

UFG
IQ

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE
DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EM
FILMES DE POLIÉSTER UTILIZANDO
UMA PLOTTER DE RECORTE

N
I
K
A
E
L
E

S
O
U
S
A

M
O
R
E
I
R
A

NIKAELE SOUSA MOREIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. WENDELL KARLOS TOMAZELLI COLTRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GOIÂNIA- 2021

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Nikaele Sousa Moreira

3. Título do trabalho

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EM FILMES DE POLIÉSTER UTILIZANDO UMA PLOTTER DE RECORTE

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Professor do Magistério Superior**, em 22/03/2021, às 12:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **NIKAELE SOUSA MOREIRA, Discente**, em 22/03/2021, às 14:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2115392&infra_sistema=1... 1/2

22/03/2021

SEI/UFG - 1957328 - Termo de Ciência e de Autorização (TECA)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1957328** e o código CRC **57DA3F71**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EM
FILMES DE POLIÉSTER UTILIZANDO UMA PLOTTER DE
RECORTE**

NIKAELE SOUSA MOREIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás como exigência parcial, para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro

GOIÂNIA
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Moreira, Nikaele Sousa
DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EM
FILMES DE POLIÉSTER UTILIZANDO UMA PLOTTER DE RECORTE
[manuscrito] / Nikaele Sousa Moreira. - 2021.
CXV, 115 f.

Orientador: Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2021.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Aplicações bioanalíticas. 2. Detecção colorimétrica. 3. Microfluidica.
4. Detecção baseada em distância. 5. Microfabricação em polímero. I.
Coltro, Wendell Karlos Tomazelli, orient. II. Título.

CDU 543



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 344 da sessão da Defesa de Mestrado de **Nikaele Sousa Moreira**, que confere o título de **Mestra em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **10 (dez) dias do mês de fevereiro de 2021 (dois mil e vinte um)**, a partir das **09h00m**, via **Videoconferência (meet.google.com/kvn-rtnj-hnh)**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Mestrado intitulada "**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EM FILMES DE POLIÉSTER UTILIZANDO UMA PLOTTER DE RECORTE**". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (IQ-UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Bruno Gabriel Lucca (UFMS)** e **Prof^ª. Dr^ª. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (IQ-UFG)**. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta, via videoconferência (meet.google.com/bdf-vdfj-ztu), a fim de concluir o julgamento da Defesa de Mestrado, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 10 (dez) dias do mês de fevereiro de 2021 (dois mil e vinte um).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Professor do Magistério Superior**, em 10/02/2021, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Gabriel Lucca, Usuário Externo**, em 10/02/2021, às 11:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Rodrigues Mendes Duarte, Professor do Magistério Superior**, em 10/02/2021, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1868994** e o código CRC **99DEC815**.

“História, nossas histórias
Dias de luta, dias de glória

Hoje estou feliz
Acordei com o pé direito
*E eu vou fazer de novo
E vou fazer muito bem feito”*

Charlie Brown Jr.

Dedico este trabalho

*À Deus, a minha Mãe e meus irmãos e a
minha família, por todo o amor e suporte
dado durante a vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por toda a força e benção me concedido.

A minha família por sempre estar disposta a ajudar no que for necessário, em especial, minha mãe, Irismar, meus irmãos, Débora e Alanderson, e meu afilhado, Enzo Gabriel, por serem meu porto seguro em todos os momentos.

Ao professor Dr. Wendell Coltro, por ter aceitado me orientar durante mestrado, por toda paciência, dedicação, orientação e ajuda durante essa caminhada. Muito obrigado por acreditar no meu potencial, e me fazer acreditar, o senhor é um exemplo!

Aos meus professores do IF Goiano por terem me incentivado na carreira acadêmica, em especial, o Dr. Jozemir Miranda e a Dra. Fabiana Marques.

Aos meus coautores, Cyro Chagas, Karoliny Oliveira (Karol), Gerson Duarte-Junior, Fabrício Souza, Murilo Santhigo, Carlos Garcia e Lauro Kubota, por todo conhecimento.

Ao Igor Lima por sua disposição para me ajudar a entender um pouco a respeito da mecânica dos fluídos e realizar a simulação do dispositivo de mistura.

Aos meus amigos do Grupo de Microfluídica e Eletroforese (GME), por tornar o ambiente de trabalho agradável e divertido, nas pessoas de: Bárbara (Babi), Danielly (Dani), Lucas Rodrigues (Lucas crossfit), Karoliny (Karol), Lorryne, Lucas Duarte (Lukete), Gerson (Gerssô), Cyro, Fabrício, Kemilly,

Kariolanda, Thaisa, Soraia, Habdias, Lucas Matos, Lucas Castro, Karine (e seu nenê, Davi, muito fofo), Simone, Thiago (Presunto), e Anderson (Gaúcho).

As minhas amigas de longas datas, em especial, a Cristiane Garcia e Camila Jordana, por sempre estarem do meu lado. Aos meus amigos do IF Goiano nas pessoas de Paulo César, Raphael, Célio, Stephanie, Victor, Izabel e Sarita.

À Universidade Federal de Goiás (UFG), ao Instituto de Química e todos os docentes, técnicos de laboratórios e administrativos.

A CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro e apoio à pesquisa.

Por fim, meus sinceros agradecimentos a todos que participaram dessa jornada de forma direta ou indireta.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Microfluídica</i>	1
1.2 <i>Fabricação de dispositivos microfluídicos</i>	3
1.2.1 <i>Técnicas Convencionais</i>	4
1.2.2 <i>Técnicas Alternativas.....</i>	6
1.2.2.1 <i>Litografia suave</i>	8
1.2.2.2 <i>Moldagem por injeção</i>	10
1.2.2.3 <i>Estampagem a quente</i>	11
1.2.2.4 <i>Impressão 3D</i>	12
1.2.2.5 <i>Micro usinagem</i>	13
1.2.2.6 <i>Ablação a Laser</i>	15
1.2.2.7 <i>Xurografia.....</i>	16
1.2.2.8 <i>Impressão a laser.....</i>	17
1.2.2.9 <i>Impressão a laser, corte a laser e laminação</i>	18
1.3 <i>Métodos de detecção</i>	20
1.3.1 <i>Detecção eletroquímica</i>	20
1.3.2 <i>Detecção colorimétrica</i>	23
1.3.3 <i>Detecção livre de equipamento - Detecção via distância.....</i>	25

2. OBJETIVOS	29
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	29
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	29
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
3.1 <i>Materiais e reagentes.....</i>	29
3.2 <i>Fabricação de dispositivos analíticos em filmes de poliéster</i>	31
3.3 <i>Ensaio colorimétricos de glicose e ureia em placas de micropoços</i>	36
3.4 <i>Ensaio de complexação de ferro em fluxo contínuo no dispositivo de mistura 3D.....</i>	37
3.5 <i>Peroxímetro baseado à distância.....</i>	38
3.6 <i>Procedimentos e instrumentação para as análises eletroforéticas ...</i>	38
3.7 <i>Resistência química após exposição a solventes orgânicos.....</i>	40
3.8 <i>Caracterização por microscopia óptica</i>	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 <i>Processo de fabricação.....</i>	41
4.2 <i>Dimensões limitantes</i>	43
4.3 <i>Resistência mecânica e química.....</i>	46
4.4 <i>Microscopia óptica confocal</i>	48
4.5 <i>Desempenho analítico dos dispositivos de poliéster.....</i>	50
4.5.1 <i>Ensaio colorimétricos em placas de micropoços.....</i>	50
4.5.2 <i>Reação de complexação no misturador 3D sob fluxo contínuo .</i>	56
4.5.3 <i>Peroxímetro baseado à distância.....</i>	60

4.5.4	Microsistemas eletroforéticos (MSE) – resultados preliminares	62
5.	CONCLUSÕES	65
6.	PERSPECTIVAS	67
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Evolução do número de publicações envolvendo microfluídica no período de 2000 a 2021. A pesquisa foi realizada no banco de dados da *Web of Science* em 28 de dezembro de 2020 utilizando a palavra-chave “*microfluidics*” como filtro no campo “tópico”. **Fonte:** Autoria própria 2
- Figura 2.** Principais etapas de microfabricação da técnica de fotolitografia: (I) substrato é limpo e revestido com fotorresiste; (II) alinhamento da máscara e exposição à radiação UV; (III) revelação no fotorresiste positivo; (IV) revelação do fotorresiste negativo; (V) corrosão do substrato transferindo a estrutura do fotorresiste negativo para a superfície do substrato; e (VI) remoção do fotorresiste e selagem do substrato com microcanais. As linhas tracejadas indicam o corte transversal do conjunto substrato e fotorresiste. **Fonte:** Autoria própria..... 5
- Figura 3.** Técnicas alternativas de fabricação dispositivos/estruturas fabricados em polímeros, classificadas de acordo com a necessidade de molde (moldagem) (setas laranjas) (ÇOĞUN; YILDIRIM; SAHIR ARIKAN, 2017; MA et al., 2020; SANTANA et al., 2016).ou sem a necessidade de molde (setas azuis) (CHARMET et al., 2020; DE SOUZA; ALVES; COLTRO, 2012; OWENS; HART, 2018; TRANTIDOU et al., 2018). **Fonte:** Autoria própria..... 7
- Figura 4.** Representação da fabricação de canais microfluídicos fechados em PDMS por meio da litografia suave. **Fonte:** Figura adaptada Duffy et al. 1998. 9
- Figura 5.** Representação dos componentes de máquina de moldagem por injeção. **Fonte:** Figura adaptada de Becker e Gärtner, 2008. 10
- Figura 6.** Representação dos componentes necessários para prototipagem com técnica de estampagem a quente. **Fonte:** Figura adaptada de Becker e Heim, 2000. 11
- Figura 7.** Representação da impressão 3D pelo método de impressão de modelagem por fusão e deposição (FDM). **Fonte:** Duarte, 2017..... 13
- Figura 8.** Representação dos componentes básicos de uma fresadora para micro usinagem. **Fonte:** Figura adaptada de Guckenberger et al., 2015. 14

Figura 9. Representação da técnica de ablação a laser para fabricação de dispositivos microfluídicos (gerador de gotas e misturador). Fonte: Figura adaptada de Trantidou et al., 2018.	15
Figura 10. Processo de corte do substrato empregando uma plotter de corte. Em (I) <i>design</i> no <i>software</i> Silhouette Studio; (II) posicionamento do substrato na base de corte; (III) inserção da base de corte na Silhouette e impressão do <i>design</i> ; e por fim (IV) retira o substrato da base de corte, obtendo um substrato com a microestrutura. Fonte: Autoria própria.....	16
Figura 11. Representação do processo de fabricação por impressão a laser. Fonte: Do Lago et al., 2003.....	18
Figura 12. Representação do dispositivo fabricado pelo processo de PCL. Fonte: Figura adaptada de Duarte et al., 2011.....	19
Figura 13. Esquema do circuito equivalente para detecção C4D em microssistemas, onde C_0 , C_1 e C_2 são as capacitâncias formadas: pelo acoplamento dos dois eletrodos, do eletrodo de excitação e do eletrodo receptor, respectivamente. E R_s a resistência elétrica da solução eletrolítica. Fonte: autoria própria.	23
Figura 14. Placa contendo micropoços para ensaio colorimétrica para detecção de glicose digitalizada e aquisição da resposta em intensidade de cor da região selecionada empregando ferramenta histograma presente no <i>software</i> Corel Photo-Paint® A imagem capturada foi analisada no sistema de cor CMYK no canal magenta (M). Fonte: Autoria própria.	25
Figura 15. Métodos de detecção com medição baseada a distância. Fonte: Figura adaptada Tian et al., 2016.....	27
Figura 16. Representação esquemática da fabricação da placa de micropoços (a, b) e dispositivo de mistura microfluídico 3D (c, d) em filme de poliéster revestido com EVA. Em (a), placa com micropoços cortados na camada de poliéster superior é laminada contra duas camadas de poliéster para obter um dispositivo robusto (b). Em (c), canais cortados dispostos em orientações ortogonais foram laminados contra a base e a tampa de poliéster para criar um dispositivo de multicamadas (d). As etiquetas (i) e (ii) indicam os orifícios para entrada da amostra e dos reagentes e (iii) o orifício para a saída do produto da reação.	32

- Figura 17.** (a) Representação esquemática da fabricação do dispositivo microfluídico para determinar H_2O_2 contendo três camadas de substratos de poliéster, em (b) o dispositivo resultante mostrando o “*plug*” de corante para medição à distância. Em (a), poliéster com canais cortados foram primeiramente laminados contra uma base de poliéster e após a inserção do papel modificado com cobre, o dispositivo foi laminado contra a tampa de poliéster contendo dois orifícios para adicionar corante e solução de amostra. 34
- Figura 18.** (a) Representação esquemática da fabricação do MSE contendo três camadas de substratos de poliéster e (b) dispositivo resultante, em que os números 1, 2, 3 e 4 indicam onde são os reservatórios para a amostra, tampão, descarte da amostra e descarte do tampão, respectivamente. 35
- Figura 19.** Representação do modo de injeção *floating* para introdução de amostra em microcanais. Em (a) e (b) representam a aplicação de potencial no reservatório 1 (V_1), mantendo aterrado o reservatório 3, e em (c) a aplicação de potencial no reservatório 2 (V_2), mantendo aterrado o reservatório 4, para mover o “*plug*” de amostra no canal de separação em direção ao detector. 39
- Figura 20.** (a) Imagem digital mostrando os canais definidos em poliéster com larguras entre 0,25 e 1 mm. (b) Relação entre os valores nominais e os valores medidos da largura em três pontos diferentes ao longo do canal (extremidades e meio) ($n=3$). 44
- Figura 21.** (a) Imagem digital de micropoços com diferentes formas geométricas em poliéster, como círculos, quadrados, triângulos e geometrias de pentágonos, obtidos com a plotter de recorte. A plotter permitiu o corte de poços definidos com dimensões (diâmetro ou comprimento de cada lado) entre 3 e 8 mm. Os poços foram preenchidos com corantes azul, verde, amarelo e vermelho. (b) Uma imagem fotográfica da placa de micropoços com as letras G, M, e E desenhadas por meio do preenchimento dos micropoços com corantes azul, vermelho e verde, respectivamente. 46
- Figura 22.** Imagens microscópicas dos canais preenchidos (a) água, (b) acetona, (c) isopropanol, (d) etanol, (e) acetonitrila e (f) acetato de etila. 47

- Figura 23.** Micrografias ópticas mostrando (a) um micropoço e (b) sua profundidade, (c) a vista superior do dispositivo de mistura 3D e (d) perfil típico de um microcanal definido em poliéster. Em (c), a cor verde indica os canais cortados ortogonalmente, enquanto a cor azul indica a base de poliéster. 49
- Figura 24.** Reações para a determinação colorimétrica indireta de glicose. A glicose sofre oxidação pela ação da GOx, gerando H₂O₂. Este reage com os reagentes cromógenos formando um composto rosa-avermelhado denominado antipirilquinonimina. 51
- Figura 25.** Reações para determinação colorimétrica de ureia. A ureia é hidrolisada pela urease em íons amônia. Este reage com hipoclorito e salicilato, gerando um indofenol de coloração esverdeada. 52
- Figura 26.** Curvas analíticas para ensaios colorimétricos de (a) ureia e (b) glicose realizados em placas de micropoços de poliéster. As equações de regressão linear foram $y = 14,85 + 0,15 \times [\text{ureia}]$ e $y = 62,23 + 1,49 \times [\text{glicose}]$ para ureia e glicose, respectivamente. 53
- Figura 27.** Simulação de mistura no software Ansys Discovery por meio do perfil de temperatura. Os fluidos vermelho e azul foram considerados água a 50°C e 20°C, respectivamente. 57
- Figura 28.** (a) Exibe uma fotografia real do dispositivo de mistura 3D para ensaios baseados em fluxo. (b) O gráfico mostra as medições de absorvância (n = 3) para o complexo formado entre Fe²⁺ e o-fen usando reações realizadas dentro e fora do chip. 59
- Figura 29.** (a) Imagem digital mostrando o deslocamento de um “*plug*” de corante em diferentes concentrações de H₂O₂, sendo a distância medida por uma escala métrica desenhada e impressa em folha de papel sulfite; e em (b) a curva analítica resultante (n = 3). 61
- Figura 30.** (a) Exibe uma fotografia real MSE fabricado em filme de poliéster com ênfase no canal por meio de uma micrografia; (b) Eletroferogramas de dez injeções consecutivas para uma solução padrão de K⁺ 100 μmol L⁻¹. Potencial elétrico aplicado de 500 V e 800 V nos reservatórios 1 e 2, respectivamente. Tempo de

injeção de 10 s. Condições de detecção: frequência de 400-kHz e amplitude de 40 V_{pp}. 63

Figura 31. Eletroferograma com uma série de três injeções mostrando a separação de K⁺ Na⁺ e Li⁺ (100 μM). Potencial elétrico aplicado de 500 V e 800 V nos reservatórios 1 e 2, respectivamente. Tempo de injeção de 10 s. Condições de detecção: frequência de 400-kHz e amplitude de 40 V_{pp}. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes empregados e suas respectivas fórmulas moleculares, massas molares, fabricantes e purezas.....	29
Tabela 2. Estimativa de custo dos consumíveis necessários para a fabricação de dispositivos em substratos de poliéster.....	43
Tabela 3. Comparação entre o LD obtido para ureia com valores relatados na literatura.....	54
Tabela 4. Comparação entre o LD obtido para glicose com valores relatados na literatura.....	55
Tabela 5. Parâmetros das seções do misturador 3D.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

μPADs	Dispositivos analíticos microfluídicos baseado em papel (microfluidic paper-based devices)
4 AAP	4-aminoantipirina
C⁴D	Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection)
CE-MS	Eletroforese capilar acoplado com a espectrometria de massas (Capillary Electrophoresis coupled with Mass Spectrometry)
DHBS	3,5-dicloro-2-hidroxidobenzenosulfônico
DPR	Desvio Padrão Relativo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EOF	Fluxo eletrosmótico (<i>Electroosmotic Flow</i>)
EVA	acetato de etileno-vinil (<i>Ethylene Vinyl Acetate</i>)
FDM	Modelagem por fusão e deposição (<i>Fused Deposition and Modelling</i>)
GOx	Glicose oxidase
His	L-histidina
HRP	Peroxidase de rábano silvestre
LD	Limite de Detecção
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico)
MS	Espectrometria de massas (<i>mass spectrometry</i>)
MSE	Microsistemas eletroforéticos
NPS	Nitroprussiato de sódio
o-fen	orto-fenantrolina ou 1,10-fenantrolina
PC	Policarbonato
PCL	Impressão a laser, corte e laminação (<i>Print, Cut and Laminate</i>)
PDMS	Poli(dimetil siloxano)
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PMMA	Poli(metil metacrilato)
PT	Poliéster-toner
PTFE	Poli(tetrafluoroetileno)

PU	Poli(uretana)
PVAc	Poli(acetato de vinila)
PVC	Poli(cloreto de vinila)
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
UV	Radiação ultravioleta

RESUMO

Este estudo descreve o desenvolvimento de dispositivos analíticos em filmes de poliéster revestidos com uma camada de acetato de etileno-vinil (EVA) usando uma plotter de recorte. O protocolo envolve a projeção do *layout* desejado num *software* gráfico, seguida pela etapa de recorte. Após o recorte, o filme de poliéster contendo a estrutura desejada foi laminada termicamente contra um ou vários filmes de poliéster revestidos com EVA. Devido à natureza termossensível do EVA, este foi utilizado para promover a selagem dos dispositivos. A plotter de corte possibilitou o corte de canais com larguras variando de 250 a 1000 μm com boa precisão. No entanto, o protocolo de fabricação permitiu a obtenção de canais com largura $>300 \mu\text{m}$ em filmes de poliéster com espessura de 250 μm , pois os canais de largura de 250 μm apresentaram bloqueio total devido à fusão do EVA e à penetração desse material dentro dos canais. As resistências mecânica e química dos microcanais definidos nos filmes de poliéster foram avaliadas. Com relação à resistência mecânica, a estrutura microfluídica suportou o transporte de fluidos com taxa de bombeamento variando de 0 a 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, sem observação de vazamentos. A compatibilidade química da estrutura foi testada com a exposição do microcanal a diferentes solventes orgânicos (tais como acetona, isopropanol, etanol, acetonitrila e acetato de etila), os quais obteve-se resistência química satisfatória, não apresentando vazamento nos canais. A viabilidade do protocolo proposto foi demonstrada através da fabricação de microplacas contendo 96 micropoços, misturadores microfluídicos em arranjo tridimensional (3D), dispositivos para determinação de H_2O_2 baseado à distância e microssistemas eletroforéticos (MSE). Como prova de conceito, as microplacas foram utilizadas para ensaios colorimétricos de ureia e de glicose, e ambos revelaram comportamento linear nas faixas de concentração iguais a 0-100 mg dL^{-1} e 5-90 mg dL^{-1} , respectivamente. Os valores de limite de detecção (LD) obtidos para os ensaios de ureia e glicose foram 7,73 mg dL^{-1} e 0,96 mg dL^{-1} , respectivamente. As concentrações de ureia e glicose foram determinadas em amostras artificiais de urina e soro, respectivamente, e as mesmas corroboraram com os valores teóricos. A reação de complexação envolvendo Fe^{2+} e *o*-fenantrolina foi selecionada como modelo para investigar a viabilidade do misturador microfluídico 3D. A mudança de velocidade do fluido provocada pelo arranjo 3D do microcanal induziu à mistura das soluções de forma eficiente, exibindo um comportamento semelhante à reação realizada fora do chip. A versatilidade da plotter de recorte também foi demonstrada com o desenvolvimento de um dispositivo híbrido em poliéster contendo um substrato de papel impregnado com uma solução de cobre para catalisar a decomposição de H_2O_2 . O gás liberado na reação foi utilizado para promover o deslocamento de um “*plug*” de corante. Assim a distância percorrida pelo “*plug*” foi proporcional à concentração de H_2O_2 na faixa de concentração entre 117,5 e 587,5 mmol L^{-1} , obtendo um LD de 65,22 mmol L^{-1} . O MSE foi testado utilizando uma mistura modelo contendo K^+ , Na^+ e Li^+ . Devido às dimensões limitantes (largura), os resultados preliminares apresentaram baixa eficiência de separação, o que poderá ser melhorado com a diminuição da largura dos canais por meio da customização da lâmina de recorte. Considerando os resultados obtidos, conclui-se que o método proposto apresentou simplicidade e rapidez ($<10 \text{ min}$) para o desenvolvimento de dispositivos analíticos de baixo custo ($<\text{R\$ } 0,45$) podendo ser implementado em laboratórios e centros de pesquisa utilizando instrumentação alternativa e economicamente acessível.

Palavras-chave: Aplicações bioanalíticas; Detecção colorimétrica; Microfluídica; Detecção baseadas em distância; Microfabricação em polímero.

ABSTRACT

This study describes the development of analytical devices in polyester films coated with a layer of ethylene-vinyl acetate (EVA) using a clipping plotter. The protocol involves the projection of the desired layout in graphic software, followed by the clipping step. After cutting, the polyester film containing the desired structure was thermally laminated against one or more polyester films coated with EVA. Due to the thermosensitive nature of EVA, it was used to promote the sealing of devices. The cutting plotter made it possible to cut channels with widths ranging from 250 to 1000 μm with good precision. However, the manufacturing protocol allowed to obtain channels with a width $> 300 \mu\text{m}$ in polyester films with a thickness of 250 μm , since the channels with a width of 250 μm showed total blockage due to the fusion of EVA and the penetration of this material into the channels. The mechanical and chemical resistance of the microchannels defined in the polyester films were evaluated. Concerning mechanical resistance, the microfluidic structure supported the transport of fluids with a pumping rate ranging from 0 to 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, without leakage. The chemical compatibility of the structure was tested with the exposure of the microchannel to different organic solvents (such as acetone, isopropanol, ethanol, acetonitrile, and ethyl acetate), which obtained satisfactory chemical resistance, with no leakage in the channels. The viability of the proposed protocol was demonstrated through the manufacture of microplates containing 96 microwells, microfluidic mixers in three-dimensional (3D) arrangement, devices for the determination of H_2O_2 based on distance and electrophoretic microsystems (MSE). As a proof of concept, the microplates were used for colorimetric tests of urea and glucose, and both showed linear behavior in the concentration ranges equal to 0-100 mg dL^{-1} and 5-90 mg dL^{-1} , respectively. The detection of limit (LOD) values obtained for the urea and glucose assays were 7.73 mg dL^{-1} and 0.96 mg dL^{-1} , respectively. The concentrations of urea and glucose were determined in artificial samples of urine and serum, respectively, and they corroborated with the theoretical values. The complexation reaction involving Fe^{2+} and *o*-phenanthroline was selected as a model to investigate the viability of the 3D microfluidic mixer. The change in fluid velocity caused by the 3D arrangement of the microchannel induced the mixing of the solutions efficiently, exhibiting behavior similar to the reaction carried out outside the chip. The versatility of the clipping plotter was also demonstrated with the development of a hybrid polyester device containing a paper substrate impregnated with a copper solution to catalyze the decomposition of H_2O_2 . The gas released in the reaction was used to promote the displacement of a dye plug. Thus, the distance covered by the plug was proportional to the concentration of H_2O_2 in the concentration range between 117.5 and 587.5 mmol L^{-1} , obtaining an LOD of 65.22 mmol L^{-1} . The MSE was tested using a model mixture containing K^+ , Na^+ , and Li^+ . Due to the limiting dimensions (width), the preliminary results showed low separation efficiency, which can be improved by decreasing the width of the channels by customizing the cutter blade. Considering the results obtained, it is concluded that the proposed method presented simplicity and speed ($< 10 \text{ min}$) for the development of low-cost analytical devices ($< \text{R\$ } 0.45$) and can be implemented in laboratories and research centers using alternative and affordable instrumentation.

Keywords: Bioanalytical applications; Colorimetric detection; Microfluidics; Distance-based detection; Polymer microfabrication.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microfluídica

A microfluídica é o campo da ciência que trabalha com a manipulação de fluidos em canais com largura definida na ordem de dezenas de micrômetros (WHITESIDES, 2006). Esse campo da ciência, com natureza inter e multidisciplinar, tem sido bastante difundido devido às vantagens oferecidas pela miniaturização incluindo a redução do consumo de amostras e reagentes, menor geração de resíduos, curto tempo de análise, capacidade de processamento em paralelo, portabilidade e potencialidade para uso no ponto de necessidade (ARORA et al., 2010; PATABADIGE et al., 2015; WHITESIDES, 2006). As vantagens atreladas à microfluídica impulsionaram o desenvolvimento de uma variedade de dispositivos microfluídicos dedicados a vários procedimentos analíticos realizados de forma independente ou integrados em uma mesma plataforma. A possibilidade de integração de várias etapas analíticas em um único substrato, denominado de chip, originou o termo “Lab-on-a-Chip”, o qual representa o conceito de um sistema portátil contendo múltiplas funções para processamento sequencial de uma amostra de interesse (ARORA et al., 2010; MANZ; GRABER; WIDMER, 1990; PATABADIGE et al., 2015).

Uma pesquisa realizada no banco de dados da *Web of Science* (em 28 de dezembro de 2020) utilizando a palavra “*microfluidics*” como filtro no campo “tópico” resultou em aproximadamente 25.800 artigos científicos. Conforme apresentado na Figura 1, pode-se observar um aumento significativo nos últimos 20 anos, cujo comportamento linear comprova a tendência atual acerca do uso de ferramentas microfluídicas. De uma maneira geral, a microfluídica vem sendo explorada em muitas áreas do conhecimento, destacando as áreas ambientais (MEREDITH et al., 2016), clínicas (HUANG et al., 2017), farmacêuticas (DITTRICH; MANZ, 2006; NOVIANA et al., 2020), alimentícias (GAO et al., 2020), forenses (BRUIJNS et al., 2016), biológicas (HO et al., 2015) e bioquímicas (KOVARIK et al., 2012; OU et al., 2020), dentre

outras. A evolução no número de publicações permite uma reflexão abrangente sobre as técnicas analíticas implementadas em microescala. Atualmente, vários exemplos demonstrando o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para preparo e purificação de amostras, separações eletroforéticas e cromatográficas, sistemas de análise em fluxo, geração de gotículas em sistemas multifásicos e ensaios via fluxo lateral têm sido reportados na literatura (AKYAZI; BASABE-DESMONTS; BONITO-LOPEZ, 2018; ARORA et al., 2010; AUROUX et al., 2002; NANTHASURASAK et al., 2017; REYES et al., 2002; SHANG; CHENG; ZHAO, 2017). Adicionalmente, a integração de sensores colorimétricos e eletroquímicos, bem como o acoplamento da espectrometria de massas com dispositivos microfluídicos, representam as principais técnicas e metodologias exploradas nas áreas de conhecimento supracitadas (KHATRI et al., 2017; MOREIRA et al., 2018; OH et al., 2016; PAMULA et al., 2005; SCHAPPLER; VEUTHEY; RUDAZ, 2008; SCHILLY et al., 2020; WANG, 2005).

