

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Dispositivos sob demanda: desenvolvimento de
sistemas microfluídicos e sensores
eletroquímicos por impressão 3D**

Lucas da Costa Duarte

Orientador: Prof. Dr Wendell Karlos Tomazelli Coltro

Goiânia
2020



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

Lucas da Costa Duarte

3. Título do trabalho

Dispositivos sob demanda: desenvolvimento de sistemas microfluídicos e sensores eletroquímicos por impressão 3D

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 16/06/2021, às 22:21, 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 **LUCAS DA COSTA DUARTE, Discente**, em 17/06/2021, às 09:30, 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 **2139695** e o código CRC **5063811D**.



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 Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Lucas da Costa Duarte

3. Título do trabalho

Dispositivos sob demanda: desenvolvimento de sistemas microfluídicos e sensores eletroquímicos por impressão 3D

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 20/02/2025, às 15:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Da Costa Duarte**, **Usuário Externo**, em 25/02/2025, às 09:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



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 **5184812** e o código CRC **1E6A28F3**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Dispositivos sob demanda: desenvolvimento de
sistemas microfluídicos e sensores
eletroquímicos por impressão 3D**

Lucas da Costa Duarte

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Federal de
Goiás para obtenção do título de
Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr Wendell Karlos Tomazelli Coltro

Goiânia
2020

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

Duarte, Lucas da Costa

Dispositivos sob demanda: desenvolvimento de sistemas
microfluídicos e sensores eletroquímicos por impressão 3D [manuscrito]
/ Lucas da Costa Duarte. - 2020.

xiii, 98 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2020.

Bibliografia.

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

1. Impressão 3D. 2. Contagem bacteriana. 3. Micromisturador. 4.
Reação Katritzky. 5. Estradiol. I. Coltro, Wendell Karlos Tomazelli ,
orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata nº **115** da sessão da Defesa de Doutorado de **Lucas da Costa Duarte**, que confere o título de **Doutor em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **30 (trinta) dias do mês de novembro de 2020 (dois mil e vinte)**, a partir das **13h30m**, via **Videoconferência**, através da plataforma Google Meet (<https://meet.google.com/ebm-qabh-exx>), realizou-se a sessão pública da Defesa de Doutorado intitulada "**Dispositivos sob demanda: desenvolvimento de sistemas microfluídicos e sensores eletroquímicos por impressão 3D**". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago (IQ/USP)**, **Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz (IQ/UFU)**, **Prof. Dr. Juliano Alves Bonacin (IQ/UNICAMP)** e **Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz (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 a fim de concluir o julgamento da Defesa de Doutorado, tendo sido o candidato **aprovado** 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, ao(s) 30 (trinta) dias do mês de novembro de 2020 (dois mil e vinte).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Professor do Magistério Superior**, em 30/11/2020, às 17:11, 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 **Rodrigo Alejandro Abarza Munoz, Usuário Externo**, em 30/11/2020, às 17:12, 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 **Juliano Alves Bonacin, Usuário Externo**, em 30/11/2020, às 17:12, 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 **Boniek Gontijo Vaz, Professor do Magistério Superior**, em 30/11/2020, às 17:12, 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 **1713042** e o código CRC **4706EEC4**.

Referência: Processo nº 23070.049969/2020-11

SEI nº 1713042

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano. Mas o que seria o oceano se não infinitas gotas?”

Isaac Newton

Dedico este trabalho

*Aos meus pais Geraldo e Fátima por todo amor,
compreensão e esforço para me proporcionar esta
oportunidade que eles não puderam ter.*

Agradecimentos

Agradeço à Deus por ter me concedido saúde, sabedoria e discernimento para superar os obstáculos durante essa trajetória.

Aos meus pais Geraldo Duarte e Fátima Duarte por todo esforço, apoio, amor, paciência, compreensão, carinho, e conselhos que me ajudaram a sempre seguir em frente! Aos meus irmãos Leandro e Luciano pela união, paciência e apoio. Um agradecimento especial a minha amada namorada Wanessa por todo amor, companheirismo e compreensão. A toda a minha família pelo apoio em todo meu processo de formação pessoal. Muito obrigado!

Ao meu orientador Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro, exemplo de professor, pesquisador e amigo. Obrigado pela oportunidade de poder desenvolver meu potencial científico e profissional. Obrigado pela orientação, paciência, cobranças e incentivo que me fizeram evoluir!

Aos amigos Federico, Thaísa, Igor e Lanaia pelas contribuições fundamentais para realização deste trabalho. Estendo meus agradecimentos também aos amigos Eulício, Cyro, Gerson, Lucas Rodrigues, Lucas Castro, Barbara, Karoliny, Danielly, Nikaely, Habdias, Anderson, Presuntim, Fabricio, Lorryne, Kemilly, Kariolanda, Soraia e Simone que tornaram o trabalho mais agradável, ajudando e discutindo sobre os experimentos e também proporcionando boas conversas e momentos de descontração.

Aos professores Dr. Boniek G. Vaz, Dr. Eduardo Cortón e Dr. Dyrney A. Santos pela colaboração, apoio científico, disponibilidade e ensino.

Aos demais professores participantes da banca pela contribuição para melhoria desse trabalho.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado (processo 308140/2016-8)

E finalmente agradeço a todos os meus amigos que de alguma maneira contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal, muito obrigado!

Sumário

Lista de Figuras	iii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	ix
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Capítulo 1	1
1.1. Introdução geral	2
1.2. Objetivos	10
1.2.1. Geral	10
1.2.2. Específicos	10
2. Capítulo 2	11
2.1. Introdução	12
2.2. Objetivos	14
2.2.1. Geral	14
2.2.2. Específicos	14
2.3. Materiais e métodos	15
2.3.1. Materiais e reagentes	15
2.3.2. Preparação do meio de cultura	15
2.3.3. Cultura bacteriana e preparação de amostras	16
2.3.4. Fabricação de dispositivos microfluídicos	16
2.3.5. Geração de gotículas	19
2.3.6. Estimativa de bactérias em gotículas por distribuição de Poisson	19
2.3.7. Detecção de bactérias dentro de gotículas com C ⁴ D	20
2.3.8. Simulação computacional	20
2.4. Resultados e discussão	21
2.4.1. Estudos de condutividade dos meios de cultura utilizando C ⁴ D	21
2.4.2. Detecção de bactérias dentro de uma gota	23
2.4.3. Determinação de bactérias no interior das gotículas por C ⁴ D	26
2.4.4. Monitoramento de partículas não condutivas e condutivas	29
2.4.5. Contagem de células dentro das gotículas por C ⁴ D	31
2.5. Conclusões	34
Capítulo 3	36
3.1. Introdução	37
3.2. Objetivos	42
3.2.1. Geral	42
3.2.2. Específicos	42

3.3. Materiais e Métodos	43
3.3.1. Reagentes e preparo de soluções	43
3.3.2. Fabricação dos dispositivos.....	43
3.3.3. Caracterização óptica	45
3.3.4. Parâmetros operacionais das análises de espectrometria de massas	45
3.3.5. Parâmetros operacionais das análises de ESI-MS.....	47
3.4. Resultados e Discussão	47
3.4.1. Dispositivos de reação impressos em 3D para análises de MS	47
3.4.2. Monitoramento <i>online</i> da reação de Katritzky por MS de ionização direta por <i>spray</i>	49
3.4.3. Comparação entre o reator microfluídico impresso e a técnica convencional de ESI.....	54
3.5. Conclusões	56
4. Capítulo 4	57
4.1. Introdução.....	58
4.2. Objetivos	61
4.2.1. Geral	61
4.2.2. Específicos	61
4.3. Materiais e Métodos	62
4.3.1. Reagentes utilizados	62
4.3.2. Processo de fabricação	62
4.3.3. Procedimentos eletroquímicos	63
4.3.4. Aplicação Analítica	64
4.4. Resultados e Discussão	65
4.4.1. Processo de impressão da célula eletroquímica	65
4.4.2. Tratamento eletroquímico e caracterização eletroquímica dos eletrodos	66
4.4.3. Aplicação Analítica	69
4.5. Conclusões	72
5. Capítulo 5	73
5.1. Conclusões Gerais	74
5.2. Perspectivas	75
6. Referências bibliográficas	76
Súmula curricular	95

Lista de Figuras

Figura 1.1 Levantamento de publicações científicas no sistema Scopus realizado no dia 01 de novembro de 2020 utilizando as palavras 3D-printing e chemistry encontradas nos títulos, resumos ou palavras-chave das publicações indexadas..... 4

Figura 1.2 Exemplos selecionados de dispositivos microfluídicos impressos tridimensionalmente com a tecnologia FDM. (A) Um reator microfluídico. Figura modificada da referência (KITSON et al., 2012). (B) Um dispositivo utilizado para a síntese de nanopartículas de prata e ouro. Figura modificada da referência (BRESSAN et al., 2019) (C) Um sistema microfluídico modular utilizado para degradação de *stents* e cultura células. Figura modificada da referência (NIE et al., 2018). 7

Figura 2.1. Representação do sistema de bombas seringa e microdispositivo utilizado para geração e detecção de gotículas contendo a bactéria *E. coli* K12 (A). Os canais foram fabricados na configuração junção em T para injeção da fase contínua e fase dispersa mostrados em (B). Os eletrodos para detecção eletroquímica foram impressos sob o microcanal na configuração antiparalela apresentados em (C). 18

Figura 2.2. Efeito do meio de cultura e vazão na resposta C^4D . As gotas foram geradas utilizando água (■) e os meios de cultura HLB (■) e LB (■). A intensidade de pico obtida pela resposta do sistema C^4D de cada solução foi monitorada mantendo constante a vazão da fase dispersa a $5 \mu\text{L min}^{-1}$ e variando a vazão da fase contínua de 10 a $60 \mu\text{L min}^{-1}$ 22

Figura 2.3. Representação esquemática mostrando os procedimentos para detectar a bactéria *E. coli* K12 por medições de C^4D e contagem de placas. As bactérias retidas

nas gotículas geradas no microcanal são detectadas usando sensores integrados ao dispositivo microfluídico. Em seguida, as gotículas que contêm bactérias são coletadas e determinadas pelo método convencional de contagem de placas para servir como referência e comparação com a abordagem C⁴D proposta..... 24

Figura 2.4. Distribuição de Poisson e o método de contagem de placas para estimar o número de células dentro de uma gota. O gráfico (A) mostra a relação entre a probabilidade (p) e o número de células dentro de uma gota (n) calculada para os valores λ de 17,3, 86,5, 173, 865 e 1730, correspondentes a concentrações celulares iguais a 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 e 1×10^8 UFC mL⁻¹, respectivamente. O gráfico (B) indica em (■) o número médio de células dentro de uma gota (λ), em (●) a quantidade de células em uma gota determinada pelo método de contagem de placas ambas em relação com as concentrações de células injetadas. 25

Figura 2.5. Respostas de C⁴D para gotículas contendo diferentes concentrações de células de *E. coli* K12 (5×10^6 a 1×10^9 UFC mL⁻¹). Condições de detecção: onda senoidal de 500 kHz com tensão de excitação de 1 V_{pp}..... 28

Figura 2.6. Densidade de corrente ($\mu\text{A m}^{-2}$) simulada para gotículas sem (A) e com (B) as bactérias. As imagens (C) e (D) são micrografias de campo escuro das gotículas sem e com bactérias, respectivamente. 29

Figura 2.7. Medidas de C⁴D para gotículas contendo partículas (A) isolantes de Co/Nb₂O₅ e (B) condutoras de carvão ativado em concentrações que variam de 0,5 a 5,0 mg mL⁻¹ usando uma mistura de óleo e span 80 como a fase contínua. As fases dispersa e contínua foram bombeadas com vazões mantidas em 5 e 60 $\mu\text{L min}^{-1}$,

respectivamente. As gotas foram monitoradas pelo sistema C⁴D aplicando uma onda senoidal de 500 kHz com amplitude de 1 V_{pp}..... 31

Figura 2.8. Relação entre o sinal C⁴D e o número de células dentro de uma gota. As concentrações foram determinadas pela distribuição de Poisson no eixo inferior e considerando a concentração de células no meio injetado, no eixo superior..... 33

Figura 3.1. Vista (A) isométrica e (B) superior dos dispositivos dos formatos em Y e serpentina 3D projetados para os estudos de mistura monitorada por espectrometria de massas. Os dois dispositivos foram impressos utilizando o material termoplástico PLA por meio da tecnologia de impressão FDM. 45

Figura 3.2. Em (A) representação do sistema contendo bomba seringa, dispositivo MS e espectrômetro de massas utilizando para o monitoramento de reações. Em (B) acoplamento do microreator ao MS, onde (I) e (II) são as entradas para cada reagente. 46

Figura 3.3. Em (A) são apresentadas imagens obtidas por estereoscópio ótico do dispositivo impresso para monitoramento de reação por espectrometria de massas mostrando as regiões da junção em Y (I), e do segmento em L inferior (II), intermediário (III) e superior (IV). Imagens de microscopia de varredura eletrônica (MEV) de um do reservatório de amostra (B) e a seção transversal de um microcanal (C) fabricados por impressão FDM (Retirado e adaptado de Duarte, L. C. Impressão 3D: uma alternativa para fabricação de dispositivos analíticos miniaturizados. 2016. Universidade Federal de Goiás. (DUARTE; COLTRO, 2016) 49

Figura 3.4. Esquema geral da análise por MS de ionização direta usando o microrreator impresso em 3D: (A) a reação de Katritzky, onde o cátion TPP⁺ (*m/z* 309)

reage com os grupos amino de glicina e alanina para produzir os cátions em m/z 366 $[M]^+$ e m/z 380 $[M]^+$, respectivamente. Um espectro de massa representativo e o MS/MS para o produto da reação com glicina são mostrados em (B) e (C), e para alanina são mostrados em (D) e (E), respectivamente. 51

Figura 3.5. Espectros de massas registrados nos dispositivos com canal em serpentina 3D e canal em Y mostrando a reação de Katritzky entre o trifenilpirílio e os aminoácidos (A) glicina e (B) alanina. Os espectros estão apresentados em função da vazão de injeção dos reagentes, os quais variam entre 25 e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ 52

Figura 3.6. Valores de intensidades de sinal de (A) m/z 366 $[M]^+$, referente ao produto da reação com glicina, e (B) m/z 380 $[M]^+$, produto da reação com alanina. As intensidades estão exibidas em função da vazão (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$) conduzidas nos microrreatores com canal interno em forma de Y (barras em cor azul) e canal em forma de serpentina 3D (barras em cor verde). 53

Figura 3.7. Valores de intensidades de sinal de (A) m/z 366 $[M]^+$ (produto da reação com glicina) e (B) m/z 380 $[M]^+$ (produto da reação com alanina) obtido do monitoramento *online* da reação de Katritzky por MS de ionização direta por *spray* usando o microrreator em forma de serpentina 3D (barra em cor verde) a uma vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, e do monitoramento *offline* da reação por ESI-MS convencional (barra em cor laranja) monitorado após 0, 10 e 30 min de reação em solução sob agitação. 55

Figura 4.1. Design projetado da célula eletroquímica contendo eletrodo de trabalho (ET), eletrodo auxiliar (EA) e eletrodo pseudo-referência (PR). Os eletrodos foram

impressos utilizando o filamento condutivo PLA-NF e a região isolante foi fabricada utilizando o termoplástico ABS. 63

Figura 4.2. Representação do A) Sistema de detecção eletroquímica e, B) célula eletroquímica empregada usando um arranjo de 3 eletrodos fabricados com a utilização de uma impressora 3D: eletrodo de trabalho (ET), eletrodo auxiliar (EA) e eletrodo de pseudo-referência (ER). 64

Figura 4.3. A) Tratamento eletroquímico empregado para a ativação dos eletrodos fabricados com a utilização de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; B) Voltamogramas cíclicos em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros operacionais: Em A) cronoamperometria potencial aplicado 1.4 V e $-1.0 \text{ V vs. PLA-NF}$. Em B) voltametria cíclica varredura de potencial $-0,7$ a $0,5 \text{ vs PLA-NF}$ 67

Figura 4.4. A) Voltamogramas cíclicos de eletrodo tratado eletroquimicamente em ferricianeto $1 \text{ mmol L}^{-1} + 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ em diferentes velocidades de varredura ($10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200 \text{ mV s}^{-1}$). A inserção apresenta a corrente de pico anódica em função da raiz quadrada de varredura. B) Relação entre o logaritmo da corrente de pico anódica em função do logaritmo da velocidade de varredura. 68

Figura 4.5. Voltamogramas cíclicos de eletrodos impressos (PLA-NF) utilizando uma impressora 3D em solução tampão de Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 8,0$) a 50 mV s^{-1} com potenciais variando de $-0,2$ a $1,0 \text{ V}$. As linhas pretas e vermelhas representam dispositivos sem e com tratamento eletroquímico, respectivamente. 69

