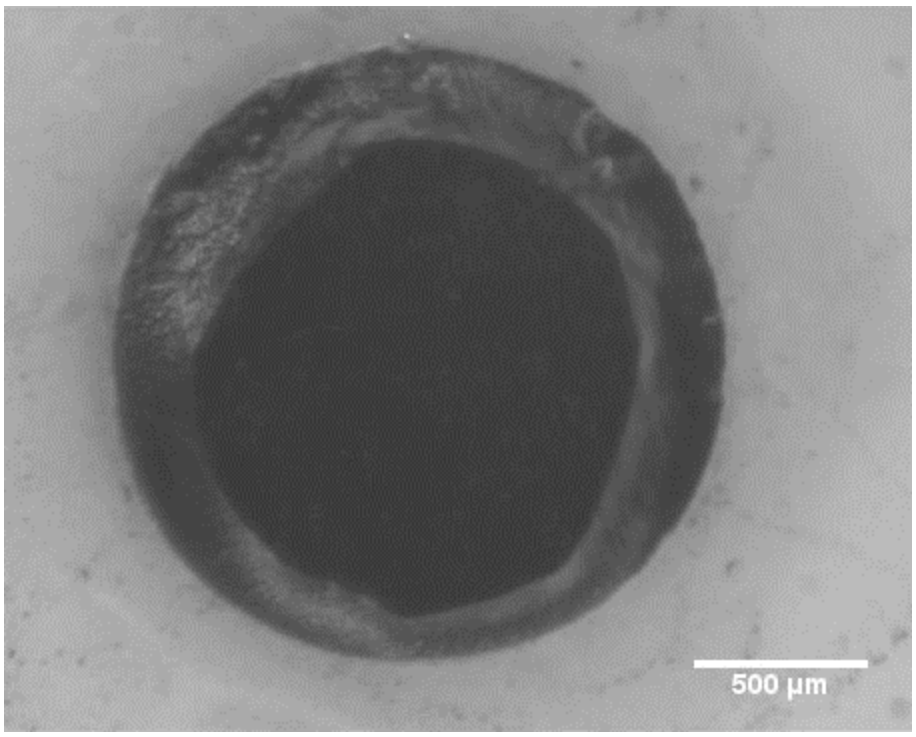
pelo lado polido (não texturizado). A Figura 74 ilustra o lado colado e a Figura 75 mostra a vista ampliada dessa colagem.

Figura 74 - Disco de aço inoxidável colado na pastilha cerâmica.



Fonte: autor da tese.

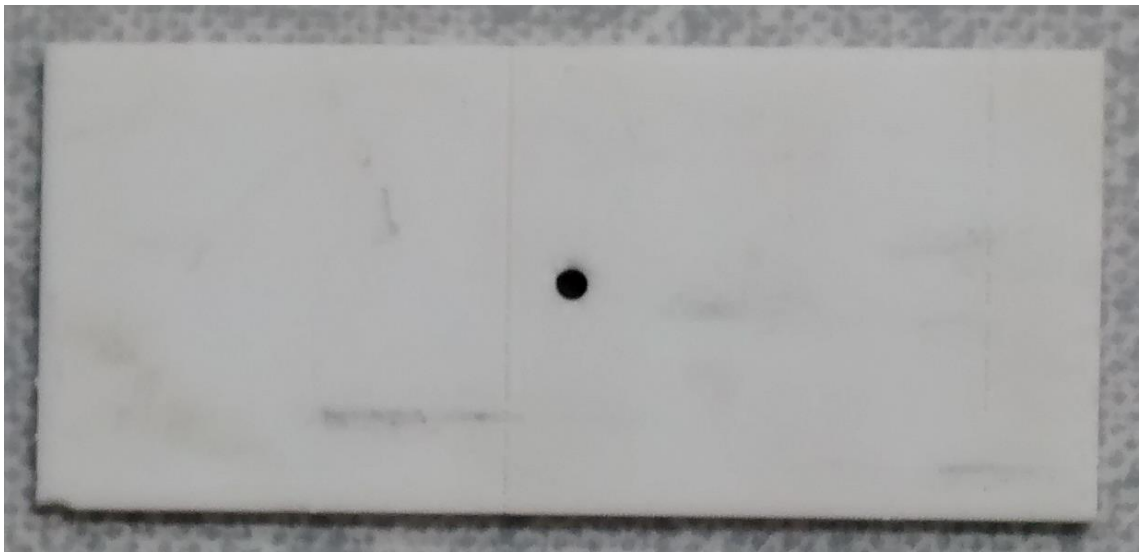
Figura 75 - Vista ampliada do disco de aço inox colado na pastilha cerâmica.



Fonte: autor da tese.

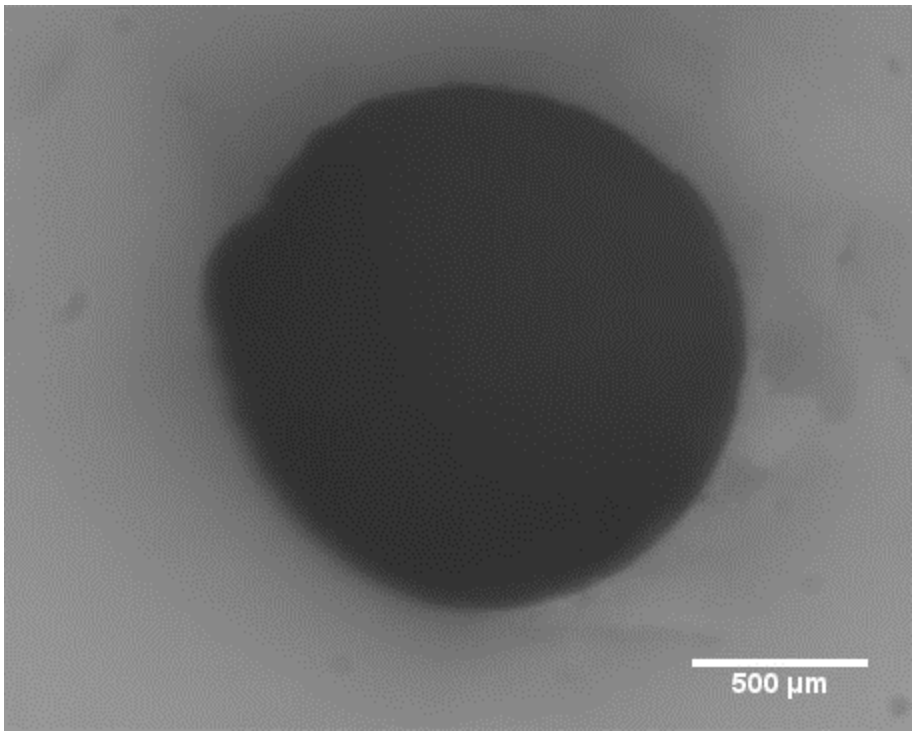
A Figura 76 mostra o lado com a face texturizada e a Figura 77 a vista ampliada desta face.

Figura 76 - Disco de aço inoxidável com face texturizada inserido na pastilha cerâmica.



Fonte: autor da tese.

Figura 77 - Vista ampliada do disco de aço inoxidável texturizado inserido na pastilha cerâmica.

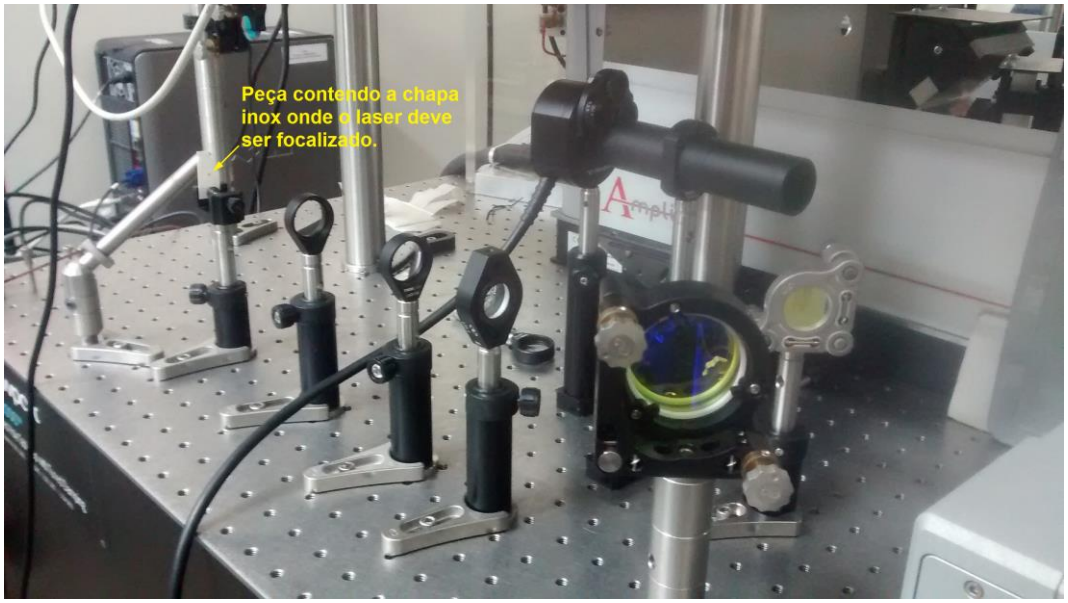


Fonte: autor da tese.

No experimento para aquecimento do disco de aço texturizado, o laser usado foi um Verdi V5, da Coherent, que é um laser de Nd:YVO4 bombeado por diodo, com emissão contínua em 532nm (2º harmônico da emissão fundamental em 1064), de frequência única. O objetivo aqui é o de aquecer a lâmina através da absorção de luz do feixe laser.

Um arranjo com espelhos foi feito com a finalidade de focalizar o feixe laser sobre o disco de aço inoxidável e deixar o diâmetro do feixe próximo ao diâmetro do disco. A Figura 78 ilustra o arranjo feito.

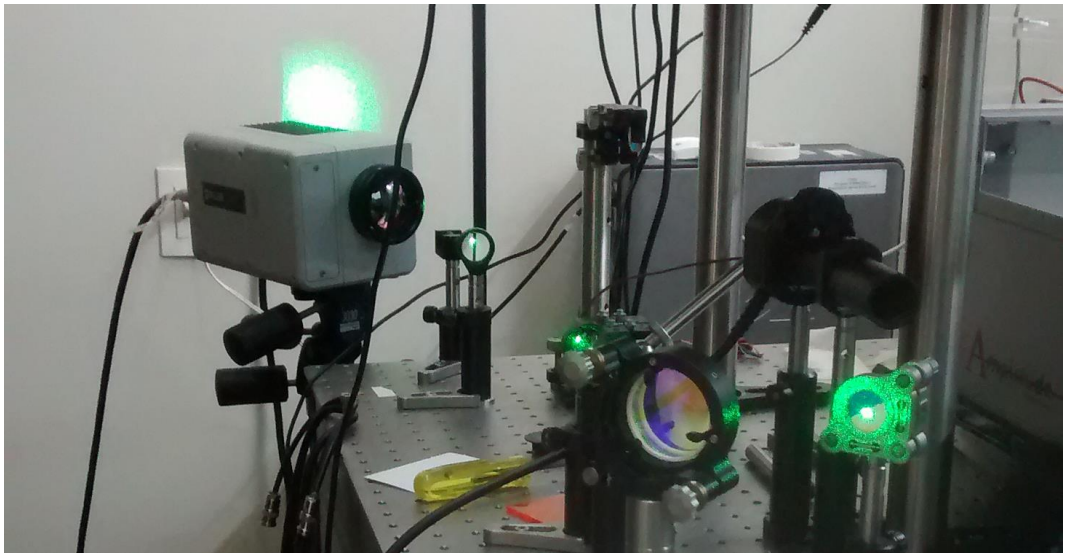
Figura 78 - Arranjo de espelhos para focalizar o feixe na peça a ser aquecida e aumentar o diâmetro do feixe no ponto focal.



Fonte: autor da tese.

Uma câmera termográfica *Thermacam* SC3000 fabricada pela empresa FLIR foi utilizada para medir a temperatura no disco de aço inoxidável aquecida pelo feixe laser. A Figura 79 ilustra a câmera utilizada.

Figura 79 - Câmera Termográfica Thermacam SC3000 - FLIR utilizada para medidas de temperatura.

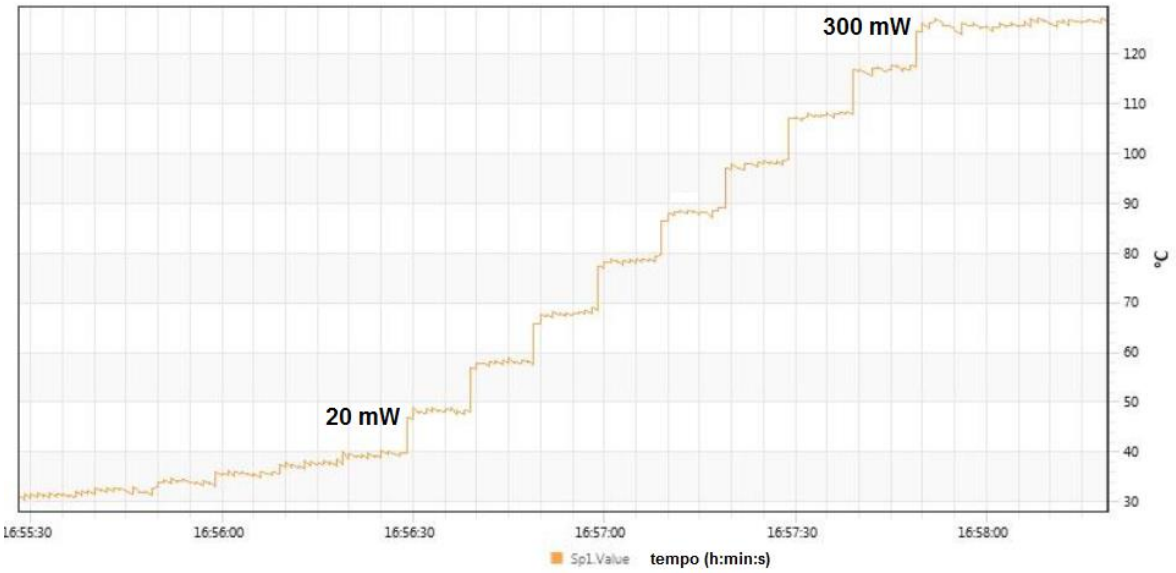


Fonte: autor da tese.