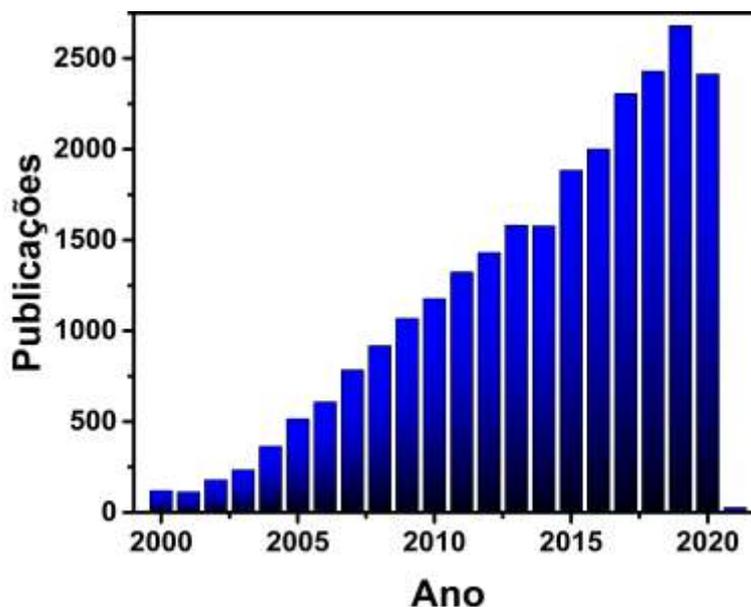


Figura 1. Evolução do número de publicações envolvendo microfluídica no período de 2000 a 2021. A pesquisa foi realizada no banco de dados da *Web of Science* em 28 de dezembro de 2020 utilizando a palavra-chave “*microfluidics*” como filtro no campo “tópico”. **Fonte:** Autoria própria

1.2 Fabricação de dispositivos microfluídicos

Os dispositivos microfluídicos podem ser fabricados em uma variedade de substratos explorando materiais clássicos como vidro, quartzo e silício, bem como materiais alternativos incluindo o papel (MARTINEZ et al., 2007) e substratos poliméricos tais como poli(dimetil siloxano) (PDMS) (DUFFY et al., 1998), poli(metil metacrilato) (PMMA) (BECKER; GÄRTNER, 2008; BECKER; LOCASCIO, 2002; CHAGAS et al., 2015; CHEN et al., 2005; GABRIEL; COLTRO; GARCIA, 2014), poli(carbonato) (PC) (SHADPOUR et al., 2007; SU et al., 2019; WANG et al., 2008), poli(uretana) (PU) (PICCIN et al., 2007), poliéster-toner (PT) (GABRIEL et al., 2018), resinas e filmes de poliéster (DUARTE et al., 2011; THOMPSON et al., 2015; VICKERS et al., 2007), dentre outros.

A escolha do substrato depende diretamente da tecnologia de fabricação disponível. Os dispositivos desenvolvidos em materiais clássicos são geralmente fabricados por meio de técnicas fotolitográficas, que apresentam alto custo de aquisição e implementação e requerem o uso de salas limpas (CHARMET et al., 2020; COLTRO et al., 2007a; WHITESIDES et al., 2001). Essas características limitam o acesso a este tipo de infraestrutura a poucos grupos de pesquisa. Porém, com os grandes avanços do campo da microfluídica e da microfabricação, novos métodos alternativos de fabricação foram desenvolvidos e explorados para o desenvolvimento de dispositivos analíticos de modo a contornar as desvantagens atreladas às técnicas convencionais em relação ao custo e a acessibilidade. Dentre as técnicas alternativas, destacam-se a litografia suave (DUFFY et al., 1998; XIA; WHITESIDES, 1998; ZHAO; XIA; WHITESIDES, 1997), a estampagem a quente (BECKER; DIETZ; DANNBERG, 1998; BECKER; HEIM, 2000), o processo de micro usinagem (GUCKENBERGER et al., 2015), a impressão 3D (AU et al., 2016), a impressão a laser (DO LAGO et al., 2003), a ablação a laser (MALEK, 2006; ROBERTS et al., 1997) e o processo de impressão com plotter de recorte (BARTHOLOMEUSZ; BOUTTÉ; ANDRADE, 2005).

1.2.1 Técnicas Convencionais

As técnicas convencionais de fabricação de dispositivos microfluídicos são baseadas em processos fotolitográficos, que foram os primeiros a serem utilizados na fabricação de sistemas microfluídicos, dado que já eram empregados na microeletrônica (BECKER; GÄRTNER, 2008; BETANCOURT; BRANNON-PEPPAS, 2006; CHARMET et al., 2020; COLTRO et al., 2007a). Essas técnicas consistem na gravação da estrutura desejada contendo canais micrométricos sobre uma superfície plana, geralmente vidro ou silício, recoberta com uma resina fotossensível, a qual é denominada de fotorresiste (BECKER; GÄRTNER, 2008; BERKOWSKI et al., 2005; DILL et al., 1975). O processo de gravação ocorre por meio da radiação ultravioleta (UV). Para isso, são realizadas várias etapas, conforme apresentado resumidamente na Figura 2. Na etapa inicial (I), o substrato limpo é revestido com uma camada de um fotorresiste através da técnica de *spin coating*. Posteriormente, uma máscara contendo o *layout* desejado (previamente fabricada em placa de vidro ou em fotolitos) é alinhada sobre o substrato recoberto com fotorresiste (II). Em seguida, a radiação UV é incidida sobre a máscara para realizar a transferência do *layout* para a camada do fotorresiste (II). Após a etapa de gravação, o substrato contendo a imagem desejada transferida para a camada do fotorresiste é revelada.

É importante destacar que, dependendo da característica do fotorresiste empregado (negativo ou positivo), ele pode se tornar insolúvel ou solúvel após a exposição à radiação UV. Para fotorresistes positivos, a região exposta à radiação se torna solúvel e pode ser removida com solvente orgânico enquanto a parte protegida pela máscara se torna sólida, promovendo assim a obtenção da estrutura microfluídica em alto relevo (BERKOWSKI et al., 2005; DILL et al., 1975), conforme apresentado na etapa III. Por outro lado, quando se utiliza fotorresistes negativos (IV), o contato da radiação com a resina induz à polimerização, gerando uma estrutura sólida permanente na etapa de revelação. Consequentemente, a parte da resina protegida pela máscara se mantém solúvel e é facilmente solubilizada no

solvente orgânico utilizado na etapa de revelação. Após a etapa fotolitográfica, os canais definidos na camada do fotorresiste negativo são transferidos para a superfície do substrato, como mostrado na etapa V. (BERKOWSKI et al., 2005; DILL et al., 1975). O processo de transferência da estrutura pode ser realizado em via seca, usando plasma de íons reativos, ou em via úmida, por meio de soluções contendo usualmente ácido fluorídrico, o qual promove a corrosão da superfície do substrato (COLTRO et al., 2007a; DILL et al., 1975). Após a corrosão, o fotorresiste é removido com o solvente orgânico e o substrato contendo os canais é submetido a uma etapa de selagem (VI), que normalmente ocorre em temperaturas elevadas ($> 500\text{ }^{\circ}\text{C}$), dependendo da composição do material (ALLEN; CHIU, 2008; HUI et al., 2005; IM et al., 2009).

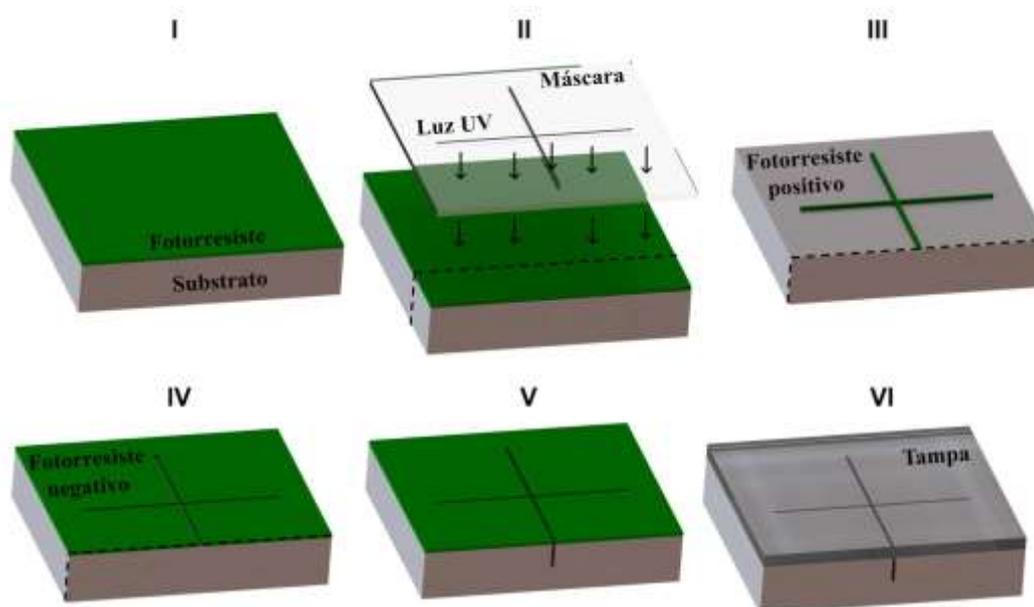


Figura 2. Principais etapas de microfabricação da técnica de fotolitografia: (I) substrato é limpo e revestido com fotorresiste; (II) alinhamento da máscara e exposição à radiação UV; (III) revelação no fotorresiste positivo; (IV) revelação do fotorresiste negativo; (V) corrosão do substrato transferindo a estrutura do fotorresiste negativo para a superfície do substrato; e (VI) remoção do fotorresiste e selagem do substrato com microcanais. As linhas tracejadas indicam o corte transversal do conjunto substrato e fotorresiste.

Fonte: Autoria própria

A fotolitografia é bem difundida no campo da microfabricação por oferecer alta definição e ótima resolução. Contudo, a mesma além de exigir instrumentação sofisticada e profissionais qualificados, requer um ambiente totalmente limpo. Esses requisitos a tornam restrita a poucos grupos de pesquisa, dado que o custo de implementação é bastante elevado. Além disso, os substratos mais empregados nesta técnica são silício, vidro ou quartzo, que apresentam custo elevado. Embora estes materiais ofereçam excelentes propriedades para aplicações envolvendo separações analíticas, o custo e o tempo de fabricação são parâmetros críticos.

1.2.2 Técnicas Alternativas

Diante destas limitações, foram relatadas técnicas alternativas para fabricação de dispositivos microfluídicos tanto nos substratos convencionais, como vidro (COLTRO et al., 2007b; WLODARCZYK; HAND; MAROTOVALER, 2019) quanto em substratos alternativos, como polímeros (BECKER; GÄRTNER, 2000, 2008; BECKER; LOCASCIO, 2002; CASTRO; MANZ, 2015; SHADPOUR et al., 2006; TSAO, 2016). A última classe de materiais recebeu atenção notável da comunidade científica devido às suas características atraentes associadas ao custo reduzido e à simplicidade de fabricação, assim como devido as suas propriedades, por exemplo, transparência óptica, maleabilidade, isolamento elétrico, dentre outras. Exemplos de materiais elastoméricos e termoplásticos têm sido amplamente relatados na literatura (BECKER; GÄRTNER, 2008; BECKER; LOCASCIO, 2002; CASTRO; MANZ, 2015; CHARMET et al., 2020; ÇOĞUN; YILDIRIM; SAHIR ARIKAN, 2017; GUCKENBERGER et al., 2015; MA et al., 2020; SANTANA et al., 2016; SHADPOUR et al., 2006; TSAO, 2016), nos quais a fabricação de dispositivos microfluídicos envolvem técnicas de moldagem, como litografia suave (SANTANA et al., 2016), moldagem por injeção (MA et al., 2020) e estampagem a quente (ÇOĞUN; YILDIRIM; SAHIR ARIKAN, 2017). Além destas, outras técnicas que não necessitam de moldagem, incluindo a impressão 3D, micro usinagem (OWENS; HART, 2018), ablação a laser

(TRANTIDOU et al., 2018), impressão a laser (DE SOUZA; ALVES; COLTRO, 2012) e impressão via plotter de recorte (Xurografia) (CHARMET et al., 2020) têm apresentado enorme potencialidade para o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos. A Figura 3 apresenta um resumo das principais técnicas alternativas dedicadas ao desenvolvimento de estruturas microfluídicas em materiais poliméricos diversos.

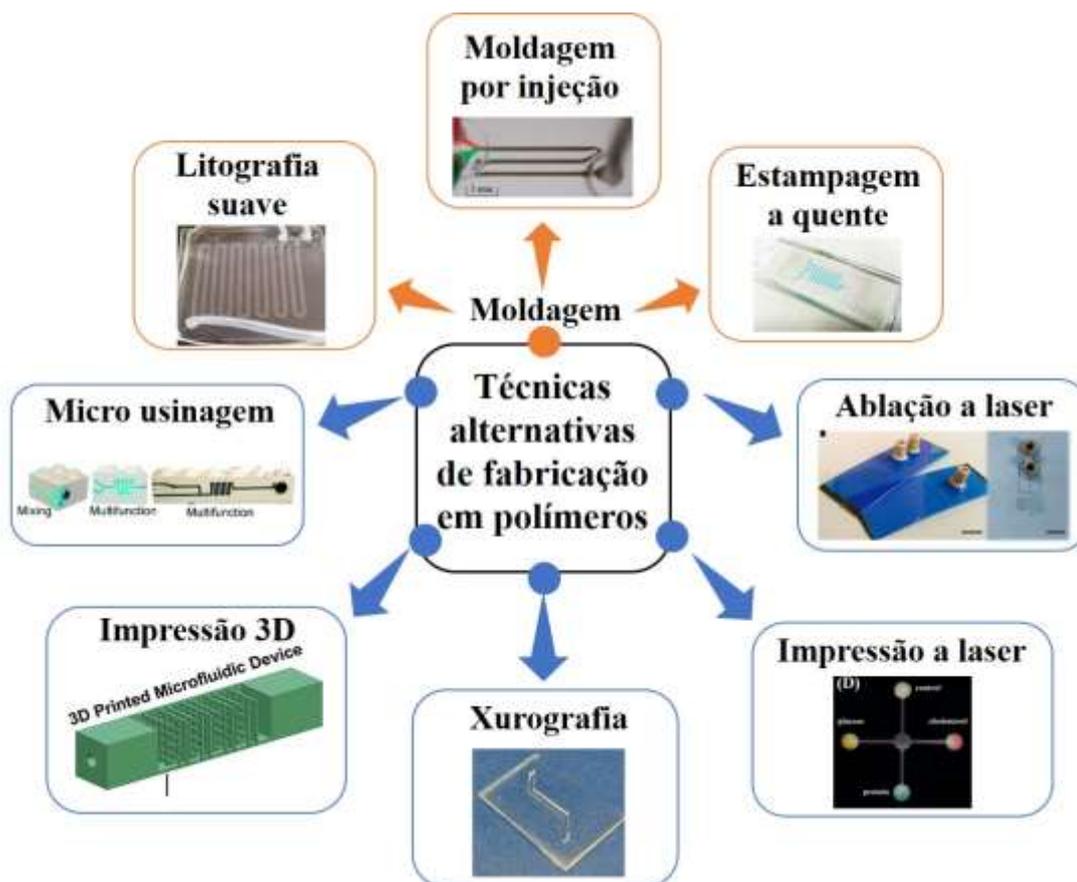


Figura 3. Técnicas alternativas de fabricação dispositivos/estruturas fabricados em polímeros, classificadas de acordo com a necessidade de molde (moldagem) (setas laranjas) (ÇOĞUN; YILDIRIM; SAHIR ARIKAN, 2017; MA et al., 2020; SANTANA et al., 2016).ou sem a necessidade de molde (setas azuis) (CHARMET et al., 2020; DE SOUZA; ALVES; COLTRO, 2012; OWENS; HART, 2018; TRANTIDOU et al., 2018). **Fonte:** Autoria própria

A fabricação de microssistemas pelas técnicas de moldagem baseia-se na utilização de moldes para a replicação das estruturas microfluídicas em substratos poliméricos. O molde deve conter a estrutura do dispositivo desejado em alto relevo, podendo ser produzido em uma variedade de materiais de acordo com a finalidade. A replicação é feita transferindo a estrutura do molde para o substrato polimérico, o que pode ser conduzido sob controle da temperatura e pressão (COLTRO et al., 2007a; SANTANA et al., 2016). Dentre as técnicas de moldagem, as mais empregadas são: litografia suave, moldagem por injeção e estampagem a quente. Porém, outras técnicas incluindo a micro usinagem, a impressão 3D, a ablação a laser, a Xurografia (impressão via plotter de recorte) e impressão a laser também vêm se destacando para a fabricação de dispositivos microfluídicos.

1.2.2.1 Litografia suave

A litografia suave é uma técnica de moldagem, em que se utiliza polímeros com características elastoméricas. Em geral, a estrutura microfluídica, definida em um molde, é transferida para o PDMS (DUFFY et al., 1998; SANTANA et al., 2016; TAN et al., 2001) ou outros polímeros, como a PU (PICCIN et al., 2007), despejando-se uma mistura do monômero e o catalisador sobre o molde (WHITESIDES et al., 2001; XIA; WHITESIDES, 1998; ZHAO; XIA; WHITESIDES, 1997). A polimerização ocorre normalmente sob aquecimento suave (70-80 °C) durante 1-2 horas (WHITESIDES et al., 2001; XIA; WHITESIDES, 1998; ZHAO; XIA; WHITESIDES, 1997). A Figura 4 demonstra um esquema de fabricação de canais por meio da litografia suave.

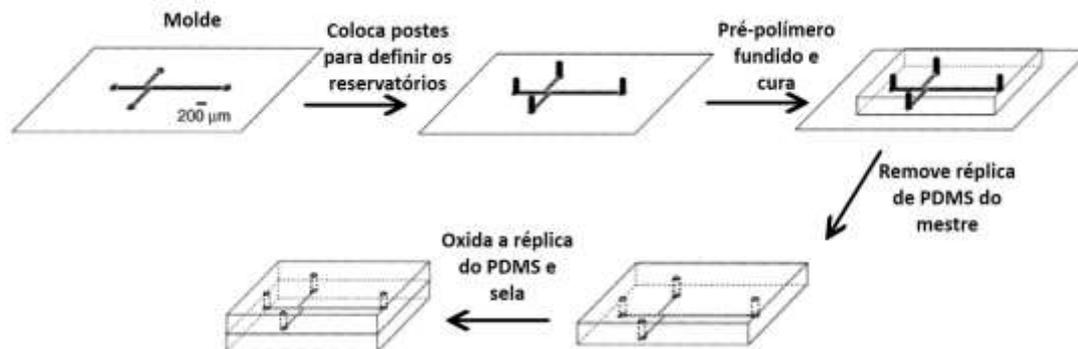


Figura 4. Representação da fabricação de canais microfluídicos fechados em PDMS por meio da litografia suave. **Fonte:** Figura adaptada Duffy et al. 1998.

Apesar desta técnica ser simples e bastante relevante para desenvolvimento de dispositivos microfluídicos, em virtude do menor custo e tempo de replicação mais curto quando comparada a fotolitografia convencional, ela usualmente requer o uso de moldes definidos por fotolitografia (WHITESIDES et al., 2001), o que nem sempre é acessível a todos os pesquisadores. Diante disso, diferentes autores reportaram o desenvolvimento de moldes alternativos para serem utilizados na litografia suave visando a replicação em polímeros elastoméricos. Qin e colaboradores (QIN; XIA; WHITESIDES, 1996), por exemplo, desenvolveram um molde empregando folha de transparência com o *design* desejado impresso utilizando sistema comercial de definição de imagem assistida por laser. Outros autores criaram moldes em filmes de transparência usando fotocopiadoras (TAN et al., 2001) ou impressoras a laser (BAO et al., 2005; LOBO JÚNIOR et al., 2015; VULLEV et al., 2006). O uso de moldes definidos com camadas de toner (BAO et al., 2005; LOBO JÚNIOR et al., 2015; TAN et al., 2001; VULLEV et al., 2006) apresentam como limitação a resolução, o que impede a fabricação de canais com larguras inferiores a 200-250 µm. Lobo-Júnior e colaboradores (LOBO-JÚNIOR et al., 2017) desenvolveram moldes em filmes de poli(acetato de vinila) (PVAc) e demonstraram com sucesso a replicação de microssistemas eletroforéticos em PDMS. As vantagens do uso

do PVAc como molde incluem a acessibilidade e ausência de solventes orgânicos tóxicos na etapa de revelação.

1.2.2.2 Moldagem por injeção

Outro método alternativo para fabricação de dispositivos microfluídicos é a moldagem por injeção. Nesse processo, o material polimérico é fundido em temperaturas entre 200 e 350 °C, dependendo do polímero utilizado, e injetado sob alta pressão diretamente sobre o molde contendo a estrutura desejada a ser replicada. Logo após o resfriamento, é realizada a retirada do molde do substrato, obtendo estrutura microfluídica replicada no polímero. A Figura 5 apresenta os componentes de uma máquina de moldagem por injeção a partir de um corte transversal, na qual pode-se observar que a instrumentação não é trivial e simples.

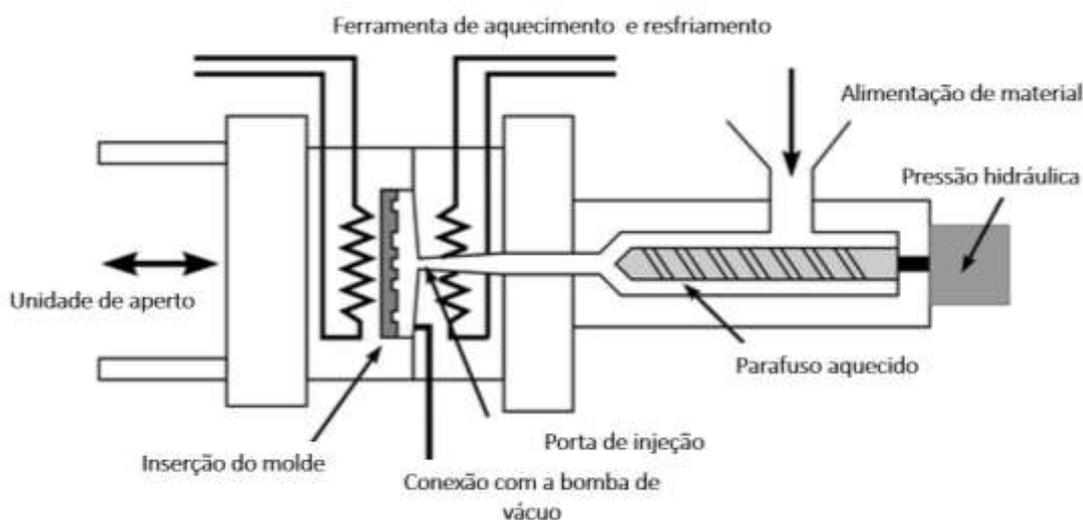


Figura 5. Representação dos componentes de máquina de moldagem por injeção. **Fonte:** Figura adaptada de Becker e Gärtner, 2008.

Os materiais poliméricos mais utilizados na técnica de moldagem por injeção são o PMMA (MA et al., 2020) e o PC (BECKER; GÄRTNER, 2008; COLTRO et al., 2007a; SU et al., 2019). A vantagem desse método está na possibilidade de se obter estruturas tridimensionais para promover a

integração de múltiplas etapas analíticas em um microssistema (BECKER; GÄRTNER, 2008). Por outro lado, a desvantagem dessa técnica consiste na instrumentação necessária para execução conforme supracitado e mostrado na Figura 5, bem como o controle preciso dos parâmetros operacionais, principalmente pressão de injeção e a temperatura do molde (MA et al., 2020). Além disso, o método requer atenção na replicação dado a necessidade de remover o ar da região do molde para evitar a formação de bolhas na estrutura replicada.

1.2.2.3 Estampagem a quente

A técnica conhecida como estampagem a quente, do inglês *hot embossing*, consiste na utilização de temperaturas elevadas (100-180 °C) para moldar polímeros termoplásticos, tipicamente o PMMA (BECKER; DIETZ; DANNBERG, 1998; BECKER; HEIM, 2000; ÇOĞUN; YILDIRIM; SAHIR ARIKAN, 2017; HE et al., 2018) e PC (BECKER; DIETZ; DANNBERG, 1998; BECKER; HEIM, 2000; SHADPOUR et al., 2007; WANG et al., 2008), empregando um molde contendo estrutura de interesse. A Figura 6 exhibe os componentes necessários para executar essa técnica de fabricação.

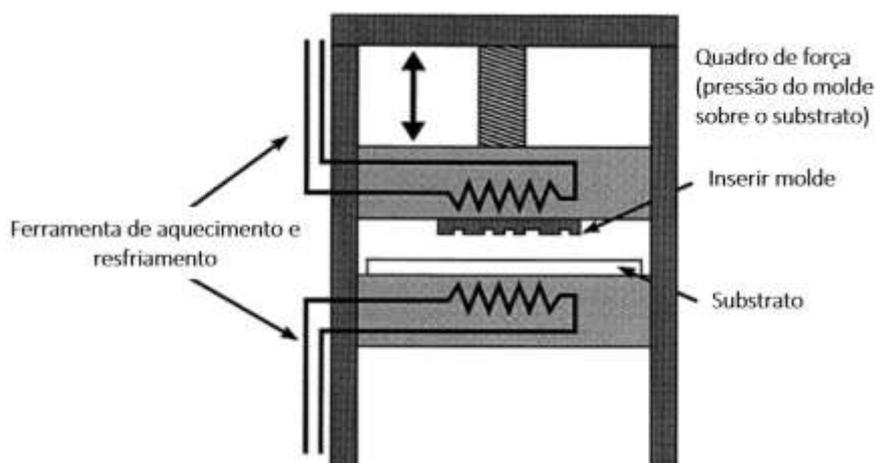


Figura 6. Representação dos componentes necessários para prototipagem com técnica de estampagem a quente. **Fonte:** Figura adaptada de Becker e Heim, 2000.

Como mostrado na Figura 6, um molde fabricado em silício ou em outro material rígido (JENA et al., 2012) é pressionado contra o substrato, polímero amolecido pela ferramenta de aquecimento e resfriamento, para realizar a replicação da estrutura microfluídica (ABGRALL; LOW; NGUYEN, 2007; BECKER; DIETZ; DANNBERG, 1998; BECKER; HEIM, 2000; CHENG et al., 2016; GENCTURK et al., 2020; HE et al., 2018). Essa técnica também é uma das mais populares para prototipagem de dispositivos microfluídicos em larga escala, porém a instrumentação necessária também apresenta custo elevado, uma vez que a etapa fundamental é a obtenção do molde, que é fabricado por técnicas fotolitográficas.

1.2.2.4 Impressão 3D

Nos últimos anos, a impressão 3D vem se destacando como técnica alternativa para a fabricação de sensores (COMINA; SUSKAA; FILIPPINI, 2014; DUARTE et al., 2017) e dispositivos microfluídicos (AU et al., 2016; BRESSAN et al., 2019; CHEN et al., 2020; CHEN; MO; GONG, 2020; DUARTE et al., 2017; O'NEIL, 2020; WAHEED et al., 2016). Nesse processo, a impressão da estrutura microfluídica pode ocorrer através de diferentes métodos incluindo: estereolitografia, impressão direta por jato de tinta, sinterização seletiva a laser, manufatura de objeto laminado e modelagem por fusão e deposição (FDM, do inglês *Fused Deposition and Modelling*) (AU et al., 2016; HO et al., 2015; WAHEED et al., 2016). Dentre eles, o último método é considerado o mais simples e o que demanda instrumentação mais acessível. O custo de uma impressora do tipo FDM varia entre R\$ 2.000,00 e R\$ 5.000,00 e a resolução do método é da ordem de 300 μm .