Figura 4.6. A) Voltamogramas cíclicos de uma solução $50\mu\text{mol L}^{-1}$ de 17β -estradiol para diferentes unidades de pH. B) Relação entre corrente de pico anódica e potencial de pico em função do pH. 70

Figura 4.7. A) Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de estradiol (185 nmol L^{-1} – $200\mu\text{mol L}^{-1}$). Parâmetros: $E_{\text{step}} = 2\text{ mV}$; Amplitude = 50 mV ; velocidade de varredura = 5 mV s^{-1} . B) Relação entre a corrente pico anódica em função da concentração de estradiol. A Inserção apresenta a região linear da curva analítica: 185 nmol L^{-1} a $20\mu\text{mol L}^{-1}$ 71

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ABS	Acrilonitrila butadieno estireno
C ⁴ D	Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (<i>capacitively coupled contactless conductivity detection</i>)
C ⁴ D ₀	Sinal obtido para gotículas sem células
C ⁴ D _B	Sinal obtido em gotículas com amostras contendo células
CAD	Desenho auxiliado por computador (<i>computer-aided design</i> ,)
CAM	Fabricação auxiliada por computador (<i>computer aided manufacturing</i>)
CNTs	Nanotubos de carbono
DMF	Dimetilformamida
DPR	Desvio padrão relativo
DPV	Voltametria de pulso diferencial
DS-MS	Ionização direta por spray em espectrometria de massas
EA	Eletrodo auxiliar
E _p	Potencial de pico
ER	Eletrodo de pseudo- referência
ESI-MS	Espectrometria de massa por eletrospray
ET	Eletrodo de trabalho
FDM	Modelagem por fusão e deposição (<i>fused deposition modeling</i>)
HNO ₃	Ácido nítrico
HLB	<i>Half-Luria Bertani</i>
I _{pa}	Corrente de pico anódico
K ₄ [Fe(CN) ₆]	Ferrocianeto de potássio
KCl	Cloreto de potássio
LB	Luria Bertani
LOC	<i>Lab-on-a-chip</i>
LOD	Limite de detecção

LOM	Manufatura de objeto laminado (<i>laminated object manufacturing</i>)
MS	Espectrometria de massas
n	Número de células em uma gota
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
p	Probabilidade de obter n número de células em uma gota
PC	Policarbonato
PET	Polietileno tereftalato
PETG	Polietileno tereftalato glicol
PLA	Ácido polilático
PLA-NF	Ácido polilático/negro de fumo
PMMA	Polimetilmetacrilato
PS	Poliestireno
PVA	Álcool polivinílico
Re	Número de Reynolds
rGO	Óxido de grafeno reduzido
Rt	Tempo de residência
SLS	Sinterização seletiva a laser (<i>selective laser sintering</i>)
STL	<i>Stereolithography</i>
Tampão BR	Tampão Britton-Robinson
TIC	Cromatogramas de íons totais (<i>total ion chromatograms</i>)
TPP	2,4,6-trifenilpirílio
UFC	Unidades formadoras de colônias
V_c	Volume da célula
V_d	Volume da gotícula
λ	Número médio de células por gota
μ TAS	Microssistemas de análises Totais
v	Velocidade de varredura

ϕ_s Fração volumétrica de células na solução de entrada

Resumo

A tecnologia de impressão 3D vem sendo amplamente explorada como método alternativo de fabricação de microdispositivos analíticos. Esta tecnologia vem resolvendo muitas limitações das técnicas convencionais de microfabricação devido sua capacidade de construir microestruturas com materiais e geometrias diversas de forma simples, rápida e de baixo custo. Neste sentido, a presente tese descreve o uso da impressão 3D para fabricação de plataformas analíticas para aplicações que envolvem contagem de células de *E. coli* incorporadas em gotículas baseadas na detecção condutométrica sem contato (C^4D), monitoramento online de reações químicas por espectrometria de massas (MS) e detecção de estradiol em análises eletroquímicas. Para medidas de C^4D os dispositivos microfluídicos foram impressos contendo microcanais na forma de junção em T e dois eletrodos integrados na disposição antiparalela. As gotas com células incorporadas foram monitoradas em tempo real utilizando o sistema C^4D . A abordagem proposta demonstrou capacidade de detectar células de *E. coli* na faixa de concentração entre 86,5 e 8650 UFC gotícula⁻¹ com limite de detecção de 63,66 UFC gota⁻¹. Para o desenvolvimento do reator miniaturizado empregado no monitoramento de reações químicas por MS foi construído um dispositivo microfluídico contendo um canal em forma de serpentina 3D e outro contendo canal em forma de Y. Ambos os dispositivos foram avaliados para o monitoramento da reação de Katritzky injetando simultaneamente as soluções de 2,4,6-trifenilpirílio (TPP) e de aminoácidos (glicina ou alanina) e o produto da reação foi monitorado de forma *online* por MS em diferentes vazões. Os espectros adquiridos demonstraram que as abundâncias relativas dos produtos obtidos com o dispositivo contendo canal em serpentina 3D tiveram ordem de grandeza até três vezes maior que as obtidas com o dispositivo com canal em Y. A performance do dispositivo em serpentina 3D também foi avaliada comparando com a técnica de ESI(+)-MS tradicional. O reator impresso em serpentina 3D promoveu a reação de forma mais rápida e com maior taxa de formação de produto em relação a técnica de ESI(+)-MS. A célula eletroquímica contendo eletrodos integrados foi inteiramente fabricada por impressão 3D. O dispositivo eletroquímico foi fabricado em única etapa com tempo de fabricação de 12 min e custo de US\$ 0,08. Testes preliminares para detecção de 17β - estradiol por DPV alcançaram um LOD de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e curva analítica com faixa linear de 0,19 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Estes resultados demonstram a excelente versatilidade da tecnologia de impressão 3D sendo aplicada em diferentes áreas da química bioanalítica. O método de contagem de contagem de bactérias, o dispositivo para monitoramento online de reações químicas, bem como a célula eletroquímica para detecção de hormônios oferecem simplicidade instrumental, baixo custo, alta sensibilidade permitindo a abertura de novas possibilidades de aplicações em diversas áreas da química.

Palavras-chave: Bactéria *E. Coli*; Contagem bacteriana; Micromisturador; Reação Katritzky; Estradiol; Detecção condutométrica sem contato; Espectrometria de Massas; Detecção Eletroquímica; Impressão 3D.

Abstract

3D printing technology has been widely explored as an alternative method of manufacturing analytical microdevices. This technology has been solving many limitations of conventional microfabrication techniques due to its ability to build microstructures with different materials and geometries in a simple, fast and low-cost way. In this sense, this thesis describes the use of 3D printing to manufacture analytical platforms for applications involving counting *E. coli* cells embedded in droplets based on contactless conductometric detection (C⁴D), online monitoring of chemical reactions by mass spectrometry (MS) and estradiol detection in electrochemical analysis. For C⁴D measurements, microfluidic devices were printed containing T-junction microchannels and two electrodes integrated in the antiparallel arrangement. The droplets with incorporated cells were monitored in real time using the C⁴D system. The proposed approach demonstrated the ability to detect *E. coli* cells in the concentration range between 86.5 and 8650 CFU droplet⁻¹ with a detection limit of 63.66 CFU droplet⁻¹. For the development of the miniaturized reactor used in the monitoring of chemical reactions by MS, a microfluidic device was built containing a channel in the shape of a 3D serpentine and another one containing a channel in the Y-shaped. Both devices were evaluated for monitoring the Katritzky reaction, injecting simultaneously 2,4,6-triphenylpriryllium (TPP) and amino acid (glycine or alanine) solutions and the reaction product were monitored online by MS at different flow rates. The acquired spectra demonstrated that the relative abundances of the products obtained with the device containing the 3D serpentine channel had an order of magnitude up to three times greater than those obtained with the Y-shaped device. The device performance in 3D serpentine was also evaluated comparing with the traditional ESI(+)-MS technique. The 3D serpentine printed reactor promoted the reaction quickly and with a higher rate of product formation compared to the ESI(+)-MS technique. The electrochemical cell containing integrated electrodes was entirely manufactured by 3D printing. The electrochemical device was manufactured in a single step with a manufacturing time of 12 min and a cost of US\$ 0.08. Preliminary tests for the detection of 17 β - estradiol by DPV reached an LOD of 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and an analytical curve with a linear range of 0.19 to 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. These results demonstrate the excellent versatility of 3D printing technology being applied in different areas of bioanalytical chemistry. The counting method of counting bacteria, the device for online monitoring of chemical reactions, as well as the electrochemical cell for detection of hormones offer instrumental simplicity, low cost, high sensitivity, allowing the opening of new application possibilities in different areas of chemistry.

Keywords: *E. Coli* bacteria; Bacterial count; Micromixer; Katritzky reaction; Estradiol; Contactless conductivity detection; Mass Spectrometry; Electrochemical Detection; 3D printing.

Capítulo 1

Introdução geral

1.1. Introdução geral

Os avanços em tecnologias de microfabricação associados ao conceito de microssistemas de análises totais (μ TAS), também denominados de *lab-on-a-chip* (LOC) vem, constantemente, recebendo grande atenção na área de química analítica e bioanalítica, pois permite substituir ensaios padrão comumente realizados em laboratórios por processos controlados em microescala (DEMELLO, 2006; EL-ALI; SORGER; JENSEN, 2006). Desde os primeiros trabalhos relatados na década de 1990, a miniaturização de sistemas analíticos já apresentava excelentes vantagens para análises químicas e biológicas incluindo redução do tempo de análise, baixo consumo de amostra (na ordem de nL e pL), alto desempenho analítico e portabilidade possibilitando análises em campo (HARRISON et al., 1992; MANZ; GRABER; WIDMER, 1990). Desde então, uma ampla faixa de tecnologias tem sido desenvolvida, adaptada ou melhorada para permitir a fabricação de canais em microescala (ARORA et al., 2010; DITTRICH; TACHIKAWA; MANZ, 2006; KOVARIK et al., 2012, 2013; PATABADIGE et al., 2016; VILKNER; JANASEK; MANZ, 2004; WEST et al., 2008). Dentre as técnicas tradicionais de microfabricação estão a fotolitografia convencional, a litografia suave, a estampagem a quente, a moldagem por injeção e a ablação à laser, as quais já estão bastante difundidas na comunidade científica (BECKER; GÄRTNER, 2008; GUCKENBERGER et al., 2015; ILIESCU et al., 2012). Estas técnicas possibilitam a produção de canais numa grande variedade de plataformas microfluídicas como vidro, quartzo e silício bem como diferentes substratos poliméricos. O vidro é o substrato mais popular para essa finalidade devido às suas propriedades químicas bem conhecidas e excelente transparência óptica (ILIESCU et al., 2012; PESSOA DE SANTANA et al., 2013). No

entanto, os métodos convencionais de fabricação de dispositivos de vidro requerem instalação de sala limpa e envolvem, frequentemente, processos demorados como corrosão química e selagem térmica. A última é a etapa mais laboriosa e também oferece, muitas vezes, baixa reprodutibilidade. Desta maneira, se faz necessário o desenvolvimento de tecnologias alternativas de fabricação afim de reduzir custos e tempo.

Neste contexto, a tecnologia de impressão 3D vem ganhando destaque como uma nova e revolucionária ferramenta de prototipagem rápida. Ao contrário dos processos tradicionais de criação de objetos sólidos como o fresamento ou torneamento por exemplo, que remove material para esculpir o objeto, a impressão 3D funciona adicionando sucessivas camadas de material construindo objetos de diversos formatos (HOQUE; CHUAN; PASHBY, 2012). Dessa forma, a impressão 3D é considerada um processo aditivo de prototipagem rápida na qual um objeto tridimensional é construído a partir de um modelo criado digitalmente. Tal tecnologia vem revolucionando os processos de fabricação devido sua capacidade de produzir objetos sob medida, com boa precisão, de forma automatizada, construídos em apenas uma única etapa permitindo aplicações em áreas médicas, indústrias automotivas, aeroespacial, e até mesmo em indústrias alimentícias (ANDERSON et al., 2013; CHEN et al., 2014; COMINA; SUSKA; FILIPPINI, 2014, 2015; GROSS et al., 2014; HO et al., 2015; KITSON et al., 2012; O'NEILL et al., 2014; SHALLAN et al., 2014; TEMIZ et al., 2015). Ao longo dos anos esta tecnologia de prototipagem rápida vem sendo cada vez mais comum em laboratórios de pesquisa. A Figura 1.1 apresenta o crescimento exponencial de relatórios científicos que abordam o uso da impressão 3D em procedimentos químicos no período de 2007 a 2020.

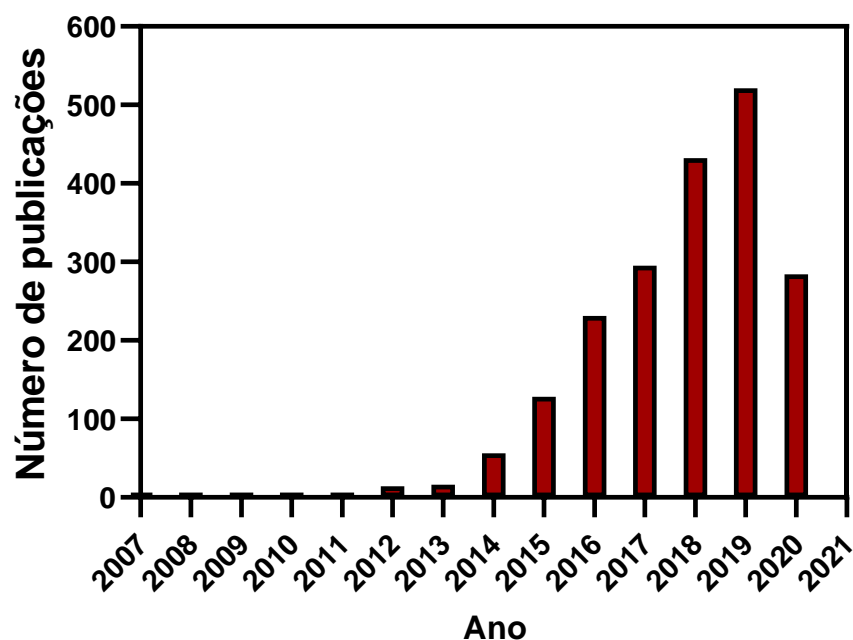


Figura 1.1 Levantamento de publicações científicas no sistema Scopus realizado no dia 01 de novembro de 2020 utilizando as palavras 3D-printing e chemistry encontradas nos títulos, resumos ou palavras-chave das publicações indexadas.

Atualmente, uma ampla variedade de tecnologias de impressão 3D está comercialmente disponível, incluindo a sinterização seletiva a laser (*selective laser sintering*, SLS), manufatura de objeto laminado (*laminated object manufacturing*, LOM), a impressão por jato de tinta (*inkjet printing*) e a modelagem por fusão e deposição (*fused deposition modeling*, FDM) (GROSS et al., 2014; MACDONALD et al., 2017). Para todos os processos de impressão 3D deve-se seguir algumas etapas preliminares. Primeiramente, realiza-se a modelagem tridimensional do protótipo desejado em um *software* com o sistema de desenho auxiliado por computador (*computer-aided design*, CAD). Há uma infinidade de softwares que contam com esse recurso, dentre eles estão o SolidWorks®, AutoCAD®, Solid Edge®, OpenSCAD, FreeCAD® e Autodesk® Fusion 360. O protótipo criado digitalmente é exportado para um *software* de fabricação auxiliada por computador (*Computer Aided Manufacturing*, CAM). Ultimaker Cura, Cliever Studio, Repetier Host, Simplify3D®

e PrusaSlic3r são exemplos de software CAM, que permitem “fatiar” e configurar os parâmetros de impressão de cada camada do objeto a ser impresso. Dessa forma, com os parâmetros escolhidos a máquina é capaz calcular o caminho necessário para a construção de cada parte do objeto.