Para efetuar a medida de temperatura utilizando a câmera térmica é necessário fornecer a informação da emissividade do material onde a câmera está focalizada.

Com o feixe laser focalizado no lado texturizado e a câmera térmica focalizada no lado polido onde a emissividade do material é conhecida medidas de temperatura no disco de aço em função da elevação da potência do feixe laser foram feitas e a Figura 80 mostra os dados obtidos.

Figura 80 - Medidas de temperatura com irradiação do laser pelo lado polido
Medidas feitas com câmera térmica.



Fonte: SAMAD, R. E. e HERRERA, C. C.

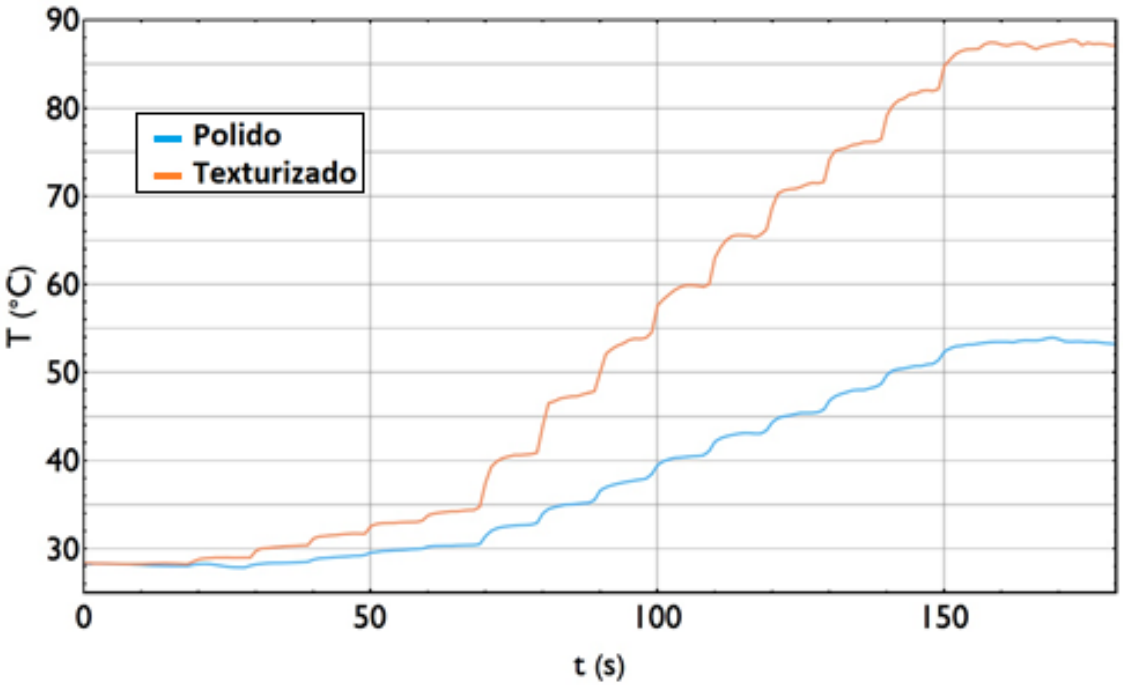
A potência do feixe laser gerada pelo equipamento ao iniciar a radiação foi mantida em 5 mW e a cada 10 s aproximadamente foi aumentada para 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mW. Devido ao acréscimo de espelhos para desvio do feixe e também para ajuste do diâmetro do feixe ao atingir a amostra houve uma perda de aproximadamente 20% na potência.

É possível notar pelo gráfico que a temperatura responde ao aumento quase instantaneamente e se mantém constante até um novo aumento na potência do feixe laser, mostrando a capacidade de superar a deficiência do aquecimento global que é a demora para atingir a temperatura almejada, crucial em algumas reações.

A emissividade do material no lado texturizado não é conhecido, o que tornou difícil efetuar a medida com o feixe laser focalizado no lado polido. Utilizamos então, um termopar do tipo K com fios de 150 µm de diâmetro para termos um comparativo entre as temperaturas alcançadas quando da irradiação do feixe por ambos os lados.

Devido a pequena massa do disco de aço inoxidável, a massa do sensor (termopar) passa a ser significativa fazendo com que a medida de temperatura não tenha precisão, mas para efeitos comparativos é possível mostrar que a texturização altera a propriedade do disco de aço inoxidável, tornando-a altamente absorvedora de luz e que, para uma mesma variação de potência emitida pelo laser, há uma elevação de temperatura bem maior quando focalizado no lado texturizado do que o aumento provocado quando da focalização no lado polido. O gráfico comparativo das temperaturas medidas pelo termopar tipo K nas duas condições é mostrado na Figura 81.

Figura 81 - Medidas de temperatura com irradiação do laser pelo lado polido e pelo lado texturizado utilizando termopar tipo K.



Fonte: SAMAD, R. E. e HERRERA, C. C.

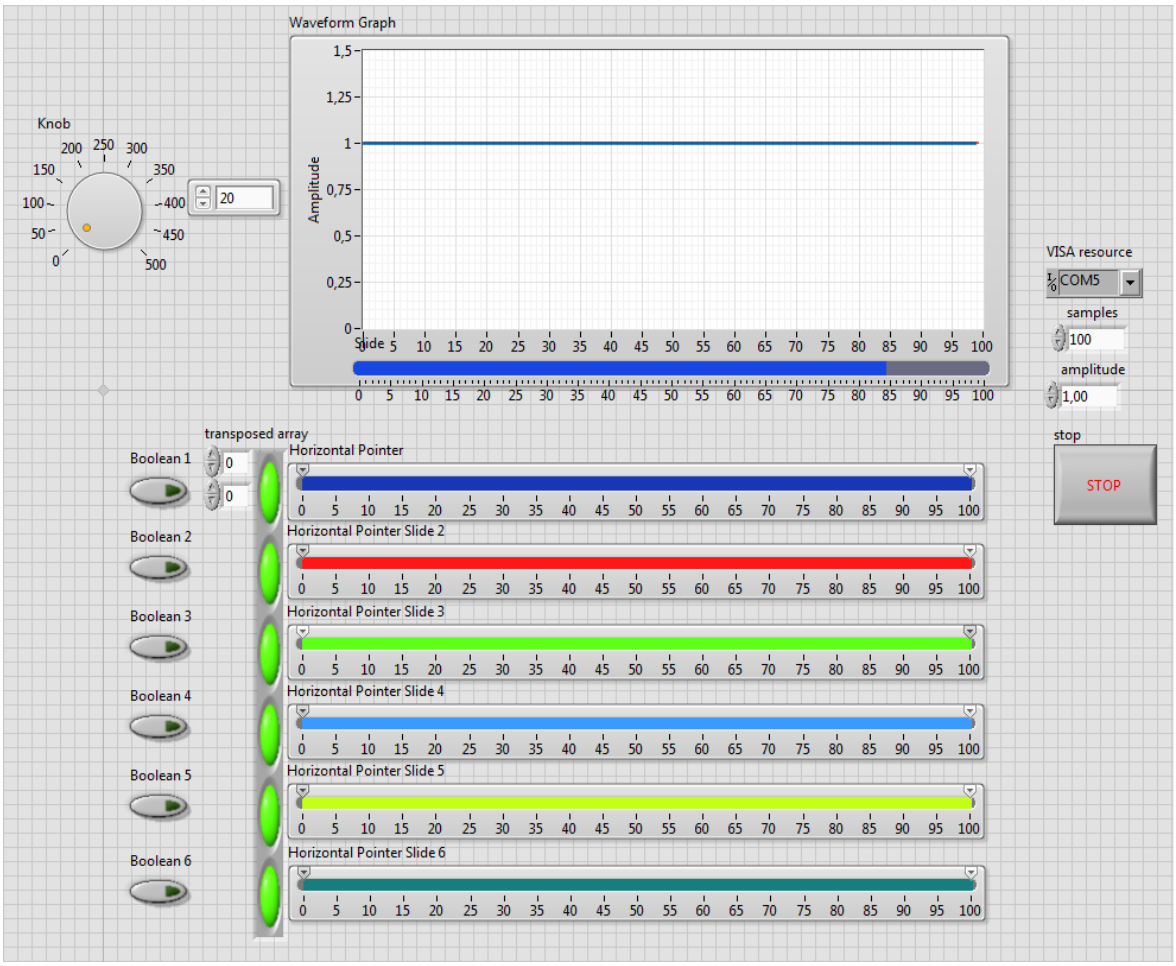
5.3 Sistemas Microfluídicos

Os sistemas microfluídicos foram construídos para duas aplicações específicas e os resultados são mostrados a seguir.

5.3.1 Sistema para teste ELISA

O painel frontal do programa Labview desenvolvido para a injeção dos reagentes no microcircuito é mostrada na Figura 82. É possível controlar as seis microválvulas das entradas do microcircuito permitindo o ajuste do tempo que a válvula deve permanecer aberta para que cada reagente atenda a recomendação descrita no processo.

Figura 82 - Painel frontal Labview para controle das entradas dos reagentes no sistema microfluídico para teste ELISA.

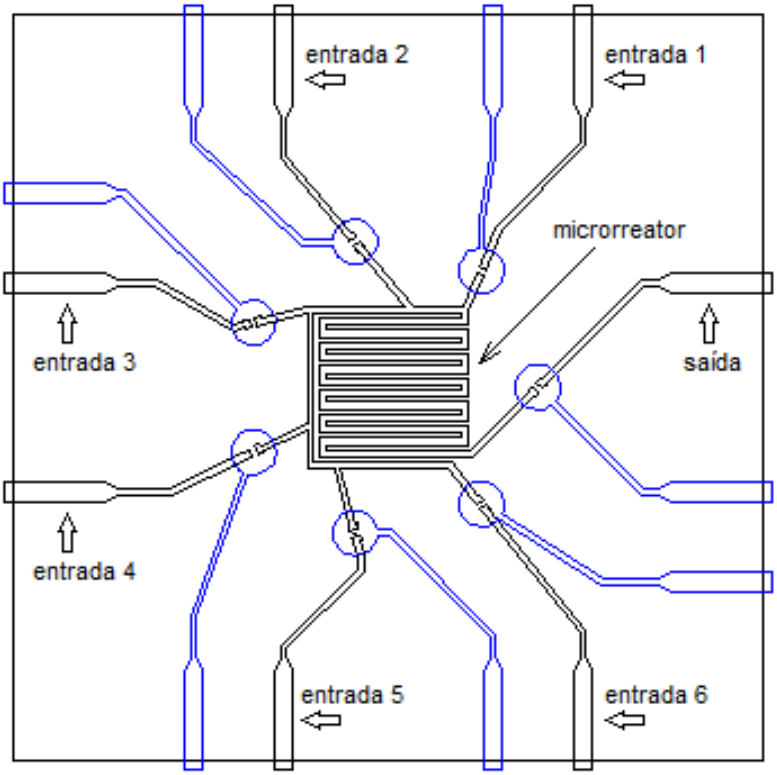


Fonte: autor da tese.

O sistema microfluídico para teste ELISA foi desenvolvido em parceria com o Centro de Biotecnologia (CB) do IPEN. Os desenvolvimentos foram específicos para detectar a presença de veneno de cobras cascavel e jararaca, e os parâmetros otimizados para reduzir o consumo dos insumos e os tempos de incubação e reação.

Utilizando o microcircuito mostrado na Figura 36, ilustrado pela Figura 83 e realizando o procedimento descrito na sessão 4.5.1 usando o antígeno contendo veneno de jararaca a eficácia do sistema pode ser comprovada.

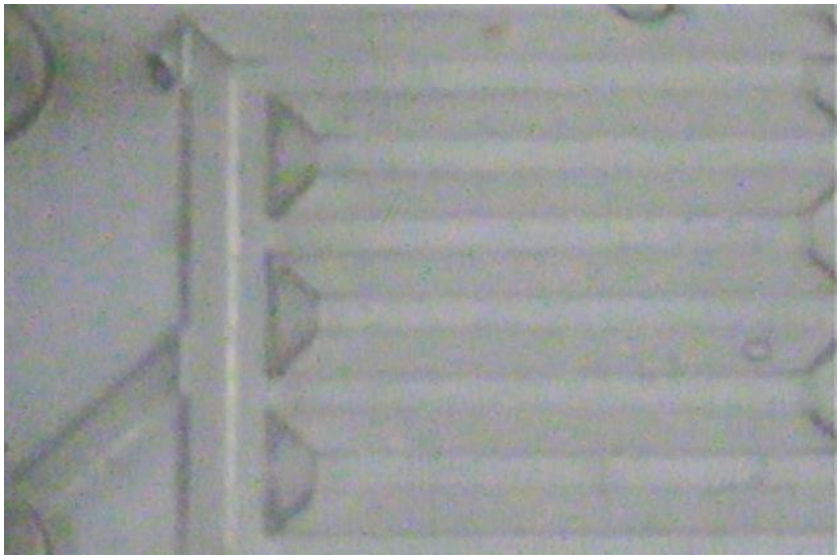
Figura 83 - Ilustração do circuito microfluídico para teste ELISA.



Fonte: autor da tese.

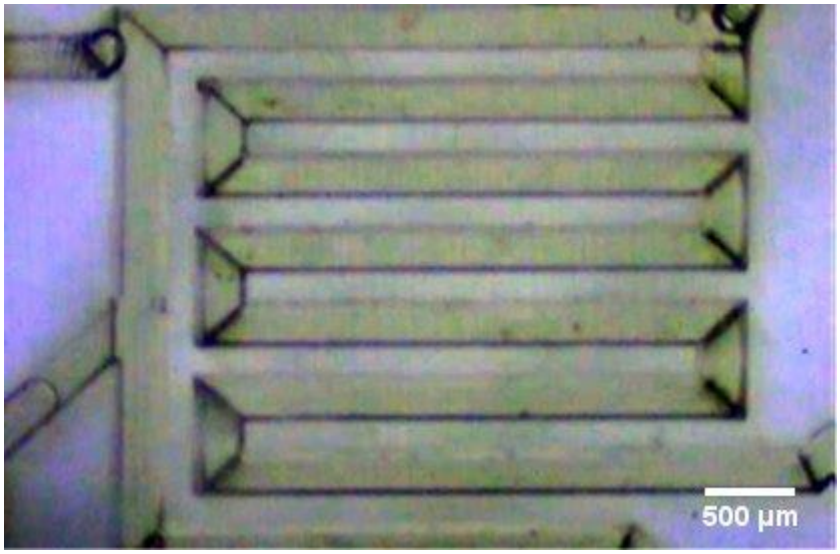
Após a injeção da solução de ortofenildiamina a mudança de cor de transparente para amarelada foi observada. A Figura 84 mostra a coloração do circuito logo após a injeção da solução e a Figura 85 mostra a coloração 20 min mais tarde.