A impressão 3D permite a fabricação de dispositivos de forma rápida e com menor geração de resíduos. No modo FDM, conforme apresentado na Figura 7, o material polimérico é fundido e passa pelo bico extrusor que deposita o material camada por camada até a obtenção do objeto, que pode ser dentro de aproximadamente 20-30 min de acordo com o dispositivo projetado. Por exemplo, o dispositivo simples apresentado na [Figura 7](#)

destinado para ionização direta por spray em espectrometria de massas foi fabricado em apenas 20 min (DUARTE, 2017).

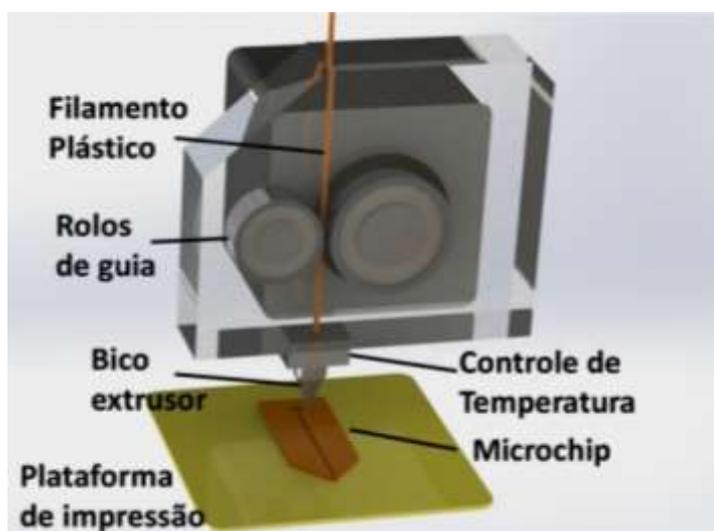


Figura 7. Representação da impressão 3D pelo método de impressão de modelagem por fusão e deposição (FDM). **Fonte:** Duarte, 2017.

Vale destacar que no método de impressão 3D FDM não há necessidade de etapas adicionais, ou seja, o dispositivo já é impresso devidamente selado, podendo inclusive conter sensores integrados (CARDOSO et al., 2020; DUARTE et al., 2017; O'NEIL, 2020). Além disso, esse método de fabricação vai ao encontro com os princípios da química verde, baseado na menor produção de resíduos do processo (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

1.2.2.5 Micro usinagem

A técnica de micro usinagem é uma prototipagem rápida subtrativa, que consiste na utilização de microfresa para moldar o substrato de acordo com a estrutura desejada, removendo pequenos fragmentos do substrato por corte rotativo, como exibido na Figura 8 (GUCKENBERGER et al., 2015). Além do substrato e da microfresa, a máquina de micro usinagem é constituída por uma mesa de trabalho empregada para firmar o substrato e propiciar a

movimentação em XY, e um eixo onde a fresa é fixada, e assim a mesma pode girar e movimentar-se no eixo Z.

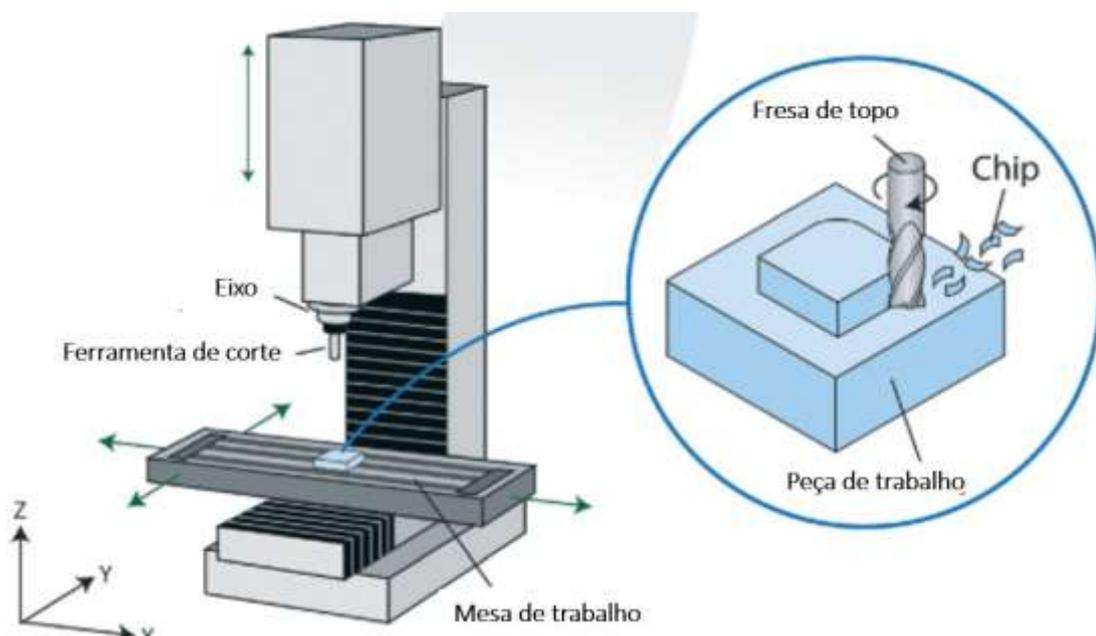


Figura 8. Representação dos componentes básicos de uma fresadora para micro usinagem. **Fonte:** Figura adaptada de Guckenberger et al., 2015.

Esta técnica vêm se destacando na microfluídica pois possibilita a fabricação de moldes e plataformas microfluídicas com boa repetibilidade, precisão e resolução (BANEJAD et al., 2020; GUCKENBERGER et al., 2015; OWENS; HART, 2018; YANG et al., 2019). Além disso, permite usinar microcanais em materiais poliméricos e metálicos em menos de 30 minutos, bem como criar estrutura complexas em 3D. Como exemplo, destaca-se o trabalho realizado por Owens e Hart (2018) em que apresentam módulos com microcanais fabricados com alta resolução em peças de LEGO, que são montados criando um dispositivo microfluídico.

No entanto, a técnica além de requerer profissionais qualificados apresenta um custo elevado para aquisição do equipamento (> R\$ 5.000) e compra de ferramentas (como as fresas que necessitam ser trocadas regularmente em decorrência dos danos ou desgaste), e isso é um fator limitante para muitos pesquisadores.

1.2.2.6 Ablação a Laser

A ablação a laser é outra técnica utilizada para a prototipagem rápida subtrativa, na qual um laser de CO₂ é focado sobre a superfície do material polimérico de modo a interagir promovendo a decomposição fotofísica e térmica do substrato (BECKER; GÄRTNER, 2008; MALEK, 2006; ROBERTS et al., 1997). Com a degradação, são formados canais na superfície polimérica, conforme apresentado na Figura 9, cujas dimensões dependem da velocidade e potência do laser (GABRIEL; COLTRO; GARCIA, 2014; HU; CHEN, 2018). Os substratos mais adequados para essa técnica são os polímeros poliimida, poli(tereftalato de etileno) (PET), PMMA, poli(cloreto de vinila) (PVC), poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) e PC (BECKER; GÄRTNER, 2008; MALEK, 2006).

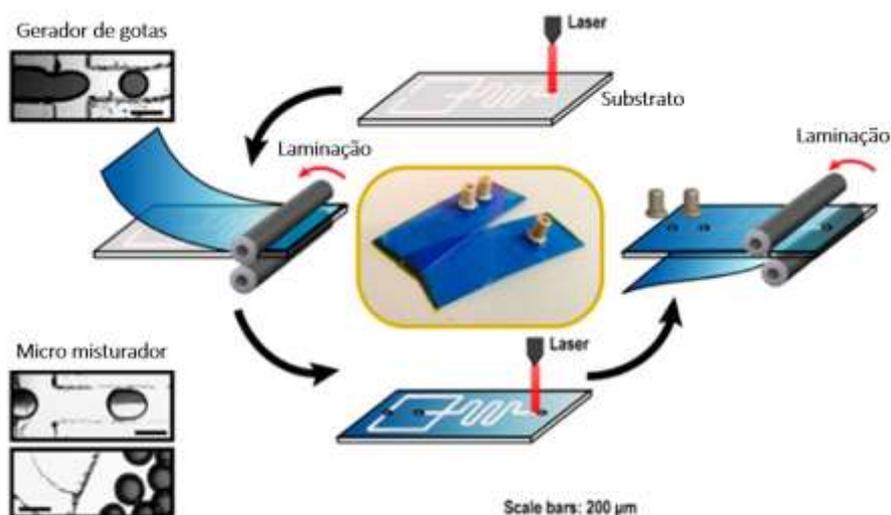


Figura 9. Representação da técnica de ablação a laser para fabricação de dispositivos microfluídicos (gerador de gotas e misturador). **Fonte:** Figura adaptada de Trantidou et al., 2018.

Essa técnica tem sido utilizada tanto para fabricação de moldes (ISIKSACAN et al., 2016) quanto para a criação de microcanais diretamente nos substratos dos dispositivos (HU; CHEN, 2018; ISLAM; NATU; MARTINEZ-DUARTE, 2015; TRANTIDOU et al., 2018). Por exemplo, Trantidou e colaboradores (2018) reportam o emprego da mesma para criar

microcanais de largura de 200 μm e orifícios em folha de PMMA e filme seco fotorresistente, respectivamente, para fabricação de diferentes dispositivos microfluídicos, como gerador de gotículas e misturadores (Figura 9). Já Isiksacan *et al.* (2016), relata sua utilização para a fabricação de molde em PDMS a ser empregado para replicação da estrutura microfluídica do dispositivo. Entretanto, mesmo a técnica sendo mais acessível quando comparada a fotolitografia, moldagem por injeção e estampagem a quente, ela ainda apresenta um custo elevado de aquisição (> R\$ 6000,00).

1.2.2.7 Xurografia

O método de corte por lâmina, conhecido como Xurografia, foi proposto em 2005 por Bartholomeusz (BARTHOLOMEUSZ; BOUTTÉ; ANDRADE, 2005) e consiste na utilização de um plotter de recorte para criar o dispositivo microfluídico desejado. Diferente dos métodos descritos anteriormente, este processo apresenta um custo mais acessível e maior praticidade. De forma sucinta, o desenho da estrutura desejada é projetado e enviado para a plotter, que promove o corte da imagem projetada usando uma lâmina sobre um substrato de interesse, como ilustrado na Figura 10.

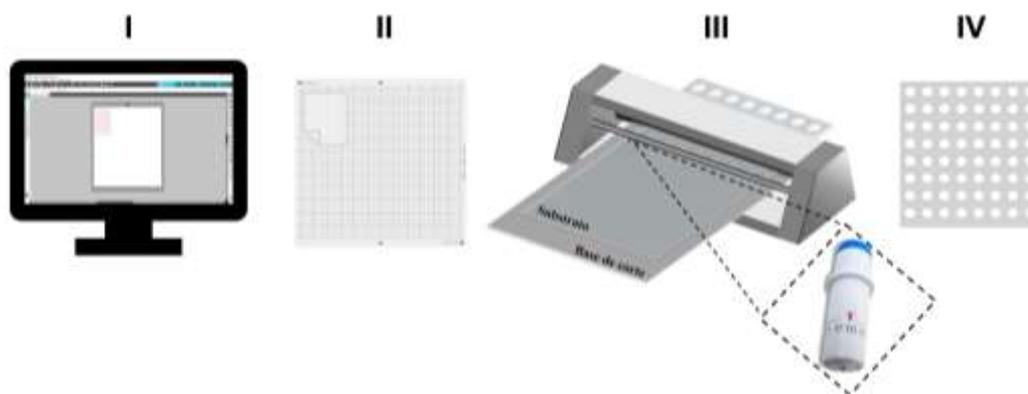


Figura 10. Processo de corte do substrato empregando uma plotter de corte. Em (I) *design* no *software* Silhouette Studio; (II) posicionamento do substrato na base de corte; (III) inserção da base de corte na Silhouette e impressão do *design*; e por fim (IV) retira o substrato da base de corte, obtendo um substrato com a microestrutura. **Fonte:** Autoria própria

O método empregando a plotter de recorte vem sendo relatado na literatura para o corte de filmes adesivos para a fabricação de dispositivos em acrílico (ISLAM; NATU; MARTINEZ-DUARTE, 2015), produção de moldes em fitas adesivas (SPELLER et al., 2019), fabricação de microcanais em PMMA (CHARMET et al., 2020), dispositivos analíticos à base de papel (GLAVAN et al., 2013), desenvolvimento de sensores eletroquímicos empregando papel pirolisado (DAMASCENO et al., 2020), fita adesiva de baixa aderência (DE OLIVEIRA et al., 2019) e filme de poliéster modificado com material condutor (DIAS et al., 2019). Os filmes de poliéster são conhecidos como filmes de transparência e possuem algumas características atrativas como baixo custo, flexibilidade e compatibilidade com todos os tipos de impressoras.

1.2.2.8 Impressão a laser

O uso de filmes de poliéster para fabricar dispositivos microfluídicos foi descrito pela primeira vez em 2003 por Do Lago e colaboradores (DO LAGO et al., 2003) (Figura 11). Neste estudo pioneiro, a camada superior do dispositivo foi perfurada (I), e em seguida o *layout* do dispositivo foi desenhado em um *software* gráfico e impresso a laser no filme de poliéster (II). Durante a impressão, uma camada de toner foi depositada na superfície do poliéster (a). Em seguida, o dispositivo impresso foi laminado contra um filme em branco (III) ou contra sua imagem especular, permitindo obter canais com profundidade de aproximadamente 6 ± 1 ou 12 ± 2 μm , respectivamente. E por fim, os reservatórios (b) foram colados alinhados com os orifícios feitos na camada superior (VI).

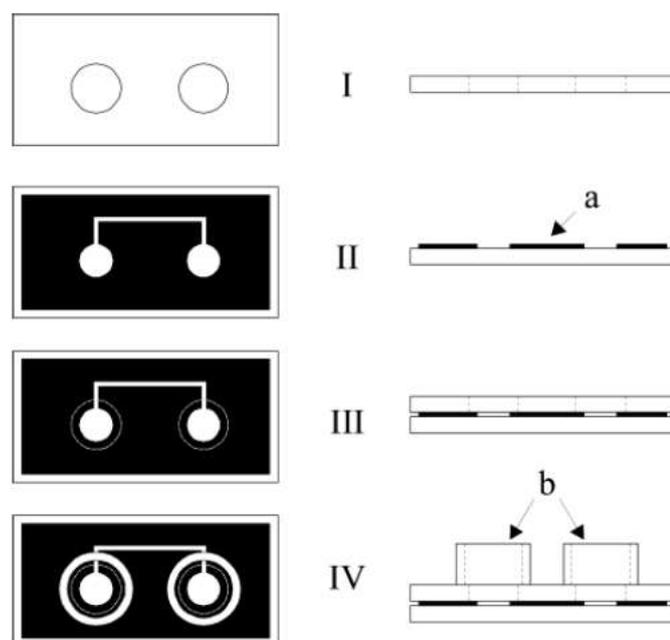


Figura 11. Representação do processo de fabricação por impressão a laser. **Fonte:** Do Lago et al., 2003.

Esse protocolo de fabricação a seco foi extensivamente explorado para criar microchips de eletroforese, micromisturadores passivos, dispositivos de preparo de amostras, moldes para prototipagem em PDMS, placas de microzonas para bioensaios, dispositivos microfluídicos para ensaios via fluxo lateral e dispositivos de geração de gotículas, como recentemente reportado (GABRIEL et al., 2018). A viabilidade da plataforma fabricada em PT para ensaios bioanalíticos também foi demonstrada recentemente através de imunoenaios (OLIVEIRA et al., 2016), amplificação isotérmica mediada por alça (DE OLIVEIRA et al., 2017), extração de RNA (GIMENEZ et al., 2017) e diagnóstico molecular de doenças tropicais (MENDES et al., 2019).

1.2.2.9 Impressão a laser, corte a laser e laminação

Além do processo desenvolvido por Do Lago et al. (DO LAGO et al., 2003), um protocolo de fabricação baseado na metodologia de impressão a

laser, recorte e laminação (PCL, do inglês *Print, Cut and Laminate*) foi descrito com sucesso pelo grupo de pesquisa do Prof. James P. Landers (DUARTE et al., 2011) há cerca de dez anos, permitindo a produção de estruturas microfluídicas em multicamadas. No método PCL, como pode-se notar na Figura 12, as camadas cortadas definem a estrutura do canal, e o toner depositado de ambos os lados dos filmes de poliéster das camadas intermediárias do dispositivo promove a vedação de várias camadas e pode ser usado como barreiras hidrofóbicas, permitindo o controle do fluxo do fluido nos microcanais (JACKSON et al., 2016).

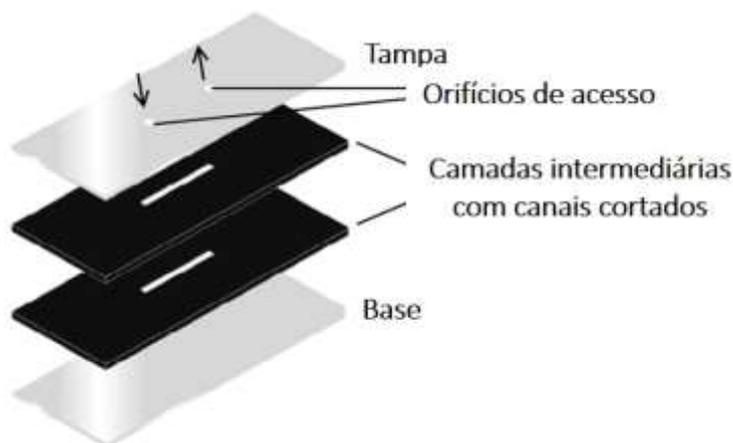


Figura 12. Representação do dispositivo fabricado pelo processo de PCL.
Fonte: Figura adaptada de Duarte et al., 2011.

Vários exemplos foram relatados na literatura usando o protocolo PCL, incluindo o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos associados com a força centrífuga para determinação de hematócritos (THOMPSON et al., 2016b), armazenamento de reagentes e deslocamento interno de fluídos para detecção de drogas de abuso (KRAUSS et al., 2019), detecção de patógenos (DUVALL et al., 2016), separação eletroforética de DNA (DUVALL et al., 2017), mobilização de reagentes, mistura e amplificação por PCR para análise genética (DUVALL et al., 2017; KRAUSS; HOLT; LANDERS, 2017).

Apesar das inúmeras vantagens oferecidas pelos dispositivos microfluídicos baseados em toner criados por meio de impressão a laser ou

protocolo PCL, esse tipo de plataforma também apresenta algumas limitações. Em relação à superfície do poliéster, sua composição química afeta diretamente a magnitude e a estabilidade do fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*) (GABRIEL et al., 2018). Embora a magnitude do EOF desse material seja tipicamente menor que a de outros substratos populares, como vidro ou PDMS, sua magnitude pode ser afetada pelo tipo de poliéster selecionado para suportar as camadas de toner (COLTRO; LUNTE; CARRILHO, 2008). Além disso, é importante mencionar que essas barreiras delimitam as paredes do canal e que, devido à sua natureza hidrofóbica, a adsorção indesejável entre o analito e o toner pode comprometer o desempenho analítico (COLTRO; LUNTE; CARRILHO, 2008; GABRIEL et al., 2018). Além disso, o uso de solventes orgânicos como acetona e acetonitrila nesses dispositivos é bastante desafiador devido à solubilidade do toner, questão que pode comprometer a estrutura do dispositivo microfluídico. Por fim, é importante destacar que a vedação do canal microfluídico usando as camadas de toner como camadas adesivas não suporta bombeamento hidrodinâmico, limitando assim o uso desta plataforma para aplicações que envolvam ensaios de controle eletrocinético (COLTRO; LUNTE; CARRILHO, 2008; DO LAGO et al., 2003; DUVALL et al., 2017), ação capilar (DE SOUZA; ALVES; COLTRO, 2012) e rotação centrífuga (THOMPSON et al., 2016b).

Além das diferentes técnicas de fabricação de dispositivos é importante mencionar que os dispositivos miniaturizados têm como vantagem também a possibilidade de acoplar com diferentes métodos de detecção, destacando aqui a detecção eletroquímica, colorimétrica e a livre de equipamento.

1.3 Métodos de detecção

1.3.1 Detecção eletroquímica

A detecção eletroquímica baseia-se na medida de uma propriedade elétrica do sistema que é proporcional à concentração da espécie de interesse

presente na amostra (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2008). Esse método tem sido acoplado em diferentes dispositivos microfluídicos (CHAGAS et al., 2015; COLTRO et al., 2007a; DIAS et al., 2019; JOZANOVIĆ et al., 2017; METTAKOONPITAK et al., 2016; PETRONI; LUCCA; FERREIRA, 2017; QUERO et al., 2019; SCHILLY et al., 2020). Quando comparado aos métodos ópticos (fluorescência, fluorescência induzida a laser, por exemplo) e espectrometria de massas, essa detecção exibe uma instrumentação simples e mais acessível economicamente (COLTRO et al., 2007a; METTAKOONPITAK et al., 2016). Além disso, a detecção eletroquímica apresenta uma capacidade ímpar de ser acoplada nos dispositivos, devido ao fato que os eletrodos podem ser fabricados tanto por protocolos bem estabelecidos na literatura, tais como a serigrafia (DE OLIVEIRA et al., 2019; DIAS et al., 2019; PETRONI; LUCCA; FERREIRA, 2017), impressão jato a tinta (HU et al., 2012) e desenhados a lápis (CHAGAS et al., 2015), quanto por novos protocolos usando micro fios (FOSDICK et al., 2014) ou a prototipagem rápida por meio da impressão 3D (CARDOSO et al., 2020; DUARTE et al., 2017; O'NEIL, 2020). Ademais, a detecção eletroquímica tem como vantagem a portabilidade, dado que conta com potenciostatos portáteis que possibilitam a análise em lugares remotos (METTAKOONPITAK et al., 2016).

As principais técnicas eletroquímicas empregadas nos microssistemas eletroforéticos (MSE) são a amperometria (KIM et al., 2016; PETRONI; LUCCA; FERREIRA, 2017; SCHILLY et al., 2020) e a condutometria (CASTRO; MANZ, 2015; CHONG et al., 2017; JOZANOVIĆ et al., 2017; MOREIRA et al., 2017, 2018; QUERO et al., 2019). A primeira é baseada na medida de corrente resultante, na presença de uma espécie eletroativa nos processos de oxidação e redução na superfície do eletrodo de trabalho. Já a segunda, consiste na medida da diferença de condutividade iônica entre o eletrólito de corrida e o analito. A detecção condutométrica tem como vantagem ser um detector universal, que diferentemente da técnica

amperométrica, não necessita de espécies eletroativas para realizar a análise (BAKER, 1995).

A condutometria pode ser realizada no modo com contato ou sem contato. Na detecção com contato, os eletrodos são posicionados no microcanal de separação e estão em contato direto com a solução. Esse contato pode promover efeitos negativos na análise, devido a contaminação do eletrodo por meio da adsorção e a formação de bolhas em decorrência da eletrólise. Enquanto isso na detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C⁴D, do inglês *Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*), conforme sugere o nome, os eletrodos não entram em contato direto com a solução presente no interior do canal, diminuindo assim as problemáticas relacionadas à interação da solução com os eletrodos (BRITO-NETO et al., 2005; COLTRO et al., 2012; DA SILVA; DO LAGO, 1998).

No sistema C⁴D dois eletrodos (eletrodos de excitação e receptor) são posicionados em paralelo na parede externa do canal, gerando capacitâncias em relação ao eletrólito (C_1 e C_2), e uma resistência elétrica formada pela solução eletrolítica no interior do microcanal (R_s), conforme representado na Figura 13. Desse modo, para monitorar a condutância é aplicado um potencial senoidal no eletrodo de excitação, e a corrente gerada é percebida pelo eletrodo receptor, e esses dados são registrados em softwares específicos, como PowerChrom[®]. E como a resposta do detector é dada em termos da diferença de condutividade entre analito e eletrólito de análise, pode se obter sinais positivos ou negativos do analito de acordo com meio utilizado (COLTRO et al., 2012; DA SILVA; DO LAGO, 1998; DA SILVA; GUZMAN; DO LAGO, 2002).

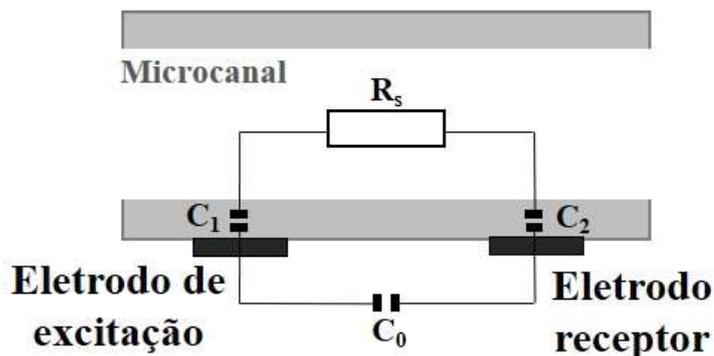


Figura 13. Esquema do circuito equivalente para detecção C4D em microsistemas, onde C_0 , C_1 e C_2 são as capacitâncias formadas: pelo acoplamento dos dois eletrodos, do eletrodo de excitação e do eletrodo receptor, respectivamente. E R_s a resistência elétrica da solução eletrolítica. **Fonte:** autoria própria.

Esse método de detecção tem sido acoplada em MSE para diversas aplicações, incluindo alimentícias (JOZANOVIĆ et al., 2017), ambientais (MOREIRA et al., 2017), clínicas (CHONG et al., 2017) e forenses (MOREIRA et al., 2018; PINHEIRO et al., 2019), devido a facilidade de fabricação dos chips e integração dos eletrodos, além da simplicidade instrumental necessária.

1.3.2 Detecção colorimétrica

A detecção colorimétrica consiste na relação entre a cor gerada e a presença do analito. Essa técnica proporciona tanto a análise quantitativa quanto qualitativa, e pode ser realizada em diferentes tipos de equipamentos, sendo que os convencionais necessitam de volume maior de amostra e reagente, como por exemplo um espectrofotômetro (CHANG et al., 2016; GUAN; PENG; JIN, 2015), ou por equipamentos alternativos, como *scanner*, câmera fotográfica, microscópio óptico e smartphone. Esses últimos permitem a análise colorimétrica em dispositivos microfluídicos, que apresenta consumo reduzido de amostras e reagentes, na faixa de microlitros (DE SOUZA et al., 2014; KRAUSS; HOLT; LANDERS, 2017; LAI; CHANG; WANG, 2017;

OLIVEIRA et al., 2016; SALVE et al., 2018; SOUSA; DUARTE; COLTRO, 2020; WU et al., 2015).

Os dispositivos microfluídicos com detecção colorimétrica vêm sendo aplicados em diferentes áreas do conhecimento, tais como ambientais (CARDOSO et al., 2017; SOUSA; DUARTE; COLTRO, 2020), alimentícias (CARDOSO et al., 2017; SALVE et al., 2018) e clínicas (GABRIEL et al., 2016; LAI; CHANG; WANG, 2017; ORTIZ-GÓMEZ et al., 2018; WU et al., 2015). A utilização dos equipamentos alternativos mencionados para a captura de imagem influenciou o emprego da detecção colorimétrica em análises portáteis e de baixo custo e, também possibilitou o emprego das mesmas em locais com privações econômicas. Em suma, a detecção colorimétrica nesses equipamentos baseia-se na correlação da intensidade de cor em pixels de um dado analito quando esse reage com um cromógeno específico (CATE et al., 2015b; DE SOUZA et al., 2014; KRAUSS; HOLT; LANDERS, 2017; KUMERIA et al., 2017).

Nesse sentido, a análise colorimétrica da imagem capturada pode ser executada de forma simples e rápida, por meio de *softwares* (por exemplo, Corel-PhotoPaint® (GABRIEL et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2014; SILVA; OLIVEIRA; COLTRO, 2017)) ou aplicativos (por exemplo, PhotoMetrix® (SOUSA; DUARTE; COLTRO, 2020)). Considerando o uso de softwares, a imagem pode ser processada no modo RGB (*Red, Green and Blue*), CMYK (*Cyan, Magenta, Yellow and Black*) ou na escala de cinza, e posteriormente, a área de interesse é selecionada e a média da intensidade de cor em pixels é analisada pela ferramenta histograma no canal de cor desejado (DE SOUZA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014). Como exemplo, a Figura 14 apresenta análise colorimétrica de glicose em diferentes concentrações por meio da ferramenta supracitada no canal de cor magenta.