Dentre as tecnologias de impressão 3D existentes, a FDM está entre as técnicas mais populares para prototipagem rápida de objetos sólidos devido sua acessibilidade e custo-benefício (GROSS et al., 2014; SHALLAN et al., 2014). Esta técnica consiste na extrusão de material polimérico semi-fundido sob a plataforma de impressão. Após a deposição da primeira camada o material termoplástico endurece e permite a deposição da camada seguinte, tal processo ocorre sucessivamente até a conclusão do protótipo (GROSS; LOCKWOOD; SPENCE, 2017; HO et al., 2015; O’NEILL et al., 2014; SHALLAN et al., 2014). Suas aplicações variam na fabricação de protótipos para odontologia, medicamentos, joias, calçados, automóveis e artes (BARNATT, 2016; BERMAN, 2012; GROSS; LOCKWOOD; SPENCE, 2017; SHALLAN et al., 2014). O método FDM ainda se destaca por ser uma tecnologia versátil permitindo o uso de uma variedade de materiais poliméricos como o ácido polilático (PLA), acrilonitrila butadieno estireno (ABS), álcool polivinílico (PVA), polietileno tereftalato (PET), poli (metacrilato de metila) (PMMA), náilon, polietileno tereftalato glicol (PETG) e termoplástico elastomérico (TPE). Além disso, permite a combinação de diferentes materiais para construção de um único objeto. A combinação dos termoplásticos mais utilizados como o PLA e ABS com materiais metálicos como cobre, níquel, e compósitos de grafeno e nanotubos de carbono proporciona objetos condutores, e permite a utilização deste material para a construção de circuitos eletrônicos e sensores que podem ser aplicados em técnicas de detecções eletroquímicas (DUARTE et al., 2017; HWANG et al., 2015; SA’UDE et al., 2013).

Em microfluídica, a impressão 3D tem se demonstrado uma ferramenta bastante promissora para prototipagem rápida de dispositivos com o conceito *lab-on-a-chip* (LOC). A capacidade de construir microdispositivos em uma única etapa e de forma automatizada descarta a necessidade de etapas laboriosas de fabricação tradicionalmente relacionadas aos processos de corrosão química e de selagem térmica (COMINA; SUSKA; FILIPPINI, 2014, 2015). Em um dos nossos trabalhos recentes desenvolvemos um microdispositivo impresso em 3D capaz de gerar gotículas e mensurar em tempo real o seu tamanho por meio de um detector condutométrico sem contato capacitivamente acoplado (C⁴D). O dispositivo microfluídico foi construído com microcanais no formato de junção em T com 50,0 mm × 0,75 mm × 0,7 mm um contendo dois eletrodos integrados em arranjo antiparalelo. A impressão foi realizada combinando dois filamentos termoplásticos diferentes, o copolímero ABS foi utilizado para a fabricação da região superior do dispositivo que contém o microcanal, enquanto que a região dos eletrodos foi fabricada utilizando o termoplástico PLA dopado com nanopartículas de carbono. Gotículas de água e óleo foram geradas e seu tamanho foi monitorado por C⁴D em tempo real. Os tamanhos das gotículas encontrados variaram entre 3,6 a 2,4 mm e foram estimados com base no tempo de residência (Rt) dentro da célula de detecção associados com a velocidade de fluxo (DUARTE et al., 2017). Outros trabalhos recentemente reportados destacam a fabricação de microdispositivos por meio da impressão 3D. Dentre eles, o trabalho de Kitson *et al.* relata a fabricação de um dispositivo microfluídico capaz de promover reações químicas que está exemplificado na Figura 1.2A (KITSON et al., 2012, 2014). Bressan e colaboradores descreveram a síntese nanopartículas de prata e ouro utilizando um dispositivo impresso tridimensionalmente (Figura 1.2B) por meio da tecnologia FDM (BRESSAN et al., 2019). Utilizando o mesmo método de impressão Jing Nie *et al.* desenvolveram

um dispositivo modular microfluídico utilizado para degradação de matrizes de suporte para reparação óssea (*stents*), bem como a realização de cultura de células (NIE et al., 2018). Os módulos foram construídos contendo canais de 493 μm (Figura 1.2B). Os diversos módulos microfluídicos são de fácil montagem e permitem que diversas funções sejam alcançadas sem duplicar o processo de fabricação, além disso um único modulo pode ser retirado para realização de testes posteriores.

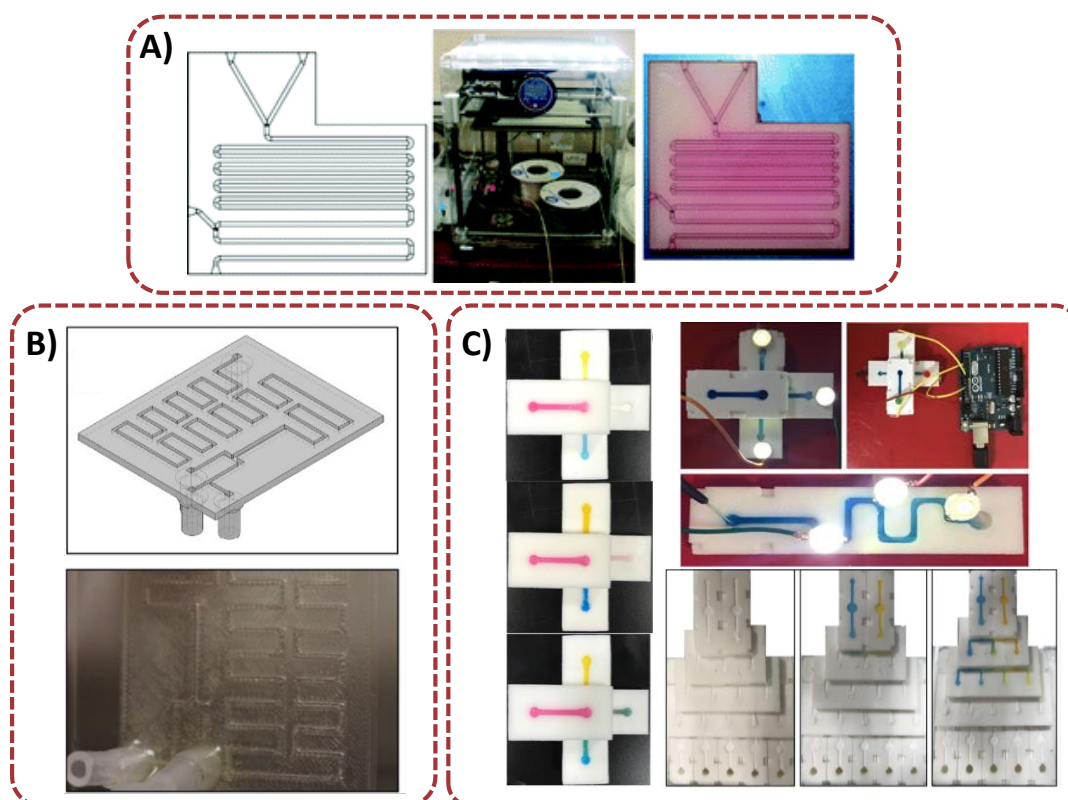


Figura 1.2 Exemplos selecionados de dispositivos microfluídicos impressos tridimensionalmente com a tecnologia FDM. (A) Um reator microfluídico. Figura modificada da referência (KITSON et al., 2012). (B) Um dispositivo utilizado para a síntese de nanopartículas de prata e ouro. Figura modificada da referência (BRESSAN et al., 2019) (C) Um sistema microfluídico modular utilizado para degradação de *stents* e cultura células. Figura modificada da referência (NIE et al., 2018).

Além dos dispositivos microfluídicos, a impressão 3D vem sendo explorada de forma destacada no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Filamentos condutores obtidos através da incorporação de metais ou alótropos de carbono na matriz polimérica (ABS ou PLA) vem sendo desenvolvidos para serem empregados

na fabricação de sensores eletroquímicos através do método de impressão FDM (CARDOSO et al., 2020a; MUÑOZ; PUMERA, 2020; O'NEIL, 2020). Rocha *et al.* desenvolveram um filamento condutor composto de micropartículas de Ni(OH)₂, grafeno e ácido polilático (Ni/G/PLA)(ROCHA et al., 2020b). O filamento proposto foi utilizado para a fabricação de um sensor eletroquímico aplicado para detecção seletiva de glicose. O eletrodo descartável de Ni/G/PLA alcançou um limite de detecção de 2,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a detecção de glicose sem a necessidade do uso de enzimas. No entanto, de uma forma geral, os eletrodos impressos com filamentos termoplásticos condutores necessitam de etapas de tratamento de superfície para melhorar seu desempenho eletroquímico. NASIR *et al.* descreveram a combinação de um pré-tratamento químico utilizando N, N-dimetilformamida (DMF) e eletroquímico aplicando um potencial constante de 2,5 V por 250 s para aumentar a sensibilidade de um eletrodo de grafeno/PLA (ZAFIR MOHAMAD NASIR et al., 2020). Após o tratamento o eletrodo proposto foi empregado para detecção da micotoxina zearalenona em alimentos obtendo um limite de detecção de 0,340 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Silva e colaboradores relataram uma nova abordagem de tratamento químico de eletrodos impressos envolvendo os reagentes DMF/HNO₃/NaBH₄ sequenciais para gerar óxido de grafeno reduzido (rGO) em uma matriz polimérica de PLA (SILVA et al., 2020). O eletrodo rGO-PLA foi aplicado para a determinação de serotonina em urina sintética e catecol em amostras de água natural alcançando limites de detecção de 0,032 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Neste sentido, a presente tese visa apresentar a versatilidade da tecnologia de impressão 3D FDM aplicando esta técnica para a construção de estruturas miniaturizadas empregadas em diferentes áreas da química analítica. No capítulo 2

será apresentado o desenvolvimento de uma nova metodologia de contagem de bactérias utilizando um dispositivo microfluídico de geração de gotas e a detecção condutométrica sem contato C⁴D. No capítulo 3 será abordado a construção de um misturador miniaturizado para monitoramento online de reações químicas por espectrometria de massas. No capítulo 4 será abordado o uso de uma impressora 3D multimaterial para desenvolvimento de uma célula eletroquímica totalmente construída por impressão 3D para análises de hormônios.

1.2. Objetivos

1.2.1. Geral

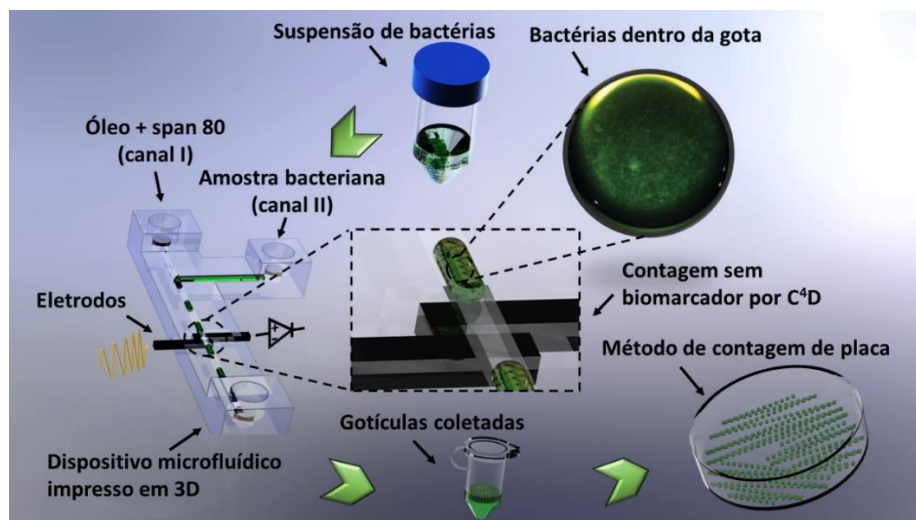
Explorar a versatilidade da tecnologia de impressão 3D para o desenvolvimento de dispositivos analíticos impressos para serem empregados em diferentes vertentes da química bioanalítica incluindo a contagem bacteriana por detecção condutométrica sem contato, desenvolvimento de um reator para monitoramento online de reações químicas por espectrometria de massas, bem como a fabricação de uma célula eletroquímica contendo eletrodos integrados para a detecção de hormônios.

1.2.2. Específicos

- ✓ Desenvolver uma metodologia de contagem celular por meio do C⁴D utilizando microdispositivo impresso.
- ✓ Construir um microdispositivo para promover e monitorar em tempo real reações orgânicas no interior de microcanais por espectrometria de massas.
- ✓ Avaliar o desempenho analítico de uma célula eletroquímica produzida integralmente por impressão 3D para análises de hormônios.

Capítulo 2

Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos *via* impressão 3D para contagem de bactérias em gotículas



2.1. Introdução

Nos últimos anos, vários avanços relacionados ao estudo de determinação populacional de células explorando plataformas microfluídicas têm sido reportados. Convencionalmente, a determinação de populações celulares requer uma quantidade relativamente grande de amostra (200 μ L a 10 mL), são demoradas, minimamente automatizadas e necessitam de reagentes caros (CLAUSELL-TORMOS et al., 2008; HUANG et al., 2015). A abordagem mais utilizada para determinação populacional de microrganismos é a contagem em placas pois ela pode ser aplicada tanto para a contagem de grandes grupos microbianos como também para a contagem de gêneros específicos. Esta tecnologia consiste no plaqueamento de alíquotas da amostra bacteriana em meio de cultura sólido. As placas são incubadas a uma condição de tempo e temperatura adequada para o microrganismo a ser determinado, os microrganismos se multiplicam formando colônias visíveis que podem ser contadas manualmente ou com o auxílio de leitores automatizados (BROWN, 2005; BRUGGER et al., 2012; FROEDER ARCURI et al., 2008). Embora seja comumente explorada e acessível o método de contagem em placas apresenta alguns desafios que incluem a necessidade de grandes quantidades de placas de Petri que precisam ser plaqueadas manualmente, alto volume de reagentes, além de análises laboriosas, uma vez que cada placa de Petri deve ser analisada separadamente.

As bactérias também podem ser contadas de forma precisa e automatizada utilizando um citômetro de fluxo. No entanto, a principal desvantagem dessa tecnologia está no elevado custo do equipamento. Neste sentido, os dispositivos microfluídicos representam uma alternativa promissora, uma vez que podem solucionar as limitações das técnicas mencionadas. Particularmente, a microfluídica

baseada em gotículas tem demonstrado novas possibilidades experimentais para análises microbiológicas, como por exemplo a detecção e identificação de patógenos, teste de suscetibilidade a antibióticos e estudos de fisiologia e interações microbianas (BJORK et al., 2015; BOEDICKER et al., 2008; CHURSKI et al., 2012; HUANG et al., 2015; KAMINSKI; SCHELER; GARSTECKI, 2016; KANG et al., 2014). A geração de gotículas é baseada no fluxo de uma emulsão de água e óleo, desse modo o meio de cultura das células atua como fase aquosa. Isso significa que cada gotícula funciona como um biorreator miniaturizado, uma vez que é possível promover a cultura e a quantificação de microrganismos. As gotículas são geralmente detectadas por meio de detectores ópticos incluindo a fluorescência induzida por laser, a absorção na região do UV-visível, a espectroscopia Raman, e a espectroscopia de infravermelho (CECCHINI et al., 2011; CHAN et al., 2011; LI et al., 2007; SRISA-ART; DEMELLO; EDEL, 2007). A maioria dos estudos focados em detecção de gotículas exploram o uso de microscópios ópticos acoplados a câmeras de alta resolução, os quais permitem detectar gotículas produzidas em alta frequência (kHz), porém a instrumentação é dispendiosa e requer usuários treinados para operação técnica.

Neste sentido, este capítulo descreve o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico impresso em 3D com sensores integrados para monitorar em tempo real a quantidade de células em gotículas por meio do C⁴D. A *E. Coli* K12 foi utilizada como modelo de microrganismo para a metodologia proposta. O sistema de detecção C⁴D foi explorado para analisar o comportamento da resposta de condutância na presença de diferentes números de células dentro das gotículas. A abordagem proposta foi comparada com ao método de referência e padrão, que é baseado na diluição e na contagem de placas aliada à distribuição estatística para estimar o número de células dentro de cada gota. A instrumentação necessária é relativamente simples, barata e

portátil. É importante observar que essa técnica foi recentemente relatada para monitorar o tamanho das gotículas geradas em um sistema bifásico nos canais microfluídicos 3D (DUARTE et al., 2017). Portanto, esta ferramenta de detecção abre novas possibilidades para uso em análises microbiológicas baseadas em gotículas de maneira precisa, rápida e de baixo custo.

2.2. Objetivos

2.2.1. Geral

O presente capítulo visa o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico contendo sensores integrados impressos em 3D utilizando detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C⁴D) para contagem de células de *Escherichia coli* no interior de gotículas.

2.2.2. Específicos

- ✓ Explorar o uso de um dispositivo microfluídico no formato junção em T com sensores integrados de baixo custo, fabricado por uma impressora 3D com tecnologia FDM para geração de gotículas.
- ✓ Avaliar o meio de cultura adequado para determinação populacional de *E. coli* dentro do sistema microfluídico com detecção condutométrica sem contato.
- ✓ Avaliar o comportamento do sinal de condutividade gerado do sistema C⁴D na presença de diferentes quantidades de células dentro das gotículas.
- ✓ Avaliar o método proposto com a metodologia padrão de contagem em placas.

-
- ✓ Estimar a quantidade de células em cada gota pelo sistema C⁴D com o auxílio de distribuição estatística.