Figura 84 - Coloração imediatamente após a injeção da solução de ortofenildiamina.



Fonte: autor da tese.

Figura 85 - Coloração após decorridos 20 min da injeção da solução de ortofenildiamina.



Fonte: autor da tese.

Testes com antígeno contendo veneno de cascavel também foram efetuados e mostraram o mesmo resultado.

Quando das realizações dos testes, os mesmos também foram efetuados em placas de poços ilustrada pela Figura 86. Nas mesmas foram feitas experiências em poços onde foi utilizado antígeno com o veneno (+) e poços sem o antígeno para verificação do falso positivo (-).

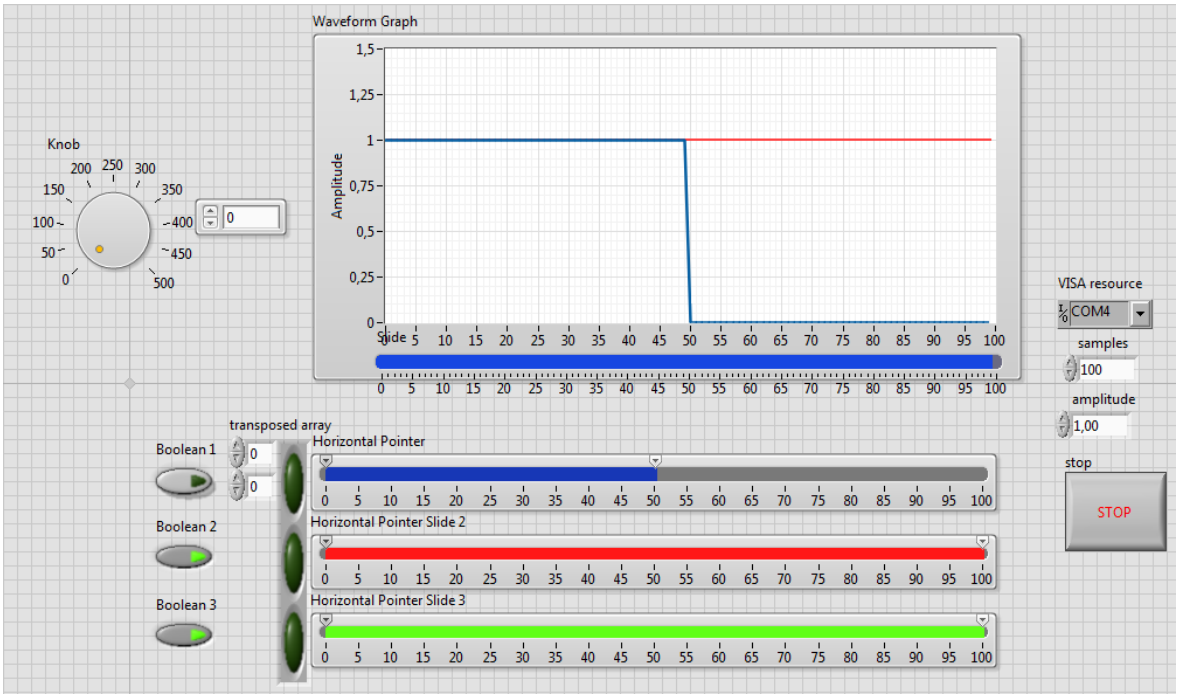
Figura 86 - Coloração após decorridos 20 min da injeção da solução na placa de poços.

Fonte: autor da tese.

5.3.2 Sistema para síntese de nanocristais

Um programa em Labview foi elaborado para efetuar o controle de vazão, via microcontrolador Arduino, das três entradas dos sistema microfluídicos construídos para síntese de nanocristais. O painel frontal é mostrado na Figura 87. Esse controle permite abrir e fechar individualmente cada entrada com o ajuste do período total do ciclo e a porcentagem de tempo da microválvula aberta e fechada.

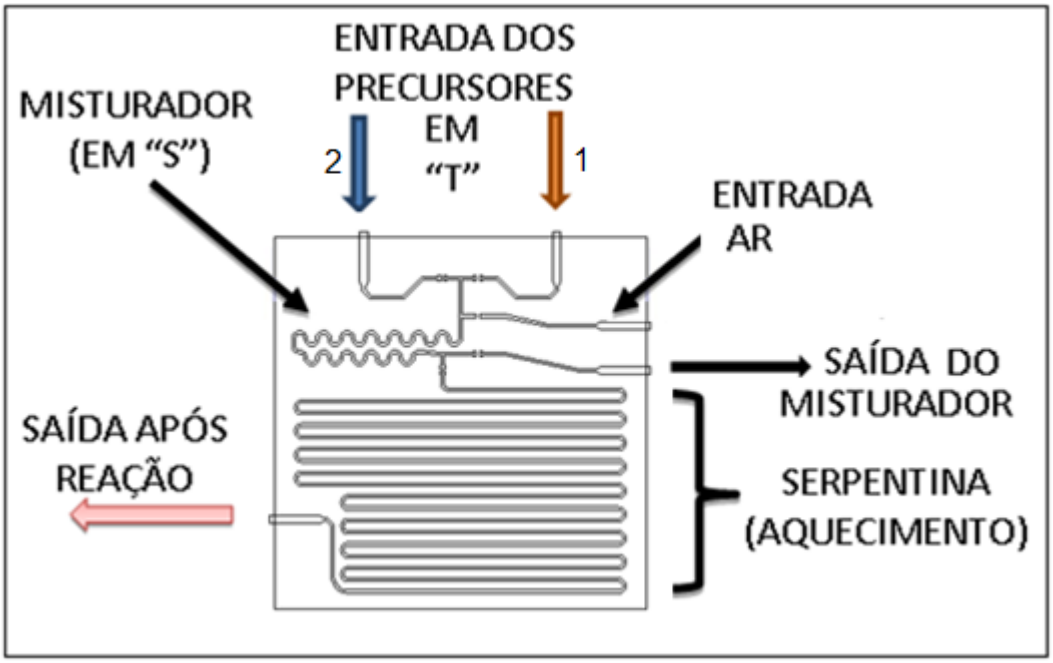
Figura 87 - Painel frontal Labview para controle das entradas dos reagentes no sistema microfluídico para síntese de nanocristais.



Fonte: autor da tese.

Considerando o primeiro microcircuito construído mostrado na Figura 38 e ilustrado pela Figura 88 análises foram feitas.

Figura 88 - Ilustração do primeiro microcircuito construído para síntese de nanocristais.



Fonte: autor da tese.

5.3.2.1 Análise teórica do fluxo nos microcanais

Considerando o microcircuito ilustrado pela Figura 88 algumas análises teóricas foram feitas. Adota-se água sendo injetada com pressão na entrada 1 e mantida fechadas as entradas 2, de ar pressurizado e a saída do misturador. As microválvulas foram desprezadas para efeito de cálculo e estando as mesmas abertas adotou-se que os microcanais não estão interrompidos.

Nesse circuito os microcanais foram usinados com largura de 200 µm e profundidade de 100 µm. Assim, da equação (3.5) temos que o diâmetro hidráulico vale:

$$D_H = 133\ \mu m$$

para uma pressão máxima desejada de 15 psi (1psi ≅ 6895 Pa), ao empurrarmos água ($\eta \cong 1\ mPa.s$; $\rho \cong 997\ Kg/m^3$) pelo microcanal da entrada 1 e considerando um canal linear sem curvas da equação (3.7) obtemos uma velocidade de:

$$v \cong 1{,}83\ m/s$$

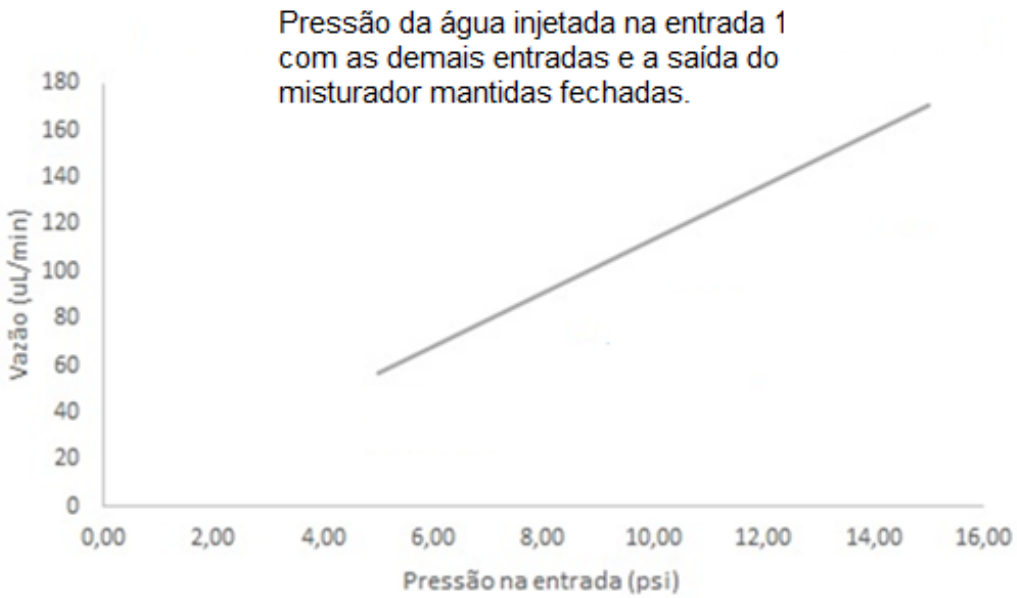
que, nos dá pela equação (3.1) um número de Reynolds de:

$$Re \cong 242$$

que ainda caracteriza um fluxo laminar.

Adotando-se aqui a suposição de aproximar o microcircuito construído como sendo um único canal retangular retilíneo com comprimento igual ao comprimento total do microcircuito (misturador + reator) e considerar esse comprimento $L \cong 415\ mm$ através da equação (3.25c) pode-se levantar o gráfico ilustrado pela Figura 89 que mostra a vazão nesse canal reto em função da variação de pressão.

Figura 89 - Vazão em um canal retangular reto com comprimento igual ao do microcircuito construído.



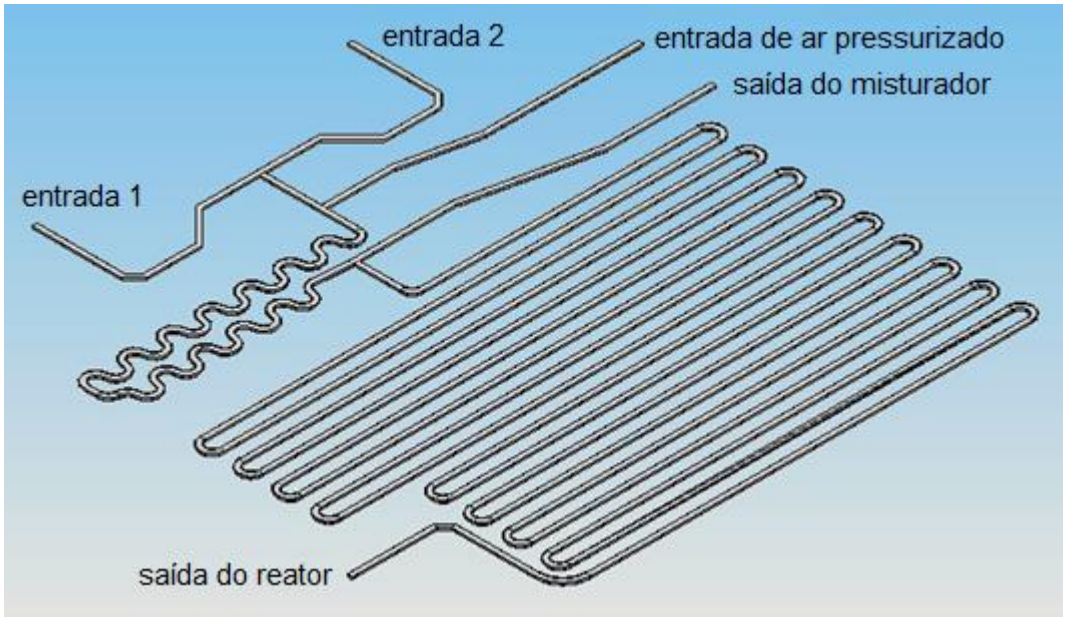
Fonte: autor da tese.

Como o microcircuito não é linear, somado ao desprezo do efeito da microválvula, espera-se uma vazão inferior ao valor a ser medido.

5.3.2.2 Valores de fluxo obtidos por simulação

Para um comparativo das medidas de fluxo obtidas em função das pressões geradas, foi feito também a simulação através de *software.* O microcircuito para simulação ilustrado na Figura 90 não apresenta as microválvulas por não se saber simulá-las, assim as mesmas foram desprezadas.