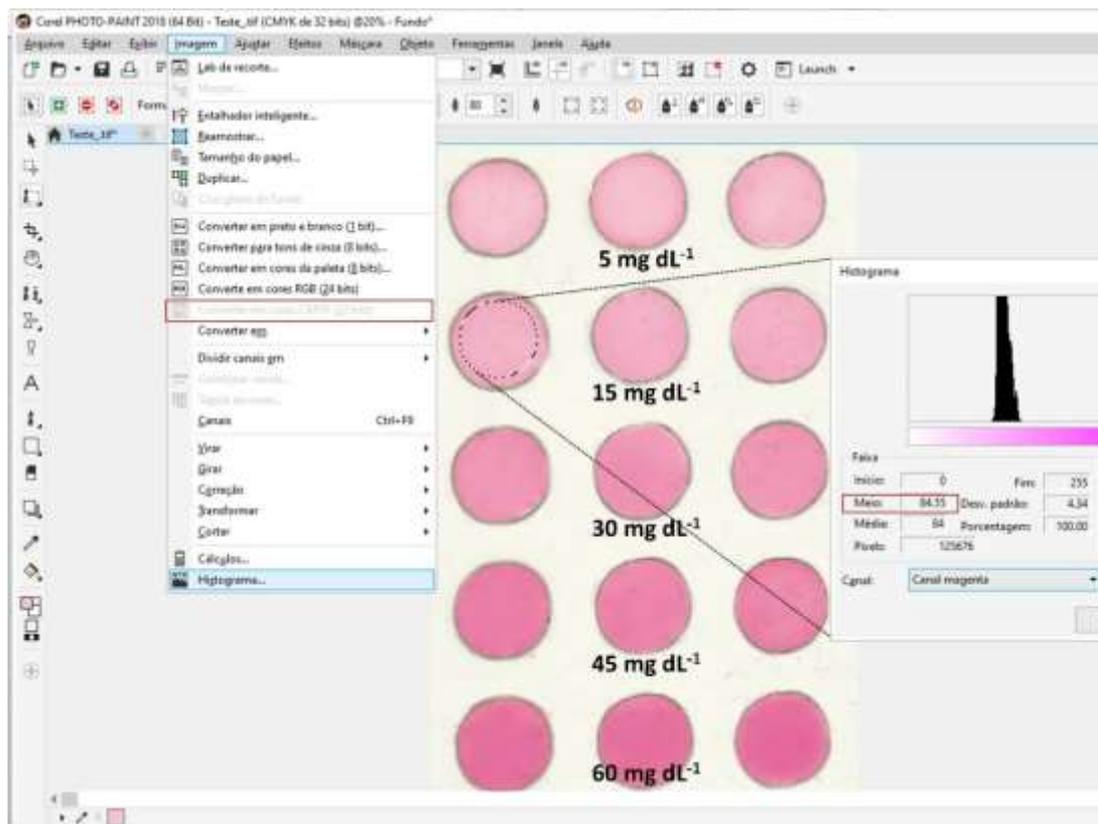


Figura 14. Placa contendo micropoços para ensaio colorimétrica para detecção de glicose digitalizada e aquisição da resposta em intensidade de cor da região selecionada empregando ferramenta histograma presente no *software* Corel Photo-Paint®. A imagem capturada foi analisada no sistema de cor CMYK no canal magenta (M). **Fonte:** Autoria própria.

1.3.3 Detecção livre de equipamento - Detecção via distância

Há décadas tem-se observado o afincamento para o desenvolvimento de dispositivos que possam fornecer uma análise quantitativa livre de equipamento, para atender os países em desenvolvimento. Uma vez que, a organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece alguns parâmetros para que os dispositivos destinados a diagnóstico sejam utilizados no ponto de necessidade, designados ASSURED (do inglês, *Affordable, Sensitive, Specific, User friendly, Rapid and robust, Equipment free, Deliverable*), consequentemente, os dispositivos necessitam ser: acessíveis, sensíveis, específicos, fáceis de usar, rápidos, robustos e livre de equipamentos e

devem ser de fácil manuseio pelos usuários (AKYAZI; BASABE-DESMONTS; BONITO-LOPEZ, 2018; SMITH et al., 2018).

Desse modo, diferentes dispositivos livres de equipamentos foram reportados, conforme revisado por Fu (2014). Esses podem ser divididos em quatro grupos de acordo com o princípio utilizado para detecção do analito, como os baseados: (i) na intensidade de cor na zona de detecção, comparada com a cor desenvolvida por concentrações conhecidas; (ii) na quantidade de barras visíveis formadas no canal ao longo do fluxo amostra; (iii) no tempo gasto para que a zona de detecção apresente um sinal em relação a um controle; e (iii) na distância de um sinal visual gerado/percorrido que é proporcional à concentração do analito (FU, 2014).

A detecção baseada à distância vem se destacado nos últimos anos como alternativa poderosa para detecção quantitativa em dispositivos microfluídicos para aplicações clínicas, alimentícias e ambientais (TIAN et al., 2016). Nesta detecção, a etapa fundamental consiste em converter os resultados das reações químicas em respostas que possam ser visualizadas por meio da distância. As respostas podem ser obtidas a partir da capacidade de parar o fluxo ("*stop-flow*") (CHATTERJEE; MANSFIELD; WOOLLEY, 2014; CHEN; YANG, 2015), levitação magnética (MIRICA et al., 2010), ação capilar (CATE et al., 2013, 2015a; GEROLD; BAKKER; HENRY, 2018; NGUYEN et al., 2020) e expansão volumétrica (SONG; WANG; QIN, 2013; ZHU et al., 2014), conforme apresentado na Figura 15.

Dentre estes métodos, cita-se a expansão volumétrica, que consiste no deslocamento de "*plugs*" ou barras de corante dentro dos microcanais, em que a distância percorrida pelo "*plug*" é proporcional à concentração do analito. O deslocamento é ocasionado pela produção de gás, gerado tipicamente pela reação de degradação de peróxido de hidrogênio, catalisada pelas enzimas peroxidases e seus miméticos (AgNPs, Pt, Cobre), que também são utilizados para amplificar o sinal visual proporcionando alta sensibilidade ao dispositivo (SONG; WANG; QIN, 2013; ZHU et al., 2014).

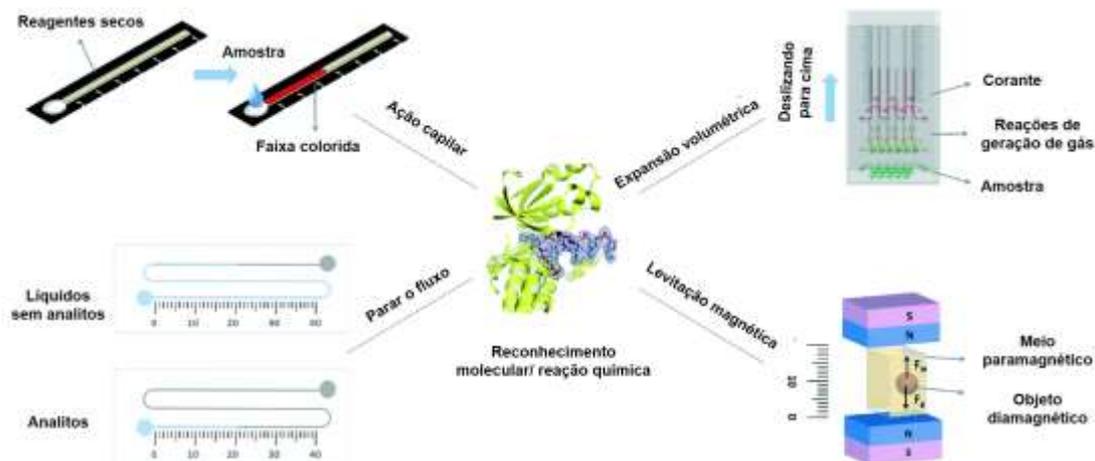


Figura 15. Métodos de detecção com medição baseada a distância. **Fonte:** Figura adaptada Tian et al., 2016.

Diante do exposto, é notório que no âmbito da microfabricação há uma busca contínua pelo desenvolvimento de métodos simples, baratos, acessíveis e com potencialidade de viabilizar a produção de dispositivos analíticos de forma independente de instrumentação sofisticada. Nesse contexto, o presente estudo apresenta pela primeira vez o uso de uma plotter de recorte para o desenvolvimento de dispositivos analíticos em filmes de poliéster. O método proposto foi explorado para a fabricação de diferentes dispositivos analíticos incluindo microplacas contendo arranjo de 96 micropoços para análise colorimétrica, misturadores microfluídicos definidos em estruturas tridimensionais, dispositivos para monitoramento de peróxido de hidrogênio (peroxímetro) baseado à distância e MSE com detecção condutométrica sem contato (C⁴D).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho visa o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos em filmes de poliéster utilizando uma plotter de recorte.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a versatilidade e as limitações do protocolo de fabricação utilizando a plotter de recorte;
- Avaliar a resistência mecânica e química dos dispositivos fabricados em filmes poliéster revestidos com uma camada de acetato de etileno-vinil (EVA);
- Demonstrar a viabilidade do método de fabricação através do desenvolvimento de microplacas, dispositivos microfluídicos tridimensionais, dispositivos baseados no deslocamento de um “*plug*” de corante e MSE;
- Avaliar a potencialidade das microplacas para ensaios colorimétricos de glicose e ureia;
- Demonstrar a eficiência de um misturador fabricado em filmes de poliéster em um arranjo tridimensional por uma reação de complexação de ferro com 1,10-fenantrolina (*o*-fen);
- Explorar o conceito de detecção via distância percorrida por um “*plug*” de corante para determinação de peróxido de hidrogênio;
- Avaliar preliminarmente a fabricação de MSE para separação de cátions inorgânicos.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e reagentes

Os reagentes empregados estão especificados na Tabela 1, juntamente com as respectivas fórmulas moleculares, massas molares, fabricantes e purezas. Todos os reagentes químicos foram utilizados em grau analítico sem purificação adicional.

Tabela 1. Reagentes empregados e suas respectivas fórmulas moleculares, massas molares, fabricantes e purezas.

Reagente	Fórmula Molecular	MM (g mol ⁻¹)	Fab.	Pureza (%)
1,10-fenantrolina (o-fen)	C ₁₂ H ₈ N ₂	180,21	Sigma Aldrich	≥ 99,0
3,5-dicloro-2-hidroxidobenzenosulfônico (DHBS)	C ₆ H ₃ Cl ₂ NaO ₄ S	265,05	Sigma Aldrich	≥ 98,0
4-aminoantipirina (4-AAP)	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O	203,24	Sigma Aldrich	≥ 97,0
Acetato de etila	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	Synth	> 99,5
Acetato de sódio	CH ₃ COONa	83,02	Sigma Aldrich	≥ 99,0
Acetona	CH ₃ COCH ₃	58,08	Neon	≥ 99,5
Acetonitrila	C ₂ H ₃ N	41,05	Sigma Aldrich	> 99,9
Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico (MES)	C ₆ H ₁₃ NO ₄ S	195,24	Sigma Aldrich	≥ 99,0
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	60,05	Vetec	> 99,5
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	176,12	Synth	≥ 99,9
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	192,13	Neon	> 95,0
Ácido clorídrico	HCl	36,46	Qhemis	≤ 37,0
Ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	292,24	Sigma Aldrich	≥ 99,4
Ácido láctico	C ₃ H ₆ O ₃	90,08	Cromoline	> 85,0
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	84,01	Sigma Aldrich	≥ 99,7
Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	53,49	Sigma Aldrich	≥ 99,5
Cloreto de cálcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	147,01	Sigma Aldrich	≥ 99,0
Cloreto de lítio	LiCl	42,39	Sigma Aldrich	≥ 99,0

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Cloreto de magnésio hexahidratado	$\text{Cl}_2\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	203,30	Sigma Aldrich	$\geq 99,0$
Cloreto de potássio	KCl	74,55	Sigma Aldrich	$\geq 99,5$
Cloreto de sódio	NaCl	58,44	Sigma Aldrich	$\geq 99,5$
D(+)-glicose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180,16	Sigma Aldrich	$\geq 99,5$
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	46,07	Scharlau	$> 99,9$
Fosfato de sódio dibásico	Na_2HPO_4	141,96	Sigma Aldrich	$\geq 98,0$
Fosfato de sódio monobásico	NaH_2PO_4	119,98	Sigma Aldrich	$\geq 99,0$
Glicerina	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	92,08	Synth	$> 95,0$
Glicose oxidase (GOx)	<i>Aspergillus niger</i>	181 U mg^{-1}	Sigma Aldrich	-
Hidróxido de sódio	NaOH	40,00	Sigma Aldrich	$\geq 98,0$
Hipoclorito de sódio	NaClO	74,44	Sigma Aldrich	$> 10,0$
Isopropanol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	60,10	Neon	$\geq 99,5$
L-histidina (His)	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	155,55	Sigma Aldrich	$\geq 99,0$
Nitrato de cobre hidratado	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	187,56	Sigma Aldrich	$\geq 99,9$
Nitroprussiato de sódio (NPS)	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	297,95	Vetec	≤ 100
Peroxidase (HRP)	rábano silvestre	73 U mg^{-1}	Sigma Aldrich	-
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	34,01	Neon	35,0
Salicilato de sódio	$\text{NaHOC}_6\text{H}_4\text{COO}$	160,10	Sigma Aldrich	$\geq 99,5$
Sulfato de ferro (II) hepta-hidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278,01	Sigma Aldrich	$\geq 99,5$
Sulfato de sódio	Na_2SO_4	142,04	Sigma Aldrich	$\geq 99,0$
Tris (hidroximetil) aminometano (Tris)	$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	121,14	Sigma Aldrich	$\geq 99,8$
Urease	<i>Canavalia ensiformis</i> (Jack bean)	40 U mg^{-1}	Sigma Aldrich	-
Ureia	NH_2CONH_2	60,06	Sigma Aldrich	$\geq 99,0$

*MM: massa molecular; Fab: fabricante.

As soluções analíticas foram preparadas com água ultrapura processada através de um sistema de purificação de água (Direct-Q3®, Millipore, Darmstadt, Alemanha) com resistividade igual a 18,2 MΩ cm. O corante vermelho foi adquirido da BASF (Suvinil, BASF, São Bernardo do Campo, SP, Brasil).

O soro de controle normal (Quimicontrol) foi adquirido da Ebram Laboratory Products (Belenzinho, SP, Brasil). Os papéis de cromatografia Whatman grau 1 e as folhas de poliéster revestidas com uma camada termossensível (comercializada como bolsas de laminação térmica ou polaseal) (125 e 250 μm de espessura) foram recebidos da GE Healthcare Life Sciences (Chicago, IL, EUA) e do Yidu Group Co., (Hsi-Chih, TPE, Taiwan), respectivamente. Cola epóxi e fita adesiva foram encomendadas da Tekbond (Embu das Artes, SP) e 3M (Manaus, AM, Brasil), respectivamente.

A urina artificial foi preparada de acordo com o procedimento descrito por Brooks e Keevil (BROOKS; KEEVIL, 1997), com algumas modificações. Em resumo, a solução foi preparada misturando ácido láctico (1,1 mmol L⁻¹), ácido cítrico (2,0 mmol L⁻¹), ureia (170 mmol L⁻¹), bicarbonato de sódio (2,5 mmol L⁻¹), cloreto de cálcio (2,5 mmol L⁻¹), cloreto de sódio (9,0 mmol L⁻¹), cloreto de magnésio hexahidratado (2,0 mmol L⁻¹), sulfato de sódio (10,0 mmol.L⁻¹), cloreto de amônio (25,0 mmol L⁻¹), fosfato de sódio monobásico (7,0 mmol L⁻¹) e fosfato de sódio dibásico (7,0 mmol L⁻¹). A solução de corante vermelho foi preparada diluindo uma alíquota de 100 μL do corante concentrado até um volume final de 10 mL com água ultrapura.

3.2 Fabricação de dispositivos analíticos em filmes de poliéster

A viabilidade do protocolo proposto nesse estudo com base na plotter de recorte foi avaliada em três diferentes plataformas: fabricação de placas contendo micropoços, dispositivos misturadores tridimensionais e dispositivos para ensaios via distância percorrida por um “*plug*” de corante. Além disso, o protocolo desenvolvido foi também testado para a fabricação de MSE. Os *layouts* de todos os dispositivos foram projetados usando um *software* gráfico

(Silhouette Studio v. 4.2) e enviados para a plotter de recorte com lâmina (Silhouette, Belo Horizonte, MG, Brasil) e cortados em um filme de poliéster revestido com ou sem uma camada termossensível. A Figura 16 mostra o esquema de fabricação da placa de micropoços e do misturador tridimensional.

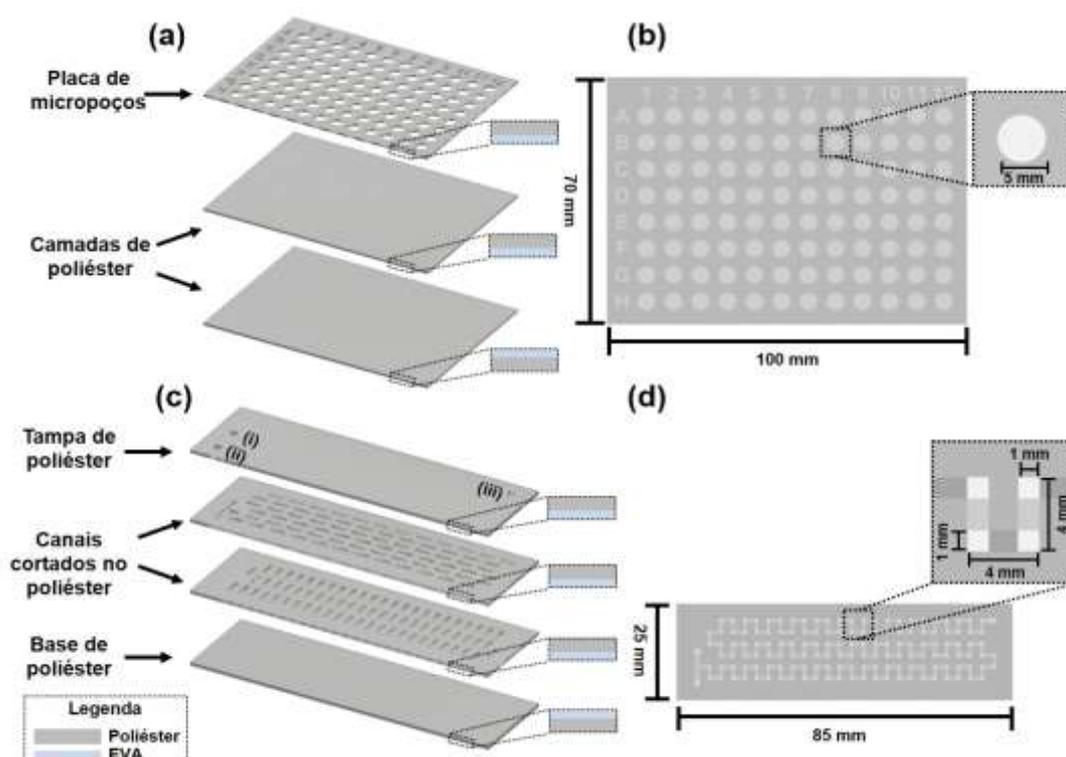


Figura 16. Representação esquemática da fabricação da placa de micropoços (a, b) e dispositivo de mistura microfluídico 3D (c, d) em filme de poliéster revestido com EVA. Em (a), placa com micropoços cortados na camada de poliéster superior é laminada contra duas camadas de poliéster para obter um dispositivo robusto (b). Em (c), canais cortados dispostos em orientações ortogonais foram laminados contra a base e a tampa de poliéster para criar um dispositivo de multicamadas (d). As etiquetas (i) e (ii) indicam os orifícios para entrada da amostra e dos reagentes e (iii) o orifício para a saída do produto da reação.

A placa de micropoços (100 mm de comprimento x 70 mm de largura) foi projetada para conter 96 poços com diâmetro de 5 mm cada (capacidade volumétrica de 9 μ L) dispostos em 12 colunas e 8 linhas, conforme mostrado

na Figura 16a. Após o corte, a placa de micropoços foi selada com auxílio da camada termossensível de EVA contra duas outras folhas de poliéster para proporcionar maior rigidez, utilizando um laminadora térmica (Gazela, Divinópolis, MG, Brasil) a uma temperatura de 140 °C, obtendo a placa de micropoços, conforme visualizado na Figura 16b. A profundidade dos micropoços é definida pela espessura da película de poliéster. Neste dispositivo, os filmes de poliéster utilizados foram de 250 µm de espessura.

Um dispositivo misturador foi criado em um arranjo tridimensional baseado em uma estrutura microfluídica definida usando quatro camadas de poliéster (250 µm de espessura cada), como ilustrado na Figura 16c. Basicamente, os canais microfluídicos (4 mm de comprimento x 1 mm de largura) foram projetados na orientação ortogonal e laminados contra dois outros filmes de poliéster (85 mm x 25 mm). Como pode ser observado na Figura 16c, três furos (diâmetro de 2 mm) foram criados na camada de superior (tampa) para possibilitar o acesso aos canais microfluídicos. Em seguida, as bases das ponteiros (10 µL) de micropipeta foram cortadas e posicionadas nos orifícios para promover a conexão entre o dispositivo de poliéster e as bombas seringas através das mangueiras de silicone para a entrada da amostra e dos reagentes. Na saída do canal microfluídico também foi conectado uma mangueira de silicone para coletar o produto da reação diretamente em uma cubeta de vidro.

Também foi desenvolvido um dispositivo em filmes de poliéster (250 µm de espessura cada) para determinar a concentração de H₂O₂, denominado peroxímetro, baseado no deslocamento de um “*plug*” de corante, visando explorar a potencialidade do método de fabricação proposto. A estrutura do dispositivo consistiu em três camadas, sendo a camada intermediária constituída por um único canal reto (45 mm de comprimento x 0,7 mm de largura) contendo uma zona retangular (9 mm de comprimento x 5 mm de largura) em filme de poliéster (65 mm de comprimento x 10 mm de largura), para suportar uma camada de papel modificado com cobre, conforme exibido na Figura 17a. Também pode-se observar na Figura 17a dois orifícios (diâmetro de 2 mm) criados na camada de cobertura para possibilitar a adição

do “*plug*” de corante e da amostra. Após o recorte da estrutura do dispositivo em filmes de poliéster, a camada intermediária contendo o canal foi laminada contra uma base de poliéster. Em seguida, um pedaço de papel (9 mm de comprimento x 5 mm de largura) foi cortado usando uma máquina de corte a laser de CO₂ (Modelo PE-40B, Perfect Laser, Wuhan, Hubei, China) e lavado três vezes (30 min cada) com água ultrapura em banho ultrassônico (Modelo Q335D, Quimis, Diadema, SP, Brasil) para remover os resquícios do corte com a laser do papel. Entretanto, pode-se empregar também a plotter de recorte para cortar o papel em retângulo, evitando a etapa de lavagem supracitada.

O papel cromatográfico foi então embebido durante 18 horas em uma solução contendo nitrato de cobre 1 mol L⁻¹ para impregnar íons Cu²⁺ na superfície celulósica. Finalmente, o papel foi deixado secar a 60 °C durante 3 horas em uma estufa (Modelo 402, Ethik Technology, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil). O papel modificado com cobre foi inserido na zona retangular definida em poliéster e laminado contra uma tampa de poliéster contendo dois orifícios perfurados, conforme ilustrado na Figura 17b.

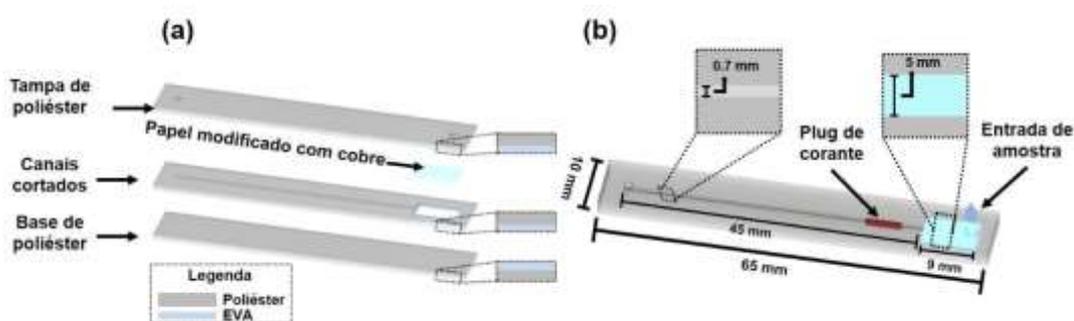


Figura 17. (a) Representação esquemática da fabricação do dispositivo microfluídico para determinar H₂O₂ contendo três camadas de substratos de poliéster, em (b) o dispositivo resultante mostrando o “*plug*” de corante para medição à distância. Em (a), poliéster com canais cortados foram primeiramente laminados contra uma base de poliéster e após a inserção do papel modificado com cobre, o dispositivo foi laminado contra a tampa de poliéster contendo dois orifícios para adicionar corante e solução de amostra.

Além das microplacas, do dispositivo misturador e do peroxímetro, também foi desenvolvido um MSE em poliéster. O *layout* do dispositivo apresenta canais dispostos na geometria de uma cruz simples, conforme apresentado na Figura 18. O comprimento dos canais de injeção e separação foi de 15 mm e 50 mm, respectivamente, sendo ambos com 250 μm de largura. Os canais foram cortados em uma folha de poliéster sem a camada termossensível, que foi removida simplesmente retirando a fina película desse material presente na folha de poliéster (Polaseal). O filme de poliéster foi laminado contra a base e a tampa de poliéster contendo a camada termossensível (60 mm de comprimento x 20 mm de largura).

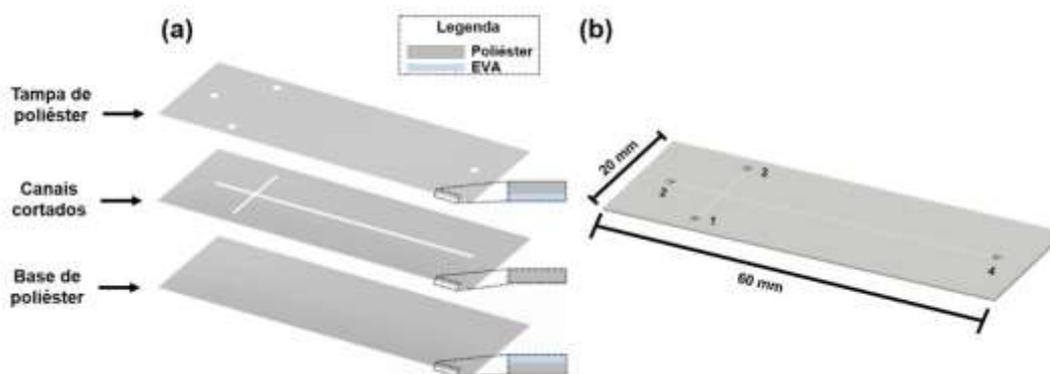


Figura 18. (a) Representação esquemática da fabricação do MSE contendo três camadas de substratos de poliéster e (b) dispositivo resultante, em que os números 1, 2, 3 e 4 indicam onde são os reservatórios para a amostra, tampão, descarte da amostra e descarte do tampão, respectivamente.

Conforme observado na Figura 18a, quatro furos (diâmetro de 0,80 mm) foram confeccionados na tampa de poliéster para proporcionar o acesso aos canais. Posteriormente, as bases das pontetas (200 μL) de micropipetas foram coladas nos orifícios usando uma cola epóxi, criando os reservatórios para amostra (1), tampão (2), descarte de amostra (3) e descarte de tampão (4) (Figura 18b). Os filmes de poliéster empregados para produção deste dispositivo foram de 125 μm de espessura.

3.3 Ensaios colorimétricos de glicose e ureia em placas de micropoços

Os ensaios colorimétricos de glicose e ureia foram realizados na microplaca fabricada em poliéster. Para o ensaio enzimático de glicose, 3 μL de uma solução contendo 4-AAP (4 mmol L^{-1}) e DHBS (8 mmol L^{-1}) foram adicionados aos poços, seguidos pela adição de 3 μL de uma solução contendo GOx (120 U mL^{-1}) e HRP (30 U mL^{-1}) preparado em tampão fosfato 100 mmol L^{-1} (pH 6,0). Por fim, 3 μL das soluções padrão de glicose (5 a 90 mg dL^{-1}) ou da amostra de soro controle normal foram adicionados aos poços.