2.3. Materiais e métodos

2.3.1. Materiais e reagentes

Triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio, manitol e Span® 80 foram adquiridos da Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, EUA), enquanto o óleo mineral foi fornecido pela Farmax (Divinópolis, MG, Brasil). Os filamentos de acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) (diâmetro de 1,75 mm) e poli(ácido lático) (PLA) dopados com nanotubos de carbono (CNTs) (diâmetro de 1,75 mm e resistividade de 0,75 Ω cm) foram recebidos da Movtech Commercial Technology LTDA (São Bernardo do Campo, SP, Brasil) e Functionalize Inc. (Seattle, Washington, EUA), respectivamente. Todos os reagentes químicos foram utilizados como recebidos, sem tratamento adicional.

2.3.2. Preparação do meio de cultura

O meio de cultura Luria Bertani (LB) foi preparado contendo 10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 0,085 mol L⁻¹ de cloreto de sódio. Um meio de cultura com baixa condutividade baseado no meio LB também foi utilizado para avaliar o efeito da condutividade no sistema C⁴D. Este meio denominado *half*-Luria Bertani (HLB) foi preparado com todos os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano (5 g L⁻¹ de triptona, 2,5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 0,17 mol L⁻¹ de manitol). As medidas de condutividade de LB e HLB foram descritas anteriormente apresentando valores de 9,6 e 1,1 mS cm⁻¹, respectivamente (MORTARI; ADAMI;

LORENZELLI, 2015). Todos os meios de cultura foram previamente esterilizados em autoclave a 120 °C durante 30 min.

2.3.3. Cultura bacteriana e preparação de amostras

A *Escherichia coli* K12 foi gentilmente fornecida pelo Dr. S. Ruzal (Universidade de Buenos Aires, Argentina). Os microrganismos foram mantidos em placas de Petri (4 °C) contendo ágar nutriente e replicados a cada 15 dias. Para iniciar experimentos, a bactéria *E. coli* K12 foi inoculada (duas ou três colônias) em caldo triptona soja estéril (23 g L⁻¹, Laboratorios Britania SA, Buenos Aires, Argentina) e foi cultivada aerobicamente em um agitador orbital a 32 °C. O crescimento celular foi monitorado a 600 nm (DO₆₀₀) usando um espectrofotômetro (Persee, espectrômetro UV/VIS T7, CA, EUA). As unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) foram avaliadas por diluição em placas em meio de ágar LB, e as colônias foram contadas após 24 h de crescimento a 32 °C. Para a colheita da biomassa microbiana, as culturas foram cultivadas até a fase exponencial inicial (DO₆₀₀ = 1,0 ± 0,2, o que corresponde a 2,0 × 10⁸ UFC mL⁻¹). As células de *E. coli* K12 de foram então colhidas por centrifugação com uma microcentrífuga (Cavour VT-1216, Buenos Aires, Argentina) por 30 s a 14.000 g, e o sedimento foi lavado com solução salina estéril (8 g L⁻¹ NaCl). Após uma segunda centrifugação, o sedimento foi suspenso em meio de cultura (LB ou HLB) e foram feitas diluições em série para a preparação da amostra.

2.3.4. Fabricação de dispositivos microfluídicos

Os dispositivos microfluídicos com eletrodos integrados foram fabricados usando uma impressora 3D auto-replicável modelo Prusa Movtech adquirida da empresa Movtech Comercial Tecnologia LTDA-ME (São Bernardo do Campo,

Brasil). Esta impressora de *hardware* livre é constituída com a tecnologia de modelagem por fusão e deposição (*fused deposition modeling*, FDM), baseada no modelo RepRap, e possui uma área de trabalho de 195 mm × 195 mm × 110 mm. Para a impressão do dispositivo microfluídico foi feito, primeiramente, a criação do modelo tridimensional da plataforma microfluídica desejada por meio do sistema CAD utilizando o *software* gráfico AutoCAD® 2014 Free Student (Autodesk Inc., San Rafael, USA). Um arquivo com a extensão STL (*Stereolithography*) é gerado contendo uma superfície de malhas triangulares no formato do modelo tridimensional. Em seguida, o arquivo STL foi aberto em um *software* CAM (*Computer Aided Manufacturing*) gratuito, Cura 15.02.1 (Ultimaker, Geldermalsen, Netherlands) configurado para o modelo da impressora. Este *software* calcula os movimentos da impressora baseado na geometria do modelo STL gerado, e prepara o objeto para impressão determinando o posicionamento do objeto, a quantidade e a altura das camadas a serem impressas. Parâmetros como a velocidade de impressão, densidade da peça impressa, temperatura do bico de extrusão e da plataforma de impressão também são definidos no *software* CAM. O dispositivo foi então impresso pelo método de Modelagem por Fusão e Deposição (*Fused Deposition Modelling*, FDM). A impressão dos dispositivos foi realizada utilizando dois filamentos termoplásticos diferentes. O copolímero ABS foi utilizado como substrato para fabricação da região superior do dispositivo que contém o microcanal. A região dos eletrodos foi fabricada utilizando o termoplástico PLA dopado com nanopartículas de carbono, a qual agrega característica condutora ao polímero.

O dispositivo impresso em 3D consiste de dois canais microfluídicos dispostos na configuração junção em T (*T-junction*). O canal I medindo 50,0 mm de comprimento, 0,75 mm de largura e 0,7 mm altura, foi utilizado para a injeção da fase

contínua e o canal II com 15,0 mm de comprimento, 0,75 mm de largura e 0,7 mm altura foi utilizado para injeção da fase dispersa. A cela de detecção é composta de dois eletrodos na disposição antiparalela. Cada eletrodo foi impresso com 10,0 mm de comprimento, 1,5 mm de largura, 2,0 mm de espessura e posicionados com 0,5 mm entre eles. Os reservatórios foram construídos com um diâmetro de 3,0 mm e 2,0 mm de altura, sendo que logo acima há um encaixe com diâmetro e altura maiores (5,5 mm x 4,0 mm) para acoplamento de tubos de silicone que permitem a combinação com a bomba seringa. Os microdispositivos impressos com eletrodos integrados são apresentados na Figura 2.1.

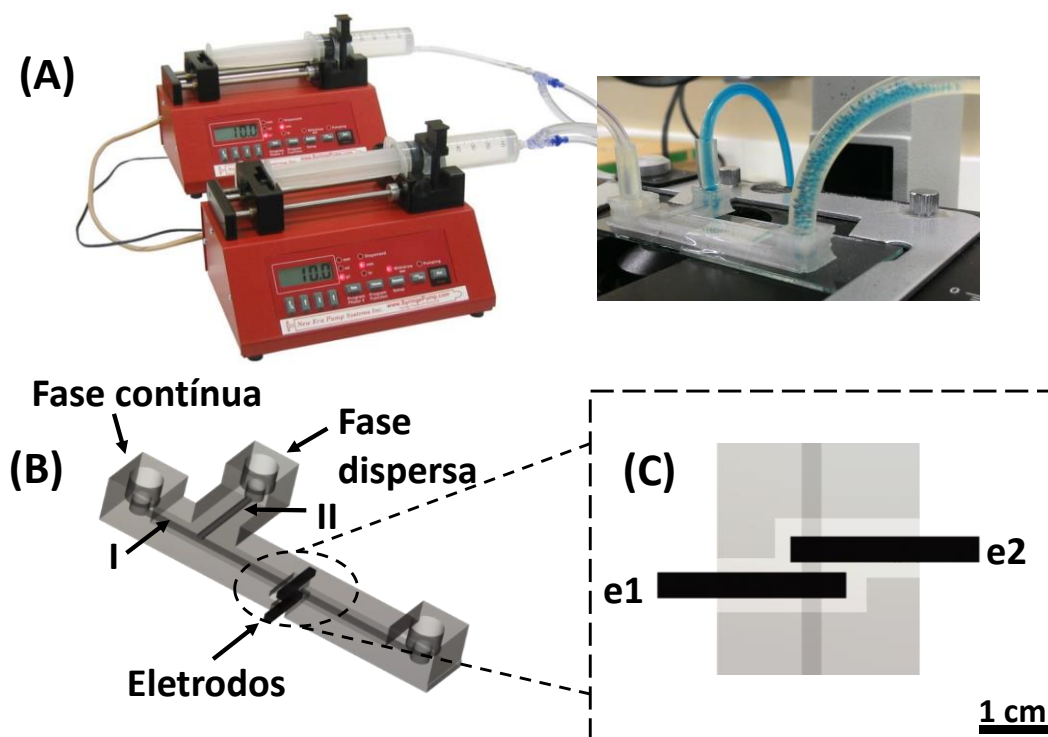


Figura 2.1. Representação do sistema de bombas seringa e microdispositivo utilizado para geração e detecção de gotículas contendo a bactéria *E. coli* K12 (A). Os canais foram fabricados na configuração junção em T para injeção da fase contínua e fase dispersa mostrados em (B). Os eletrodos para detecção eletroquímica foram impressos sob o microcanal na configuração antiparalela apresentados em (C).

2.3.5. Geração de gotículas

Para a geração de gotículas, uma mistura de óleo e o tensoativo 1% Span® 80 foi bombeada como fase contínua no canal I, enquanto que a amostra bacteriana (*E. coli* K12) foi bombeada como uma fase dispersa no canal II (ver Figura 2.1). Ambas as fases foram introduzidas simultaneamente nos canais microfluídicos usando duas bombas de seringa (NE-300, New Era Pump Systems) conectadas ao dispositivo impresso em 3D através de tubos de silicone ($d_i = 0,8$ mm e $d_e = 4,0$ mm). As vazões foram fixadas em $5 \mu\text{L min}^{-1}$ para a fase dispersa e $60 \mu\text{L min}^{-1}$ para a fase contínua.

2.3.6. Estimativa de bactérias em gotículas por distribuição de Poisson

A distribuição de Poisson foi usada para estimar o número de células por gotícula, incluindo a probabilidade associada. A probabilidade de Poisson foi calculada com a seguinte equação:

$$p(\lambda, n) = \frac{\lambda^n e^{-\lambda}}{n!} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

onde λ é o número médio de células por gota, n é o número de células em uma gota e p é a probabilidade de obter n número de células em uma gota. O parâmetro λ é definido pela razão entre a fração volumétrica de células na solução de entrada (ϕ_s) e uma gota contendo uma célula, como:

$$\phi_d = \frac{V_c}{V_d} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

onde V_c e V_d são os volumes da célula e da gotícula, respectivamente. Assim, λ pode ser expresso como (CLAUSELL-TORMOS et al., 2008; COLLINS et al., 2015; KÖSTER et al., 2008):

$$\lambda = \frac{\phi_s}{\phi_d} \quad (\text{Eq. 2.3})$$

A relação entre o número médio de células em uma gota (λ) e o número de células injetadas foi corroborada com o método empírico (determinação da UFC por contagem de placas).

2.3.7. Detecção de bactérias dentro de gotículas com C⁴D

As bactérias contidas nas gotículas foram detectadas usando um sistema *homemade* de C⁴D, desenvolvido de acordo com a eletrônica proposta por da Silva *et al.* (FRACASSI DA SILVA; GUZMAN; DO LAGO, 2002). Todos os experimentos foram realizados aplicando uma onda senoidal de 500 kHz de frequência e amplitude de 1 V_{pp} ao eletrodo de excitação por meio de um gerador de função modelo GV-2002 (ICEL, Manaus, Brasil). A corrente resultante foi registrada no eletrodo receptor. Em seguida, o sinal foi amplificado, retificado, convertido em tensão, enviado para uma interface analógica/digital (National Instruments, NI USB-6009) e monitorado pelo *software* escrito em LabVIEWTM com uma resolução de aquisição de dados de 1 ms.

2.3.8. Simulação computacional

A simulação computacional foi realizada para representar as alterações de condutividade relacionadas com o número de bactérias presentes na gota registradas

com o dispositivo impresso em 3D contendo eletrodos integrados. A simulação foi realizada utilizando o software COMSOL Multiphysics (COMSOL Inc., Estocolmo, Suécia), com base em equações diferenciais parciais com o método dos elementos finitos para calcular a distribuição da densidade da corrente elétrica em microestruturas.

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Estudos de condutividade dos meios de cultura utilizando C⁴D

Como é bem sabido, a resposta do sistema C⁴D depende das diferenças de condutividade entre o eletrólito e o analito de interesse (COLTRO et al., 2012). Este princípio operacional também é esperado para a contagem da população bacteriana dentro das gotículas. Portanto, a intensidade do sinal registrada para diferentes meios de cultura foi avaliada com o objetivo de selecionar o meio que proporciona o maior deslocamento do sinal de condutividade, considerando o tempo de permanência das gotículas na cela de detecção. Gotas de água ultrapura e dos meios de cultura HLB e LB foram geradas dentro dos canais microfluídicos, conforme descrito na seção 3.5 de materiais e métodos. A resposta do detector C⁴D foi registrada utilizando água, HLB e LB como fase dispersa, mantendo sua vazão em 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ e variando a vazão da fase contínua (óleo + Span[®] 80) de 10 a 60 $\mu\text{L min}^{-1}$. Como pode ser visto na Figura 2.2 o aumento da vazão da fase contínua promoveu uma diminuição na magnitude do sinal do C⁴D. O decaimento do sinal ocorre principalmente por duas razões: em vazões mais altas, o tempo de permanência da gota na cela de detecção se torna menor e o comprimento da gota tende a diminuir, deixando o formato cilíndrico da gota mais próximo de uma forma esférica (GARSTECKI et al., 2006).

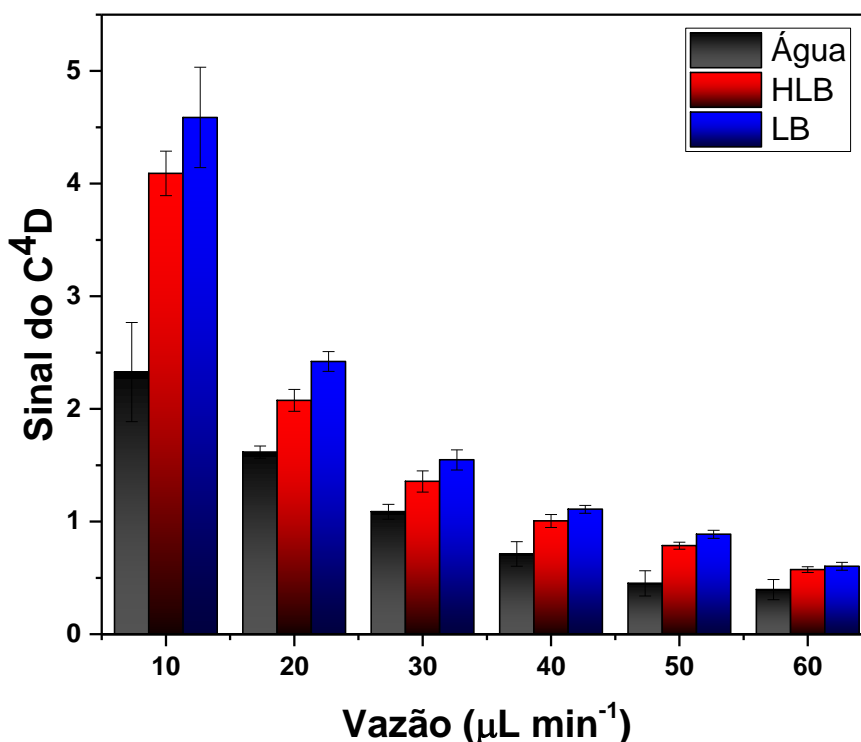


Figura 2.2. Efeito do meio de cultura e vazão na resposta C⁴D. As gotas foram geradas utilizando água (■) e os meios de cultura HLB (■) e LB (■). A intensidade de pico obtida pela resposta do sistema C⁴D de cada solução foi monitorada mantendo constante a vazão da fase dispersa a 5 µL min⁻¹ e variando a vazão da fase contínua de 10 a 60 µL min⁻¹.

Os menores valores de intensidade de sinal observados nas medidas de C⁴D foram obtidos para gotículas de água seguidas por HLB e LB, respectivamente. Este perfil reflete o fato de que a água apresenta condutividade menor que os meios de cultura HLB e LB. Os analitos como as células *E. coli* K12 atuam como isolantes que podem ser detectados por C⁴D com maior relação sinal/ruído quando cultivados em um meio de cultura de alta condutividade (GAWAD et al., 2004; MCGRATH et al., 2017). Por esta razão, o meio LB foi selecionado para realização dos experimentos relacionadas ao monitoramento de gotículas contendo células de *E. coli*. Além disso, foram utilizadas vazões de 60 µL min⁻¹ na fase contínua, uma vez que esta vazão gera gotículas com formato esférico, simplificando os cálculos subsequentes.