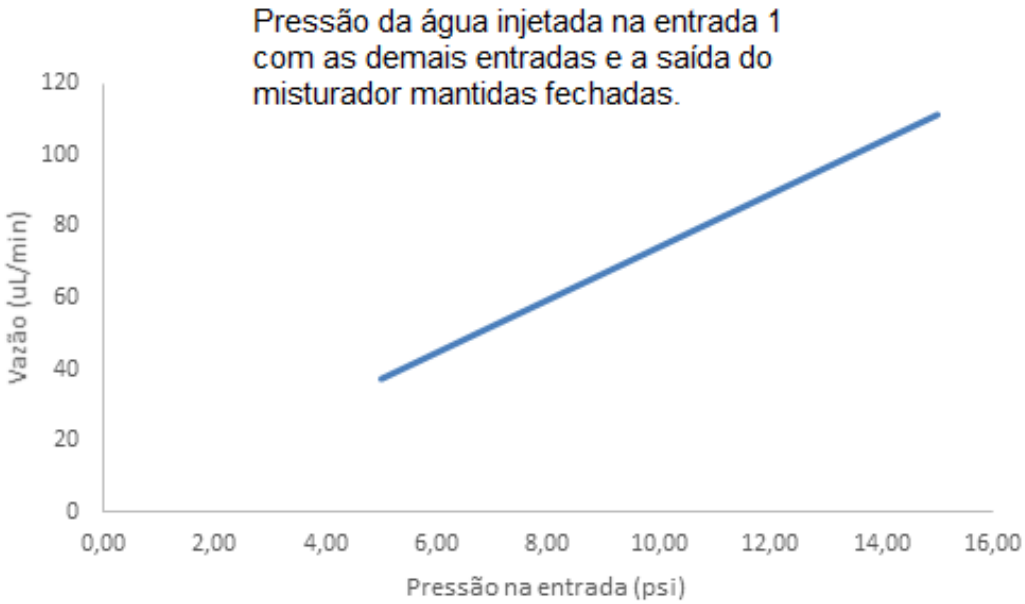
Figura 90 - Vista isométrica do microcircuito adaptado para simulação de fluxos.



Fonte: autor da tese.

As condições adotadas foram as mesmas para o calculado, ou seja, água sendo injetada com pressão na entrada 1 e mantida fechadas as entradas 2, de ar pressurizado e a saída do misturador. Os dados obtidos por simulação são mostrados na Figura 91.

Figura 91 - Fluxo obtido por simulação para o circuito da Figura 90.

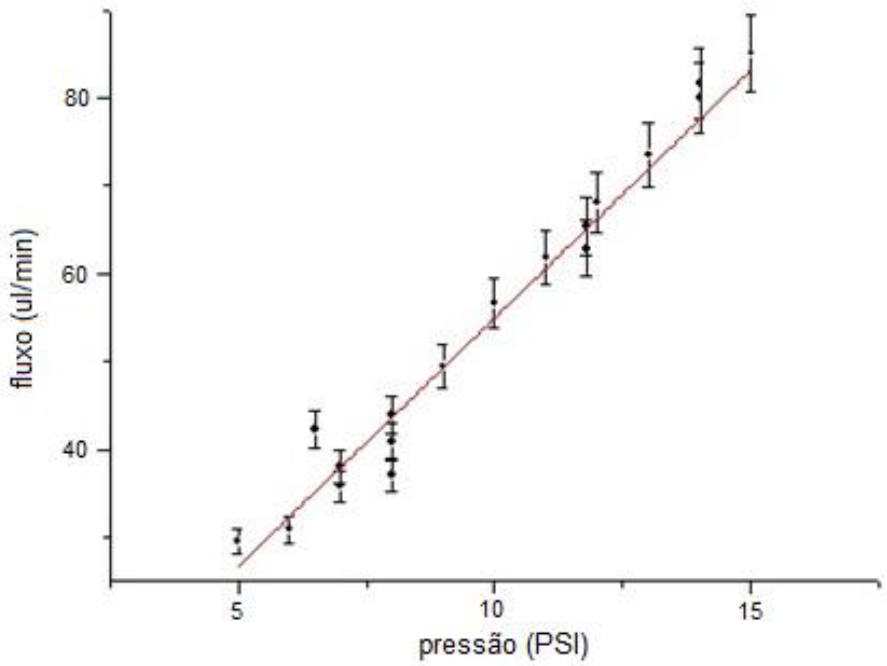


Fonte: Adaptado de PERES, J. C. *et al*, 2018.

5.3.2.3 Medidas de fluxo para o primeiro circuito construído

Utilizando o microcircuito da Figura 38 ilustrado pela Figura 88, foram feitas medidas do fluxo de água em função da pressão regulada fornecida externamente para empurrá-la e, os resultados são ilustrados na Figura 92. Este experimento foi feito injetando pressão na entrada 1 e mantendo fechadas as entradas 2 e de ar. Através do sistema de controle foi mantida a saída do misturador fechada e a entrada do reator aberta, de forma que a água entra pela entrada 1 e sai na saída do reator.

Figura 92 - Fluxo de água através do primeiro microcircuito construído em função da pressão externa utilizada para empurrá-la.



Fonte: AMORIM DA SILVA, T.F. e HERRERA, C.C., 2017.

5.3.2.4 Comparação entre fluxos calculados, simulados e medidos

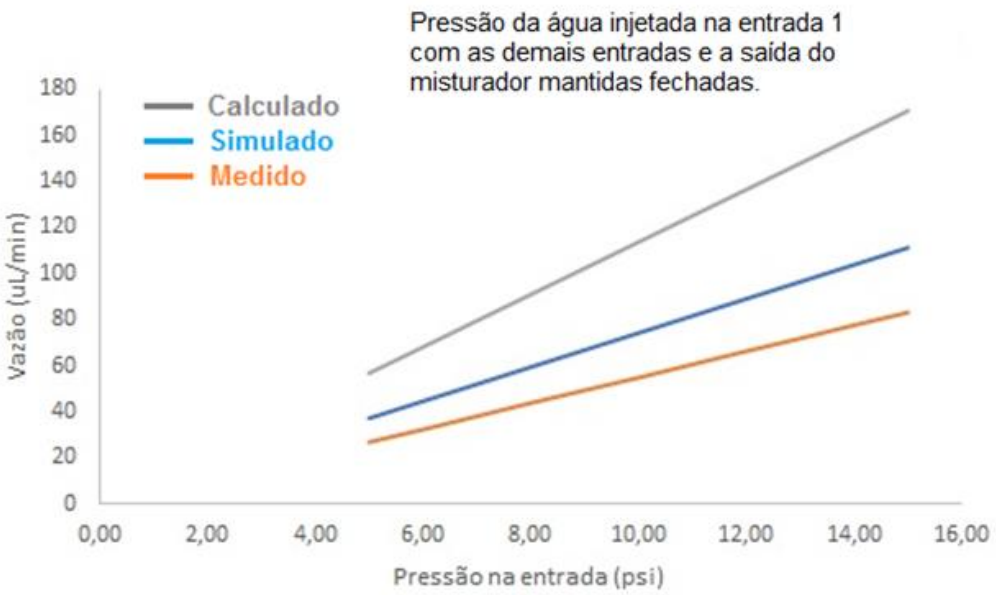
Através dos resultados obtidos foi possível constatar que o fluxo através de pressão obtido por cálculo foi maior que os obtidos por simulação, que por sua vez, ficou maior em relação ao medido no circuito construído. Os dados obtidos para os fluxos calculado, simulado e medidos são mostrados na Tabela 2 e mostrados graficamente pela Figura 93.

Tabela 2 - Comparativo entre os fluxos obtidos por cálculo, simulação e por medidas no microcircuito da Figura 38.

Pressão (psi)	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Calculados (µl/min)	57,0	68,4	79,8	91,2	102,6	114,0	125,4	136,8	148,2	159,6	171,0
Simulados (µl/min)	37,4	44,8	52,2	59,6	67,0	74,4	81,8	89,2	96,6	104,0	111,4
Medidos (µl/min)	27,0	32,0	38,0	43,0	49,0	55,0	61,0	66,0	72,5	77,5	83,0

Fonte: autor da tese.

Figura 93 - Gráfico comparativo entre Calculado, Simulado e Medido.



Fonte: autor da tese.

Era esperado que os valores medidos apresentassem um fluxo menor que os simulados porque a presença das microválvulas impõem uma resistência ao fluxo e foram desprezadas na simulação. Também era esperado que os valores simulados ficassem abaixo dos valores calculados porque nos cálculos foi considerado um circuito com canais retangulares reto e as curvas ignoradas também aumentam a resistência ao fluxo.

Com a diferença observada entre valores simulados e medidos é possível estimar a perda das microválvulas e assim a presença delas poderá se levada em conta em simulações futuras.

Os resultados mostraram a necessidade de alargar e aprofundar o microcircuito para permitir um fluxo maior pois, inicialmente imaginava-se trabalhar com um fluxo de no mínimo 100 µl/min. Outra consideração importante é que os reagentes a serem usados na síntese de nanocristais apresentam uma maior viscosidade em relação à da água que foi utilizada nos cálculos, simulação e experimentos e irão provocar uma redução ainda maior no fluxo. Também é desejável não ultrapassar a pressão de 15 psi pois aumenta consideravelmente a probabilidade de vazamentos e quebra do substrato de vidro BK7.

A decisão de aumentar a largura e a profundidade dos microcanais foi uma decisão acertada para um aumento de vazão. Pela equação (3.25c) é possível perceber que para uma mesma diferença de pressão essas alterações geram um aumento de fluxo Q considerável pois o mesmo é diretamente proporcional ao cubo da altura (h^3) e diretamento proporcional à largura (w).

5.3.2.3 Resultados da síntese de nanopartículas

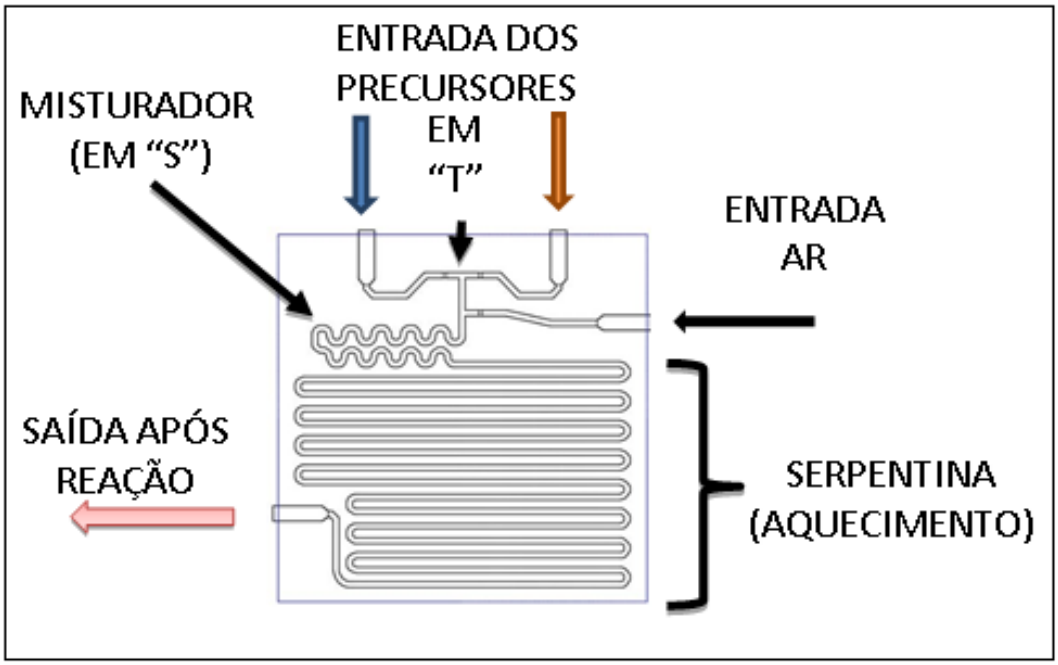
O composto fluoreto a ser sintetizado foi o **$NaYF_4$:Yb^{3+}:Er^{3+}**. Na síntese desse fluoreto, as formas cúbicas e hexagonais podem ser obtidas. O objetivo a ser alcançado é obter a maior quantidade de nanocristais na forma hexagonal porque nesta forma os dopantes apresentam uma alta luminescência na faixa do infravermelho próximo que os tornam um material interessante para uso como marcador em imagens de sistemas biológicos.

Duas soluções foram preparadas para serem injetadas nas entradas do circuito microfluídico: Solução de NaF - a dissolução NaF foi feita em água destilada sob agitação à temperatura ambiente; Solução dos $TRCl_3$ (TR = Y, Yb e Er) – foram diluídas inicialmente em HCl puro e misturadas com concentração de 89,5% Y_2O_3, 0,5% Er_2O_3 e 10% Yb_2O_3, sob aquecimento à 100 °C e agitação até a dissolução completa dos reagentes.

Utilizando o circuito microfluídico do CHIP1 mostrado na Figura 39 e ilustrado na Figura 94 a solução de NaF foi injetada em um dos microcanais de entrada e a solução de $TRCl_3$ foi injetada na outra entrada. Não foi utilizada a entrada de ar que permaneceu fechada pelo controle de sua microválvula.

O material resultante de cada experimento foi caracterizado (para determinação das fases formadas), após secagem, por Difração de raios-X (DRX).

Figura 94 - Projeto básico do circuito microfluídico para síntese de nanocristais - CHIP1.



Fonte: AMORIM DA SILVA, T.F. e HERRERA C.C., 2018.

A Tabela 3 resume os parâmetros experimentais que resultaram na formação das fases desejadas e a proporção das mesmas determinadas por análise do difratograma experimental pelo método de Rietveld [71]. A Figura 95 mostra o difratograma de raios-x desta amostra.