Em relação ao ensaio de ureia, inicialmente foram adicionados aos poços 2,25 μL das soluções padrão de ureia em diferentes concentrações (0 a 100 mg dL^{-1}) ou da amostra de urina artificial (diluída 12x). Posteriormente, adicionou-se uma alíquota de 2,25 μL de solução de urease (218 U mL^{-1}) preparada em glicerina (1 mol L^{-1}), EDTA (10 mmol L^{-1}), tampão Tris-HCl (100 mmol L^{-1}) e tampão fosfato ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; pH = 7,4). Em seguida, uma alíquota de 2,25 μL de uma solução contendo salicilato de sódio ($1,2 \text{ mol L}^{-1}$) e NPS (68 mmol L^{-1}) foi adicionada. Por fim, 2,25 μL de uma solução contendo hipoclorito de sódio ($1,2 \text{ mol L}^{-1}$) e hidróxido de sódio ($3,5 \text{ mol L}^{-1}$) foi adicionado nos poços após 5 minutos de reação para interromper a atividade enzimática.

As imagens digitais foram capturadas usando um *scanner* de escritório (Modelo G4050, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA), no modo slide com uma resolução de 600 dpi e salvo no formato *tiff*. Para ambos os ensaios, as imagens foram digitalizadas 5 minutos após o término da reação. As intensidades de pixel foram analisadas no *software* Corel Photo-Paint®, selecionando o canal de cor magenta e o padrão de cor CMYK para os ensaios de glicose e ureia, respectivamente.

3.4 Ensaio de complexação de ferro em fluxo contínuo no dispositivo de mistura 3D

Um ensaio para a reação de complexação de ferro foi realizado em fluxo contínuo em um dispositivo microfluídico definido tridimensionalmente para demonstrar sua capacidade de promover com eficiência a mistura de soluções. Conforme descrito recentemente por Mora e colaboradores (2019), esses dispositivos oferecem vantagens significativas sobre os arranjos 2D (MORA et al., 2019). Nesse caso, o bombeamento hidrodinâmico foi realizado com duas bombas seringa (NE-300, New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, EUA). As seringas descartáveis com capacidade de 10 mL foram preenchidas com as soluções e conectadas às entradas (i) e (ii) (ver Figura 16c) através de tubos de silicone (i.d. = 0,65 mm; o.d. = 1,20 mm).

Soluções padrão de Fe^{2+} (2, 6 e 10 mg L^{-1}) foram bombeadas pela entrada (i) com uma taxa de fluxo ajustada para 20 $\mu\text{L min}^{-1}$. Uma solução aquosa contendo uma mistura de ácido ascórbico (4,5 mmol L^{-1}), *o*-fen (4,4 mmol L^{-1}), tampão acetato (0,4 mol L^{-1} ; pH 4,5) foi bombeada pela entrada (ii) a uma taxa de fluxo de 20 $\mu\text{L min}^{-1}$. Após a mistura dentro dos canais tridimensionais, o produto da reação foi coletado diretamente na cubeta de vidro durante 50 minutos (resultando em 2 mL de produto) e analisado por espectrofotometria.

O ensaio de complexação de Fe^{2+} com *o*-fen também foi realizado fora do dispositivo de mistura 3D para comparação da eficiência de mistura. Para isso, foi coletado 2 mL da solução padrão de Fe^{2+} (2, 6 e 10 mg L^{-1}) e 2 mL de solução aquosa contendo uma mistura de ácido ascórbico (4,5 mmol L^{-1}), *o*-fen (4,4 mmol L^{-1}), tampão acetato (0,4 mol L^{-1} ; pH 4,5) e ambas foram adicionadas em um flaconete de vidro de 5 mL, e em sequência a mistura foi agitada manualmente. Posteriormente, foi transferido 2 mL do produto da reação para um cubeta de vidro. E igualmente a mistura realizada dentro do dispositivo, o produto da reação foi analisada por espectrofotometria.

A análise espectrofotométrica do complexo formado através da complexação com *o*-fen foi realizada utilizando um espectrofotômetro modelo SP1105 adquirido da Bel Engineering (Monza, MB, Itália) para comparar a

eficiência da mistura realizada no dispositivo 3D. As medidas de absorvância foram registradas a 510 nm usando uma cubeta de vidro com caminho óptico de 1 cm. Para esse fim, a reação de complexação foi realizada conforme descrito anteriormente e a análise quantitativa foi registrada na faixa de concentração de Fe^{2+} entre 1 e 5 mg L^{-1} .

3.5 Peroxímetro baseado à distância

Um peroxímetro baseado à distância foi realizado em um dispositivo fabricado em poliéster contendo um canal único e reto conectado a um reservatório retangular previamente preenchido com um pedaço de papel impregnado com cobre. Primeiro, 1 μL de solução de corante vermelho foi introduzido no canal através do orifício perfurado na parte superior do dispositivo e depois aspirado com auxílio de um seringa de 10 mL até o ponto zero da escala métrica através do orifício perfurado na camada inferior do dispositivo. Em seguida, 3 μL de solução de H_2O_2 (117,5 a 587,5 mmol L^{-1}) foram adicionados ao reservatório contendo o papel impregnado com cobre. O orifício criado no reservatório foi então selado com uma fita adesiva para permitir que O_2 gerado pela decomposição de H_2O_2 empurre o “*plug*” de corante ao longo do canal. Após 10 minutos de reação, a distância percorrida pelo “*plug*” de corante foi medida usando a escala milimétrica e correlacionada com a concentração. A escala milimétrica de 0 a 55 mm foi desenhada em um *software* gráfico e impressa em folha sulfite branca, e o peroxímetro foi posicionado sobre a escala.

3.6 Procedimentos e instrumentação para as análises eletroforéticas

Para avaliar o desempenho do MSE fabricado em poliéster recoberto com EVA, com exceção da camada com canais (poliéster sem EVA), foram realizados testes para a separação de cátions inorgânicos (K^+ , Na^+ e Li^+). Para isso, primeiramente, os canais foram lavados com água ultrapura e condicionados eletrocineticamente com solução tampão composta por uma

mistura equimolar de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico (MES) e L-histidina (His) (30 mmol L^{-1} cada) durante 5 e 10 min, respectivamente. Os reservatórios 1, 2, 3 e 4 foram preenchidos com alíquotas de $50 \mu\text{L}$ do tampão. Após o condicionamento, foi realizada a injeção eletrocinética da amostra empregando o modo *floating*, que está representado na Figura 19.

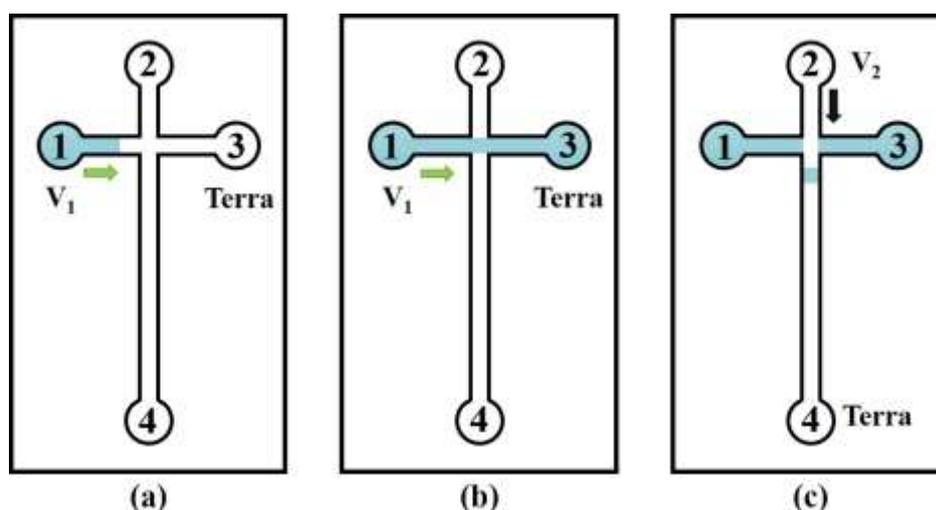


Figura 19. Representação do modo de injeção *floating* para introdução de amostra em microcanais. Em (a) e (b) representam a aplicação de potencial no reservatório 1 (V_1), mantendo aterrado o reservatório 3, e em (c) a aplicação de potencial no reservatório 2 (V_2), mantendo aterrado o reservatório 4, para mover o “*plug*” de amostra no canal de separação em direção ao detector.

Primeiramente, adicionou-se $50 \mu\text{L}$ de amostra no reservatório 1 e aplicou-se um potencial elétrico de 500 V durante 10 s , mantendo o reservatório 3 aterrado para garantir o preenchimento do canal com amostra (Figura 19a e 19b). Em seguida, o potencial aplicado no reservatório 1 foi desligado, e aplicou-se um potencial de 800 V no reservatório 2 durante 120 s mantendo o reservatório 4 aterrado, com intuito de mover o “*plug*” de amostra presente na intersecção dos canais em direção ao detector (Figura 19c). Para detecção condutométrica sem contato, aplicou-se um sinal senoidal com frequência e amplitude iguais a 400 kHz e 40 V_{pp} , respectivamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

As análises foram realizadas utilizando uma plataforma microfluídica (Modelo ET121, Edaq, Denistone East, Austrália), uma fonte de alta tensão (Modelo ER230, Edaq, Denistone East, Austrália) e um detector C⁴D (Modelo ER225, Edaq, Denistone East, NSW Austrália). Os *softwares* empregados para controle de potencial aplicado e aquisição dos dados foram Sequencer™ e PowerChrom®, respectivamente. Vale ressaltar que o desenvolvimento experimental utilizando MSE encontra-se em andamento e apenas os resultados preliminares serão apresentados.

3.7 Resistência química após exposição a solventes orgânicos

A resistência química do microcanal fabricado em filme de poliéster com a camada termosensível foi testada usando acetona, isopropanol, etanol, acetonitrila e acetato de etila. Para essas experiências, microcanais (55 mm de comprimento x 0,7 mm de largura) foram preenchidos independentemente com 10 µL de cada solvente (puro) e mantidos por 2 horas. Em seguida, os canais foram enxaguados, secos e avaliados por microscopia óptica.

3.8 Caracterização por microscopia óptica

A seção transversal do dispositivo microfluídico e a morfologia dos canais e reservatórios criados através da impressão de recorte foram avaliadas por microscopia óptica usando um microscópio óptico Zeiss Axio Imager 2 acoplado a um sistema de varredura a laser Zeiss LSM 700, equipado com um laser de diodo (405 nm) e lente objetiva EC EPIPLAN 20x/0,4 HD M27. Um Estereomicroscópio Research – Opticam (Modelo OPZTR, OPTICAM, São Paulo, SP, Brasil) e um microscópio óptico (Modelo XSZ-N107T, COLEMAN, Santo André, SP, Brasil) foram utilizados para medir as larguras reais dos microcanais criados nos filmes de poliéster, bem como para avaliar a morfologia da superfície após exposição a produtos químicos, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Processo de fabricação

O uso de filmes de poliéster na fabricação de dispositivos microfluídicos emergiu como um substrato acessível e alternativo quando comparado com outros materiais mais comumente utilizados. Como mencionado anteriormente, os canais microfluídicos podem ser fabricados nesta plataforma através da impressão a laser, também conhecido como impressão direta (DO LAGO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2014), ou através da combinação de etapas associadas à impressão, corte a laser e laminação térmica (PCL) (BIRCH et al., 2017; DUARTE et al., 2011; THOMPSON et al., 2015, 2016a). No presente estudo, um filme de poliéster revestido com uma camada de EVA foi usado, ao invés de folhas de transparências comuns, como substrato para o desenvolvimento de dispositivos analíticos por meio de uma plotter de recorte. O EVA é termossensível e tem sido utilizado para promover a selagem, ou vedação, entre dois ou mais substratos de poliéster (HENDERSON, 1993). O uso do substrato de poliéster revestido com EVA permite a fabricação direta de microcanais e outras estruturas, incluindo micropoços, empregando uma plotter de recorte, que promove o corte de microcanais e outros compartimentos desejados. Em seguida, os filmes contendo as estruturas recortadas são laminadas termicamente usando um filme de poliéster sem EVA ou outro revestido com EVA.

No protocolo proposto, a camada de EVA promove uma vedação mais intensa e efetiva quando comparada às camadas de toner depositadas no filme de poliéster com uma impressora à laser, dado que a camada de EVA apresenta melhor compatibilidade química aos solventes orgânicos concentrados do que a camada de toner. Uma vez que no trabalho de Gabriel *et al.* (2012) quando se empregou uma solução tampão com mais de 3% de metanol, como eletrólito em uma separação eletroforética, a intensidade dos picos dos analitos diminuíram e a linha de base apresentou menor estabilidade. Além disso, no trabalho desenvolvido por Coltro *et al.* (2008) utilizou-se acetona para remover a camada de toner empregada como máscara para padronização de eletrodos na superfície de poliéster, indicando

assim, a solubilidade do toner no solvente orgânico acetona. Além disso, Do Lago *et al.* (2003) afirma que devido natureza do toner e do filme de poliéster solventes orgânicos concentrados não devem ser usados nos dispositivos de PT (COLTRO; DA SILVA; CARRILHO, 2008; DO LAGO *et al.*, 2003; DUARTE *et al.*, 2011; GABRIEL *et al.*, 2012, 2018; HU; CHEN, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Em comparação com outros protocolos de fabricação já relatados, a fabricação direta de canais microfluídicos em substratos de poliéster não requer o uso de um sistema de laser de CO₂ (DUARTE *et al.*, 2011; THOMPSON *et al.*, 2015; WEIGL *et al.*, 2001), a impressão de várias camadas de toner (DO LAGO *et al.*, 2003; PICCIN *et al.*, 2014), ou uma etapa adicional para fixação de adesivo sensível ao calor (BIRCH *et al.*, 2017).

Além disso, a instrumentação necessária para produzir dispositivos microfluídicos em substratos de poliéster envolve basicamente uma plotter de recorte e uma laminadora térmica, que podem ser adquiridas ao custo de aproximadamente R\$ 3.000,00 (US\$ 700). A viabilidade do protocolo de impressão de recorte foi demonstrada através da fabricação de microplacas contendo 96 micropoços, dispositivos microfluídicos contendo canais definidos tridimensionalmente para mistura de soluções, bem como dispositivos para determinação do teor de H₂O₂ baseado na distância percorrida por um “*plug*” de corante. Para a fabricação desses dispositivos, os consumíveis empregados incluem substrato de poliéster e folha de papel cromatográfico. O custo total estimado por unidade de cada dispositivo está resumido na Tabela 2. Como pode ser observado, as microplacas, os dispositivos para mistura ou o peroxímetro podem ser fabricados ao custo unitário inferior a R\$ 0,45 (US\$ 0,10).

Tabela 2. Estimativa de custo dos consumíveis necessários para a fabricação de dispositivos em substratos de poliéster.

Dispositivos	Consumíveis	Quant.	Custo (R\$)	Quant. de dispositivos fabricados	Custo total/ unid. (R\$)
Placa de micropoços	Folhas de laminação térmica*	1,5 unid.	0,34	1	0,34
	Folha de laminação térmica	1 unid.	0,21	1	
Misturador 3D	Folha de laminação térmica	1 unid.	0,21	5	0,21
	Folha de laminação térmica	1 unid.	0,21	5	
Peroxímetro	Papel cromatográfico (200x200 mm)	1 unid.	2,51	800	0,05
	Solução de nitrato de cobre (5 mL)	1,2 g	0,21	100	

*Cada unidade do produto comercial é constituída por dois filmes de poliéster.

Além do custo, é importante destacar o tempo necessário para fabricação dos dispositivos. Após projetar a configuração desejada, as etapas de impressão e laminação podem ser concluídas em aproximadamente 10 min. Além disso, o protocolo de fabricação a seco não gera resíduos químicos, sendo considerado um processo verde (ANASTAS; EGHBALI, 2010; GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). Em relação ao protocolo proposto, é importante destacar que os dispositivos analíticos foram fabricados em folhas de poliéster com tamanho igual a 80 mm x 110 mm (largura x comprimento). No entanto, o uso de folhas maiores (tamanhos A3, A4, por exemplo) pode permitir a fabricação de dezenas de dispositivos em um único filme durante uma mesma etapa de recorte.

4.2 Dimensões limitantes

As dimensões limitantes e a fidelidade da etapa de recorte dos canais em filmes de poliéster foram investigadas. Para tal finalidade, canais simples

em formato reto com comprimento igual a 5 cm foram projetados com largura variando de 250 a 1000 μm . Como visualizado na Figura 20a, os microcanais foram recortados com sucesso e com boa uniformidade. Por outro lado, o método de fabricação proposto exibiu limitações para se obter canais estreitos. Utilizando o protocolo descrito neste estudo, a fabricação de canais com largura menor que 300 μm ficou bastante comprometida, tendo afetado significativamente a uniformidade e a reprodutibilidade. Dessa forma, a largura de 300 μm foi considerada limitante na fabricação dos dispositivos utilizando filme de poliéster recoberto com EVA.

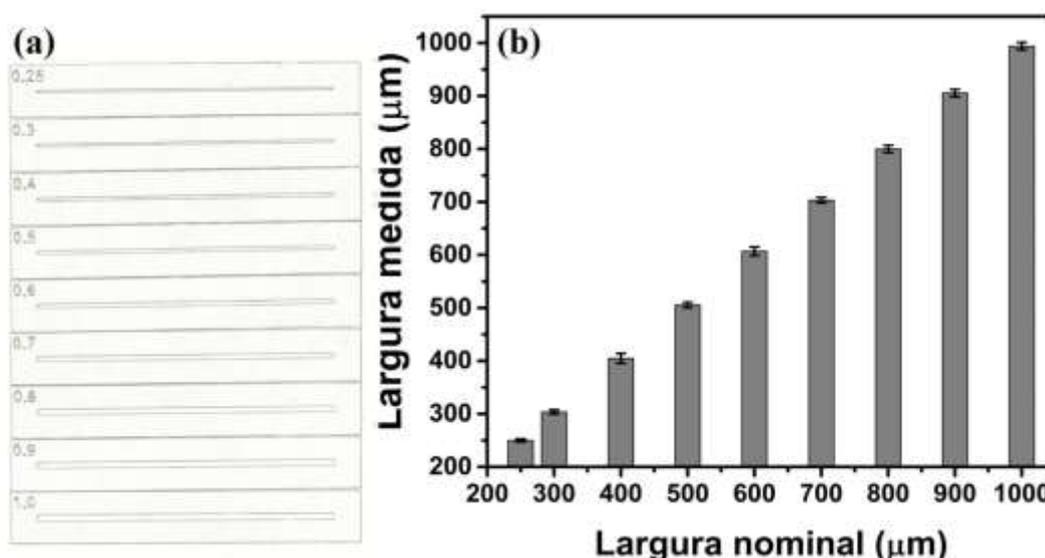


Figura 20. (a) Imagem digital mostrando os canais definidos em poliéster com larguras entre 0,25 e 1 mm. (b) Relação entre os valores nominais e os valores medidos da largura em três pontos diferentes ao longo do canal (extremidades e meio) (n=3).

Para os canais recortados, as larguras nominais foram comparadas aos valores de largura medidos opticamente. Com relação a essa comparação, os valores de largura foram medidos em três pontos diferentes ao longo do canal (extremidades e meio) usando um estereoscópio óptico acoplado com câmera digital e software para análise morfológica. Com base nos dados exibidos na Figura 20b, é possível afirmar que o processo de corte apresentou excelente precisão e fidelidade às larguras esperadas. Para as larguras nominais que

variaram de 250 a 1000 μm , as larguras medidas apresentaram valores na faixa de 249 ± 3 a 994 ± 7 μm . Com base nos dados obtidos, pode-se inferir que a plotter de recorte ofereceu boa precisão considerando os valores nominais para a fabricação de canais em substratos de poliéster.

Os canais com largura de 250 μm apresentaram um bloqueio total devido à fusão do EVA e à penetração dessa cola dentro dos mesmos. Em vista disso, em testes preliminares realizados com os MSE, optou-se por remover a camada de EVA da folha de poliéster da camada intermediária do dispositivo, ou seja, da camada de poliéster com os canais. Essa estratégia foi adotada de modo a se obter canais com largura de aproximadamente 250 μm .

A profundidade do microcanal é outro parâmetro importante na definição da estrutura microfluídica em substratos de poliéster. Nos trabalhos pioneiros, os microcanais foram definidos na plataforma composta de PT através da impressão de camadas de toner simples ou duplas, permitindo a obtenção de canais com profundidades iguais a 6 ou 12 μm , respectivamente (DO LAGO et al., 2003). Uma estratégia para aumentar a razão de aspecto foi demonstrada pelo grupo liderado pelo Professor James P. Landers através do protocolo de PCL (DUARTE et al., 2011; THOMPSON et al., 2015). Nesta abordagem, as camadas de toner foram inicialmente impressas a laser nos dois lados de um filme de poliéster. Em seguida, a estrutura microfluídica foi cortada usando um sistema de laser de CO_2 e os filmes foram alinhados e laminados juntos, promovendo a fabricação de canais com profundidade proporcional ao número de filmes de poliéster.

Como nesse protocolo de fabricação o substrato é recortado, a espessura do filme define a profundidade do microcanal após a laminação. Os substratos de poliéster selecionados para produzir dispositivos analíticos são comercializados em diferentes espessuras, variando de 75 a 250 μm . Nesse sentido, a profundidade do canal pode ser ajustada dependendo da aplicação desejada, alterando, quando necessário, a espessura do substrato. A plotter de recorte também pode ser empregada na fabricação de eletrodos em

substratos de poliéster (DIAS et al., 2019) e materiais mecanicamente frágeis, como papel pirolisado (DAMASCENO et al., 2020).

Além de avaliar as dimensões limitantes, a viabilidade do uso da plotter de recorte também foi investigada na fabricação de micropoços em diferentes formatos geométricos incluindo círculos, quadrados, triângulos e pentágonos. Conforme apresentado na Figura 21a, pode-se observar que a plotter permitiu o corte de poços definidos com dimensões (diâmetro ou comprimento de cada lado) entre 3 e 8 mm em todas as formas geométricas mencionadas. Dentre as opções avaliadas, escolheu-se os micropoços definidos em formato circular com diâmetro igual a 5 mm (Figura 21b) para realizar os ensaios colorimétricos nas microplacas poliméricas.

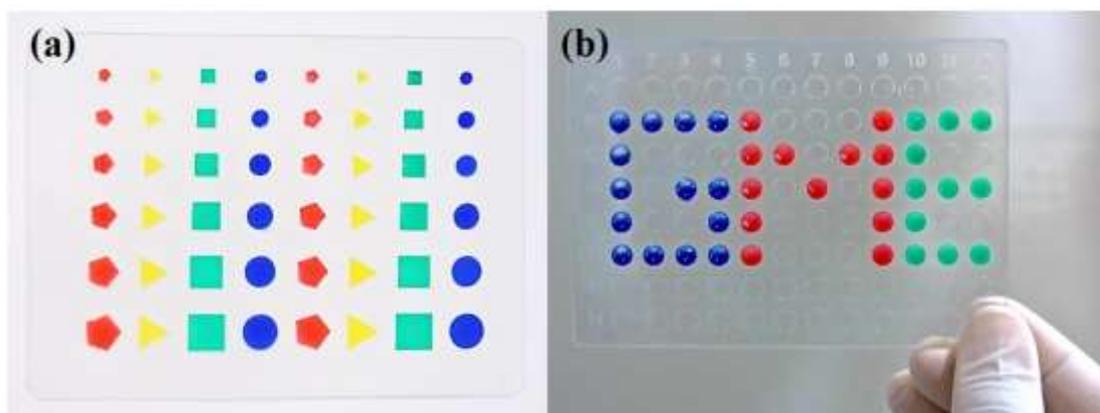


Figura 21. (a) Imagem digital de micropoços com diferentes formas geométricas em poliéster, como círculos, quadrados, triângulos e geometrias de pentágonos, obtidos com a plotter de recorte. A plotter permitiu o corte de poços definidos com dimensões (diâmetro ou comprimento de cada lado) entre 3 e 8 mm. Os poços foram preenchidos com corantes azul, verde, amarelo e vermelho. (b) Uma imagem fotográfica da placa de micropoços com as letras G, M, e E desenhadas por meio do preenchimento dos micropoços com corantes azul, vermelho e verde, respectivamente.

4.3 Resistência mecânica e química

A selagem dos canais microfluídicos promovidos pela cola de EVA forneceu alta resistência mecânica, a qual foi testada pelo bombeamento hidrodinâmico de água dentro dos microcanais. A estrutura microfluídica

suportou o transporte de fluidos com taxa de bombeamento variando de 0 a $300 \mu\text{L min}^{-1}$. Os canais não apresentaram vazamentos nessa faixa de vazão, demonstrando melhor robustez em comparação com os dispositivos de poliéster- toner (GABRIEL et al., 2018).

Devido ao uso da cola à base de EVA, foi investigada a compatibilidade química da plataforma microfluídica quando exposta a diferentes solventes orgânicos. Como pode ser observado na Figura 22, os canais de poliéster revelaram compatibilidade química satisfatória quando expostos a acetona, isopropanol, etanol, acetonitrila e acetato de etila.

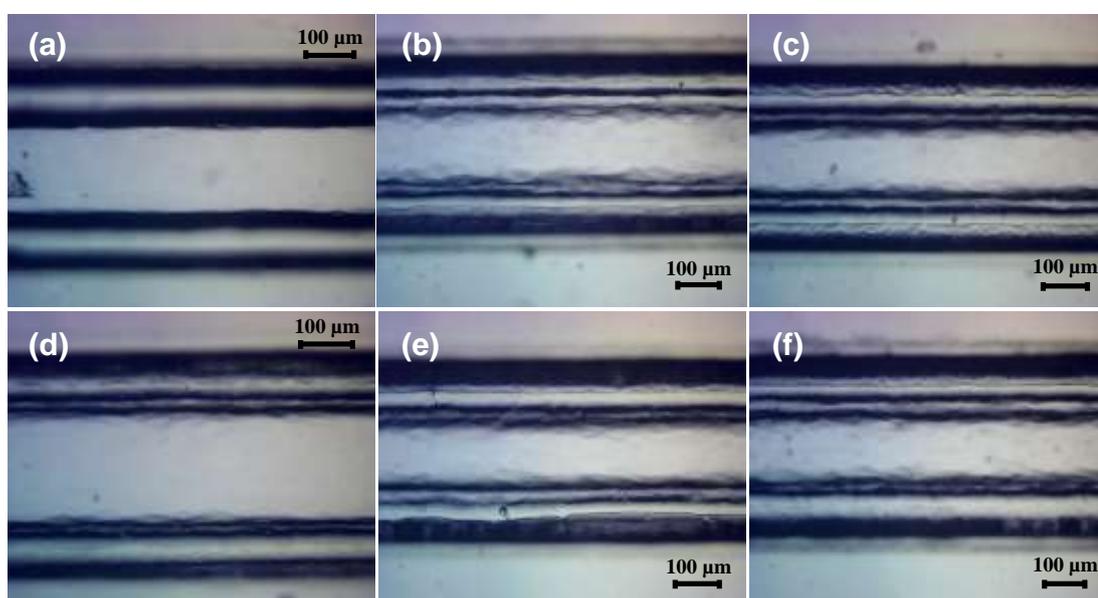


Figura 22. Imagens microscópicas dos canais preenchidos (a) água, (b) acetona, (c) isopropanol, (d) etanol, (e) acetonitrila e (f) acetato de etila.

Por meio das imagens microscópicas pode-se observar que o filme de poliéster revestido com EVA apresentou efeitos aos solventes: acetona, isopropanol, acetonitrila e acetato de etila (Figura 22 b, c, e, f, respectivamente). Entretanto, visualmente, pode-se inferir que a estrutura microfluídica ficou comprometida quando exposta ao contato com acetona, isopropanol e acetonitrila, devido ao embasamento notado na estrutura do canal, que foi atribuída a solubilização da cola de EVA nos solventes. No entanto, a estrutura microfluídica permaneceu selada após a exposição a

solventes orgânicos, revelando que a cola EVA é bastante eficaz na vedação dos dispositivos. É importante destacar que o dispositivo de poliéster provou ser uma alternativa interessante aos dispositivos de PT, que exibem baixa resistência mecânica e baixa compatibilidade com solventes orgânicos (COLTRO; DA SILVA; CARRILHO, 2008; GABRIEL et al., 2012, 2018).