2.4.2. Detecção de bactérias dentro de uma gota

Para quantificação do número de células dentro de cada gota com base nas medições de C⁴D foram geradas gotas utilizando vazões constantes de 60 e 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ para as fases contínua e dispersa, respectivamente. As imagens ópticas das gotículas geradas foram capturadas e sua forma e tamanho foram analisados com microscópio óptico e *software* ImageJ, respectivamente. As imagens obtidas revelaram que o diâmetro médio de cada gota era de $321 \pm 9 \mu\text{m}$ ($n = 10$). Considerando uma forma esférica perfeita, o volume de gotículas foi estimado em $17,3 \pm 0,5 \text{ nL}$. A Figura 2.3 apresenta os procedimentos realizados para a detecção de bactérias dentro da gota. O número de células por gotícula foi monitorado através da injeção de soluções de *E. coli K12* preparadas em caldo de cultura estéril de LB com concentrações variando de 1×10^5 a $1 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$, o que equivale à faixa entre 1,73 e 1730 UFC gotícula⁻¹, respectivamente. As gotículas geradas foram coletadas e mantidas em um tubo Eppendorf por 15 minutos para serem separadas da fase oleosa. Em seguida, as bactérias foram coletadas da fase aquosa usando uma micropipeta de 10 μL . Posteriormente, foram feitas diluições seriadas e alíquotas (10 μL) foram espalhadas em placas de ágar nutriente, com o objetivo de contar bactérias. Após 24 h a 30 °C, quantificou-se o número de colônias de bactérias nas placas de ágar e calculou-se o número de células por gotícula (em UFC mL⁻¹).

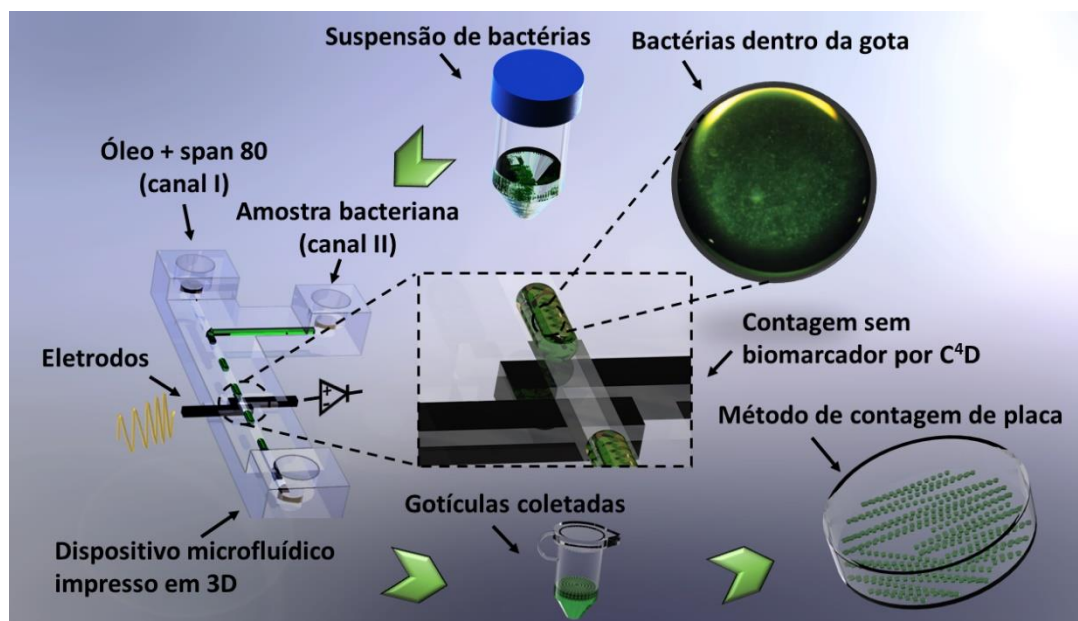


Figura 2.3. Representação esquemática mostrando os procedimentos para detectar a bactéria *E. coli K12* por medições de C⁴D e contagem de placas. As bactérias retidas nas gotículas geradas no microcanal são detectadas usando sensores integrados ao dispositivo microfluídico. Em seguida, as gotículas que contêm bactérias são coletadas e determinadas pelo método convencional de contagem de placas para servir como referência e comparação com a abordagem C⁴D proposta.

A probabilidade de obter n células e o número médio de células dentro de uma gota são apresentados nas Figura 2.4A e 2. 4B, respectivamente. Quando a solução bacteriana na concentração de 1×10^5 UFC mL⁻¹ foi introduzida no canal microfluídico, o número médio de células por gotícula (λ) obtida foi de 1,73, sendo que a probabilidade de obter gotículas vazias foi em torno de 20% e as chances de ter uma única célula dentro da gotícula foi próxima de 25%. Aumentando o número de células injetadas, a probabilidade de obter uma gota vazia diminui e o valor de λ aumenta. Por exemplo, quando foram introduzidas soluções contendo 1×10^6 UFC mL⁻¹ de bactérias, o valor de λ era 17,3 e quase não havia probabilidade de obter gotículas vazias. O número de células por gotícula quantificado com o método de contagem de placas revelou uma boa concordância com a distribuição de Poisson para concentrações de 1×10^6 a 1×10^8 UFC mL⁻¹, como pode ser visto na Figura 2.4B. Para soluções contendo

entre 1×10^5 e 5×10^5 UFC mL^{-1} não foi possível realizar as medidas de detecção por meio do sistema C⁴D.

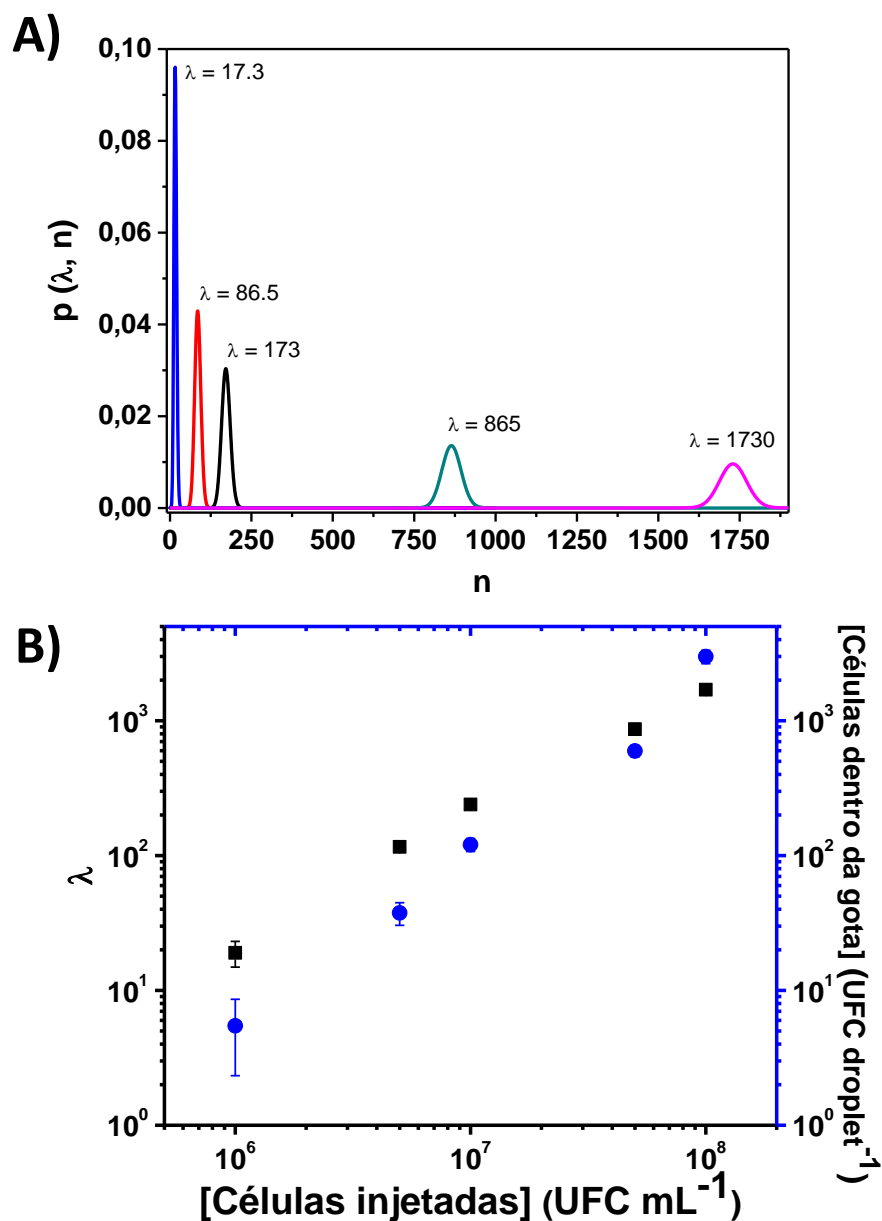


Figura 2.4. Distribuição de Poisson e o método de contagem de placas para estimar o número de células dentro de uma gota. O gráfico (A) mostra a relação entre a probabilidade (p) e o número de células dentro de uma gota (n) calculada para os valores λ de 17,3, 86,5, 173, 865 e 1730, correspondentes a concentrações celulares iguais a 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 e 1×10^8 UFC mL^{-1} , respectivamente. O gráfico (B) indica em (\blacksquare) o número médio de células dentro de uma gota (λ), em (\bullet) a quantidade de células em uma gota determinada pelo método de contagem de placas ambas em relação com as concentrações de células injetadas.

2.4.3. Determinação de bactérias no interior das gotículas por C⁴D

A sensibilidade do sistema C⁴D é significativamente influenciada pela frequência operacional e amplitude da tensão de excitação do sinal senoidal aplicado. De acordo com resultados de um estudo descrito anteriormente, a melhor relação sinal/ruído foi observada aplicando uma onda senoidal de 500 kHz com tensão de excitação de 1 V_{pp} (DUARTE et al., 2017). Estes parâmetros foram mantidos constantes para as experiências subsequentes. Em seguida, a amostra bacteriana preparada em diferentes densidades variando de 5×10⁶ a 1×10⁹ UFC mL⁻¹ (gota de 86,5 a 17300 UFC gotícula⁻¹) foi introduzida no canal II, confinada em gotas e monitorada por medidas de C⁴D. As vazões para as fases dispersam e contínua foram mantidas constantes a 5 e 60 µL min⁻¹, respectivamente. A Figura 2.5 apresenta a resposta do sinal C⁴D para diferentes concentrações da amostra bacteriana. Como pode ser visto, 10 gotículas foram geradas e detectadas dentro de 30 s. Este valor demonstra que a abordagem proposta oferece uma frequência analítica capaz de gerar, aproximadamente, 1200 gotas por hora. A frequência observada é bastante semelhante à nossa abordagem anterior (DUARTE et al., 2017; DUARTE; COLTRO, 2016).

Além disso, o aumento da densidade bacteriana promove uma diminuição na intensidade do pico registrado. Esses resultados estão de acordo com o modelo de circuito equivalente proposto por Foster e Schwan (FOSTER; SCHWAN, 1989), que também foi usado por outros autores para interpretar medidas de impedância de uma única célula com boa concordância (GAWAD; SCHILD; RENAUD, 2001; GAWAD et al., 2004; MORGAN et al., 2007). Esses fenômenos ocorrem principalmente porque a membrana celular é um isolante elétrico, sendo pouco condutivo abaixo das frequências de 1 MHz (MCGRATH et al., 2017; SPENCER; HOLLIS; MORGAN,

2014). O modelo elétrico bacteriano na frequência de operação de 500 kHz é equivalente ao chamado modelo de casco simples (SUKHORUKOV et al., 2001), conhecido como o modelo elétrico mais simples que descreve as propriedades das células biológicas. Nesse modelo, uma célula é considerada uma esfera condutora (citoplasma) arredondada por uma camada isolante que corresponde à membrana plasmática. A condutividade elétrica de *E. coli* K12 foi estudada previamente, obtendo-se valores de 4,4 e 0,025 mS cm⁻¹ para citoplasma e membrana plasmática, respectivamente (HÖLZEL, 1999). As células são representadas por um elemento isolante, principalmente devido à presença da membrana celular lipídica. Isso significa que a condutividade das gotículas diminui enquanto a concentração das células das gotículas aumenta, como mostrado na Figura 2.5. Em frequências mais altas (MHz), as bactérias se tornam cada vez mais condutoras devido ao acoplamento capacitivo através das membranas (MCGRATH et al., 2017).

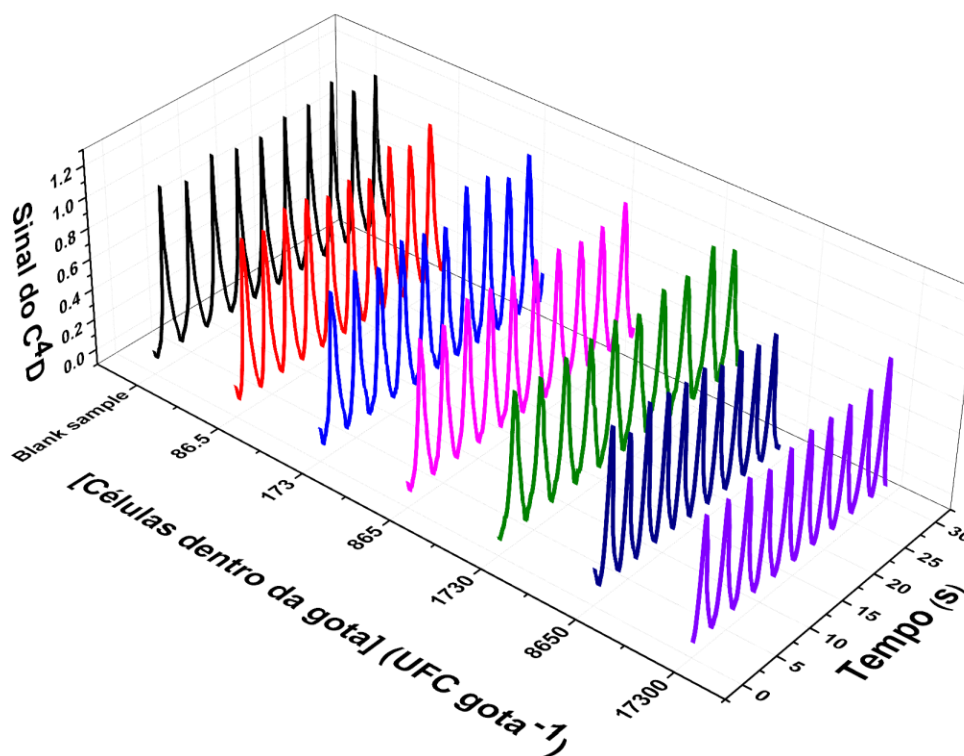


Figura 2.5. Respostas de C^4D para gotículas contendo diferentes concentrações de células de *E. coli* K12 (5×10^6 a 1×10^9 UFC mL^{-1}). Condições de detecção: onda senoidal de 500 kHz com tensão de excitação de $1 V_{pp}$.

Uma simulação computacional foi realizada usando o software COMSOL para demonstrar a variação da densidade de corrente elétrica em relação à condutividade da gota. A Figura 2.6 apresenta a seção transversal do microcanal onde é possível observar o momento em que a gota é posicionada sobre os eletrodos C^4D . É importante destacar que o sinal de saída C^4D está relacionado à corrente elétrica de entrada que flui entre seus eletrodos (COLTRO et al., 2012; KUBA; HAUSER, 2009). A densidade de corrente representa a condutividade da gota, que diminui quando um número elevado de células está presente dentro de uma gota. Comparando gotículas com e sem bactérias, uma densidade de corrente mais alta fluindo entre os eletrodos pode ser vista quando não há células dentro da gotícula. Desta forma, o sinal gravado em função da corrente é inversamente proporcional à concentração bacteriana dentro das gotículas.