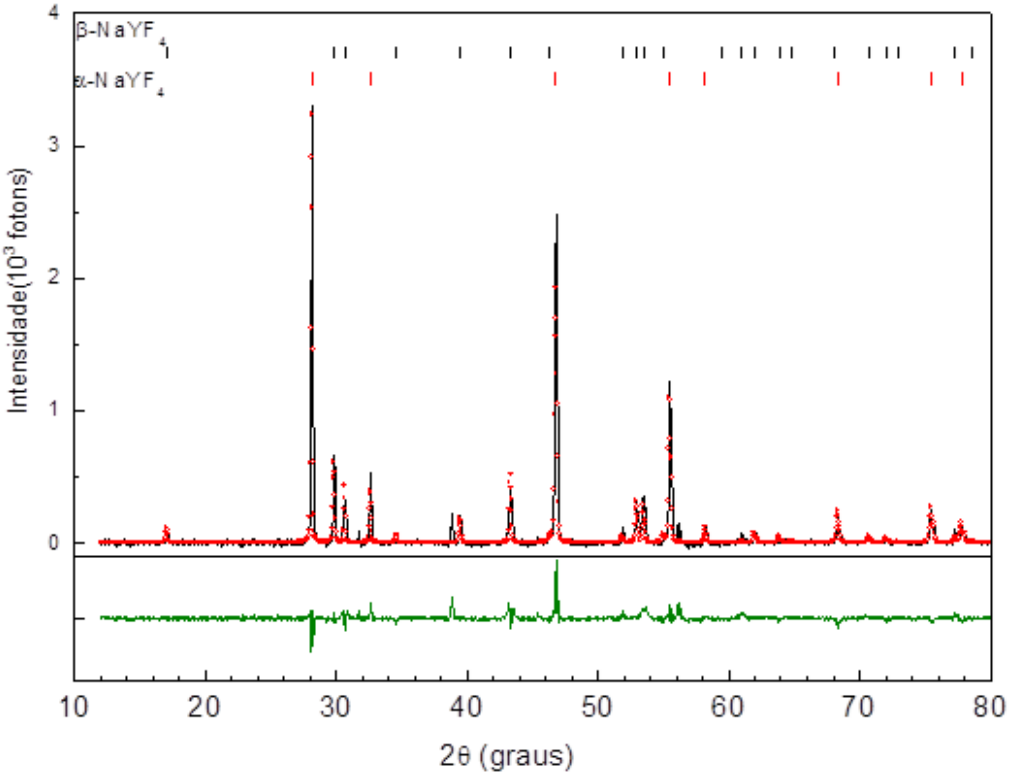
Tabela 3 - Parâmetros de síntese de $NaYF_4$:Yb:Er utilizando-se o CHIP1 e resultados observados na análise dos dados de Difração de raio-X pelo método de Rietveld.

Amostra	Fluxo NaF (ml/min)	Fluxo $TRCl_3$ (ml/min)	taxa de residência (s)	Temperatura (ºC)	Razão NaF:$TRCl_3$
1#CHIP1	0,2	0,2	1,2	80	12:1

Fases observadas	Proporção
α-$NaYF_4$:Yb^{3+}:Er^{3+} (estrutura Cubica)	69,3%
β-$NaYF_4$:Yb^{3+}:Er^{3} (estrutura Hexagonal)	30,7%
CHI[2]	3,3

Fonte: Adaptado de AMORIM DA SILVA, T.F., 2018.

Figura 95 - Resultado gráfico da análise pelo método de Rietveld do difratograma da amostra 1#CHIP1.



Fonte: AMORIM DA SILVA, T.F., 2018.

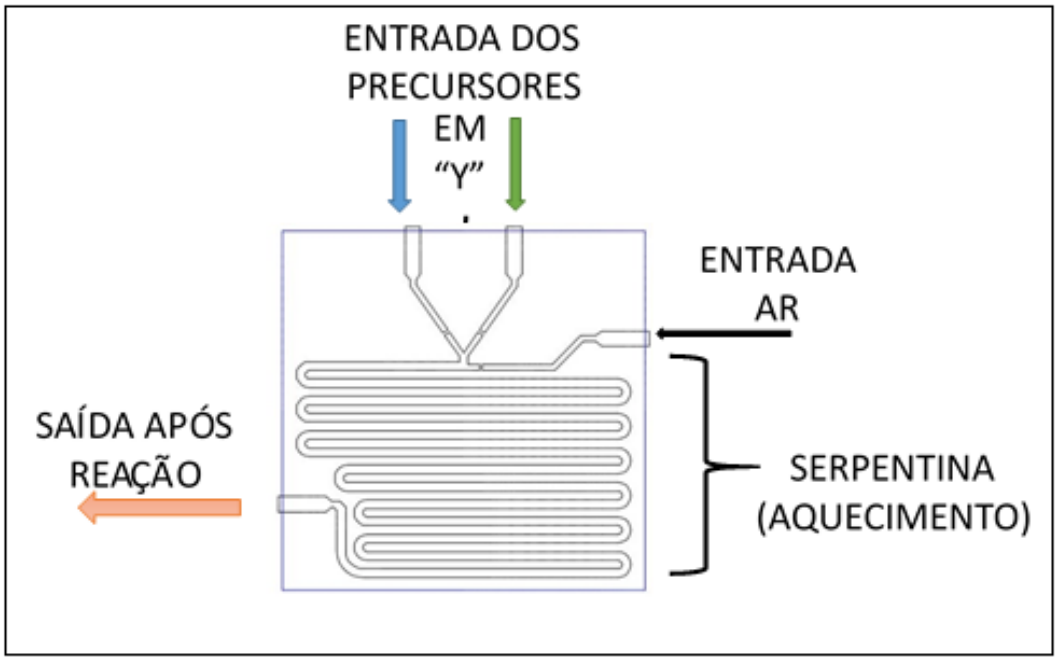
Os resultados obtidos foram satisfatórios porque houve a formação tanto da fase cúbica como da hexagonal, porém o microcircuito entupiu com muita facilidade obrigando a desmontagem e montagem do sistema inúmeras vezes. O

aumento do fluxo se mostrava necessário, porém o aumento de pressão acima de 15 psi resultava em vazamentos tanto nos conectores como através do PDMS nas regiões próximas às extremidades da placa de vidro. O aumento de pressão através dos parafusos para tentar evitar esses vazamentos acabou levando à trincagem da placa de vidro por onde os reagentes se movimentavam obrigando a usinagem de um novo microcircuito. A solução para aumentar o fluxo dos reagentes só se mostrou viável através do aumento da área da seção transversal dos microcanais.

O misturador projetado tinha a finalidade de promover uma melhor mistura, porém as reações estavam ocorrendo antes de percorrer todo o percurso do mesmo provocando o entupimento. Assim decidiu-se remover o mesmo no novo microcircuito a ser usinado.

Um novo CHIP com microcanais com 400 µm de largura e 300 µm de profundidade foi usinado. A entrada foi modificada para a forma em “Y” em substituição a forma de “T” do microcircuito anterior. Estas alterações levaram a alteração do volume total do novo *chip* chamado de CHIP2 e apresentado na Figura 96.

Figura 96 - Projeto básico do circuito microfluídico para síntese de nanocristais - CHIP2.



Fonte: AMORIM DA SILVA, T.F. e HERRERA C.C., 2018.

A Tabela 4 relaciona as condições dos experimentos realizados no CHIP2, em diferentes composições e temperatura fixa (80ºC), e resultados obtidos na análise dos difratogramas experimentais de DRX. A Figura 97 mostra os resultados desta análise na forma gráfica para o experimento 2#CHIP2.

Os dados de DRX evidenciaram a presença majoritária de YF_3 nas duas condições. Isto significa que praticamente não houve reação dos precursores. As modificações realizadas e os parâmetros adotados nesta etapa não foram adequados à síntese de $NaYF_4$. Estavam planejadas experiências adicionais, entretanto, o CHIP2 trincou após remontagem impossibilitando a sequência de testes adicionais no mesmo.

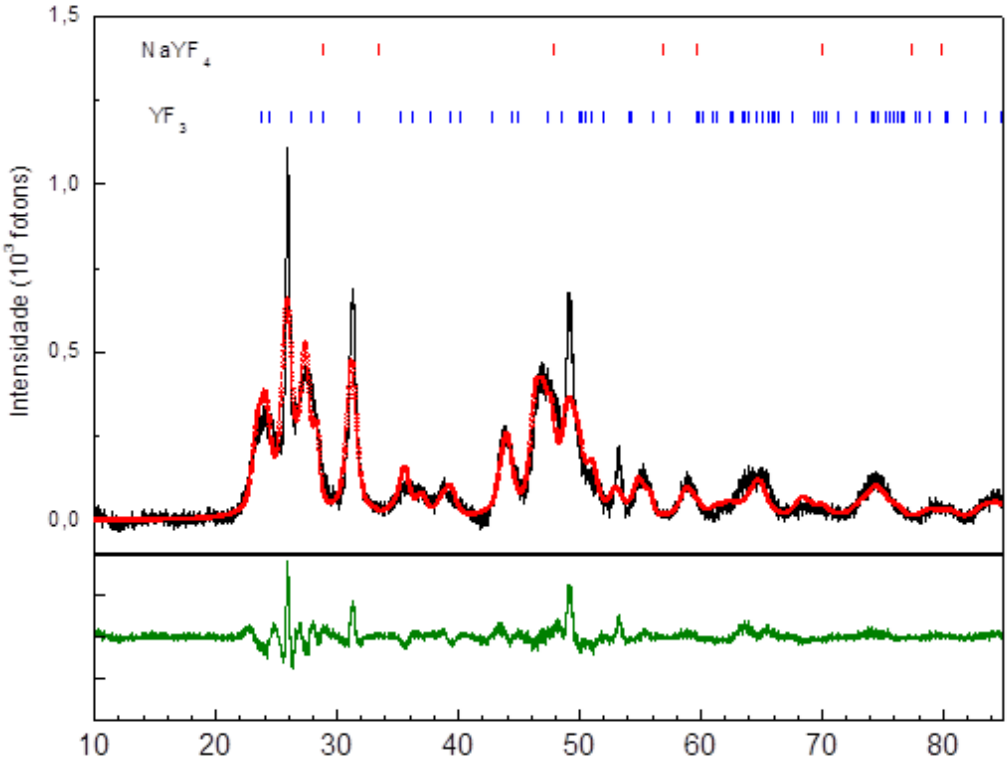
Tabela 4 - Parâmetros de síntese de $NaYF_4$:Yb:Er utilizando-se o CHIP2 e resultados observados na análise dos dados de Difração de raios-X pelo método de Rietveld.

Amostra	**Fluxo NaF (ml/min)**	**Fluxo $TRCl_3$ (ml/min)**	**taxa de residência (s)**	**Temperatura (ºC)**	**Razão NaF:$TRCl_3$**
1#CHIP2	0,8	0,8	1,8	80	6:1
2#CHIP2	0,375	0,125	5,4	80	6:1

Fases observadas	**Proporção**
1#CHIP2	
YF_3	98,2%
α-$NaYF_4$:Yb^{3+}:Er^{3+} (estrutura Cubica)	1,8%
CHI^2	4,6
2#CHIP2	
YF_3	97,8%
α-$NaYF_4$:Yb^{3+}:Er^{3+} (estrutura Cubica)	2,2%
CHI^2	4,4

Fonte: Adaptado de AMORIM DA SILVA, T.F., 2018.

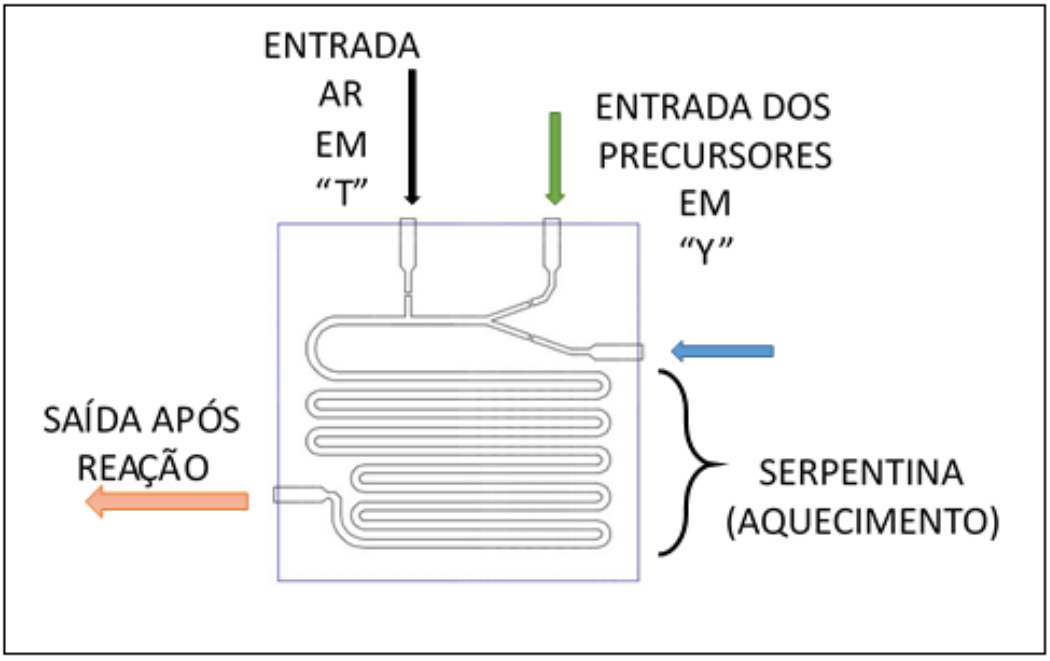
Figura 97 - Resultado gráfico da análise pelo método de Rietveld do difratograma da amostra 2#CHIP2.



Fonte: AMORIM DA SILVA, T.F., 2018.

Para dar continuidade aos experimentos, foi preparado um terceiro *Chip* onde o volume da serpentina final foi reduzido, pois os microcanais foram reduzidos em comprimento. Esta modificação resultou em melhor vedação e consequentemente na eliminação dos vazamentos detectados no CHIP2. A Figura 98 apresenta o projeto do CHIP3; observa-se também que a configuração de entrada em forma de “Y” foi modificada para que a entrada de ar ficasse numa posição do microcircuito onde os reagentes já tivessem percorrido um pequeno trecho dentro do microcanal.

Figura 98 - Projeto básico do circuito microfluídico para síntese de nanocristais - CHIP3.



Fonte: AMORIM DA SILVA, T.F. e Herrera C.C., 2018

A Tabela 5 relaciona as condições dos experimentos realizados no CHIP3, em diferentes composições e temperatura fixa (80ºC) , e os resultados obtidos na análise dos difratogramas experimentais de DRX pelo método de Rietveld. A Figura 99 mostra os resultados desta análise na forma gráfica para o experimento 6#CHIP3 que obteve o melhor resultado.