4.4 Microscopia óptica confocal

A profundidade dos micropoços e microcanais fabricados em substratos de poliéster foi caracterizada por microscopia óptica confocal. As Figuras 23a e 23b mostram micrografias ópticas de um único poço e uma visão ampliada de sua região interna, possibilitando visualizar a uniformidade da estrutura criada pelo corte da impressão. A profundidade obtida para o poço foi de aproximadamente $235 \pm 2 \mu\text{m}$, o que é bastante consistente com a profundidade esperada, pois a espessura nominal do filme de poliéster fornecida pelo fabricante é de $250 \mu\text{m}$. Essa pequena diferença pode ser atribuída ao próprio processo de fabricação, uma vez que durante a laminação térmica, o substrato de poliéster é selado contra outro filme devido ao derretimento da cola EVA.

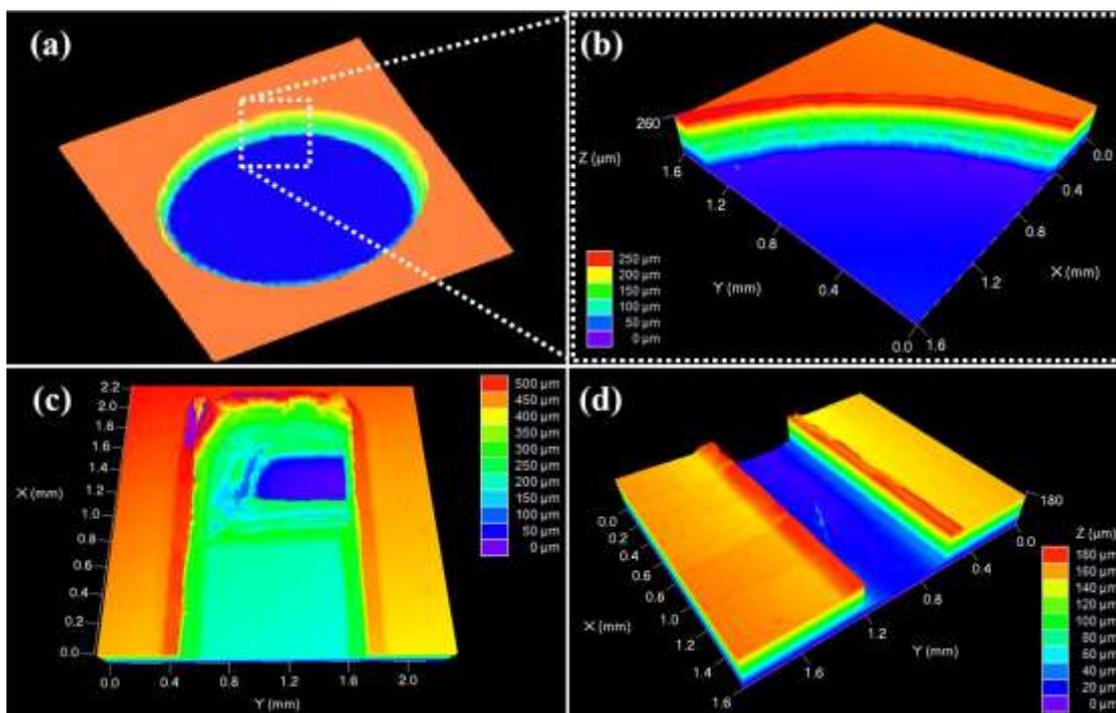


Figura 23. Micrografias ópticas mostrando (a) um micropoço e (b) sua profundidade, (c) a vista superior do dispositivo de mistura 3D e (d) perfil típico de um microcanal definido em poliéster. Em (c), a cor verde indica os canais cortados ortogonalmente, enquanto a cor azul indica a base de poliéster.

A Figura 23c exibe uma imagem óptica da junção dos canais para o misturador definido em 3D. Observou-se que a profundidade da junção dos canais foi de aproximadamente $459 \pm 5 \mu\text{m}$, enquanto o valor esperado era $500 \mu\text{m}$. Nesse caso, existem dois fatores a serem considerados. Primeiro, a diferença observada está relacionada ao achatamento do filme de EVA devido à laminação térmica. Além disso, é importante notar que o filme de EVA está presente na base e no segundo filme de poliéster, que foram alinhados face a face, causando assim uma maior deformação e achatamento do canal. A Figura 23d mostra uma micrografia obtida para o canal do peroxímetro. Para uma melhor visualização da estrutura do canal, o filme de EVA foi removido do filme de poliéster que contém o canal de corte. A profundidade medida para o canal criado no dispositivo peroxímetro foi de aproximadamente $145 \pm 3 \mu\text{m}$, o que está de acordo com a espessura da folha de poliéster sem o filme EVA

(150 μm). Além disso, a ausência de grandes imperfeições superficiais nas paredes é um bom indicativo do processo de corte suave.

4.5 Desempenho analítico dos dispositivos de poliéster

A versatilidade dos dispositivos analíticos fabricados com a *plotter* de recorte foi demonstrada explorando (i) ensaios colorimétricos nas microplacas, (ii) mistura sob fluxo contínuo em dispositivos microfluídicos definidos em 3D e (iii) detecção de H_2O_2 por meio da distância percorrida por um “*plug*” de corante. Além disso, testes preliminares foram realizados para demonstrar a potencialidade do método proposto para a fabricação de MSE.

4.5.1 Ensaios colorimétricos em placas de micropoços

Os ensaios colorimétricos para ureia e glicose foram escolhidos como ensaios modelo, devido às suas relevâncias clínicas e à possibilidade de serem detectados em amostras biológicas (PUNDIR; JAKHAR; NARWAL, 2019; TOSCHI; WOLPERT, 2016; WU et al., 2015). Além disso, a simplicidade da reação colorimétrica e do procedimento analítico para análise da intensidade de cor podem impulsionar a implementação desse tipo de plataforma para testes de baixo custo no ponto de necessidade sem instrumentação sofisticada.

O ensaio colorimétrico para detecção de glicose foi realizado por meio de uma reação indireta, mediante a reação com os reagentes cromógenos 4-AAP e DHBS catalisada pelas enzimas GOx e HRP, conforme apresentado na Figura 24 (TRINDER, 1969). Nesta reação, primeiramente a β -D-glicose na presença de oxigênio é oxidada pela ação catalítica da enzima GOx gerando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (WOHLFAHRT et al., 2004). Posteriormente, perante a ação catalítica da HRP, o H_2O_2 reage com 4-AAP e DHBS, ocorrendo a redução do peróxido a água e a oxidação dos cromógenos formando antipirilquinonimina, que apresenta coloração rosa-avermelhada e cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose (BARHAM; TRINDER, 1972).

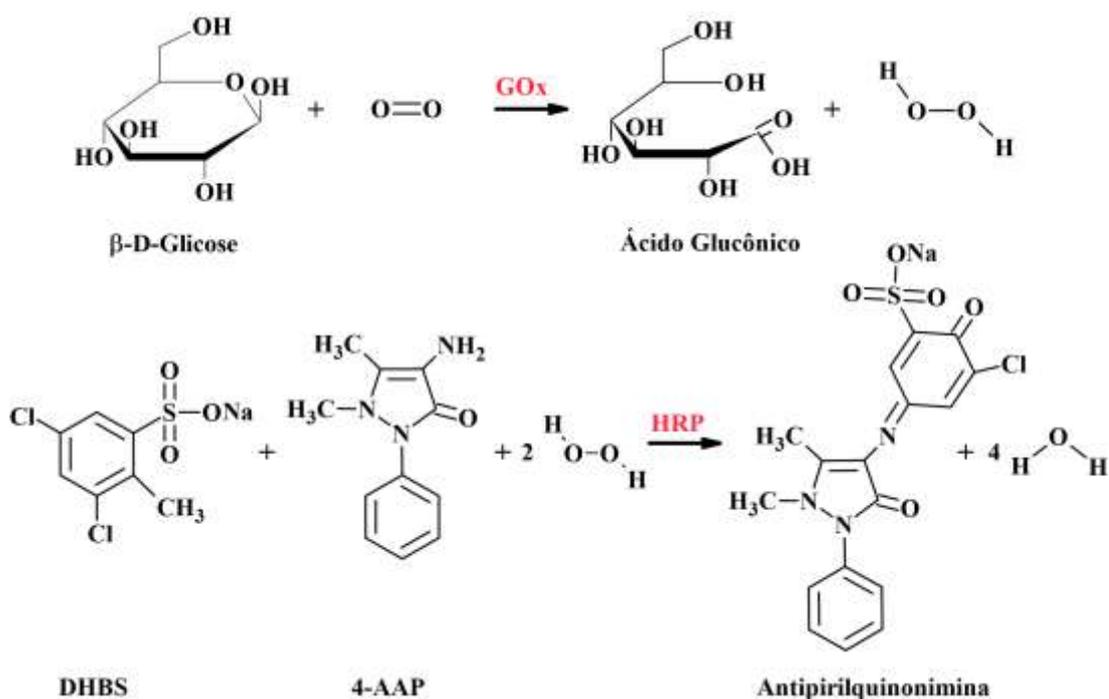


Figura 24. Reações para a determinação colorimétrica indireta de glicose. A glicose sofre oxidação pela ação da GOx, gerando H_2O_2 . Este reage com os reagentes cromógenos formando um composto rosa-avermelhado denominado antipirilquinonimina.

A detecção colorimétrica de ureia foi realizada por meio das reações entre hipoclorito de sódio e salicilato de sódio, sendo catalisadas pela enzima urease e o complexo NPS, conforme exibido na Figura 25. Nesta reação, a ureia é hidrolisada formando amônia e dióxido de carbono, sob atividade catalítica da urease. Posteriormente, em pH alcalino, ocorre a reação catalisada pelo NPS, onde a amônia reage com o hipoclorito e o salicilato, formando o intermediário 5-aminosalicilato, que em sequência sofre acoplamento oxidativo com íon de salicilato, gerando um indofenol (2,2-dicarboxi-indofenol) (BOLLETER; BUSHMAN; TIDWELL, 1961; KRORN, 1980; SEARLE, 1984). Este composto apresenta coloração esverdeada, cuja intensidade de cor foi relacionada com a concentração de ureia.

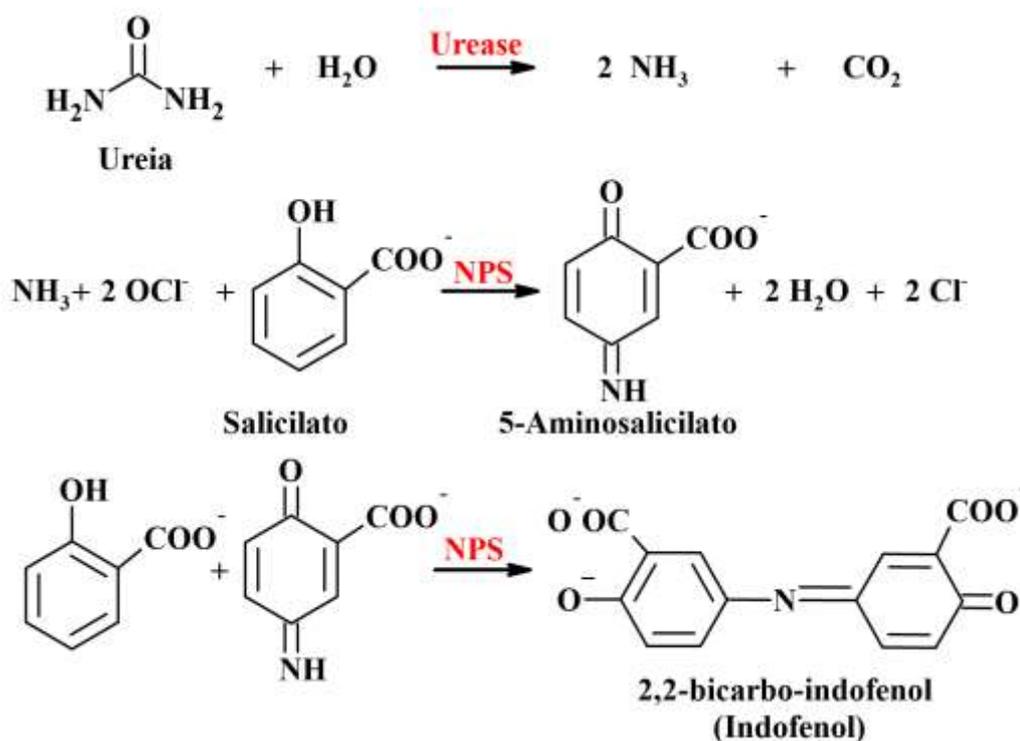


Figura 25. Reações para determinação colorimétrica de ureia. A ureia é hidrolisada pela urease em íons amônia. Este reage com hipoclorito e salicilato, gerando um indofenol de coloração esverdeada.

As respostas colorimétricas para ureia e glicose foram registradas para soluções padrão preparadas em faixas de concentração entre $0 - 100 \text{ mg dL}^{-1}$ e $5 - 90 \text{ mg dL}^{-1}$, respectivamente. Esses intervalos foram selecionados para avaliar a viabilidade das microplacas a serem utilizadas nas faixas de concentração clínica úteis associadas aos fluidos biológicos, tais como soro e urina humana) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; GOODARZI; SAEYS, 2016; PUNDIR; JAKHAR; NARWAL, 2019; SAATKAMP et al., 2016; WANG et al., 2019a).

Conforme apresentado nas Figuras 26a e 26b, os ensaios colorimétricos para ureia e glicose apresentaram comportamentos lineares nas faixas de concentração estudadas. Os coeficientes de correlação (R^2) obtidos nos ensaios para ureia e glicose foram iguais a 0,996 e 0,994, respectivamente. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) foram

calculados para três réplicas em cada concentração e variaram de 0,5 - 4,0% e de 0,8 - 7,6% para os ensaios de ureia e glicose, respectivamente. Considerando a captura de imagens através de um *scanner*, os valores de DPR foram considerados satisfatórios, revelando um enorme potencial para aplicações bioanalíticas envolvendo amostras reais.

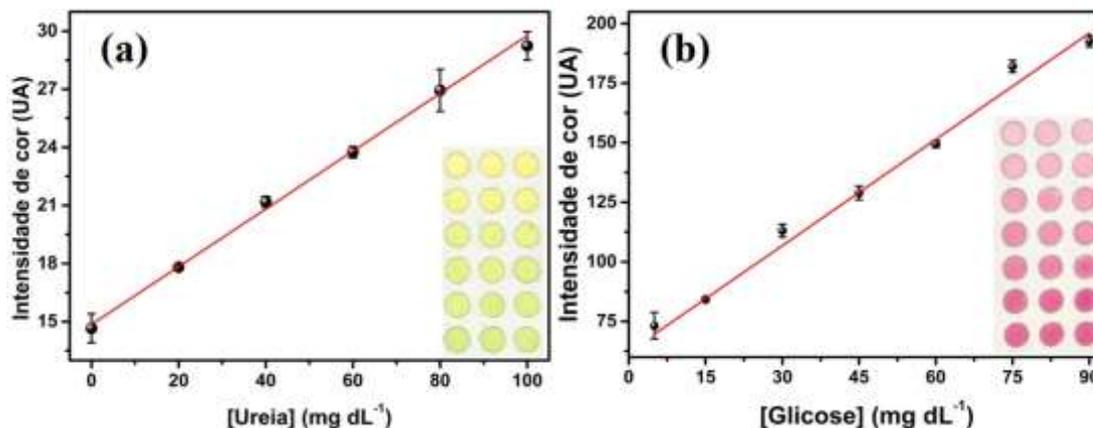


Figura 26. Curvas analíticas para ensaios colorimétricos de (a) ureia e (b) glicose realizados em placas de micropoços de poliéster. As equações de regressão linear foram $y = 14,85 + 0,15 \times [\text{ureia}]$ e $y = 62,23 + 1,49 \times [\text{glicose}]$ para ureia e glicose, respectivamente.

A sensibilidade analítica e o limite de detecção (LD) foram avaliados para ambos os ensaios. Em termo de sensibilidade analítica, os valores obtidos para os ensaios de ureia e glicose foram $0,15 \text{ (UA/mg dL}^{-1}\text{)}$ e $1,49 \text{ (UA/mg dL}^{-1}\text{)}$, respectivamente. Os valores de LD foram calculados com base na razão entre três vezes o desvio padrão encontrado para o controle ($n= 3$) e o coeficiente angular da curva analítica. Os valores de LD obtidos para os ensaios de ureia e glicose foram $7,73 \text{ mg dL}^{-1}$ e $0,96 \text{ mg dL}^{-1}$, respectivamente. Os dados foram comparados com alguns estudos encontrados na literatura para o ensaio de ureia e glicose conforme apresentado na Tabela 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Comparação entre o LD obtido para ureia com valores relatados na literatura.

Dispositivo	Cromógeno	LD (mg dL ⁻¹)	Referência
Espectrofotometria	Azul de bromotimol	0,17	(LIMA; FERNANDES; RANGEL, 2004)
Espectrofotometria	TMB	0,03	(DENG et al., 2016)
Espectrofotometria	AgNPs/DIPO*	0,18	(ALI et al., 2018)
Espectrofotometria	Indol	0,06	(WANG et al., 2019b)
Sensor com fibra óptica	BTB	16,90	(WANG et al., 2019a)
μPADs	Vermelho de fenol	17,00	(LUTHER; FRAHAN; LIEBERMAN, 2017)
μPADs	p-DMAB	50,00	(SALVE et al., 2018)
μPADs	Vermelho de fenol	10,40	(SONI; SURANA; JHA, 2018)
μPADs	AgNPs/Ácido tiomálico	0,18	(SHEINI, 2020)
Placa de micropoços	NaClO/NaOH	7,73	Este estudo

* 1,3-di- (1H-imidazol-1-yl) -2-propanol

Conforme observado na Tabela 3, para o ensaio de ureia, o LD obtido neste estudo foi menor do que os valores relatados por outros autores usando μPADs (LUTHER; FRAHAN; LIEBERMAN, 2017; SALVE et al., 2018; SONI; SURANA; JHA, 2018) ou um sensor com fibra óptica (WANG et al., 2019a), com exceção do trabalho desenvolvido Sheini (2020), que empregou nanopartículas de prata (AgNPs) modificada com ácido tiomálico. Segundo a autora o melhor nível de detectabilidade quando comparados a outros sistemas de detecção usando nanopartículas, pode ser atribuída ao fato do ácido tiomálico dispor de grupos de ácidos carboxílicos e tiol que interagem com os produtos da reação de ureia catalisada pela urease, amônia e dióxido de carbono, através das ligações de hidrogênio e das interações eletrostática e nucleofílica (SHEINI, 2020).

Por outro lado, o LD obtido com substratos de poliéster foi superior ao encontrados em estudos que realizaram a análise colorimétrica usando espectrofotometria convencional na região do UV/Vis (ALI et al., 2018; DENG et al., 2016; LIMA; FERNANDES; RANGEL, 2004; WANG et al., 2019b).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar dos valores reportados nesses estudos serem menores, o método proposto nesse trabalho possui vantagens em relação ao custo e portabilidade, dado que tem a possibilidade de ao invés de um *scanner* para registrar os dados, usar um smartphone com aplicativo de análise colorimétrica, como o PhotoMetrix®.

Para o ensaio de glicose, os resultados obtidos nas microplacas foram comparados com os dados relatados por outros autores usando dispositivos analíticos baseados em papel e toner, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação entre o LD obtido para glicose com valores relatados na literatura.

Dispositivo	Cromógeno	LD (mg dL ⁻¹)	Referência
μPADs	4-AAP/DHBS	0,41	(GABRIEL et al., 2016)
μPADs	TMB	0,045	(ORTIZ-GÓMEZ et al., 2018)
μPADs	4AAP/MAOS*	5,40	(PARK et al., 2018)
μPADs	4-AAP/DHBS	0,48	(CASTRO et al., 2019b)
μPADs	KI	1,80	(LIU et al., 2019)
μPADs	4-AAP/Fenol	7,21	(AKSORN; TEEPOO, 2020)
Dispositivo microfluídico – PT	KI	30,00	(DE SOUZA; ALVES; COLTRO, 2012)
Dispositivo microfluídico – PT	KI	21,61	(OLIVEIRA et al., 2014)
Microplaca – PT	KI	10,80	(SILVA; OLIVEIRA; COLTRO, 2017)
Placa de micropoços	4-APP/DHBS	0,96	Este estudo

*Sal de sódio de N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetilanilina monohidratado.

De acordo com a Tabela 4, no geral o LD relatado neste trabalho foi menor do que o obtido em microplacas impressas (SILVA; OLIVEIRA; COLTRO, 2017) e dispositivos microfluídicos (DE SOUZA; ALVES; COLTRO, 2012; OLIVEIRA et al., 2014) fabricados em plataformas de PT e superior a outros valores obtidos em alguns μPADs (CASTRO et al., 2019a; CHEN et al., 2012; GABRIEL et al., 2016; ORTIZ-GÓMEZ et al., 2018). Quando comparado a trabalhos reportados na literatura usando dispositivos baseados em toner (DE SOUZA; ALVES; COLTRO, 2012; OLIVEIRA et al., 2014; SILVA;

OLIVEIRA; COLTRO, 2017) o melhor nível de detectabilidade de glicose alcançado nos dispositivos propostos está relacionado ao cromógeno utilizado (4-AAP/DHBS), que oferece maior sensibilidade e melhor LD do que o cromógeno (KI) empregado nos dispositivos de poliéster-toner (GABRIEL et al., 2016).

A viabilidade bioanalítica dos dispositivos propostos foi explorada através da análise quantitativa de ureia e glicose em amostras artificiais de urina e soro, respectivamente. A concentração de ureia obtida em uma amostra de urina artificial foi de $91 \pm 3 \text{ mg dL}^{-1}$ ($n = 3$). Considerando a concentração teórica de ureia na amostra artificial (85 mg dL^{-1}), a análise química nas microplacas revelou um erro experimental de aproximadamente 7%. A concentração de glicose foi determinada em uma amostra de soro artificial disponível comercialmente (controle normal). A concentração de glicose encontrada na amostra de soro foi de $70 \pm 4 \text{ mg dL}^{-1}$ ($n = 3$). O valor obtido está de acordo com a faixa de concentração fornecida pelo fabricante no rótulo da amostra ($69 - 102 \text{ mg dL}^{-1}$). Portanto, o desempenho das microplacas para ensaios enzimáticos foi bastante satisfatório e pode ser uma alternativa para ser explorada em análises de rotina.

4.5.2 Reação de complexação no misturador 3D sob fluxo contínuo

Primeiramente, é importante enfatizar que a estrutura microfluídica definida em três dimensões foi essencial para promover a mistura das soluções no dispositivo, pois neste temos duas seções conforme indicado na Tabela 5, sendo uma com altura de $250 \mu\text{m}$ correspondente aos canais horizontais e verticais (Seção 1) e outra com altura de $500 \mu\text{m}$ referente a conexão dos canais mencionados (Seção 2). Estudos preliminares foram realizados em canais planares (ou seja, em canais com apenas uma seção de $250 \mu\text{m}$ de altura) e nenhuma mistura foi observada devido não ocorrer variação na velocidade média do fluxo, uma vez que o fluido escoava uniformemente por uma seção em serpentina, e também devido ao baixo número de Reynolds ($R_e = 1,19$).

No entanto, em sistemas microfluídicos números de Reynolds elevados não são esperados conforme o sistema convencional, para classificar o escoamento como regime turbulento indicando que a mistura das espécies, pois em sistemas com baixo número de Reynolds a mistura ocorre por difusão. Esse tipo de mistura ocorre lentamente, e em decorrência disso, os misturadores miniaturizados são projetados para aumentar a área de contato entre as espécies de interesse, uma vez que aumenta o efeito de mistura (LEE et al., 2011, 2016; RAZA; HOSSAIN; KIM, 2020).

Assim, um misturador passivo foi proposto com estrutura de serpentina definido em 3D para aumentar a área de contato e tempo de contato da amostra para promover a mistura. Na Figura 27 apresenta uma simulação de mistura por meio do perfil de temperatura realizado no software Ansys Discovery considerando água a 50°C sendo bombeado em uma entrada e a 20°C em outra entrada do dispositivo.

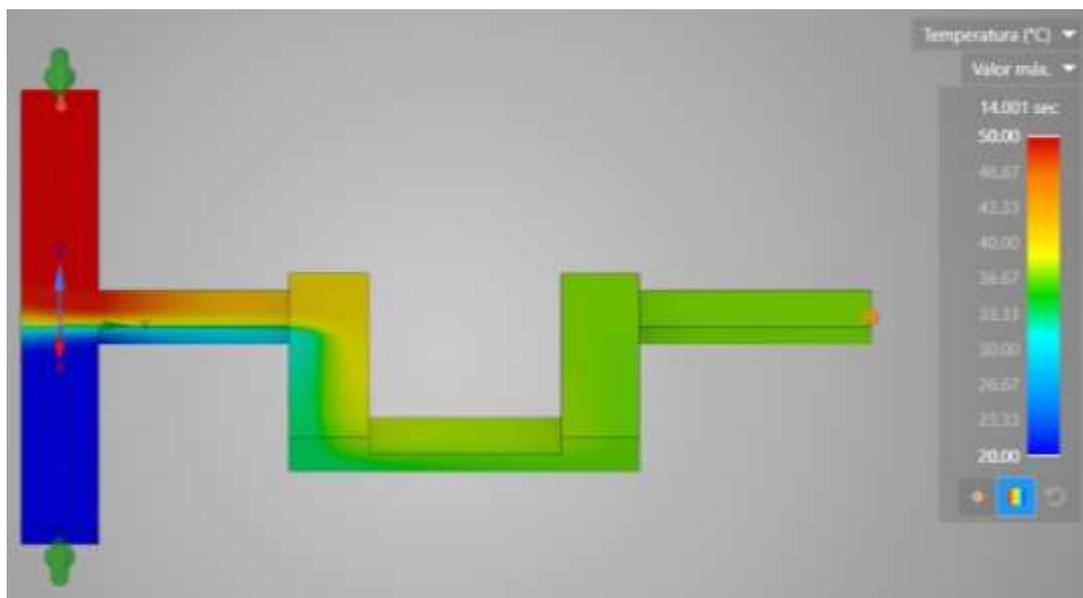


Figura 27. Simulação de mistura no software Ansys Discovery por meio do perfil de temperatura. Os fluidos vermelho e azul foram considerados água a 50°C e 20°C, respectivamente.

Na Figura 27 a formação da cor verde representa que ocorreu a mistura dos fluidos injetados nas duas entradas. Observa-se que logo na primeira

mudança de seção (ou seja, do canal horizontal para a conexão com o canal vertical) o fluido começa a incorporar um temperatura média representado pelo alteração de cor do fluido vermelho para amarelo e do azul marinho para um azul de tom mais claro, e em sequência na segunda mudança de seção nota-se a predominância da coloração verde. Essa mudança rápida na coloração não seria esperada em um canal planar em que a mistura ocorresse apenas pela difusão dos fluidos, mas sim que a coloração azul e vermelha se prolonga se no decorrer do canal. Portanto, com base no supracitado nota-se que o sucesso da mistura não advém apenas da difusão, mas também em função da advecção ocasionada pela mudança de seções proporcionada pela estrutura 3D, que implica a mudança de velocidade e variação no número de Reynolds ao longo do escoamento do fluido, que pode ser conferido na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros das seções do misturador 3D.

Parâmetros	Seção 1	Seção 2
Largura (μm)	1000	1000
Altura (μm)	250	500
Diâmetro hidráulico (mm)	0,4	0,6
Velocidade média do fluido ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	$2,67 \times 10^{-3}$	$1,33 \times 10^{-3}$
Número de Reynolds	1,19	0,99

A viabilidade dos misturadores definidos em 3D foi testada usando a reação de complexação Fe^{2+} com o-fen, que gera uma solução de cor laranja. Para esse propósito, uma solução contendo Fe^{2+} foi bombeada hidrodinamicamente sendo inserida no misturador através da entrada (i). Simultaneamente, uma solução contendo o-fen, ácido ascórbico e tampão acetato foi bombeada e inserida no misturador através da entrada (ii), conforme apresentado na Figura 16c (ver também Figura 28a). A formação de um complexo colorido foi observada no interior dos microcanais, como apresentado na Figura 28a. Para demonstrar a prova de conceito do dispositivo misturador, o produto da reação foi coletado na saída do canal e analisado por espectrofotometria a 510 nm. A mesma reação também foi

realizada fora dos microcanais. A Figura 28b apresenta as respostas de absorvância registradas para o complexo de cor laranja gerado dentro e fora do dispositivo de mistura 3D.