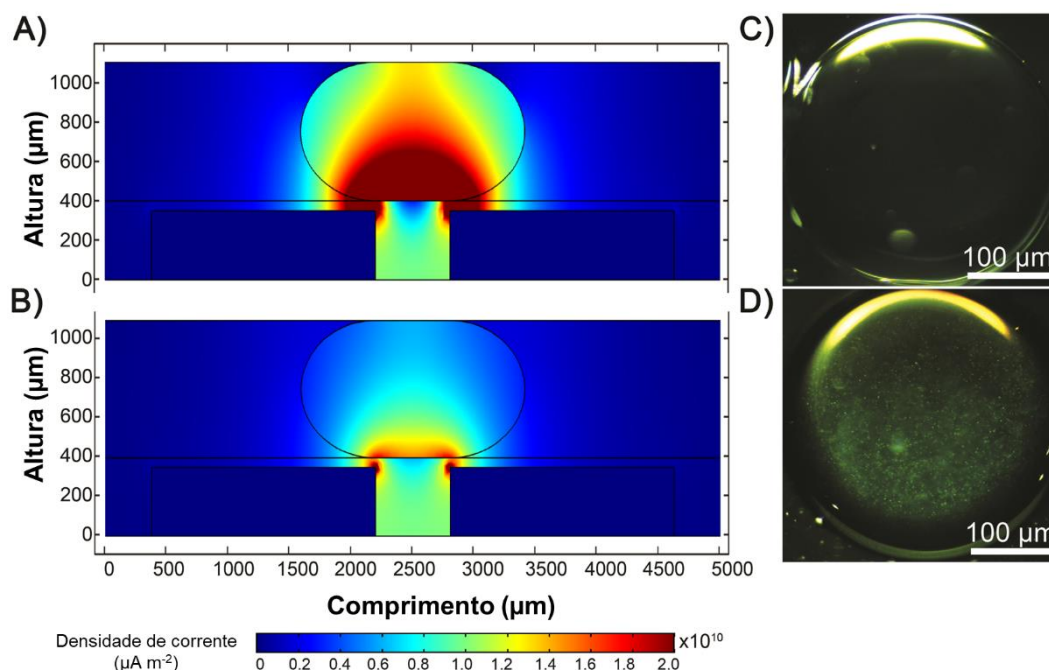


Figura 2.6. Densidade de corrente ($\mu\text{A m}^{-2}$) simulada para gotículas sem (A) e com (B) as bactérias. As imagens (C) e (D) são micrografias de campo escuro das gotículas sem e com bactérias, respectivamente.

2.4.4. Monitoramento de partículas não condutivas e condutivas

Para apoiar melhor esse comportamento visto na Figura 2.6 um experimento análogo foi realizado no dispositivo impresso em 3D, substituindo as células bacterianas por partículas não condutoras e condutoras (partículas de $\text{Co/Nb}_2\text{O}_5$ e carvão ativado, respectivamente). Utilizando aglomerados de $\text{Co/Nb}_2\text{O}_5$ (cerca de 1 μm de diâmetro) como partículas isolantes foram geradas gotículas contendo concentrações entre 0,5 e 5,0 mg mL^{-1} de $\text{Co/Nb}_2\text{O}_5$ e monitoradas pelo sistema C^4D . Os testes revelaram um perfil de resposta semelhante ao encontrado para gotículas contendo células bacterianas, uma vez que houve uma diminuição na intensidade do sinal do C^4D ao passo que se aumenta a concentração de $\text{Co/Nb}_2\text{O}_5$. A variação absoluta do sinal C^4D (considerando o branco) foi de cerca de 74,4 mV para

concentrações de 5 mg mL^{-1} . Os dados foram então normalizados utilizando a Eq. 2.4 e um comportamento diretamente proporcional foi observado para a resposta ΔC^4D em função da concentração de $\text{Co/Nb}_2\text{O}_5$, conforme mostrado na Figura 2.7A. O comportamento observado para as partículas isolantes foi bastante semelhante a proposta apresentada para a contagem de células de *E. coli*, demonstrando evidências de que o mecanismo proposto é válido.

Semelhantemente foram realizadas medidas de C^4D usando partículas de carvão ativado com aglomerados de diâmetro médio de aproximadamente $17 \mu\text{m}$. As gotículas contendo carvão ativado foram analisadas variando a concentração entre $0,5$ e $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Os valores absolutos da resposta C^4D apresentaram um perfil crescente diretamente proporcional à concentração de carvão ativado com variação de 400 mV para concentrações de $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Da mesma forma que os resultados obtidos com as partículas isolantes, os dados obtidos para o carvão ativado também foram tratados com a Eq. 2.4. Como pode ser visto na Figura 2.7B, o aumento na concentração de carvão ativado promoveu uma diminuição na variação de ΔC^4D .

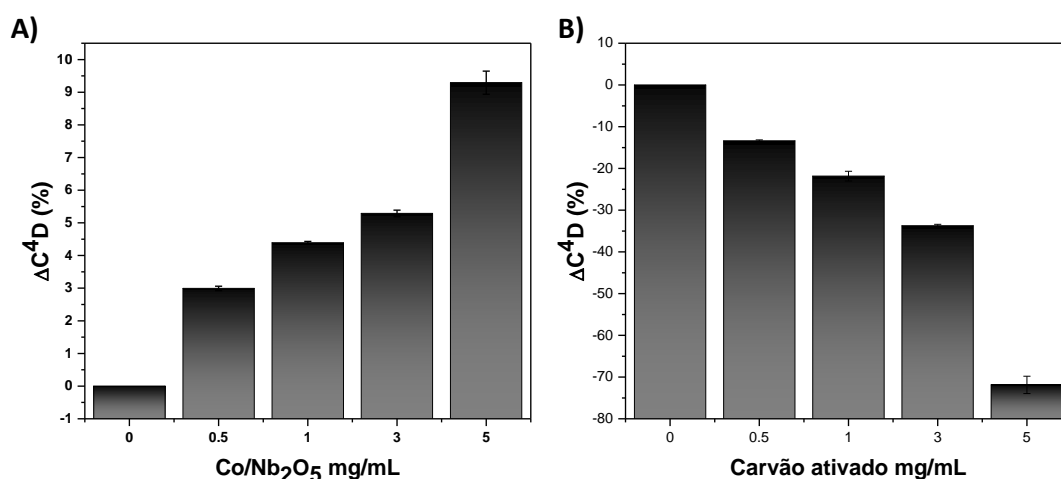


Figura 2.7. Medidas de C^4D para gotículas contendo partículas (A) isolantes de Co/Nb_2O_5 e (B) condutoras de carvão ativado em concentrações que variam de 0,5 a 5,0 $mg\ mL^{-1}$ usando uma mistura de óleo e span 80 como a fase contínua. As fases dispersa e contínua foram bombeadas com vazões mantidas em 5 e 60 $\mu L\ min^{-1}$, respectivamente. As gotas foram monitoradas pelo sistema C^4D aplicando uma onda senoidal de 500 kHz com amplitude de 1 V_{pp} .

2.4.5. Contagem de células dentro das gotículas por C^4D

Tendo isso em vista, a viabilidade analítica do dispositivo proposto foi avaliada analisando a intensidade dos 10 picos obtidos por C^4D após a introdução de células na fase dispersa. Considerando que o sinal C^4D diminui à medida que o número de células em uma gota aumenta, os valores de sinal obtidos foram tratados para obter um perfil diretamente proporcional utilizando a Eq. 2.4:

$$\Delta C^4D = \frac{(C^4D_0 - C^4D_B)}{C^4D_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 2.4})$$

onde C^4D_0 é o sinal obtido para gotículas sem células (branco) e C^4D_B é o sinal obtido em gotículas com amostras contendo células.

Com o objetivo de contar as células de *E. coli* dentro das gotículas, a resposta analítica baseada nas medidas de C^4D foi relacionada com a concentração celular

contida dentro de uma gotícula (UFC gotícula⁻¹). Como pode ser visto na Figura 2.8, o dispositivo microfluídico com detector C⁴D integrado revelou grande potencial para detectar células de *E. coli* K12 em uma faixa linear de 86,5 a 8650 UFC gotículas⁻¹ (5x10⁶ a 5x10⁸ UFC mL⁻¹). A resposta C⁴D exibiu um comportamento linear com coeficiente de determinação linear igual a 0,998. O limite de detecção (LOD) alcançado pelo método de contagem sem marcadores biológicos foi estimado em 63,66 UFC gotícula⁻¹ (3,68 x 10⁶ UFC mL⁻¹) considerando a relação sinal-ruído igual a 3 vezes o valor do desvio padrão registrado para o branco. O LOD alcançado é menor do que outros valores relatados usando técnicas sem biomarcadores. Liu *et al.* encontraram um LOD de 100 células de *E. coli* por gota (3x10⁸ CFU mL⁻¹) usando medidas de dispersão de luz (LIU et al., 2016). Jakiela *et al.* relataram com sucesso um LOD de 14000 células de *E. coli* por gota (1x10⁷ CFU mL⁻¹) através de medidas de turbidez (JAKIELA et al., 2013). Considerando os ótimos níveis de detectabilidade em comparação com os sistemas de detecção tradicionais com biomarcadores, o uso do sistema de detecção condutométrico em dispositivos microfluídicos impressos em 3D surgem como uma plataforma analítica promissora para aplicações envolvendo microbiologia e estudos biotecnológicos.

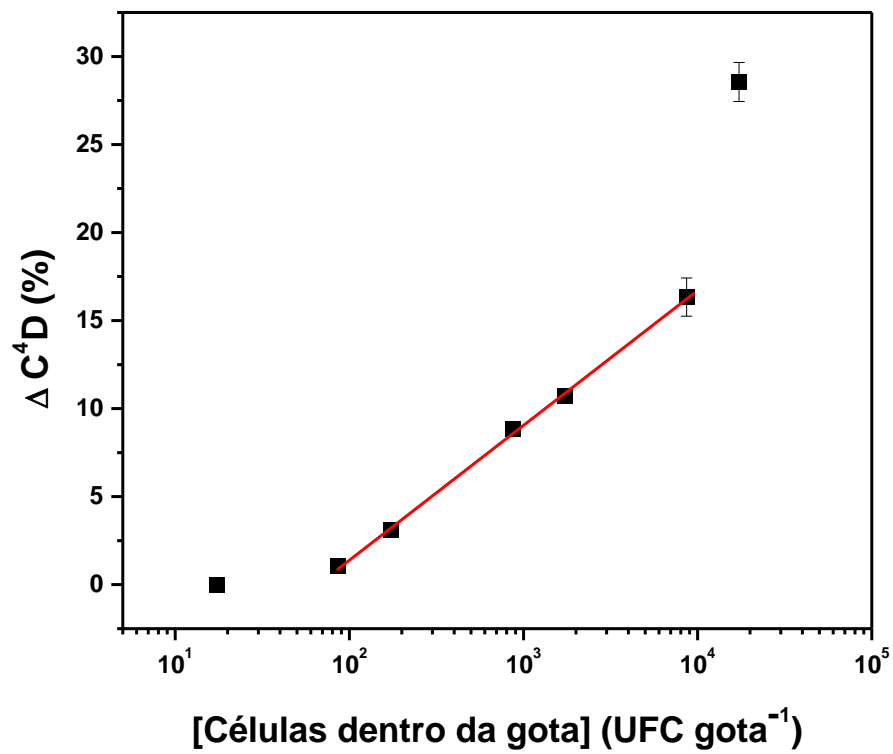


Figura 2.8. Relação entre o sinal C⁴D e o número de células dentro de uma gota. As concentrações foram determinadas pela distribuição de Poisson no eixo inferior e considerando a concentração de células no meio injetado, no eixo superior.

2.5. Conclusões

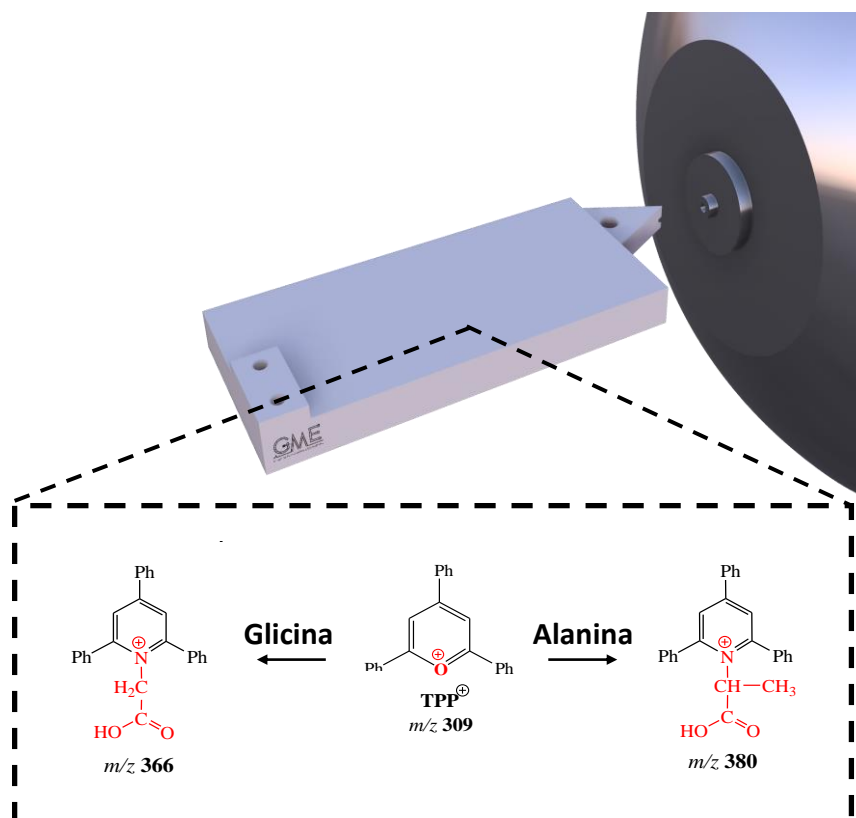
O uso do dispositivo microfluídico com sensores integrados demonstrou excelente capacidade para a detecção de células de *E. coli* dentro de gotículas por meio de medidas de condutividade sem contato. A metodologia proposta permitiu detectar células de *E. coli* na faixa de concentração entre 86,5 e 8650 UFC gotículas⁻¹. As gotículas geradas nos microcanais apresentaram formato aproximadamente esférico com diâmetro e volume médios de $321 \pm 9 \mu\text{m}$ e $17,3 \pm 0,5 \text{ nL}$, respectivamente. O número de células por gota foi estimado através do método de contagem de placas e mostrou boa concordância com a distribuição estatística de Poisson. A prova de conceito foi realizada com um experimento análogo utilizando partículas condutivas e não condutivas, onde foi obtido o perfil semelhante o perfil obtido com a metodologia de contagem de células proposta.

É importante destacar que a metodologia proposta alcançou melhores níveis de detecção quando comparado aos encontrados na literatura utilizando detectores ópticos. O uso do C⁴D integrado em dispositivos microfluídicos impressos em 3D também ofereceu outras vantagens: i) a instrumentação necessária é simples, barata e compatível com a integração em diferentes plataformas, possibilitando o desenvolvimento de sistemas portáteis, ii) o processo de fabricação da plataforma microfluídica com sensores integrados é automatizado e não gera resíduos, pois não se faz uso de reagentes, iii) o método de contagem por C⁴D ocorre em uma única etapa pois descarta a necessidade de adicionar biomarcadores fluorescentes como demanda os protocolos padrão e iv) não há necessidade de etapas de desintegração celular (ou lise) antes da detecção pelo sistema C⁴D. Por fim, o monitoramento em tempo real associado a todas as outras vantagens demonstram que o sistema de contagem proposto

tem grande potencialidade para se tornar uma poderosa ferramenta para aplicações em análises microbiológicas incluindo a discriminação de outros tipos de células.

Capítulo 3

Desenvolvimento de micro-reator tridimensional para monitoramento em tempo real de reações orgânicas por espectrometria de massas



3.1. Introdução

Diante da necessidade de se obter resultados rápidos, alto desempenho analítico e portabilidade a química analítica moderna vem constantemente passando por um processo de miniaturização (CULBERTSON et al., 2014; KOVARIK et al., 2013; PATABADIGE et al., 2016). Adicionalmente, o baixo consumo de amostra é uma outra grande característica da miniaturização dos processos analíticos (JIN; NGUYEN, 2018; KOVARIK et al., 2013; PATABADIGE et al., 2016). O pequeno volume de reagentes necessário, da ordem nano ou microlitros, tem tornado o uso de dispositivos microfluídicos cada vez mais atrativo para estudos de reações químicas (JÄHNISCH et al., 2004). Esta vantagem é importante pois, muitas vezes, os reagentes podem ser tóxicos ou perigosos e minimizar seu uso contribui para química verde e segurança laboratorial (HESSEL; LÖWE; SCHÖNFELD, 2005; ILLG et al., 2011; JÄHNISCH et al., 2004; SINGH et al., 2016). Além disso, os reagentes podem ser caros ou pouco disponíveis comercialmente e seu uso moderado pode ser de grande interesse para grupos de pesquisa com poucos recursos.

Em relação aos reatores convencionais, os reatores miniaturizados ainda se destacam por apresentar um melhor controle de temperatura envolvida no processo reacional, tempos curtos de mistura, bem como a capacidade de acoplamento com diversas técnicas de detecção analítica (HESSEL; LÖWE; SCHÖNFELD, 2005; NGUYEN; WU, 2004). Contudo, não é uma tarefa fácil promover a mistura entre dois fluidos em sistemas miniaturizados. Isso se justifica pelo fato do fluxo gerado no interior dos microcanais ser predominantemente laminar com baixos valores de número de Reynolds ($Re < 100$). Neste caso, a mistura não se mostra eficiente pois o processo ocorre baseado apenas por difusão (LIU; KIM; SUNG, 2004b; YI; BAU,

2003). O processo de difusão molecular pode ser significativamente acelerado promovendo advecção caótica no interior do canal. Construir microestruturas capazes de provocar sucessivas mudanças de direção do fluxo ao longo do canal podem favorecer significativamente a ocorrência de uma mistura caótica efetiva (HESSEL; LÖWE; SCHÖNFELD, 2005; OTTINO et al., 2004).