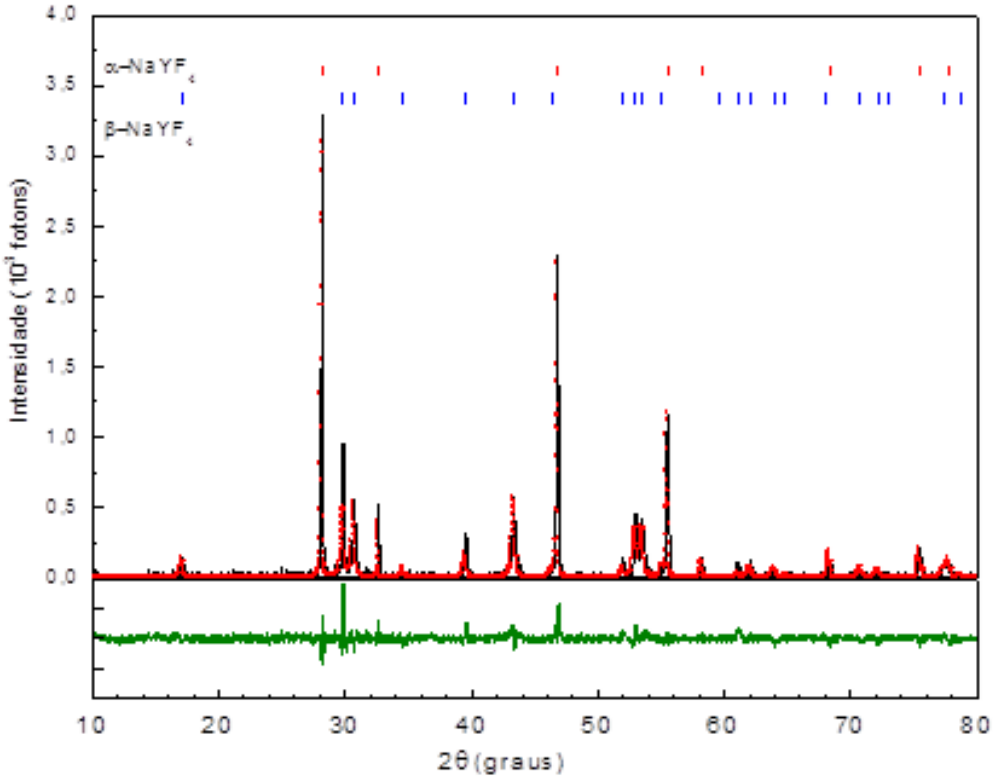
Tabela 5 - Parâmetros de síntese de $NaYF_4$:Yb:Er utilizando-se o CHIP3 e resultados observados na análise dos dados de Difração de raio-X pelo método de Rietveld.

Amostra	Fluxo NaF (ml/min)	Fluxo $TRCl_3$ (ml/min)	taxa de residência (s)	Temperatura (ºC)	Razão NaF:$TRCl_3$
2#CHIP3	7,275	2,425	0,3	80	6:1
4#CHIP3	9,975	3,325	0,2	80	9:1
6#CHIP3	1,05	0,35	1,8	80	12:1

Fases observadas	Proporção
2#CHIP3	
α-$NaYF_4$:Yb^{3+}:Er^{3+} (estrutura Cubica)	14,1%
β-$NaYF_4$:Yb^{3+}:Er^3(estrutura Hexagonal)	14,6%
YF_3	71,3%
CHI^2	3,3
4#CHIP3	
α-$NaYF_4$:Yb^{3+}:Er^{3+} (estrutura Cubica)	91,3%
β-$NaYF_4$:Yb^{3+}:Er^3(estrutura Hexagonal)	7,4%
YF_3	1,3%
CHI^2	1,8
6#CHIP3	
α-$NaYF_4$:Yb^{3+}:Er^{3+} (estrutura Cubica)	57,9%
β-$NaYF_4$:Yb^{3+}:Er^3(estrutura Hexagonal)	42,1%
YF_3	-x-
CHI^2	2,0

Fonte: Adaptado de AMORIM DA SILVA, T.F., 2018.

Figura 99 - Resultado gráfico da análise pelo método de Rietveld da amostra 6#CHIP3.

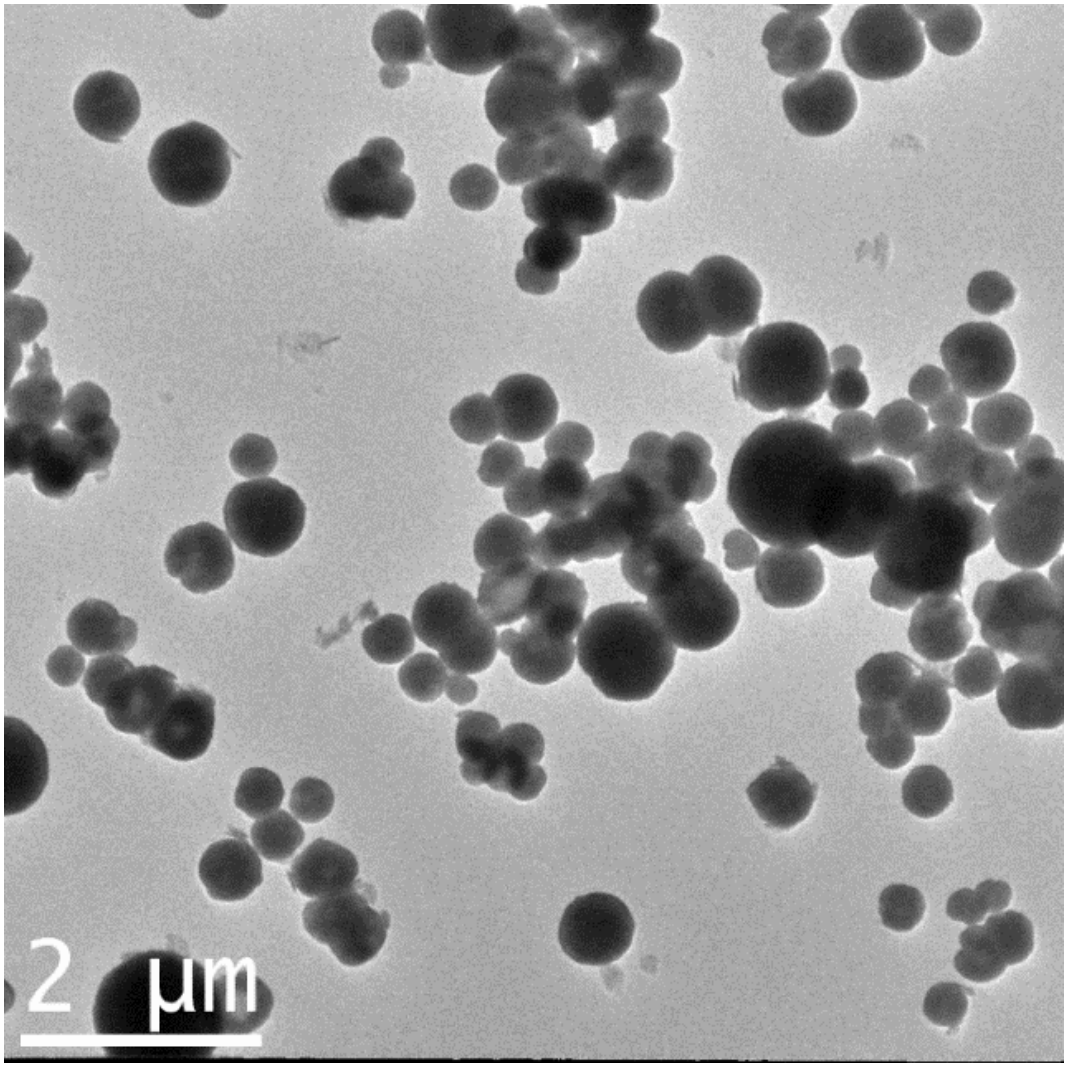


Fonte: AMORIM DA SILVA, T.F., 2018.

Observamos a formação de $NaYF_4:Yb^{3+}:Er^{3+}$ em todos os experimentos embora em diferentes concentrações, indicando a adequação do CHIP3 para obtenção de nanopartículas deste composto fluoreto. A razão $NaF:TRCl_3$ de 12:1 eliminou a formação de YF_3 e gerou a maior proporção da fase hexagonal almejada. Os resultados obtidos no CHIP1, que também geraram a formação da fase hexagonal, também apresentavam a razão $NaF:TRCl_3$ de 12:1, o que reforça ser esta a razão ideal para dar prosseguimento às pesquisas.

A Figura 100 mostra uma foto obtida por microscopia eletrônica de transmissão da amostra produzida neste *chip* indicando a formação de partículas esféricas com dimensões da ordem de 50~200 nm. Para controle da dimensão e fases das partículas produzidas, serão necessários estudos adicionais dos parâmetros de síntese empregados (fluxo de reagentes, temperatura e composição).

Figura 100 - Microscopia eletrônica de transmissão de amostra obtida no CHIP3.



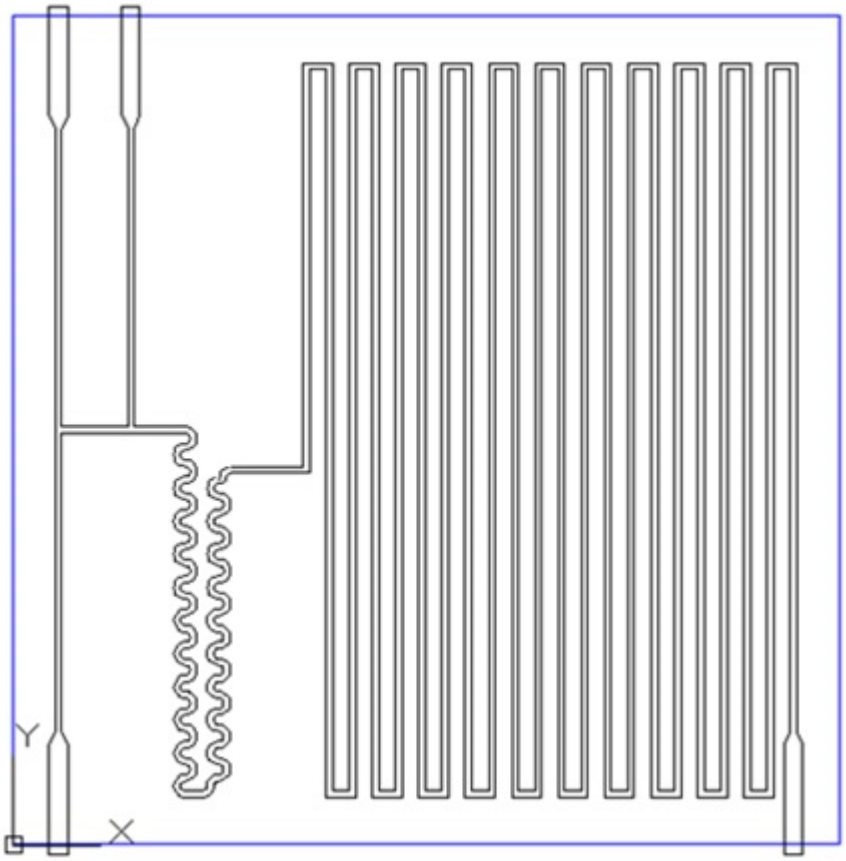
Fonte: AMORIM DA SILVA, T.F., 2018.

5.4 Simulador de fluxo - Microcircuito para síntese de nanocristais

Inicialmente o circuito proposto para a síntese de nanocristais previa, no microrreator, alterações de direção do fluxo com ângulos de 90º conforme mostrado na Figura 101, mas uma primeira dúvida que surgiu foi a de que curvas circulares no microrreator, ilustrada na Figura 102, talvez produzissem um melhor resultado em termos de mistura entre dois reagentes.

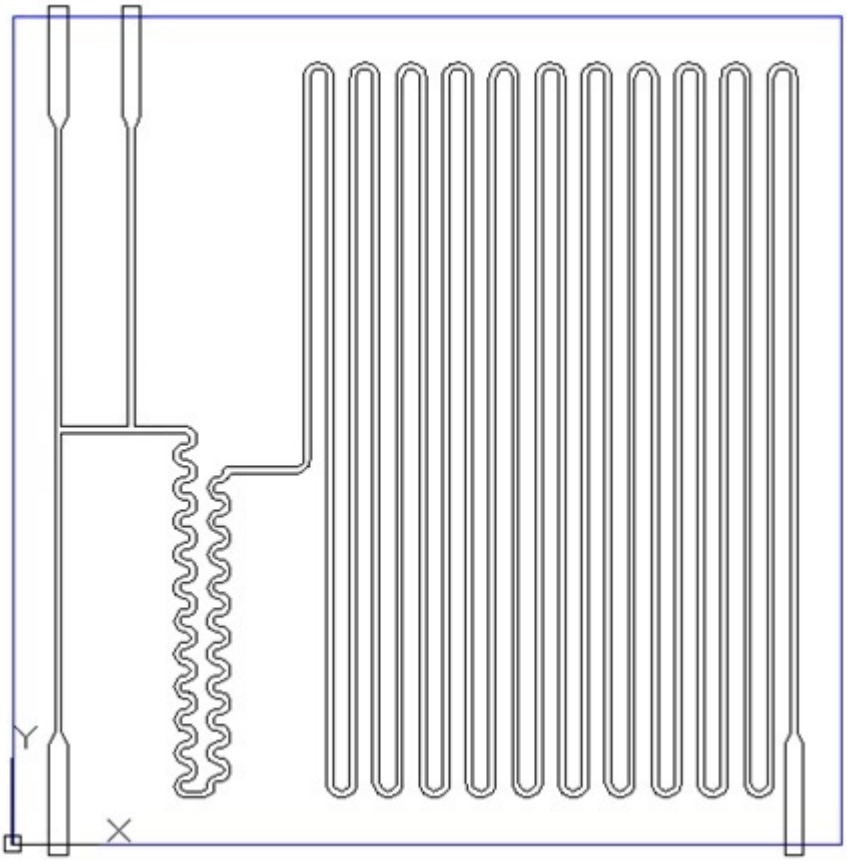
O resultado da simulação mostrou que realmente as curvas circulares promovem uma melhor mistura entre dois reagentes distintos e as mesmas foram adotadas nos microcircuitos construídos [80].

Figura 101 - Desenho do primeiro microcircuito proposto para síntese de nanocristais. O mesmo não foi usinado porque o simulador de fluxo indicou que curvas circulares promovem uma melhor mistura.



Fonte: autor da tese.

Figura 102 - Desenho do primeiro circuito usinado para síntese de nanocristais.



Fonte: autor da tese.

Com o início dos testes foi detectado que a vazão máxima atingida sem que houvesse vazamentos pelas mangueiras e rompimento do vidro ainda estava abaixo das vazões desejadas para a produção dos nanocristais.