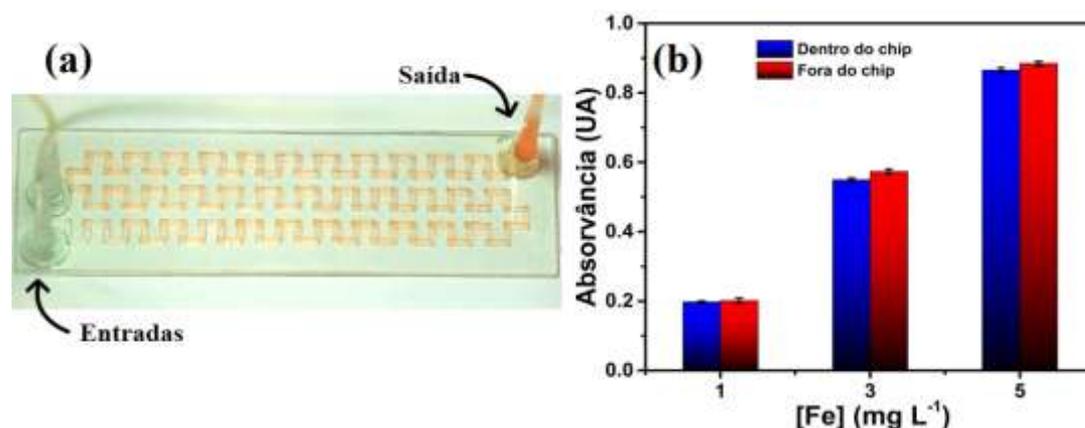


Figura 28. (a) Exibe uma fotografia real do dispositivo de mistura 3D para ensaios baseados em fluxo. (b) O gráfico mostra as medições de absorvância ($n = 3$) para o complexo formado entre Fe^{2+} e o-fen usando reações realizadas dentro e fora do chip.

Como pode ser observado nos dados apresentados na Figura 28b, as respostas de absorvância foram bastante semelhantes para as três concentrações de Fe^{2+} . A diferença em termos de absorvância foi inferior a 4%. Além disso, é importante notar que as respostas em termo de absorvância revelaram boa repetibilidade. Os valores de DPR para as medições realizadas dentro e fora dos microcanais variaram de 0,8 - 1,6% e 0,7- 3,9%, respectivamente. Estes dados indicam que a mistura dentro do dispositivo foi bastante eficiente e não foi observada diferença perceptível em comparação com a reação realizada fora do mesmo. Desse modo, o presente dispositivo microfluídico de mistura apresenta potencial para ser empregado no preparo de amostras para análise química, na síntese de materiais orgânicos e nanopartículas, bem como, para o desenvolvimento de Lab-on-a-Chip contendo um sistema de mistura com um sensor integrado.

4.5.3 Peroxímetro baseado à distância

Nos últimos anos, os métodos de detecção baseados em distância foram descritos na literatura como abordagens poderosas e livres de instrumentação, com enorme potencial para testes no local de atendimento (TIAN et al., 2016). Em geral, a determinação quantitativa é baseada na distância que um produto colorido é formado ao longo de um microcanal (CATE et al., 2013, 2015a; GEROLD; BAKKER; HENRY, 2018; NGUYEN et al., 2020; PHOONSAWAT et al., 2018; YAMADA et al., 2015) ou no deslocamento de um “*plug*” de corante promovido pela formação de oxigênio em uma reação de H_2O_2 normalmente catalisada por um metal (SONG; WANG; QIN, 2013; ZHU et al., 2014). Sendo assim, um dispositivo microfluídico foi projetado para medir concentrações de peróxido com base na distância, denominado peroxímetro, para demonstrar a viabilidade do protocolo de fabricação proposto para esse tipo de aplicação.

Como descrito anteriormente na seção experimental, um pedaço de papel foi modificado com cobre para mimetizar a atividade da peroxidase, catalisando assim, a reação de decomposição do H_2O_2 para gerar H_2O e O_2 (GUAN; PENG; JIN, 2015; HU et al., 2013). Como resultado, a formação de O_2 promove o deslocamento do “*plug*” de corante dentro do microcanal devido ao aumento da pressão dentro da câmara (reservatório do papel modificado) e a distância percorrida, em escala milimétrica, é diretamente proporcional à concentração do analito. A prova de conceito foi demonstrada usando soluções padrão preparadas em diferentes concentrações de H_2O_2 . As imagens resultantes e a curva de calibração são exibidas nas Figuras 29a e 29b, respectivamente.

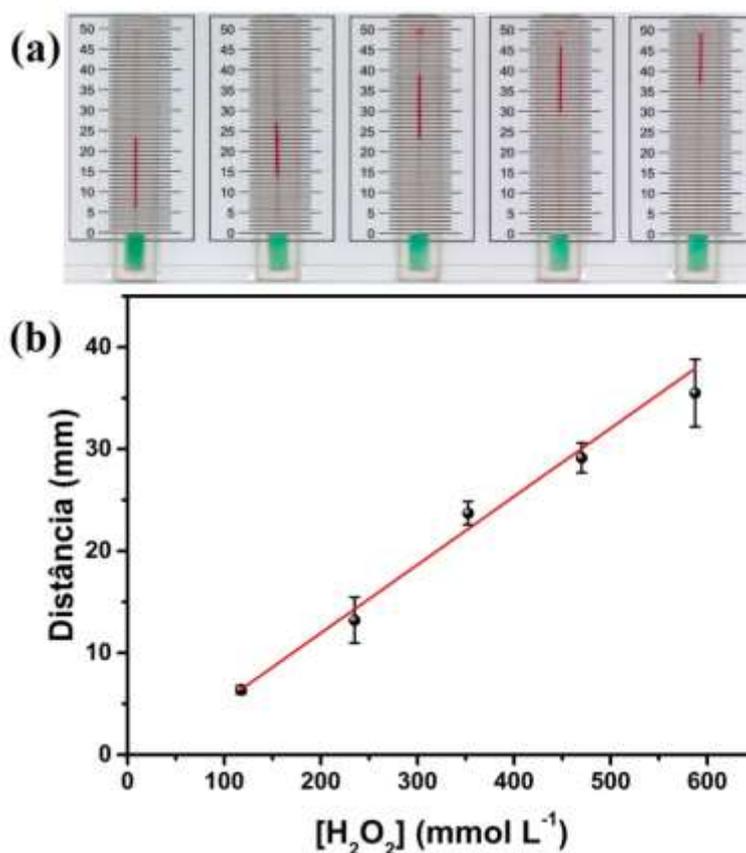


Figura 29. (a) Imagem digital mostrando o deslocamento de um “plug” de corante em diferentes concentrações de H₂O₂, sendo a distância medida por uma escala métrica desenhada e impressa em folha de papel sulfite; e em (b) a curva analítica resultante (n = 3).

Como pode ser observado nos dados apresentados, o peroxímetro baseado na distância revelou um comportamento linear ($R^2 = 0,991$) na faixa de concentração de H₂O₂ entre 117,5 e 587,5 mmol L⁻¹. Além disso, a repetibilidade foi testada em cada concentração em três repetições e os valores de DPR variaram de 4,8 a 17,1%. Esses valores podem ser justificados pelo fato distância percorrida ser medida visualmente na escala milimétrica, bem como pela à dificuldade de vedar o orifício de entrada da amostra de forma rápida após a adição da mesma. O LD foi calculado e o valor encontrado foi de 65,22 mmol L⁻¹.

Até o dado momento, este é o primeiro trabalho que mostra o desenvolvimento de um dispositivo de peroxímetro à distância em substratos de poliéster. Outros autores relataram com sucesso exemplos de métodos à

distância para detectar cocaína (ZHU et al., 2014) e ácidos nucleicos (SONG; WANG; QIN, 2013) explorando o deslocamento de um “*plug*” de corante. Zhu e colaboradores (2014) demonstraram o desenvolvimento de um dispositivo fabricado em vidro contendo hidrogel seletivo à cocaína encapsulada em nanopartículas de Au/Pt para detecção visual de cocaína, cuja análise quantitativa foi baseada na distância percorrida pelo corante induzido pela geração de oxigênio. Usando a mesma estratégia, Song e co-autores (2013) desenvolveram um dispositivo para análise quantitativa de DNA. Os autores pré-depositaram filmes de Pt em microcanais de vidro para catalisar a reação de H_2O_2 e amplificar o deslocamento de um “*plug*” de corante, objetivando oferecer melhor resposta visual em termo de deslocamento para quantificação do analito.

Em comparação com os relatos de Zhu et al. (2014) e Song e colaboradores (2013)(SONG; WANG; QIN, 2013)(SONG; WANG; QIN, 2013), o método baseado em distância para medir o peróxido é bastante atrativa. Considerando o catalisador, o uso de íons Cu^{2+} fornece uma alternativa altamente estável que também é mais simples e mais barata que os catalisadores metálicos convencionais. Além disso, a montagem do dispositivo de poliéster não requer instrumentação sofisticada ou instalações de salas limpas, tornando a fabricação mais rápida usando consumíveis acessíveis, como folhas de papel e poliéster.

4.5.4 Microssistemas eletroforéticos (MSE) – resultados preliminares

A avaliação preliminar do microssistema eletroforético fabricado segundo o protocolo de fabricação proposto foi feita através do teste de repetibilidade entre injeções. Para isso, foram realizadas dez injeções consecutivas de uma solução padrão de K^+ ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) no modo *floating*, aplicando no canal de injeção um potencial de 500 V durante 10 s e no canal separação 800 V durante 120 s. A Figuras 30a exibe uma imagem do MSE

fabricado e a Figura 30b apresenta os eletroferogramas obtidos para dez injeções consecutivas.

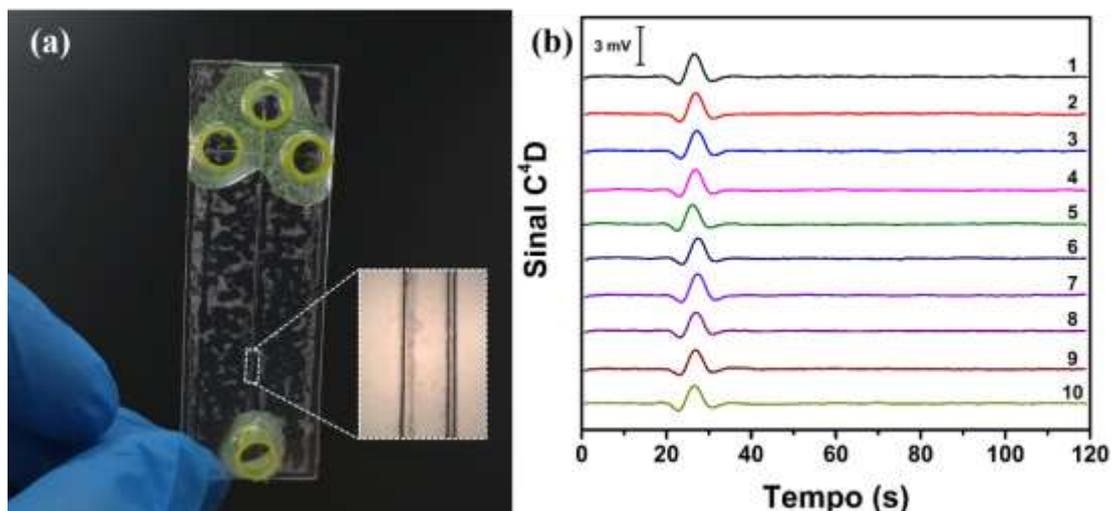


Figura 30. (a) exibe uma fotografia real MSE fabricado em filme de poliéster com ênfase no canal por meio de uma micrografia; (b) Eletroferogramas de dez injeções consecutivas para uma solução padrão de K^+ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial elétrico aplicado de 500 V e 800 V nos reservatórios 1 e 2, respectivamente. Tempo de injeção de 10 s. Condições de detecção: frequência de 400-kHz e amplitude de $40 V_{pp}$.

Conforme visualizado na Figura 30, a injeção eletrocinética exibiu repetibilidade satisfatória, considerando os valores de DPR de dez injeções para área, intensidade de pico, tempo de migração e eficiência de separação de K^+ de 8,5%, 7,4%, 0,7%, 8,7%, respectivamente. Portanto, a injeção no modo *floating* foi apropriada para o microssistema proposto. Após garantir uma boa repetibilidade na injeção, a potencialidade do microssistema proposto foi avaliada para a separação eletroforética de cátions inorgânicos (K^+ , Na^+ e Li^+). Para este fim, foi injetado eletrocineticamente a mistura destes cátions com concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ cada, conforme apresentado na Figura 31.

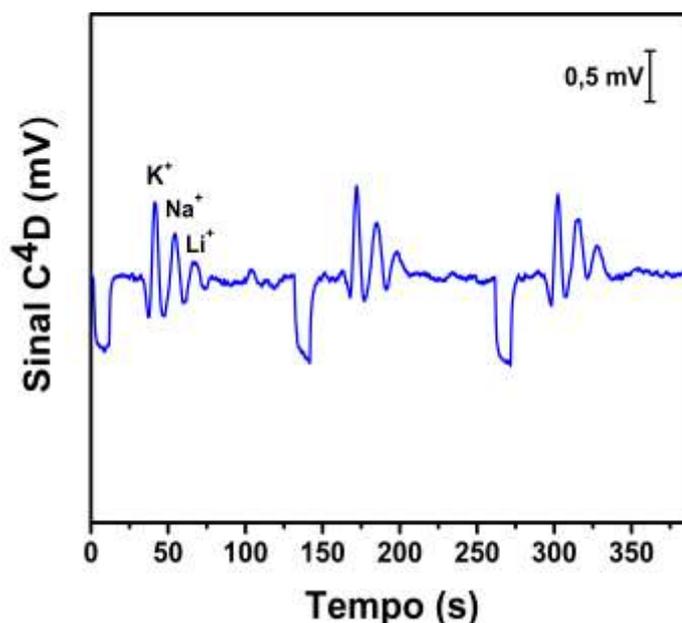


Figura 31. Eletroferograma com uma série de três injeções mostrando a separação de K^+ Na^+ e Li^+ ($100 \mu M$). Potencial elétrico aplicado de 500 V e 800 V nos reservatórios 1 e 2, respectivamente. Tempo de injeção de 10 s. Condições de detecção: frequência de 400-kHz e amplitude de 40 V_{pp} .

De acordo com o eletroferograma apresentado na Figura 31, três injeções consecutivas apresentaram picos com baixa resolução, com valores de resolução inferiores a 1, valores de DPR para tempo de migração menores que 0,8%, e eficiência de separação variando entre $2,9 \times 10^3$ e $6,1 \times 10^3$ pratos/m. Os valores obtidos para a eficiência de separação são considerados baixos (GABRIEL et al., 2012), porém podem ser atribuídos à rugosidade e às dimensões do canal de separação. Nesse sentido, uma das principais lacunas existentes no método proposto está relacionada com a melhora da resolução do processo, que pode ser explorado buscando dispositivos com canais recortados com dimensões menores que a utilizada ou ainda alternando a espessura do filme de poliéster recoberto com EVA utilizado nesse processo. Esses aspectos certamente impactarão na largura do canal resultante, o que pode resultar em separações eletroforéticas com maior eficiência de separação. Ademais, o ajuste na resolução e definição dos canais pode favorecer o acoplamento com outros detectores, destacando-se a fluorescência e a espectrometria de massas.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

O protocolo de fabricação de dispositivos analíticos em substratos de poliéster usando uma plotter de recorte é uma abordagem simples, acessível e barata. Em geral, os dispositivos foram recortados em filmes de poliéster e laminados contra outro filme de poliéster revestido com uma camada termossensível, demonstrando assim a simplicidade de fabricação. É importante enfatizar também a simplicidade instrumental requerida no método de fabricação proposto. Conforme apresentado neste trabalho, o processo de fabricação requer apenas uma plotter de recorte e um laminador térmico de escritório. Ambos os instrumentos podem ser adquiridos com aproximadamente R\$ 3.000,00, tornando a instrumentação bastante atraente para ser implementada em laboratórios com recursos limitados. Além disso, a fabricação de todos os dispositivos analíticos mostrados neste estudo envolve apenas poliéster e papel. O custo de cada dispositivo foi estimado em menos de R\$ 0,45.

Esse processo alternativo permitiu o corte de canais com largura entre 250 e 1000 μm com boa precisão e fidelidade. A limitação encontrada no método está relacionada a obtenção de canais com largura inferior à 300 μm , devido ao bloqueio total do canal causado pela fusão da cola de EVA. Apesar disso, o protocolo de fabricação foi adequado para aplicações que envolvem mistura em canais tridimensionais e medições baseadas à distância. Quando comparado aos dispositivos de PT, o uso de um substrato de poliéster revestido com uma camada termossensível garantiu maior resistência mecânica e melhor compatibilidade com solventes orgânicos.

Além disso, a versatilidade do método desenvolvido também foi demonstrada através da fabricação de microplacas contendo 96 poços para ensaios colorimétricos para a detecção de ureia e glicose. Ambos apresentaram um comportamento linear com valores de R^2 iguais a 0,996 e 0,994, respectivamente. Os valores de LD obtidos foram de 7,73 mg dL^{-1} e 0,96 mg dL^{-1} para os ensaios de ureia e glicose, respectivamente. A viabilidade bioanalítica da placa foi avaliada por meio da determinação das concentrações de ureia e glicose em amostras artificiais de urina e soro,

respectivamente, onde as concentrações obtidas foram de acordo com os valores teóricos esperados.

A viabilidade do dispositivo de mistura foi explorada empregando a reação de complexação envolvendo Fe^{2+} e o-fen que foi realizada dentro e fora do chip, visando uma comparação da eficiência de mistura. Os resultados obtidos não apresentaram diferença perceptível, indicando assim, que a estrutura 3D proporcionou turbulência suficiente para promover a mistura dentro dos microcanais. A detecção baseada à distância percorrida por um “*plug*” de corante foi explorada com o desenvolvimento de um dispositivo híbrido (poliéster e papel), usando um pedaço de papel modificado com cobre para catalisar uma reação de peróxido de hidrogênio, gerando água e oxigênio. O oxigênio promove o deslocamento de um “*plug*” de corante adicionado no canal do dispositivo, possibilitando relacionar a distância percorrida com a concentração de peróxido. Os resultados obtidos apresentaram um comportamento linear ($R^2= 0,991$) na faixa de concentração de 117,5 a 587,5 mmol L⁻¹, e LD de 65,22 mmol L⁻¹. Em suma, os dispositivos analíticos desenvolvidos com base no protocolo que envolve uma *plotter* de recorte proporcionaram excelente desempenho analítico para aplicações bioanalíticas, emergindo como uma plataforma alternativa frente a outros materiais mais populares.

Embora o protocolo de fabricação tenha possibilitado o corte reprodutível de micropoços e dispositivos microfluídicos para ensaios à distância e de mistura, a principal limitação como já mencionado, refere-se à preparação de canais com largura inferior à 300 μm . Em vista disso, novos estudos estão sendo realizados buscando melhorias associadas às condições operacionais de corte e fabricação, com o objetivo de obter dispositivos microfluídicos para separações eletroforéticas. O primeiro microssistema fabricado para essa finalidade apresentou resultados promissores, porém o mesmo requer canais mais estreitos de modo a proporcionar separações com maior eficiência de separação.

PERSPECTIVAS

6. PERSPECTIVAS

O protocolo de fabricação apresentado demonstrou-se bastante viável para fabricação de dispositivos como as microplacas, misturadores microfluídicos e dispositivos para monitoramento de peróxido de hidrogênio via deslocamento de um “*plug*” de corante, de forma simples e de baixo custo. Contudo, mostrou limitação em relação a largura mínima dos microcanais. Sendo assim, os esforços serão concentrados em encontrar alternativas para sanar a mesma, seja otimizando os parâmetros operacionais de corte ou do substrato. Baseado nisso, o primeiro MSE foi desenvolvido utilizando substrato de poliéster com espessura de 125 μm , tendo a camada intermediária (camada com canais cortados) do dispositivo sem revestimento de EVA, alcançando um canal de largura próximo de 250 μm . Os resultados preliminares apresentados pelo MSE são promissores para prosseguir os estudos, porém exibiu uma baixa eficiência de separação em comparação a outros dispositivos reportados na literatura. Isso ocorreu muito provavelmente em função das dimensões dos canais, as quais foram definidas pela resolução da plotter (espessura da lâmina de recorte) e da espessura do filme de poliéster. Considerando a instrumentação utilizada no processo, a customização das lâminas de recorte pode possibilitar a obtenção de canais mais estreitos.

Caso a estratégia de fabricar canais mais estreitos não funcione como o esperado, pode-se optar pela inserção de “*strips*” de papel no interior dos canais microfluídicos definidos em poliéster de modo a preenchê-los com papel. Essa estratégia resultaria em uma plataforma híbrida tendo o papel a função de promover a separação baseando-se na interação com os analitos. Nesse caso, o mecanismo de separação envolveria o princípio da eletrocromatografia, na qual o papel teria a função de uma pseudo fase estacionária.

Além disso, pretende-se desenvolver um MSE em filmes de poliéster ou híbrido para acoplar com a espectrometria de massas, dado o enorme potencial analítico deste detector para obtenção de informações acerca da razão massa carga (m/z) dos íons gerados pela ionização da amostra. Com

esse acoplamento, espera-se aumentar a sensibilidade e quantificar compostos que eventualmente apresentem a mesma mobilidade eletroforética, possibilitando assim a aplicação em amostras complexas de apelo ambiental e alimentícia, dentro outras. Ademais, a integração de um detector C⁴D juntamente com a espectrometria de massas ao MSE é de extrema importância para uma detecção dupla simultaneamente, podendo fornecer análise confirmatória do mesmo analito ou/e também a análise de diferentes componentes de interesse em matrizes complexas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABGRALL, P.; LOW, L.-N.; NGUYEN, N.-T. Fabrication of planar nanofluidic channels in a thermoplastic by hot-embossing and thermal bonding. **Lab on a Chip**, v. 6, p. 520–522, 2007.

AKSORN, J.; TEEPOO, S. Development of the simultaneous colorimetric enzymatic detection of sucrose, fructose and glucose using a microfluidic paper-based analytical device. **Talanta**, v. 207, n. August 2019, p. 120302, 2020.

AKYAZI, T.; BASABE-DESMONTS, L.; BONITO-LOPEZ, F. Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation. **Analytica Chimica Acta**, v. 1001, p. 1–17, 2018.

ALI, N. et al. Spectrophotometric methods for the determination of urea in real samples using silver nanoparticles by standard addition and 2nd order derivative methods. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 189, p. 110–115, 15 jan. 2018.

ALLEN, P. B.; CHIU, D. T. Calcium-assisted glass-to-glass bonding for fabrication of glass microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 18, p. 7153–7157, 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Management of diabetes in pregnancy: Standards of medical care in Diabetes - 2018. **Diabetes Care**, v. 41, p. S137–S143, 2018.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: Principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.

ARORA, A. et al. Latest Developments in Micro Total Analysis Systems. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 12, p. 4830–4847, 2010.

AU, A. K. et al. 3D-Printed Microfluidics. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 55, n. 12, p. 3862–3881, 2016.

AUROUX, P. A. et al. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2637–2652, 2002.

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. New York: Wiley, 1995.

BANEJAD, A. et al. Design, fabrication and experimental characterization of whole-thermoplastic microvalves and micropumps having micromilled liquid channels of rectangular and half-elliptical cross-sections. **Sensors and Actuators, A: Physical**, v. 301, p. 111713, 2020.

BAO, N. et al. Fabrication of poly(dimethylsiloxane) microfluidic system based on masters directly printed with an office laser printer. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, p. 270–275, 2005.

BARHAM, D.; TRINDER, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. **Analyst**, v. 97, p. 142–145, 1972.

- BARTHOLOMEUSZ, D. A.; BOUTTÉ, R. W.; ANDRADE, J. D. Xurography: Rapid prototyping of microstructures using a cutting plotter. **Journal of Microelectromechanical Systems**, v. 14, n. 6, p. 1364–1374, 2005.
- BECKER, H.; DIETZ, W.; DANNBERG, P. Microfluidic Manifolds by Polymer Hot Embossing for μ -Tas Applications. In: **Micro Total Analysis Systems '98**. [s.l.] Springer Netherlands, 1998. p. 253–256.
- BECKER, H.; GÄRTNER, C. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. **Electrophoresis**, v. 21, n. 1, p. 12–26, 2000.
- BECKER, H.; GÄRTNER, C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 1, p. 89–111, 2008.
- BECKER, H.; HEIM, U. Hot embossing as a method for the fabrication of polymer high aspect ratio structures. **Sensors and Actuators, A: Physical**, v. 83, n. 1, p. 130–135, 2000.
- BECKER, H.; LOCASCIO, L. E. Polymer microfluidic devices. **Talanta**, v. 56, n. 2, p. 267–287, 2002.
- BERKOWSKI, K. L. et al. Introduction to Photolithography: Preparation of Microscale Polymer Silhouettes. **Journal of chemical Education**, v. 82, n. 9, p. 1365–1369, 2005.
- BETANCOURT, T.; BRANNON-PEPPAS, L. Micro-and nanofabrication methods in nanotechnological medical and pharmaceutical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 483–495, 2006.
- BIRCH, C. et al. Rapid fabrication of electrophoretic microfluidic devices from polyester, adhesives and gold leaf. **Micromachines**, v. 8, n. 1, p. 17, 2017.
- BOLLETER, W. T.; BUSHMAN, C. J.; TIDWELL, P. W. Spectrophotometric Determination of Ammonia as Indophenol. **Analytical Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 592–594, 1961.
- BRESSAN, L. P. et al. 3D-printed microfluidic device for the synthesis of silver and gold nanoparticles. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 1083–1089, 1 maio 2019.
- BRITO-NETO, J. G. A. et al. Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1198–1206, jul. 2005.
- BROOKS, T.; KEEVIL, C. W. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 203–206, 1997.
- BRUIJNS, B. et al. Microfluidic Devices for Forensic DNA Analysis: A Review. **Biosensors**, v. 6, n. 3, p. 41, 2016.
- CARDOSO, R. M. et al. Additive-manufactured (3D-printed) electrochemical sensors: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1118, p. 73–91, 2020.
- CARDOSO, T. M. G. et al. A paper-based colorimetric spot test for the identification of adulterated whiskeys. **Chemical Communications**, v. 53, n.

56, p. 7957–7960, 2017.

CASTRO, L. F. DE et al. Salivary diagnostics on paper microfluidic devices and their use as wearable sensors for glucose monitoring. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 19, p. 4919–4928, 2019a.

CASTRO, L. F. DE et al. Salivary diagnostics on paper microfluidic devices and their use as wearable sensors for glucose monitoring. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 19, p. 4919–4928, 19 jul. 2019b.

CASTRO, E. R.; MANZ, A. Present state of microchip electrophoresis: State of the art and routine applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 66–85, 2015.

CATE, D. M. et al. Simple, distance-based measurement for paper analytical devices. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 12, p. 2397–2404, 2013.

CATE, D. M. et al. Multiplexed paper analytical device for quantification of metals using distance-based detection. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 13, p. 2808–2818, 2015a.

CATE, D. M. et al. Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 19–41, 21 nov. 2015b.

CHAGAS, C. L. S. et al. Hand drawing of pencil electrodes on paper platforms for contactless conductivity detection of inorganic cations in human tear samples using electrophoresis chips. **Electrophoresis**, v. 36, n. 16, p. 1837–1844, 2015.

CHANG, Y. et al. A simple label free colorimetric method for glyphosate detection based on the inhibition of peroxidase-like activity of Cu(II). **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 228, p. 410–415, 2016.

CHARMET, J. et al. Low-Cost Microfabrication Tool Box. **Micromachines**, v. 11, n. 2, p. 135, 2020.