De forma geral, os micromisturadores são construídos por técnicas convencionais de microfabricação incluindo a fotolitografia (BAEK; SONG, 2011; LIN et al., 2018), a estampagem a quente (BECKER; GÄRTNER, 2001; MCCREEDY, 2000) e a ablação a laser (HAIDER et al., 2018; RIAHI, 2012). Os materiais mais comuns usados pelas metodologias tradicionais de fabricação são o vidro (SARAGIH; KO, 2009; YANG et al., 2013), e diversos materiais poliméricos como o poli(dimetilsiloxano) (PDMS) (CHUNG et al., 2015; DICKEY; ELMORE; JONES, 2000; LEE et al., 2006) e o poli(metacrilato de metila) (PMMA)(MARMIROLI et al., 2009; ZHANG; CHEN, 2019). No entanto, essas técnicas requerem o uso de sala limpa e instrumentação especializada tornando o custo de fabricação elevado. Além disso, os métodos tradicionais consistem em várias etapas de fabricação incluindo procedimentos de gravação dos canais e etapas de selagem. Tendo isso em vista, a impressão 3D vem sendo cada vez mais utilizada para a construção de plataformas microfluídicas (AU et al., 2016; CHEN et al., 2016; HE et al., 2016; WAHEED et al., 2016). Esta técnica se destaca em viabilizar a fabricação de dispositivos miniaturizados com estruturas personalizadas, incluindo geometrias complexas e diversificadas, com alta precisão de fabricação. Esta propriedade facilita a adequação de projetos que envolvem micromisturadores à medida que novos conhecimentos sobre melhorias na taxa de reação são adquiridos. Como mencionado

no capítulo anterior a tecnologia de modelagem por fusão e deposição (FDM) é o método de impressão 3D mais popular atualmente. Os materiais mais comuns utilizados por este método de impressão são ABS, PLA, PETG, poliestireno (PS) e policarbonato (PC), no entanto uma infinidade de polímeros termoplásticos pode ser empregados no processo FDM de acordo com a necessidade do usuário (AU et al., 2016; GROSS et al., 2014; WAHEED et al., 2016). Esta tecnologia permite a fabricação em poucos minutos de forma totalmente automatizada e com custo reduzido.

Recentemente, a versatilidade do uso da impressão 3D para construção de microrreatores foi descrita com o desenvolvimento de dispositivos miniaturizados para monitoramento de reações em fluxo. Os microrreatores foram empregados para sínteses orgânicas, inorgânicas e de nanomateriais demonstrando alta eficiência dos dispositivos impressos (KITSON et al., 2012; SYMES et al., 2012). As reações em fluxo são amplamente exploradas em sistemas de microrreatores devido sua capacidade de favorecer altas taxas de mistura, repetibilidade do sistema de reação e necessidade reduzida de processamento manual (BROWNE et al., 2012). As principais técnicas que possibilitam o controle de reações químicas combinadas com os micromisturadores incluem a espectrometria de massas (BROWNE et al., 2012; FIDALGO et al., 2009; LOTTER et al., 2016; MATHIESON et al., 2013; SCOTTI et al., 2019; ZHU; FANG, 2010), a cromatografia líquida (LOTTER et al., 2016; WELCH et al., 2009), espectroscopia de infravermelho (CHAN; KAZARIAN, 2012; KITSON et al., 2012; MOORE; JENSEN, 2014; RUEPING; BOOTWICHA; SUGIONO, 2012), fluorescência (PABIT; HAGEN, 2002; SHI et al., 2020; SONG; TICE; ISMAGILOV, 2003), Raman (LEUNG et al., 2005; POONOOSAMY et al.,

2020; URAKAWA et al., 2008), a espectroscopia UV-Vis (MONAGHAN et al., 2016; SYMES et al., 2012; YUE et al., 2013). A espectrometria de massas associada com a ionização por *eletrospray* (ESI-MS) é um ótimo recurso analítico para a detecção do produto de reações em fluxo e umas das técnicas de detecção mais utilizadas para acoplamento com microrreatores. De uma forma geral, os reatores microfluídicos impressos em 3D para monitoramento online necessitam de outras plataformas para integração ao espectrômetro de massas. Mathieson e colaboradores desenvolveram um dispositivo impresso em 3D que foi plugado a um espectrômetro de massas por meio de tubos e acessórios de conexões (MATHIESON et al., 2013). Reações de agregados supramoleculares foram realizadas no dispositivo e estudadas por ESI-MS. Scotti *et al.* também utilizaram a impressão 3D para fabricar um reator miniaturizado com um capilar de aço inoxidável e uma barra de agitação magnética integrados para monitoramento online da reação de Diels-Alder por ESI-MS (SCOTTI et al., 2017). O capilar e a barra magnética foram adicionados durante a impressão pausando o processo de fabricação e reiniciando posteriormente. O capilar de nanopulverização permitiu a ionização direta dos analitos para o espectrômetro de massas. No entanto, mesmo utilizando uma proposta de prototipagem de baixo custo como a impressão 3D FDM a inserção do capilar nano-ESI elevou o custo de fabricação estimado em aproximadamente 100 €.

Outros estudos demonstraram que um substrato mais acessível como o papel combinado a peças impressas em 3D também pode ser utilizado no interfaceamento com o espectrômetro de massas. A ionização por spray de papel (PSI) consiste na aplicação de alta tensão em uma ponta de papel contendo solvente e o analito de interesse (SILVA et al., 2019). Com base na técnica PSI, os cartuchos impressos 3D

foram desenvolvidos para tornar a integração com o espectrômetro de massas mais prática e robusta. Salentijn et. al desenvolveram o primeiro cartucho para PS-MS impresso em 3D fabricado utilizando PLA (SALENTIJN; PERMENTIER; VERPOORTE, 2014). Posteriormente, o mesmo grupo relatou um design de cartucho aprimorado com a integração de uma lente de foco metálica e um coletor para liberar o gás da bainha na ponta do papel (SALENTIJN; OLESCHUK; VERPOORTE, 2017). Essas melhorias permitiram melhor focalização e estabilidade média do spray, além de maior sensibilidade para detecção de fármacos. Em um estudo recente nós descrevemos o desenvolvimento de um dispositivo impresso 3D com custo reduzido para aplicações de ionização direta por *spray* em espectrometria de massas (DS-MS) assistida por uma ponta de papel (DUARTE et al., 2016). A ponta de papel foi inserida na extremidade do canal, após a impressão, para facilitar a formação do spray. Cada dispositivo apresentou custo estimado de \$0.05.

Neste sentido, este capítulo apresenta o uso da tecnologia de impressão FDM para a fabricação de um dispositivo para monitoramento de reações em fluxo com ionização direta por espectrometria de massas. O dispositivo foi totalmente fabricado por impressão 3D e o acoplamento foi feito diretamente com o espectrômetro de massas sem auxílio de facilitadores de spray. O desempenho do reator miniaturizado foi avaliado utilizando a síntese de Katritzky e comparado com o método de controle de ESI(+)-MS.

3.2. Objetivos

3.2.1. Geral

Este capítulo tem como objetivo utilizar a tecnologia de impressão 3D para a fabricação de um reator miniaturizado capaz de ser combinado diretamente com o espectrômetro de massas para monitoramento *online* da reação de Katritzky.

3.2.2. Específicos

- ✓ Construir, em uma única etapa, um reator microfluídico para aplicações de ionização direta por *spray* em espectrometria de massas;
- ✓ Otimizar os parâmetros operacionais do reator miniaturizado;
- ✓ Promover a reação de Katritzky no interior dos microdispositivos;
- ✓ Avaliar a taxa de formação do produto formado comparando com a técnica de controle ESI(+)-MS;

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1. Reagentes e preparo de soluções

O metanol de grau HPLC foi adquirido de J. T. Baker (New Jersey, EUA). O ácido acético, tetrafluoroborato de 2,4,6-trifenilpirílio (TPP), glicina, alanina e trietilamina foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

A reação de Katritzky foi realizada com base em um estudo anterior (WALICZEK et al., 2016), com pequenas modificações. Para a análise de monitoramento *online* por MS de ionização direta por *spray* usando micro-reatores 3D foram utilizadas soluções de 1 mg mL⁻¹ de cada reagente TPP, glicina e alanina. A solução TPP foi preparada dissolvendo 10 mg do composto em 10 mL de metanol contendo 3,5 µL de trietilamina. As soluções de glicina e alanina foram preparadas adicionando 10 mg de cada composto em frascos diferentes contendo 10 mL de metanol com 5 µL de ácido acético cada. Para monitoramento offline por análise ESI-MS convencional, as soluções de reagentes foram preparadas conforme descrito acima, mas foram misturadas (TPP e glicina ou TPP e alanina) e mantidas sob agitação durante 0, 10 e 30 min antes da análise de MS.

3.3.2. Fabricação dos dispositivos

Os dispositivos para monitoramento de reação com espectrometria de massas foram construídos utilizando a tecnologia de impressão 3D *fused deposition modeling* (FDM). O design do dispositivo foi modelado em um *software* CAD (AutoCAD® 2016, Autodesk Inc., San Rafael, CA, USA) e impresso utilizando a impressora 3D Original Prusa i3 mk2/S 3D (Prusa Research s.r.o., Prague, Czech Republic). Este

modelo de impressora 3D deposita o material termoplástico aquecido sobre uma plataforma de impressão transformando o design modelado no microdispositivo de reação desejado. O filamento termopolimérico PLA (ácido polilático) adquirido na 3D Fila (Belo Horizonte, MG, Brasil) foi utilizado como substrato para fabricação dos dispositivos microfluídicos impressos. Para promover a reação o dispositivo microfluídico foi impresso contendo um canal constituído de uma sequência de curvas em forma de serpentina 3D. A região de mistura do dispositivo foi construída com base em um estudos anteriores que descreve a eficiência de mistura do formato de microcanais em serpentina 3D (ANSARI; KIM, 2009; GUO et al., 2019; LIU; KIM; SUNG, 2004a; MALECHA et al., 2009; VIJAYENDRAN et al., 2003). O canal apresenta seção transversal de 1×0.7 mm contendo 40 segmentos em formato de L. Um outro dispositivo contendo um canal em formato de Y de $1 \times 0.7 \times 60$ mm também foi desenvolvido para comparar a eficácia dos resultados de MS obtidos com o dispositivo em forma de serpentina 3D. Ambos os dispositivos apresentam um formato pontiagudo ao final do canal contendo um orifício de diâmetro de 1.5 mm com o intuito de posicionar uma agulha para aplicação de um potencial elétrico para a ionização das espécies. Os modelos dos dispositivos estão ilustrados na Figura 3.1.

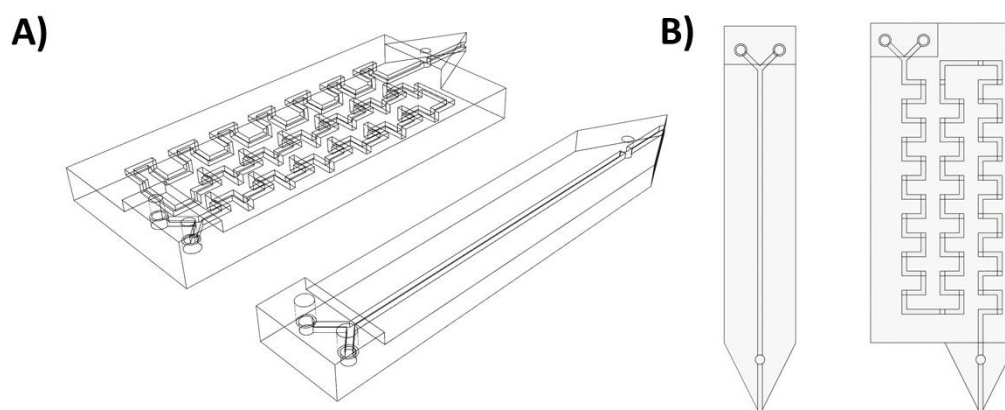


Figura 3.1. Vista (A) isométrica e (B) superior dos dispositivos dos formatos em Y e serpentina 3D projetados para os estudos de mistura monitorada por espectrometria de massas. Os dois dispositivos foram impressos utilizando o material termoplástico PLA por meio da tecnologia de impressão FDM.

3.3.3. Caracterização óptica

Para avaliar o aspecto da superfície dos canais impressos em 3D foi utilizado um microscópio estereoscópio modelo OPZTR Research (Opticam[®] Microscopy Technology, São José dos Campos, SP, Brazil) equipado com uma câmera de 10MP e resolução HD. As imagens ópticas foram adquiridas e avaliadas através do *software* Opticam[®] Microscopy OPTHD.

3.3.4. Parâmetros operacionais das análises de espectrometria de massas

A razão massa-carga dos íons gerados pelo dispositivo 3D proposto foi monitorada com o auxílio do espectrômetro de massas modelo LTQ XL Linear Ion Trap (ThermoFisherScientific, Bremen, Alemanha). A configuração instrumental para as análises de MS usando o microrreator pode ser visto na Figura 3.2. O dispositivo de

ionização direta por eletrospray foi posicionado frontalmente ao espectrômetro de massas mantendo uma distância de aproximadamente 3 mm entre a ponta do dispositivo e o orifício de entrada do equipamento. O eletrospray foi formado com aplicação de um potencial de 4kV no modo íon positivo através de uma agulha conectada à fonte de alta tensão do próprio espectrômetro de massas. Duas bombas seringas modelo NE-300 (New Era Pump Systems, Inc.) foram utilizadas para fornecer as soluções de reagentes para o dispositivo. As seringas foram conectadas ao microcanal por meio de tubos de silicone de diâmetros interno e externo de 2,0 e 3,0 mm, respectivamente. A reação de Katritzky foi avaliada utilizando diferentes vazões 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. Os espectros de massa foram adquiridos em triplicata usando o software Thermo Tune Plus e foram processados usando o pacote de software Xcalibur Analysis (versão 2.0, Service Release 2, Thermo Electron Corporation)

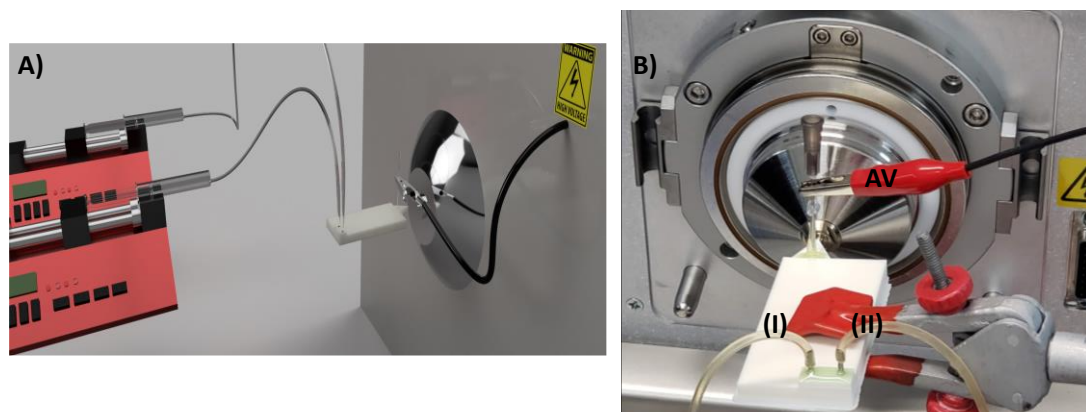


Figura 3.2. Em (A) representação do sistema contendo bomba seringa, dispositivo MS e espectrômetro de massas utilizando para o monitoramento de reações. Em (B) acoplamento do microreator ao MS, onde (I) e (II) são as entradas para cada reagente.