A utilização do CFD ajudou a determinar o comportamento dos fluidos dentro dos microcanais permitindo verificar a efetividade do misturador e do reator projetados para a síntese de nanocristais [80] e reforçaram que a decisão de alargar os microcanais para permitir um fluxo maior sem grande elevação de pressão e melhorar a mistura dos reagentes dentro dos microcanais foi correta.

6 CONCLUSÕES

Com os experimentos realizados podemos tirar algumas conclusões.

Foram obtidos parâmetros de processo para usinagem de vidro óptico BK7, que levaram a qualidade de usinagem com bom acabamento superficial, com boa precisão dimensional e sem danos importantes na região adjacente.

Com a utilização da Estação 2 de usinagem foi possível melhorar a qualidade da microusinagem em relação à obtida pela Estação 1, verificada tanto pela Perfilometria como pelo MEV. O ângulo de inclinação das paredes laterais dos microcanais passaram de aproximadamente 75% para acima de 85%. O fato da Estação 2 possuir 3 eixos em vez de 2 da Estação 1 permitiu que todo o processo de usinagem fosse automatizado reduzindo consideravelmente o tempo de confecção dos circuitos microfluídicos.

As microválvulas desenvolvidas mostraram-se muito eficientes permitindo o controle de fluxos da ordem de dezenas de nanolitros por minuto a centenas de microlitros por minuto com boa precisão, bastando apenas alguns ensaios para ajustes do controle em função da viscosidade dos reagentes.

A microbomba desenvolvida foi testada com três tipos de chaveamentos e mostraram ser possível o controle de fluxo dos reagentes quando da impossibilidade de ser utilizada uma pressão externa para movimentar os mesmos.

O controle de temperatura para aquecimento global do circuito funciona à contento, utilizando um controle PI, permitindo um controle com no máximo +-1,5 ºC de desvio do valor desejado.

O controle de temperatura localizado foi patenteado [82] e nos testes efetuados mostrou a eficiência da texturização por LIPSS do aço inoxidável. Os degraus de aumento de temperatura em função do aumento da potência do feixe laser mostrou que a resposta do sistema é muito rápida, sendo possível atingir um novo patamar de temperatura em tempos muito reduzidos (ms).

Os testes com o sistema para realização do teste ELISA mostraram ser eficientes e a mudança da coloração foi obtida em 20 minutos indicando a presença do antígeno de cascavel e também de jararaça.

Dos três microcircuitos produzidos para síntese de nanocristais o que apresentou os melhores resultados em termos de obtenção de nanopartículas com estruturas hexagonais foi o CHIP3. Foram obtidas nanopartículas com tamanhos de 50 a 200 nm.

7 TRABALHOS FUTUROS

As bolhas de ar geradas dentro dos poços da microbomba, provocando variações maiores nas medidas de vazões representam um problema a ser analisado, pois na produção do radiofármaco (^{18}F-FDG) torna-se necessário um controle mais preciso sobre a vazão dentro de um reator fechado.

Para dispensar o teste do falso positivo em placa de poços no sistema ELISA, um novo circuito microfluídico foi projetado com dois microcircuitos, um para detecção do veneno e outro para o falso positivo para garantir a veracidade do resultado do teste. A usinagem é uma das etapas subsequentes onde testes para redução dos tempos das reações também serão feitos. Experimentos devem ser feitos para o caso de detecção da toxoplasmose, ou outra doença de interesse. Um projeto mais ambicioso é construir um sistema totalmente automatizado, alimentado por uma bateria de celular, capaz de efetuar testes de doenças em qualquer região do Brasil.

Estudos precisam ser feitos para controle do tamanho das nanopartículas e a verificação da luminescência através de um Espectrômetro.

Válvulas peneira, onde o líquido pode fluir normalmente, mas micropartículas a partir de um diâmetro desejado são aprisionadas é um componente cujo desenvolvimento está sendo inicializado. Essa válvula é necessária no sistema microfluídico para a produção do radiofármaco (^{18}F-FDG).

Os componentes e processos desenvolvidos neste trabalho servirão de base para a produção de um circuito dedicado à produção do radiofármaco (^{18}F FDG), que é um dos principais radiofármacos produzidos pelo IPEN e que atende a todo o país.

8 TRABALHOS PUBLICADOS

Este trabalho possibilitou a publicação de um artigo em periódico internacional.

PERES, J. C. G.; HERRERA, C. C.; VIANNA JR, A. S.; BALDOCHI, S. L.; ROSSI, W. Analysis of a Microreactor for Synthesizing Nanocrystals by Computational Fluid Dynamics. ***The Canadian Journal of Chemical Engineering***, 2018. DOI: 10.1002/cjce.23356

Este trabalho também permitiu a publicação de cinco resumos expandidos em *Workshops* Nacionais.

HERRERA, C. C.; ROSSI, W. ; SAMAD, R. E. ; VIEIRA JR, N. D. . ***Development and control of microfluidic systems***. In: I Workshop INFO - Phase II, 2017, Recife. I Workshop INFO - Phase II, 2017.

SILVA, T. F. A. ; BALDOCHI, S. L. ; HERRERA, C. C. ; MAZZOCCHI, V. L. ; ROSSI, W. ; VIANNA JUNIOR, A. S. . ***Study of different production processes of doped rare earth fluorides nanoparticles: co-precipitation and microfluidics.*** In: I Workshop INFO - Phase II, 2017, Recife. I Workshop INFO - Phase II, 2017.

ROSSI, W. ; HERRERA, C. C. ; VIEIRA JR, N. D. ; SAMAD, R. E. . ***Microfluidic devices produced by micromachining with ultra-short laser pulses.*** In: VII Workshop em Microfluídica, 2017, São Paulo. Anais do VII Workshop em Microfluídica, 2017.

HERRERA, C. C.; ROSSI, W. ; RIBEIRO, M. S. ; SPENCER, P. J. ; SAMAD, R. E. ; VIEIRA JR, N. D. . ***Development of a Microfluidic Circuit with Femtosecond Laser Technology for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Validation.*** In: VII Workshop em Microfluídica, 2017, São Paulo. Anais do VII Workshop em Microfluídica, 2017.

SILVA, T. F. A. ; HERRERA, C. C. ; VIANNA JUNIOR, A. S. ; ROSSI, W. ; MAZZOCCHI, V. L. ; SAMAD, R. E. ; VIEIRA JR, N. D. ; BALDOCHI, S. L. . ***Microfluidic Synthesis of NaF4:Yb/Er Nanoparticles.*** In: VII Workshop em Microfluídica, 2017, São Paulo. Anais do VII Workshop em Microfluídica, 2017.

9 PATENTE

A criação de um dispositivo aquecedor com controle de temperatura para microrreatores permitiu o registro de uma patente.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. Wagner de Rossi; Ricardo Elgul Samad; Nilson Dias Vieira Jr; Leandro Gusmão da Silva; Cristhiano da Costa Herrera. ***Dispositivo de Aquecimento e Controle de Temperatura para Microrreatores***. BR 10 2017 023705 2,03 de novembro de 2018.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 WHITESIDES, G. M. The origins and future of microfluidics. ***Nature***, v. 442, p. 368-373, 2006.

2 WHITESIDES, G. M.; STROOCK, A. D. Flexible Methods for Microfluidics. ***Physics Today***, American Institute of Physic, p. 42-48, 2001.

3 OHASHI, T.; MAWATARI, K.; SATO, K.; TOKESHI, M.; KITAMORI, T. A micro-ELISA system for the rapid and sensitive measurement of total and specific immunoglobulin E and clinical application to allergy diagnosis. ***Lab on a Chip***, v. 9, p. 991-995, 2009.

4 MCDONALD, J. C.; ANDERSSON, J. R.; CHIU, D. T.; WU, H.; SCHUELLER, O. J. A.; WHITESIDES, G. M. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). ***Electrophoresis 2000***, v. 21, p. 27-40, 2000.

5 DUBUC, D.; CHEN, T.; CHRÉTIENNOT, T.; POUPOT, M.; FOURNIÉ, J. Microfluidic On-Chip for Biomedical Applications. ***IEEE***, p. 129-132, 2011.

6 ELISA. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2018. <Disponível em: https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=ELISA&oldid=52538939 >. Acesso em: 2 jul. 2018.

7 LAI, S.; WANG, S.; LUO, J.; LEE, L. J.; YANG, S. T.; MADOU, M. J. Design of a Compact Disk-like Microfluidic. ***Analytical Chemistry***, v. 76, p. 832-837, 2004.

8 LIU, H. C.; JAKOBSSON, O.; XU, C. T.; XIE, H. Y.; LAURELL, T.; ANDERSSON-ENGELS, S. Synthesis of NaYF4: $Yb3^{+,}$ Er^{3+} upconverting nanocrystals in a capillary-based continuous microfluidic reaction system. ***Colloidal Quantum Dots / Nanocrystals for Biomedical Applications VI***, v. 7909, 2011.

9 CHENG, J.; LIU, C. S.; SHANG, S.; LIU, D.; PERRIE, W.; DEARDEN, G.; WATKINS, K. A review of ultrafast laser materials micromachining. ***Optics & Laser Technology***, ELSEVIER, v. 46, p. 88-102, 2013.

10 SUN, L. Q.; KOBAYASHI, M.; MORI, T.; KAWAI, K. I.; FUJIBAYASHI, Y. Studies on Automation of Preparation of [18F]FACBC Using a Commercial Synthesizer. ***IEEE***, p. 1145-1148, 2007.

11 LEE, C. C.; SUI, G. D.; ELIZAROV, A.; SHU, C. Y. J.; SHIN, Y. S.; DOOLEY, A. N.; HUANG, J.; DARIDON, A.; WYATT, P.; STOUT, D.; KOLB, H. C.; WITTE, O. N.; SATYAMURTHY, N.; HEATH, J. R.; PHELPS, M. E.; QUAKE, S. R.; TSENG, H. R. Multistep synthesis of a radiolabeled imaging probe using integrated microfluidics. ***Science***, v. 310, p. 1793-1796, 2005.

12 ELIZAROV, A. M.; VAN DAM, R. M.; SHIN, Y. S.; KOLB, H. C.; PADGETT, H. C.; STOUT, D.; SHU, J.; HUANG, J.; DARIDON, A.; HEATH, J. R. Design and Optimization of Coin-Shaped Microreactor Chips for PET Radiopharmaceutical Synthesis. ***The Journal of Nuclear Medicine***, v. 51, p. 282-287, 2010.

13 WANG, M. W.; LIN, W. Y.; LIU, K.; MASTERMAN-SMITH, M.; SHEN, C. K. F. Microfluidics for Positron Emission Tomography Probe Development. ***Molecular Imaging***, v. 9, p. 175-191, 2010.

14 BEN-YAKAR, A.; BYER, R. L. Femtosecond laser ablation properties of borosilicate glass. ***Journal of Applied Physics***, American Institute of Physics, v. 96, p. 5316-5323, 2004.

15 GAMALY, E. G.; RODE, A. V.; TIKHONCHUK, V. T.; LUTHER-DAVIES, B. Ablation of solids by femtosecond lasers: ablation mechanism and ablation thresholds for metals and dielectrics. ***Physical of Plasmas***, v. 9, p. 949-957, 2002.

16 HARILAL, S. S.; FREEMAN, J. R.; DIWAKAR, P. K.; HASSANEIN, A. Femtosecond Laser Ablation: Fundamentals and Applications. In: ***Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*** MUSAZZI, S.; PERINI, U. (Eds.), Springer Series in Optical Sciences, 2014, Vol. 182, p. 143-166.

17 RETHFELD, B.; IVANOV, D. S.; GARCIA, M. E.; ANISIMOV, S. I. Modelling ultrafast laser ablation. ***Journal of Physics D:*** Applied Physics, IOP Publishing Ltd, v. 50, 2017.

18 SURIANO, R.; HKUZNETSOV, A.; EATON, S. M.; KIYAN, R.; CERULLO, G.; OSELLAME, R.; CHICHIKOV, B. N.; LEVI, M.; TURRI, S. Femtosecond laser ablation of polymeric substrates for the fabrication of microfluidic channels. ***Applied Surface Science***, Elsevier, v. 257, p. 6243–6250, 2011.

19 NEDIALKOV, N. N.; IMAMOVA, S. E.; ATANASOV, P. A. Ablation of metals by ultrashort laser pulses. ***Journal of Physics D:*** *Applied Physics*, v. 37, p. 638-643, 2004.

20 SONNTAG, S. ***Computer Simulations of Laser Ablation from Simple Metals to Complex Metallic Alloys.*** 2010. 130 p. Tese (Doctor of Natural Sciences) University of Stuttgart

21 STEEN, W. M.; MAZUNDER, J. ***Laser Material Processing***. 4. ed. London: Springer, 2010.

22 STROOCK, A. D. Microfluidics. In: ***Optical Biosensors:*** Today and Tomorrow, LIGLER, F. S.; TAITT, C. R. (Eds.), New York, 2008, p. 659-682.

23 NGUYEN, N. T.; WERELEY, S. T. ***Fundamentals and Applications of Microfluidics***. Boston: Artech House, 2002.

24 BRUUS, H. ***Theoretical Microfluidics***. New York: Oxford University Press, 2008.

25 BROWN, M. S.; ARNOLD, C. B. ***Fundamentals of Laser-Material Interaction and Application to Multiscale Surface Modification***. In: Laser Precision Microfabrication, Springer-Verlag, 2010, p. 91-120.

26 CHICHIKOV, B. N.; MOMMA, C.; NOLTE, S.; ALVENSLEBEN, F. V.; TIINNERMANN, A. Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids. ***Applied Physics A*** - *Materials Science & Processing*, Springer-Verlag, v. 63, p. 109-115, 1996.

27 BÄUERLE, D. ***Laser Processing and Chemistry***. 4. ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.

28 MOMMA, C.; CHICHKOV, B. N.; NOLTE, S.; ALVENSLEBEN, F. V.; TIINNERMANN, A.; WELLING, H.; WELLEGEHAUSEN, B. Short-pulse laser ablation of solid targets. ***Optics Communications***, Elsevier, v. 129, p. 134-I42, 1996.