CHATTERJEE, D.; MANSFIELD, D. S.; WOOLLEY, A. T. Microfluidic devices for label-free and non-instrumented quantitation of unamplified nucleic acids by flow distance measurement. **Analytical Methods**, v. 6, n. 20, p. 8173–8179, 21 out. 2014.

CHEN, G. et al. Low temperature bonding of poly(methylmethacrylate) electrophoresis microchips by in situ polymerisation. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, n. 1–2, p. 138–147, 2005.

CHEN, J. et al. 3D printed microfluidic devices for circulating tumor cells (CTCs) isolation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 150, p. 111900, 2020.

CHEN, X. et al. Determination of glucose and uric acid with bienzyme colorimetry on microfluidic paper-based analysis devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, n. 1, p. 363–368, 2012.

CHEN, X.; MO, D.; GONG, M. 3D Printed Reconfigurable Modular Microfluidic System for Generating Gel Microspheres. **Micromachines**, v. 11, n. 2, p. 224, 21 fev. 2020.

CHEN, Y. T.; YANG, J. T. Detection of an amphiphilic biosample in a paper microchannel based on length. **Biomedical Microdevices**, v. 17, n. 3, p. 1–8, 1 jun. 2015.

CHENG, G. et al. Physical modelling, numerical simulation and experimental investigation of microfluidic devices with amorphous thermoplastic polymers using a hot embossing process. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 229, p. 36–53, 2016.

CHONG, K. C. et al. Monitoring of vancomycin in human plasma via portable microchip electrophoresis with contactless conductivity detector and multi-stacking strategy. **Journal of Chromatography A**, v. 1485, p. 142–146, 17 fev. 2017.

ÇOĞUN, F.; YILDIRIM, E.; SAHIR ARIKAN, M. A. Investigation on replication of microfluidic channels by hot embossing. **Materials and Manufacturing Processes**, v. 32, n. 16, p. 1838–1844, 2017.

COLTRO, W. K. T. et al. Microssistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1986–2000, 2007a.

COLTRO, W. K. T. et al. A toner-mediated lithographic technology for rapid prototyping of glass microchannels. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 7, p. 931–934, 2007b.

COLTRO, W. K. T. et al. Capacitively coupled contactless conductivity detection on microfluidic systems - Ten years of development. **Analytical Methods**, v. 4, n. 1, p. 25–33, 5 jan. 2012.

COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E. Fabrication and integration of planar electrodes for contactless conductivity detection on polyester-toner electrophoresis microchips. **ELECTROPHORESIS**, v. 29, n. 11, p. 2260–2265, jun. 2008.

COLTRO, W. K. T.; LUNTE, S. M.; CARRILHO, E. Comparison of the analytical performance of electrophoresis microchannels fabricated in PDMS, glass, and polyester-toner. **Electrophoresis**, v. 29, n. 24, p. 4928–4937, 2008.

COMINA, G.; SUSKAA, A.; FILIPPINI, D. Low cost lab-on-a-chip prototyping with a consumer grade 3D printer. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 16, p. 2978–2982, 2014.

DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L. An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4339–4343, 15 out. 1998.

DA SILVA, J. A. F.; GUZMAN, N.; DO LAGO, C. L. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis: Hardware improvements and optimization of the input-signal amplitude and frequency. **Journal of Chromatography A**, v. 942, n. 1–2, p. 249–258, 2002.

DAMASCENO, S. et al. Delayed Capillary Flow of Elastomers: An Efficient Method for Fabrication and Nanofunctionalization of Flexible, Foldable,

Twistable, and Stretchable Electrodes from Pyrolyzed Paper. **Advanced Electronic Materials**, v. 6, p. 1900826, 2020.

DE OLIVEIRA, K. G. et al. Loop-mediated isothermal amplification in disposable polyester-toner microdevices. **Analytical Biochemistry**, v. 534, p. 70–77, 2017.

DE OLIVEIRA, T. R. et al. Fast and flexible strategy to produce electrochemical paper-based analytical devices using a craft cutter printer to create wax barrier and screen-printed electrodes. **Talanta**, v. 195, p. 480–489, 2019.

DE SOUZA, F. R. et al. Avaliação de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1171–1176, 2014.

DE SOUZA, F. R.; ALVES, G. L.; COLTRO, W. K. T. Capillary-driven toner-based microfluidic devices for clinical diagnostics with colorimetric detection. **Anal. Chem**, v. 84, p. 9002–9007, 2012.

DENG, H. H. et al. Colorimetric detection of urea, urease, and urease inhibitor based on the peroxidase-like activity of gold nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 915, p. 74–80, 7 abr. 2016.

DIAS, A. A. et al. Environmentally Friendly Manufacturing of Flexible Graphite Electrodes for a Wearable Device Monitoring Zinc in Sweat. **ACS Applied Materials & Interfaces**, p. 1–10, 2019.

DILL, F. H. et al. Characterization of Positive Photoresist. **IEEE Transaction on electron devices**, v. 22, n. 7, p. 445–452, 1975.

DITTRICH, P. S.; MANZ, A. Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 210–218, 2006.

DO LAGO, C. L. et al. A Dry Process for Production of Microfluidic Devices Based on the Lamination of Laser-Printed Polyester Films. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3853–3858, 2003.

DUARTE, G. R. M. et al. Dynamic solid phase DNA extraction and PCR amplification in polyester-toner based microchip. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 13, p. 5182–5189, 1 jul. 2011.

DUARTE, L. C. et al. 3D printing of microfluidic devices with embedded sensing electrodes for generating and measuring the size of microdroplets based on contactless conductivity detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 251, p. 427–432, 2017.

DUARTE, L. C. **Impressão 3D: uma alternativa para fabricação de dispositivos analíticos miniaturizados**. [s.l.] UFG, 2017.

DUFFY, D. C. et al. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 4974–4984, 1998.

DUVALL, J. A. et al. Rapid detection of *Clostridium difficile* via magnetic bead aggregation in cost-effective polyester microdevices with cell phone image

analysis. **Analyst**, v. 141, p. 5637–5645, 2016.

DUVALL, J. A. et al. Rapid multiplex DNA amplification on an inexpensive microdevice for human identification via short tandem repeat analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 980, p. 41–49, 8 ago. 2017.

FOSDICK, S. E. et al. Wire, mesh, and fiber electrodes for paper-based electroanalytical devices. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 7, p. 3659–3666, 1 abr. 2014.

FU, E. **Enabling robust quantitative readout in an equipment-free model of device development** *Analyst* The Royal Society of Chemistry, , 26 ago. 2014. Disponível em: <www.rsc.org/analyst>. Acesso em: 16 jul. 2020

GABRIEL, E. F. M. et al. Polyester-toner electrophoresis microchips with improved analytical performance and extended lifetime. **Electrophoresis**, v. 33, n. 17, p. 2660–2667, 2012.

GABRIEL, E. F. M. et al. Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosan-modified paper microfluidic devices. **Analyst**, v. 141, n. 15, p. 4749–4756, 2016.

GABRIEL, E. F. M. et al. Recent advances in toner-based microfluidic devices for bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 10, n. 25, p. 2952–2962, 2018.

GABRIEL, E. F. M.; COLTRO, W. K. T.; GARCIA, C. D. Fast and versatile fabrication of PMMA microchip electrophoretic devices by laser engraving. **Electrophoresis**, v. 35, n. 16, p. 2325–2332, 2014.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GAO, H. et al. Application of microfluidic chip technology in food safety sensing. **Sensors**, v. 20, n. 6, p. 1792, 2020.

GENCTURK, E. et al. Cell trapping microfluidic chip made of Cyclo olefin polymer enabling two concurrent cell biology experiments with long term durability. **Biomedical Microdevices**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2020.

GEROLD, C. T.; BAKKER, E.; HENRY, C. S. Selective Distance-Based K⁺ Quantification on Paper-Based Microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 7, p. 4894–4900, 2018.

GIMENEZ, T. D. et al. Dynamic solid-phase RNA extraction from a biological sample in a polyester-toner based microchip. **Analytical Methods**, v. 9, n. 13, p. 2116–2121, 2017.

GLAVAN, A. C. et al. Rapid fabrication of pressure-driven open-channel microfluidic devices in omniphobic RF paper. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 15, p. 2922–2930, 2013.

GOODARZI, M.; SAEYS, W. Selection of the most informative near infrared spectroscopy wavebands for continuous glucose monitoring in human serum.

Talanta, v. 146, p. 155–165, 2016.

GUAN, J.; PENG, J.; JIN, X. Synthesis of copper sulfide nanorods as peroxidase mimics for the colorimetric detection of hydrogen peroxide. **Analytical Methods**, v. 7, n. 13, p. 5454–5461, 2015.

GUCKENBERGER, D. J. et al. Micromilling: A method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 11, p. 2364–2378, 2015.

HE, J. et al. A one-step hot-embossing process for fabricating a channel with superhydrophobic inner walls. **Journal of Manufacturing Processes**, v. 36, p. 351–359, 2018.

HENDERSON, A. M. Ethylene-Vinyl Acetate (EVA) Copolymers: A General Review. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v. 9, n. 1, p. 30–38, 1993.

HO, C. M. B. et al. 3D printed microfluidics for biological application. **Lab on a Chip**, v. 15, p. 3627–3637, 2015.

HU, C. et al. Inkjet printing of nanoporous gold electrode arrays on cellulose membranes for high-sensitive paper-like electrochemical oxygen sensors using ionic liquid electrolytes. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 8, p. 3745–3750, 17 abr. 2012.

HU, L. et al. Copper nanoclusters as peroxidase mimetics and their applications to H₂O₂ and glucose detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 762, p. 83–86, 31 jan. 2013.

HU, Z. L.; CHEN, X. Y. Fabrication of polyethylene terephthalate microfluidic chip using CO₂ laser system. **International Polymer Processing**, v. 33, n. 1, p. 106–109, 2018.

HUANG, L. et al. Microfluidics cell sample preparation for analysis: Advances in efficient cell enrichment and precise single cell capture. **Biomicrofluidics**, v. 11, n. 1, p. 011501, 2017.

HUI, A. Y. N. et al. Microwave plasma treatment of polymer surface for irreversible sealing of microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 5, n. 10, p. 1173–1177, 2005.

IM, S. G. et al. A conformal nano-adhesive via initiated chemical vapor deposition for microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 3, p. 411–416, 2009.

SIKSACAN, Z. et al. Rapid fabrication of microfluidic PDMS devices from reusable PDMS molds using laser ablation. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 26, p. 035008, 2016.

ISLAM, M.; NATU, R.; MARTINEZ-DUARTE, R. A study on the limits and advantages of using a desktop cutter plotter to fabricate microfluidic networks. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 19, n. 4, p. 973–985, 2015.

JACKSON, K. R. et al. DNA purification using dynamic solid-phase extraction on a rotationally-driven polyethylene-terephthalate microdevice. **Analytica Chimica Acta**, v. 937, p. 1–10, 2016.

- JENA, R. K. et al. Comparison of different molds (epoxy, polymer and silicon) for microfabrication by hot embossing technique. **Sensors and Actuators B**, v. 163, p. 233–241, 2012.
- JOZANOVIĆ, M. et al. Determination of anti-oxidative histidine dipeptides in poultry by microchip capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1658–1665, 15 abr. 2017.
- KHATRI, K. et al. Microfluidic Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Analysis of Monosaccharides, Oligosaccharides, and Glycopeptides. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 12, p. 6645–6655, 2017.
- KIM, J. et al. Noninvasive Alcohol Monitoring Using a Wearable Tattoo-Based Iontophoretic-Biosensing System. **ACS Sensors**, v. 1, n. 8, p. 1011–1019, 2016.
- KOVARIK, M. L. et al. Micro total analysis systems for cell biology and biochemical assays. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 516–540, 2012.
- KRAUSS, S. T. et al. Centrifugal microfluidic devices using low-volume reagent storage and inward fluid displacement for presumptive drug detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 284, p. 704–710, 2019.
- KRAUSS, S. T.; HOLT, V. C.; LANDERS, J. P. Simple reagent storage in polyester-paper hybrid microdevices for colorimetric detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 246, p. 740–747, 2017.
- KRORN, M. D. Spectrophotometric Determination of Ammonia : A Study of a Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and Dichloroisocyanurate. **The Analyst**, v. 105, n. 1249, p. 305–316, 1980.
- KUMERIA, T. et al. Paper-based microfluidic analytical devices for colorimetric detection of toxic ions: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 93, p. 212–227, 2017.
- LAI, T. S.; CHANG, T. C.; WANG, S. C. Gold nanoparticle-based colorimetric methods to determine protein contents in artificial urine using membrane micro-concentrators and mobile phone camera. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 239, p. 9–16, 1 fev. 2017.
- LEE, C.-Y. et al. Microfluidic Mixing: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3263–3287, 18 maio 2011.
- LEE, C. Y. et al. **Passive mixers in microfluidic systems: A review** **Chemical Engineering Journal** Elsevier, , 15 mar. 2016.
- LIMA, M. J. R.; FERNANDES, S. M. V.; RANGEL, A. O. S. S. Enzymatic determination of urea in milk by sequential injection with spectrophotometric and conductometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 6887–6890, 2004.
- LIU, M. M. et al. A colorimetric assay for sensitive detection of hydrogen peroxide and glucose in microfluidic paper-based analytical devices integrated with starch-iodide-gelatin system. **Talanta**, v. 200, p. 511–517, 1 ago. 2019.

LOBO-JÚNIOR, E. O. et al. Simple, rapid and, cost-effective fabrication of PDMS electrophoresis microchips using poly(vinyl acetate) as photoresist master. **Electrophoresis**, v. 38, n. 2, p. 250–257, 2017.

LOBO JÚNIOR, E. DE O. et al. High fidelity prototyping of PDMS electrophoresis microchips using laser-printed masters. **Microsystem Technologies**, v. 21, n. 6, p. 1345–1352, 2015.

LUTHER, J. L.; FRAHAN, V. H. DE; LIEBERMAN, M. Paper test card for detection of adulterated milk. **Analytical Letters**, v. 9, n. 38, p. 5674–5683, 2017.

MA, X. et al. Injection molding and characterization of PMMA-based microfluidic devices. **Microsystem Technologies**, v. 26, n. 4, p. 1317–1324, 1 abr. 2020.

MALEK, C. G. K. Laser processing for bio-microfluidics applications (part I). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 8, p. 1351–1361, 2006.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 1, p. 244–248, 1990.

MARTINEZ, A. W. et al. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1318–1320, 2007.

MENDES, G. M. et al. Molecular Diagnostics of Dengue by Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) in Disposable Polyester-Toner Microdevices. **Article J. Braz. Chem. Soc**, v. 30, n. 9, p. 1841–1849, 2019.

MEREDITH, N. A. et al. Paper-based analytical devices for environmental analysis. **Analyst**, v. 141, n. 6, p. 1874–1887, 2016.

METTAKOONPITAK, J. et al. Electrochemistry on Paper-based Analytical Devices: A Review. **Electroanalysis**, v. 28, n. 7, p. 1420–1436, 2016.

MIRICA, K. A. et al. Magnetic levitation in the analysis of foods and water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6565–6569, 9 jun. 2010.

MORA, M. F. et al. Patterning and Modeling Three-Dimensional Microfluidic Devices Fabricated on a Single Sheet of Paper. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 13, p. 8298–8303, 2 jul. 2019.

MOREIRA, R. C. et al. High performance separation of quaternary amines using microchip non-aqueous electrophoresis coupled with contactless conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1499, p. 190–195, 26 maio 2017.

MOREIRA, R. C. et al. Screening of seized cocaine samples using electrophoresis microchips with integrated contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 39, n. 17, p. 2188–2194, 2018.

- NANTHASURASAK, P. et al. Electrophoretic separations on paper: Past, present, and future-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 985, p. 7–23, 2017.
- NGUYEN, M. P. et al. Read-by-eye quantification of aluminum (III) in distance-based microfluidic paper-based analytical devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 1100, p. 156–162, 2020.
- NOVIANA, E. et al. Emerging applications of paper-based analytical devices for drug analysis: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1116, p. 70–90, 2020.
- O'NEIL, G. D. Toward single-step production of functional electrochemical devices using 3D printing: Progress, challenges, and opportunities. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 20, p. 60–65, 2020.
- OH, S. J. et al. Fully automated and colorimetric foodborne pathogen detection on an integrated centrifugal microfluidic device. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 10, p. 1917–1926, 2016.
- OLIVEIRA, K. A. et al. Kinetic study of glucose oxidase on microfluidic toner-based analytical devices for clinical diagnostics with image-based detection. **Analytical Methods**, v. 6, n. 14, p. 4995–5000, 2014.
- OLIVEIRA, K. A. et al. Dengue diagnosis on laser printed microzones using smartphone-based detection and multivariate image analysis. **Analytical Methods**, v. 8, n. 35, p. 6506–6511, 2016.
- ORTIZ-GÓMEZ, I. et al. Microfluidic paper-based device for colorimetric determination of glucose based on a metal-organic framework acting as peroxidase mimetic. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 1, p. 47, 2018.
- OU, X. et al. Microfluidic chip electrophoresis for biochemical analysis. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 1, p. 258–270, 2020.
- OWENS, C. E.; HART, A. J. High-precision modular microfluidics by micromilling of interlocking injection-molded blocks. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 6, p. 890–901, 2018.
- PAMULA, V. K. et al. **A droplet-based lab-on-a-chip for colorimetric detection of nitroaromatic explosives**. 18th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems. **Anais...IEEE**, 2005
- PARK, C. et al. Double-sided 3D printing on paper towards mass production of three-dimensional paper-based microfluidic analytical devices (3D- μ PADs). **Lab on a Chip**, v. 18, n. 11, p. 1533–1538, 7 jun. 2018.
- PATABADIGE, D. E. W. et al. Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Applications. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 320–338, 2015.
- PETRONI, J. M.; LUCCA, B. G.; FERREIRA, V. S. Simple approach for the fabrication of screen-printed carbon-based electrode for amperometric detection on microchip electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 954, p. 88–96, 2017.
- PHOONSAWAT, K. et al. A distance-based paper sensor for the determination of chloride ions using silver nanoparticles. **Analyst**, v. 143, n. 16, p. 3867–

3873, 2018.

PICCIN, E. et al. Polyurethane from biosource as a new material for fabrication of microfluidic devices by rapid prototyping. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, n. 1–2, p. 151–158, 2007.

PICCIN, E. et al. Generation of water-in-oil and oil-in-water microdroplets in polyester-toner microfluidic devices. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 196, p. 525–531, 2014.

PINHEIRO, K. M. P. et al. Rapid separation of post-blast explosive residues on glass electrophoresis microchips. **Electrophoresis**, v. 40, n. 3, p. 462–468, 1 fev. 2019.

PUNDIR, C. S.; JAKHAR, S.; NARWAL, V. Determination of urea with special emphasis on biosensors : A review. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 123, p. 36–50, 2019.

QIN, D.; XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Rapid prototyping of complex structures with feature sizes larger than 20 μm . **Advanced Materials**, v. 8, n. 11, p. 917–919, 1996.

QUERO, R. F. et al. A novel thread-based microfluidic device for capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 286, p. 301–305, 1 maio 2019.

RAZA, W.; HOSSAIN, S.; KIM, K. Y. **A review of passive micromixers with a comparative analysis** *Micromachines* MDPI AG, , 1 maio 2020. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/micromachines>. Acesso em: 15 mar. 2021

REYES, D. R. et al. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2623–2636, 2002.

ROBERTS, M. A. et al. UV laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 11, p. 2035–2042, 1997.

SAATKAMP, C. J. et al. Quantifying creatinine and urea in human urine through Raman spectroscopy aiming at diagnosis of kidney disease. **Journal of biomedical optics**, v. 21, n. 3, p. 37001, 2016.

SALVE, M. et al. Quantifying colorimetric assays in μPAD for milk adulterants detection using colorimetric android application. **Micro & Nano Letters**, v. 13, n. 11, p. 1520–1524, 2018.

SANTANA, H. S. et al. Transesterification reaction of sunflower oil and ethanol for biodiesel synthesis in microchannel reactor: Experimental and simulation studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 302, p. 752–762, 2016.

SCHAPPLER, J.; VEUTHEY, J. L.; RUDAZ, S. 18 Coupling CE and microchip-based devices with mass spectrometry. In: AHUJA, S.; JIMIDAR, M. I. (Eds.). **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. [s.l.] Ciência e Tecnologia de Separação, 2008. v. 9p. 477–521.

SCHILLY, K. M. et al. Biological applications of microchip electrophoresis with

amperometric detection: in vivo monitoring and cell analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 1–19, 2020.

SEARLE, P. L. The berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen: A review. **Analyst**, v. 109, n. 5, p. 549–568, 1984.

SHADPOUR, H. et al. Physiochemical properties of various polymer substrates and their effects on microchip electrophoresis performance. **Journal of Chromatography A**, v. 1111, n. 2, p. 238–251, 2006.

SHADPOUR, H. et al. Multichannel microchip electrophoresis device fabricated in polycarbonate with an integrated contact conductivity sensor array. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 870–878, 2007.

SHANG, L.; CHENG, Y.; ZHAO, Y. Emerging Droplet Microfluidics. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7964–8040, 2017.

SHEINI, A. A paper-based device for the colorimetric determination of ammonia and carbon dioxide using thiomalic acid and maltol functionalized silver nanoparticles: application to the enzymatic determination of urea in saliva and blood. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 10, p. 1–11, 1 out. 2020.

SILVA, P. B. M.; OLIVEIRA, K. A.; COLTRO, W. K. T. Colorimetric detection of glucose in biological fluids using toner-based microzone plates. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 1, p. 197–201, 2017.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. [s.l.] Editora Cengage Learning, 2008.

SMITH, S. et al. The potential of paper-based diagnostics to meet the ASSURED criteria. **RSC Advances**, v. 8, n. 59, p. 34012–34034, 2018.

SONG, Y.; WANG, Y.; QIN, L. A multistage volumetric bar chart chip for visualized quantification of DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 45, p. 16785–16788, 2013.

SONI, A.; SURANA, R. K.; JHA, S. K. Smartphone based optical biosensor for the detection of urea in saliva. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 269, p. 346–353, 2018.

SOUSA, L. R.; DUARTE, L. C.; COLTRO, W. K. T. Instrument-free fabrication of microfluidic paper-based analytical devices through 3D pen drawing. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 312, p. 128018, 2020.

SPELLER, N. C. et al. Cutting edge microfluidics: Xurography and a microwave. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 291, p. 250–256, 2019.

SU, S. et al. One-step bonding and hydrophobic surface modification method for rapid fabrication of polycarbonate-based droplet microfluidic chips. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 282, p. 60–68, 2019.

TAN, A. et al. Rapid fabrication of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) by photocopying. **Lab on a Chip**, v. 1, n. 1, p. 7–9, 2001.

THOMPSON, B. L. et al. Inexpensive, rapid prototyping of microfluidic devices using overhead transparencies and a laser print, cut and laminate fabrication method. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 875–886, 2015.

THOMPSON, B. L. et al. Hematocrit analysis through the use of an inexpensive centrifugal polyester-toner device with finger-to-chip blood loading capability. **Analytica Chimica Acta**, v. 924, p. 1–8, 2016a.

THOMPSON, B. L. et al. Hematocrit analysis through the use of an inexpensive centrifugal polyester-toner device with finger-to-chip blood loading capability. **Analytica Chimica Acta**, v. 924, p. 1–8, 14 jun. 2016b.

TIAN, T. et al. Distance-based microfluidic quantitative detection methods for point-of-care testing. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 7, p. 1139–1151, 2016.

TOSCHI, E.; WOLPERT, H. Utility of Continuous Glucose Monitoring in Type 1 and Type 2 Diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 895–904, 2016.

TRANTIDOU, T. et al. Mask-Free Laser Lithography for Rapid and Low-Cost Microfluidic Device Fabrication. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 23, p. 13915–13921, 2018.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Journal of clinical pathology**, v. 22, n. 2, p. 158–161, 1969.

TSAO, C.-W. Polymer Microfluidics: Simple, Low-Cost Fabrication Process Bridging Academic Lab Research to Commercialized Production. **Micromachines**, v. 7, n. 12, p. 225, 2016.

VICKERS, J. A. et al. Thermoset polyester as an alternative material for microchip electrophoresis/electrochemistry. **Electrophoresis**, v. 28, n. 7, p. 1123–1129, 2007.

VULLEV, V. I. et al. Nonlithographic fabrication of microfluidic devices. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 50, p. 16062–16072, 2006.

WAHEED, S. et al. 3D printed microfluidic devices: Enablers and barriers. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 11, p. 1993–2013, 2016.

WANG, J. Electrochemical Detection for Capillary Electrophoresis Microchips: A Review. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1133–1140, 2005.

WANG, K. et al. A low-cost, portable and easy-operated salivary urea sensor for point-of-care application. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 132, p. 352–359, 2019a.

WANG, Y. et al. A high-performance polycarbonate electrophoresis microchip with integrated three-electrode system for end-channel amperometric detection. **Electrophoresis**, v. 29, n. 9, p. 1881–1888, 2008.

WANG, Y. et al. A reversible, colorimetric, pH-responsive indole-based hydrogel and its application in urea detection. **RSC Advances**, v. 9, n. 42, p.

24299–24304, 6 ago. 2019b.

WEIGL, B. H. et al. Lab-on-a-chip sample preparation using laminar fluid diffusion interfaces computational fluid dynamics model results and fluidic verification experiments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 371, n. 2, p. 97–105, 2001.

WHITESIDES, G. M. et al. Soft Lithography in Biology and Biochemistry. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 3, n. 1, p. 335–373, 2001.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–373, 2006.

WLODARCZYK, K. L.; HAND, D. P.; MAROTO-VALER, M. M. Maskless, rapid manufacturing of glass microfluidic devices using a picosecond pulsed laser. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

WOHLFAHRT, G. et al. The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 260, p. 69–83, 2004.

WU, Y. et al. Clinical chemistry measurements with commercially available test slides on a smartphone platform: Colorimetric determination of glucose and urea. **Clinica Chimica Acta**, v. 448, p. 133–138, 2015.

XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Soft Lithography. **Annual Review of Materials Science**, v. 28, n. 1, p. 153–184, 1998.

YAMADA, K. et al. Distance-Based Tear Lactoferrin Assay on Microfluidic Paper Device Using Interfacial Interactions on Surface-Modified Cellulose. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 44, p. 24864–24875, 2015.

YANG, X. et al. Open surface multifunctional droplet manipulation platform fabricated by micromilling. **Journal of Materials Science**, v. 54, n. 15, p. 10715–10727, 2019.

ZHAO, X.-M.; XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Soft lithographic methods for nanofabrication. **Journal of Materials Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 1069–1074, 1997.

ZHU, Z. et al. Au@pt nanoparticle encapsulated target-responsive hydrogel with volumetric bar-chart chip readout for quantitative point-of-care testing. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 46, p. 12503–12507, 2014.

CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITAE

1. Informações Pessoais

Nome Completo: Nikaele Sousa Moreira

Endereço eletrônico: nikaele_sousa@hotmail.com

Naturalidade: Itapuranga - GO

Data de Nascimento: 25/01/1997

Filiação: Irismar de Freitas Sousa e Eurípedes Moreira

2. Formação Acadêmica

Licenciatura em Química

Instituto Federal Goiano – Campus Ceres

Ceres – Goiás

2014 – 2018

3. Atividades

3.1. *Trabalhos apresentados em reuniões científicas*

MOREIRA, N. S.; CHAGAS, C. L. S.; OLIVEIRA, K. A.; DUARTE JUNIOR, G. F.; DE SOUZA, F. R.; SANTHIAGO, M.; KUBOTA, L. T. AND COLTRO W. K. T. Fabricação de dispositivos microfluídicos em poliéster para aplicações bioanalíticas. 7th School on Bioanalysis. Uberlândia, 2019.

MOREIRA, N. S. Desenvolvimento de dispositivos analíticos em filmes de poliéster utilizando uma impressora de recorte. I Simpósio de Microfluídica do Grupo de Microfluídica e Eletroforese. Goiânia, 2020.

3.2. *Artigo Publicado*

Moreira, N. S.; Chagas, C. L. S.; Oliveira, K. A.; Duarte-Junior, G. F.; De Souza, F. R.; Santhiago, M.; Garcia, C. D.; Kubota, L. T.; Coltro, W. K. T. Fabrication of microwell plates and microfluidic devices in polyester films using a cutting printer. **Analytica Chimica Acta**, v. 1119, p. 1-10, 2020.