29 ALLMEN, M. V.; BLATTER, A. ***Laser-Beam Interactions with Materials*** - Physical Principles and Applications. 2. ed. Springer, 1995. (Springer Series in Materials Science).

30 DARWISH, S. M. H.; ASMED, N.; AL-AHMARI, A. M. ***Laser Beam Micro-milling of Micro-channels in Aerospace Alloys***. DARWISH, S. M. H.; ASMED, N., et al. (Eds.) Singapore: Springer, 2017. (Advanced Structured Materials 68).

31 MACHADO, L. M. ***Microusinagem de dielétricos com pulsos laser de femtossegundos.*** 2012. 143 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

32 RULLIÈRE, C. ***Femtosecond Laser Pulses*** - *Principles and Experiments*. 2. ed. RULLIERE, C. (Ed.) France: Springer, 2004.

33 HYPSH, S. ***Femtosecond Laser Processing Overcomes Barriers for Use in Medical Device Manufacturing***. v. 172, p. 26-29, 2014.

34 SAMAD, R. E.; MACHADO, L. M.; VIEIRA JR, N. D.; ROSSI, W. Ultrashort Laser Pulses Machining. Laser Pulses – Theory, Technology, and Applications, ***INTECH***, p. 143-174, 2012.

35 MACHADO, L. M.; SAMAD, R. E.; VIEIRA JR, N. D.; ROSSI, W. Microchannels Direct Machining using the Femtosecond Smooth Ablation Method. ***Physics Procedia***, Elsevier, v. 12, p. 67-75, 2011.

36 ASHKENASI, D.; ROSENFELD, A.; STOIAN, R. Laser-induced incubation in transparent materials and possible consequences for surface and bulk micro-structuring with ultrashort pulses. High-Power Lasers and Applications, ***Proc. SPIE***, California, 2002.

37 BONSE, J.; KIRNER, S. V.; HÖHM, S.; EPPERLEIN, N.; SPALTMANN, D. Applications of laser-induced periodic surface structures (LIPSS). ***Proc SPIE***, v. 10092, 2017.

38 REBOLLAR, E.; CASTILLEJO, M.; EZQUERRA, T. A. Laser induced periodic surface structures on polymer films: From fundamentals to applications. ***European Polymer Journal***, ELSEVIER, v. 73, p. 162–174, 2015.

39 BONSE, J.; ROSENFELD, A.; KRÜGER, J. On the role of surface plasmon polaritons in the formation of laser-induced periodic surface structures upon irradiation of silicon by femtosecond laser pulses. ***Journal of Applied Physics***, v. 106, 2009.

40 HEITZ, J.; REISINGER, B.; FAHRNER, M.; ROMANIN, C.; SIEGEL, J.; SVORCIK, V. Laser-Induced Periodic Surface Structures (LIPSS) on Polymer Surfaces. ***IEEE***, 2012.

41 BOROWIEC, A.; HAUGEN, H. K. Subwavelength ripple formation on the surfaces of compound semiconductors irradiated with femtosecond laser pulses. ***Applied Physics Letters***, American Institute of Physics, v. 82, p. 4462-4464, 2003.

42 DUSSER, B.; SAGAN, Z.; SODER, H.; FAURE, N.; COLOMBIER, J. P.; JOURLIN, M.; AUDOUARD, E. Controlled nanostructrures formation by ultra fast laser pulses for color marking. ***OPTICS EXPRESS***, v. 18, 2010.

43 AGEEV, E. I.; VEIKO, V. P.; VLASOVA, E. A.; KARLAGINA, Y. Y.; KRIVONOSOV, A.; MOSKVIN, M. K.; ODINTSOVA, G. V.; PSHENICHNOV, V. E.; ROMANOV, V. V.; YATSUG, R. M. Controlled nanostructures formation on stainless steel by short laser pulses for products protection against falsification. ***OPTICS EXPRESS***, v. 26, 2018.

44 AHSAN, M. S.; AHMED, F.; KIM, Y. G.; LEE, M. S.; JUN, M. B. G. Colorizing stainless steel surface by femtosecond laser induced micro/nano-structures. ***Applied Surface Science***, Elsevier, v. 257, p. 7771–7777, 2011.

45 HWANG, T. Y.; GUO, C. Angular effects of nanostructure-covered femtosecond laser induced periodic surface structures on metals. ***Journal of Applied Physics***, American Institute of Physics, v. 108, 2010.

46 ROSSI, W.; MACHADO, L. M.; SAMAD, R. E.; FREITAS, A. Z. D.; MIRIM, D. D. C.; VIEIRA JR, N. D. ***Usinagem de circuitos microfluídicos com laser de pulsos ultracurtos***. In 7º Congresso Brasileiro de Engenharia de Fabricação, 15-19 Abr., Penedo, Rio de Janeiro, Brasil, 2013.

47 LIU, J. M. Simple technique for measurements of pulsed Gaussian-beam spot sizes. ***Optics Letters***, Optical Society of America, v. 7, p. 196-198, 1982.

48 MACHADO, L. M.; SAMAD, R. E.; ROSSI, W.; VIEIRA JR, N. D. D-Scan measurement of ablation threshold incubation effects for ultrashort laser pulses. ***OPTICS EXPRESS***, v. 20, 2012.

49 SAMAD, R. E.; VIEIRA JR, N. D. Geometrical Method for Determining the Surface Damage Threshold for Femtosecond Laser Pulses. ***NONLINEAR OPTICS AND SPECTROSCOPY***, v. 16, p. 336-339, 2005.

50 CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; MINEO, J. R.; TAKIGUTI, C. K.; NAKAHARA, O. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. ***American Society for Microbiology -*** *Infection and Immunity*, v. 21, p. 55-58, 1978.

51 KAI, J.; PUNTAMBEKAR, A.; SANTIAGO, N.; LEE, S. H.; SEHY, D. W.; MOORE, V.; HAN, J.; AHN, C. H. A novel microfluidic microplate as the next generation assay platform for enzyme linked immunoassays ELISA. ***Lab on a Chip***, v. 12, p. 4257–4262, 2012.

52 NAOT, Y.; REMINGTON, J. S. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of IgM Antibodies to Toxoplasma gondii - Use for Diagnosis of Acute Acquired Toxoplasmosis. ***The Journal of Infectious Diseases***, Oxford University Press, v. 142, p. 757-766, 1980.

53 NOVO, P.; MOULAS, G.; PRAZERES, D. M. F.; CHU, V.; CONDE, J. P. Detection of ochratoxin A in wine and beer by chemiluminescence-based ELISA in microfluidics with integrated photodiodes. ***Sensors and Actuators B:*** Chemical, ELSEVIER, p. 232-240, 2013.

54 HOEGGER, D.; MORIER, P.; VOLLET, C.; HEINE, D.; REYMOND, F.; ROSSIER, J. S. Disposable microfluidic ELISA for the rapid determination of folic acid content in food products. ***Anal Bioanal Chem***, Springer-Verlag, v. 387, p. 267–275, 2007.

55 CONSTANTINI, F.; SBERNA, C.; PETRUCCI, G.; MANETTI, C.; CESARE, G. D.; NASCETTI, A.; CAPUTO, D. Lab-on-chip system combining a microfluidic-ELISA with an array of amorphous silicon photosensors for the detection of celiac disease epitopes. ***Sensing and Bio-Sensing Research***, v. 6, p. 51-58, 2015.

56 HERRMANN, M.; ROY, E.; VERES, T.; TABRIZIAN, M. Microfluidic ELISA on non-passivated PDMS chip using magnetic bead transfer inside dual networks of channels. ***Lab on a Chip***, The Royal Society of Chemistry, v. 7, p. 1546–1552, 2007.

57 CHIN, C. D.; LAKSANASOPIN, T.; DHEUNG, Y. K.; STEINMILLER, D.; LINDER, V.; PARSA, H.; WANG, J.; MOORE, H.; ROUSE, R.; UMVILIGIHOZO, G.; KARITA, E.; MWAMBARANGWE, L.; BRAUSNTEIN, S. L.; WIJGERT, J. V. D.; SAHABO, R.; JUSTMAN, J. E.; EL-SADR, W.; SIA, S. K. Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing word. ***Nature Medicine***, v. 17, p. 1015-1020, 2011.

58 CHEN, G.; QIU, H.; PRASAD, P. N.; CHEN, X. Upconversion: Nanoparticles Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. ***Chemical Review***, American Chemical Society, v. 114, p. 5161−5214, 2014.

59 YI, G.; LU, H.; ZHAO, S.; GE, Y.; YANG, W.; CHEN, D.; GUO, L. H. Synthesis, Characterization, and Biological Application of Size-Controlled Nanocrystalline NaYF4:Yb,Er Infrared-to-Visible Up-Conversion Phosphors. ***Nano Letters***, American Chemical Society, v. 4, p. 2191-2196, 2004.

60 YI, G. S.; CHOW, G. M. Synthesis of Hexagonal-Phase NaYF4:Yb,Er and NaYF4:Yb,Tm Nanocrystals with Efficient Up-Conversion Fluorescence. ***WILEY InterScience***, p. 2324–2329, 2006.

61 MARRE, S.; JENSEN, K. F. Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. ***Chemical Society Reviews***, v. 39, p. 1183–1202, 2010.

62 YEN, B. K. H.; GÜNTHER, A.; SCHMIDT, M. A.; JENSEN, K. F.; BAWEND, M. G. A Microfabricated Gas–Liquid Segmented Flow Reactor for High-Temperature Synthesis - The Case of CdSe Quantum Dots. ***Angewandte Chemie***, v. 44, p. 5447 –5451, 2005.

63 HUNG, L.-H.; LEE, A. P. Microfluidic Devices for the Synthesis of Nanoparticles and Biomaterials. ***Journal of Medical and Biological Engineering***, v. 27, p. 1-6, 2007.

64 ZHAO, C.-X.; HE, L.; QIAO, S. Z.; MIDDELBERG, A. P. J. Nanoparticle synthesis in microreactors. ***Chemical Engineering Science***, Elsevier, v. 66, p. 1463–1479, 2011.

65 RAN, R.; SUN, Q.; BABY, T.; WIBOWO, D.; MIDDELBERG, A. P. J.; ZHAO, C.-X. Multiphase microfluidic synthesis of micro- and nanostructures for pharmaceutical applications. ***Chemical Engineering Science***, Elsevier, 2017.

66 SHAN, J.; QIN, X.; YAO, N.; JU, Y. Synthesis of monodisperse hexagonal NaYF4:Yb, Ln (Ln = Er, Ho and Tm) upconversion nanocrystals in TOPO. ***Nanotechnology***, IOP Publishing Ltd, v. 18, 2007.

67 SARAKOVSKIS, A.; VOSS, M.; DOKE, G.; JANKOVICA, D.; GRUBE, J. Synthesis of cubic and hexagonal $NaYF_4:Er^{3+}$. ***Materials Science and Engineering***, IOP Publishing, v. 38, 2012.

68 FENG, W.; ZHU, X.; LI, F. Recent advances in the optimization and functionalization of upconversion nanomaterials for in vivo bioapplications. ***NPG Asia Materials***, Nature, v. 5, 2013.

69 ZHANG, F. ***Photon Upconversion Nanomaterials***. LOCKWOOD, D. J. (Ed.) Springer-Verlag, 2015. (Nanostructure Science and Technology).

70 BUNACIU, A. A.; UDRISTIOIU, E. G.; ABOUL-ENEIN, H. Y. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. ***Critical Reviews in Analytical Chemistry***, v. 45, p. 289-299, 2015.

71 RIETVELD, H. M. A Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic Structures. ***Journal of Applied Crystallography***, v. 2, p. 65-71, 1969.

72 GUARNIERI, A. A. ***Utilização do Método de Rietveld no Estudo Estrutural dos Compostos $K_2Mo_xW_{(1-x)}O_4$.*** 2005. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

73 KONISHI, S.; JEONG, O. C. Fabrication of All PDMS Micro Pump. International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, ***IEEE***, Nov. 7-9, Nagoya University, 2005.

74 JEONG, O. C.; KONISHI, S. Fabrication and drive test of pneumatic PDMS micro pump. ***Sensors and Actuators A:*** Physical, ELSEVIER, p. 849–856, 2007.

75 JEONG, O. C.; MORIMOTO, T.; WATANABE, Y.; KONISHI, S. Peristaltic PDMS pump with perfect dynamic valves for both gas and liquid. In 2006 MEMS, ***IEEE***, Jan. 22-26, Istanbul, Turkey, p. 782-785, 2006.

76 KNIGHT, M.; HOUSE, J. Design and fabrication of a peristaltic micropump. ***Design, Test, Integration and Packaging of MEMS/MOEMS***, p. 290-294, 2003.

77 HSU, Y. C.; LE, N. B. Equivalent electrical network for performance characterization of piezoelectric peristaltic micropump. ***Microfluid Nanofluid***, Springer, p. 237-248, 2009.

78 SMITS, J. G. Piezoelectric Micropump with Three Valves Working Peristaltically. ***Sensors and Actuators A:*** Physical, ELSEVIER, v. 21, p. 203-206, 1990.

79 TUANTRANONT, A.; MAMANEE, W.; LOMAS, T.; PORNTHEERAPAT, N.; AFZULPURKAR, N. V.; WISITSORAAT, A. A Three-stage Thermopneumatic Peristaltic Micropump for PDMS-based Micro-nanofluidic Systems. ***IEEE***, p. 1203-1206, 2007.

80 PERES, J. C. G.; HERRERA, C. C.; VIANNA JR, A. S.; BALDOCHI, S. L.; ROSSI, W. Analysis of a Microreactor for Synthesizing Nanocrystals by Computational Fluid Dynamics. ***The Canadian Journal of Chemical Engineering***, 2018.

81 SILVA, L. G. D. ***Funcionalização da Superfície de Metais através da Produção de Nanoestruturas Periódicas produzidas por Laser Pulsado de Femtossegundo.*** 2017. 86 p. Tese (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

82 COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. Wagner de Rossi; Ricardo Elgul Samad; Nilson Dias Vieira Jr; Leandro Gusmão da Silva; Cristhiano da Costa Herrera. ***Dispositivo de Aquecimento e Controle de Temperatura para Microrreatores***. BR 10 2017 023705 2,03 de novembro de 2018.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Denvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax (0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.