3.3.5. Parâmetros operacionais das análises de ESI-MS

As reações entre TPP e glicina e entre TPP e alanina também foram monitoradas de forma *off-line* por análise ESI-MS convencional. As soluções preparadas, conforme descrito na seção 2.3.1, foram misturadas e mantidas sob agitação por 0, 10 e 30 min antes da análise de MS. Os parâmetros instrumentais utilizados foram os seguintes: modo de ionização positiva; temperatura capilar: 275 °C; tensão capilar: 15 V; tensão de pulverização: 4 kV; lente do tubo: 50 V; energia de colisão para experimentos de MS/MS: 25 um; vazão de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Dispositivos de reação impressos em 3D para análises de MS

Para desenvolver um sistema de monitoramento online de reações em fluxo por MS de ionização direta por *spray* foi fabricado um dispositivo contendo um canal em formato de serpentina 3D e extremidade pontiaguda para formação do eletrospray. Um dispositivo contendo apenas um canal em formato de Y e a extremidade de emissão foi fabricado para estudos comparativos. A Figura 3.3 apresenta imagens obtidas por meio de um microscópio estereoscópio dos dispositivos impressos. As imagens foram obtidas na junção em Y e das divisões em L que compõe o canal em serpentina 3D em etapas de fabricação que mostram o fragmento em L inferior, intermediário e superior (Figura 3.3A). As imagens óticas confirmam que não houve obstrução dos canais impressos. A secção transversal do canal possui um aspecto rugoso característico do processo de impressão FDM (DUARTE et al., 2016; GROSS et al., 2014). As paredes do canal apresentam aspectos semelhante ao formato de escada devido a sobreposição

de camadas do material termoplástico durante o processo de fabricação. A altura das camadas depositadas está relacionada com a resolução da impressora 3D, que neste caso foi de 150 μm .

O volume interno de ambos os dispositivos foi estimado pesando cada dispositivo seco e posteriormente medindo o peso dos dispositivos preenchidos com água. A diferença entre os pesos é proporcional ao volume interno do dispositivo impresso, como descrito anteriormente. O volume estimado para dispositivo com canal de serpentina tridimensional e o com canal em Y foi de 430 μL e 115 μL , respectivamente. Estes valores apresentam boa fidelidade ao volume de 445 μL e 135 μL calculado com base nos *designs* dos respectivos dispositivos modelados no *software* CAD. Ambas as peças foram impressas juntas com um tempo total de impressão de 1h30min. O custo de fabricação para cada dispositivo foi cerca de US\$ 0,30 para serpentina 3D e US\$ 0,11 para o canal em Y.

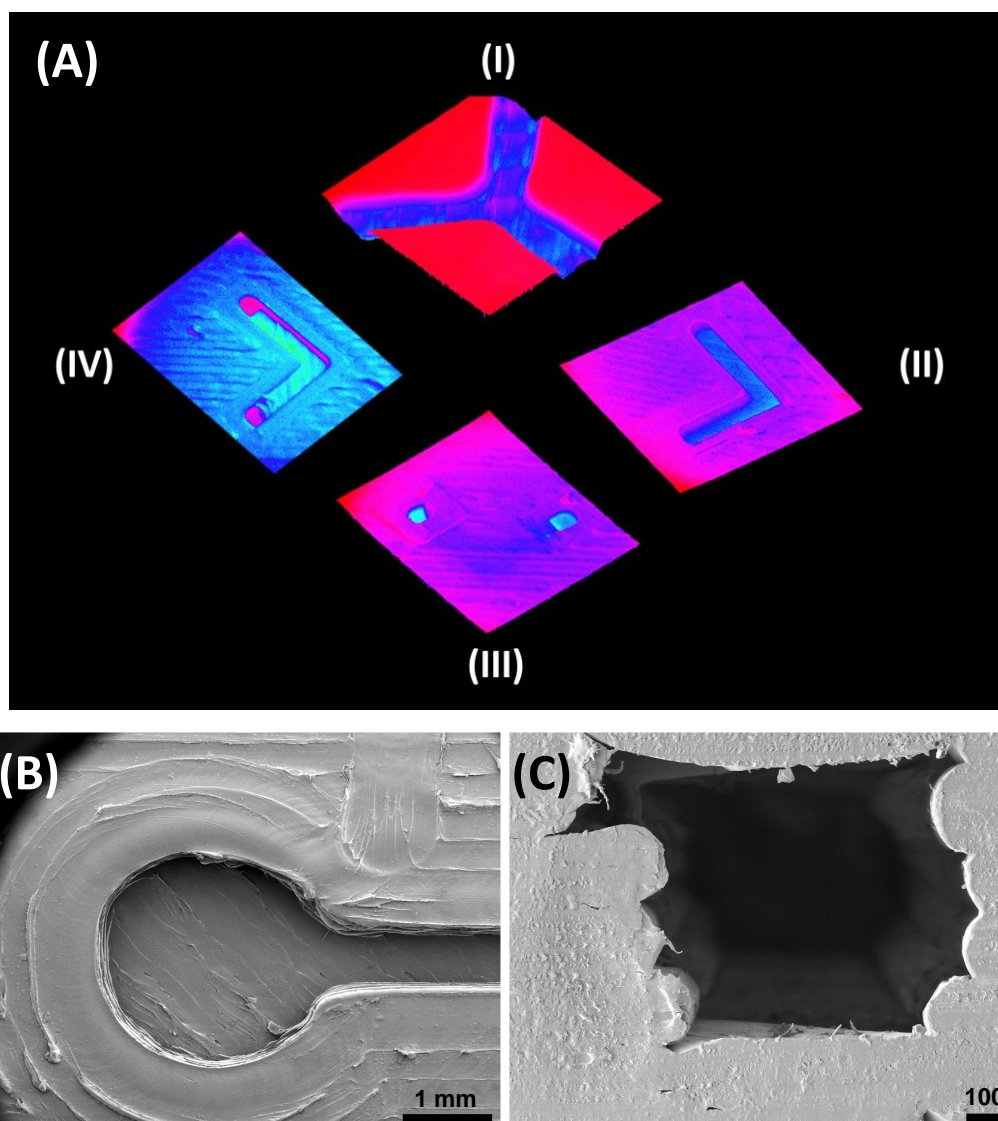


Figura 3.3. Em (A) são apresentadas imagens obtidas por estereoscópio ótico do dispositivo impresso para monitoramento de reação por espectrometria de massas mostrando as regiões da junção em Y (I), e do segmento em L inferior (II), intermediário (III) e superior (IV). Imagens de microscopia de varredura eletrônica (MEV) de um do reservatório de amostra (B) e a seção transversal de um microcanal (C) fabricados por impressão FDM (Retirado e adaptado de Duarte, L. C. Impressão 3D: uma alternativa para fabricação de dispositivos analíticos miniaturizados. 2016. Universidade Federal de Goiás. (DUARTE; COLTRO, 2016)

3.4.2. Monitoramento *online* da reação de Katritzky por MS de ionização direta por *spray*

O desempenho analítico dos microrreatores impressos em 3D foi investigado injetando simultaneamente as soluções de TPP e de aminoácidos (glicina ou alanina),

cada um por meio de uma entrada diferente do microrreator, de modo que os reagentes se misturassem dentro do dispositivo. O produto da reação de Katritzky é então pulverizado na ponta do dispositivo para ser analisado por MS. A reação de Katritzky (Figura 3.4) foi obtida pela reação do cátion TPP com o grupo amino dos aminoácidos glicina e alanina por meio de uma adição nucleofílica seguida de desprotonação, abertura do anel e ciclização catalisada pela adição de ácido (BADU-TAWIAH; CYRIAC; COOKS, 2012; HEIDARIZADEH; ABADAST, 2011; KATRITZKY; MARSON, 1984). Os cátions produzidos pela reação com glicina e alanina foram detectados em m/z 366 $[M]^+$ (Figura 3.4b) e m/z 380 $[M]^+$ (Figura 3.4d), respectivamente. Experimentos de MS/MS foram realizados a fim de confirmar as estruturas dos produtos da reação (Figura 3.4c e 3.4e). Os íons referentes aos fragmentos adquiridos estão de acordo com estudo previamente relatado (WALICZEK et al., 2016).

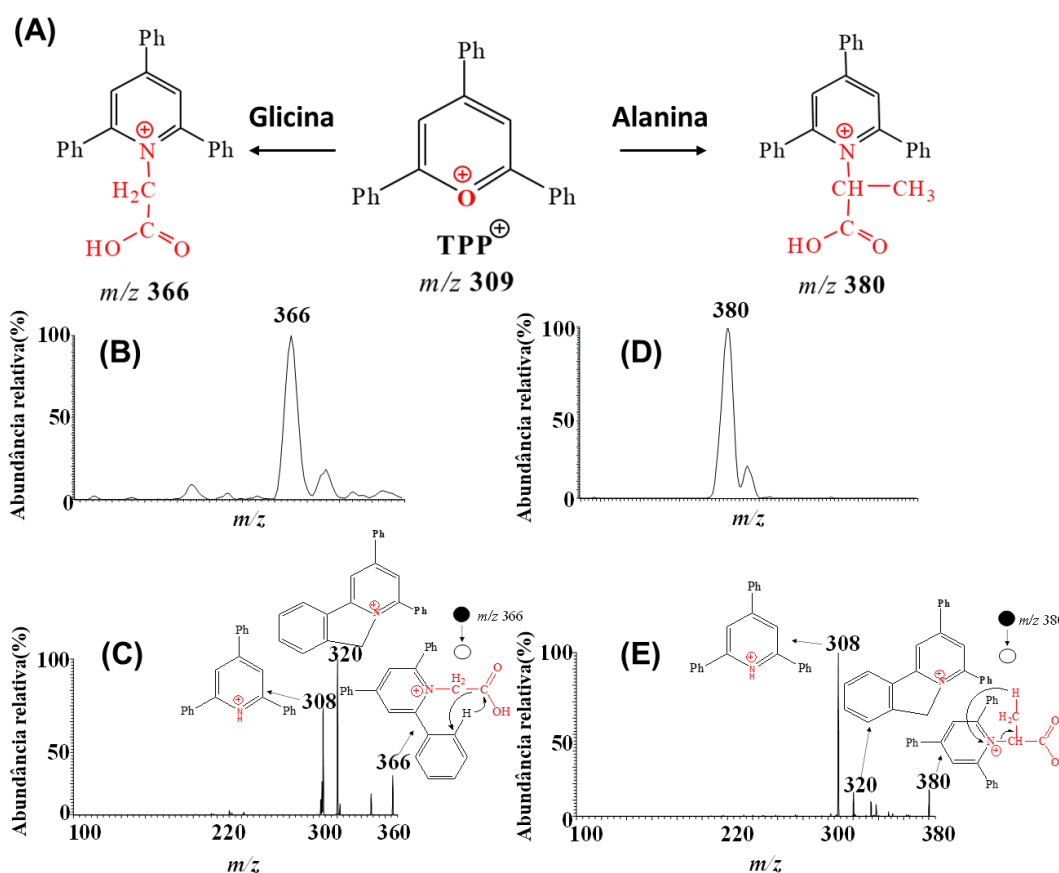


Figura 3.4. Esquema geral da análise por MS de ionização direta usando o microrreator impresso em 3D: (A) a reação de Katritzky, onde o cátion TPP⁺ (m/z 309) reage com os grupos amino de glicina e alanina para produzir os cátions em m/z 366 [M]⁺ e m/z 380 [M]⁺, respectivamente. Um espectro de massa representativo e o MS/MS para o produto da reação com glicina são mostrados em (B) e (C), e para alanina são mostrados em (D) e (E), respectivamente.

A reação de Katritzky foi monitorada nos dois dispositivos impressos (serpentina 3D e formato em Y) e a resposta dos produtos de reação foram avaliados. Diferentes vazões de soluções de reagentes (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$) foram investigadas para cada dispositivo. Cada reator foi alimentado mantendo os mesmos valores de vazão para TPP e aminoácido. A abundância relativa em m/z 366 (para a reação entre TPP e glicina) e m/z 380 (para a reação entre TPP e alanina) foram monitorados, e os resultados são mostrados na Figura 3.5.

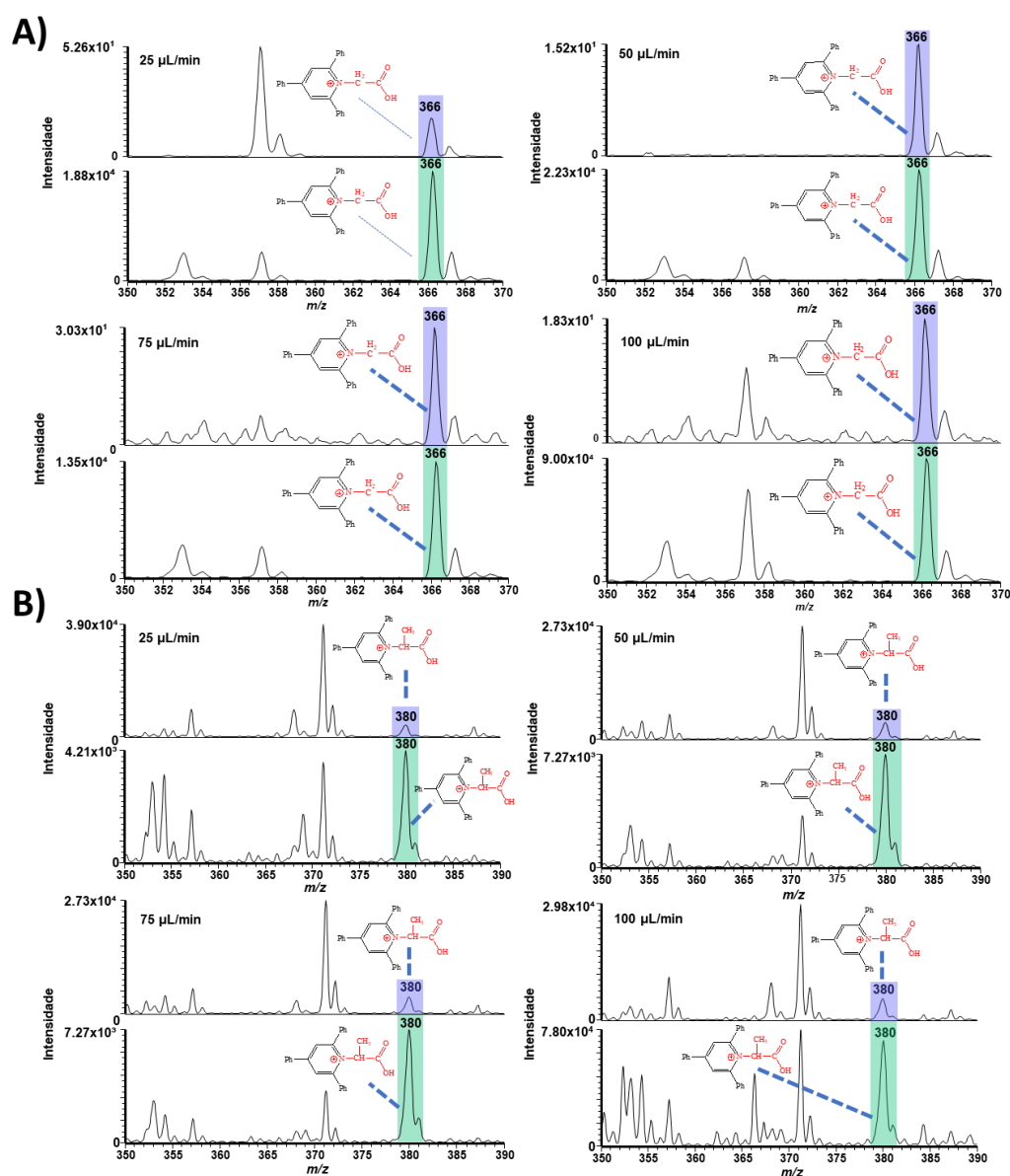


Figura 3.5. Espectros de massas registrados nos dispositivos com canal em serpentina 3D e canal em Y mostrando a reação de Katritzky entre o trifenilpirílio e os aminoácidos (A) glicina e (B) alanina. Os espectros estão apresentados em função da vazão de injeção dos reagentes, os quais variam entre 25 e 100 $\mu\text{L}/\text{min}^{-1}$.

Em todas as taxas de fluxo o cone de Taylor foi gerado de forma satisfatoriamente estável para a formação do eletrospray. No entanto, em vazões acima de 50 $\mu\text{L}/\text{min}^{-1}$, foi observada a formação de uma gota na ponta do micro misturador durante o processo de eletropulverização. No entanto, de acordo com os dados apresentados na Figura 5, foram obtidos baixos valores de desvios-padrão relativos (DPR) das correntes iônicas extraídas dos perfis de m/z 366 e m/z 380 para cada

misturador. O dispositivo de formato em Y apresentou maiores desvios entre as análises para m/z 366, com valores de DPR variando de 7,5 a 6,2%, para taxas de fluxo de 25 a 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, respectivamente (Figura 5A). Por outro lado, pequenos desvios foram observados para m/z 380, com valores de DPR entre 0,20 a 0,30% para fluxos de 25 a 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, respectivamente. No entanto, pode ser visto na Figura 5B que o dispositivo 3D serpentina apresentou os menores desvios em ambas as reações com valores de DPR entre 0,015% a 0,02% (m/z 366) e 0,01% a 0,03% (m/z 380) considerando os fluxos de 25 a 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, respectivamente. Esses resultados indicam alta estabilidade de ionização por eletrospray obtida com o misturador proposto usando vazões de até 100 $\mu\text{L min}^{-1}$.

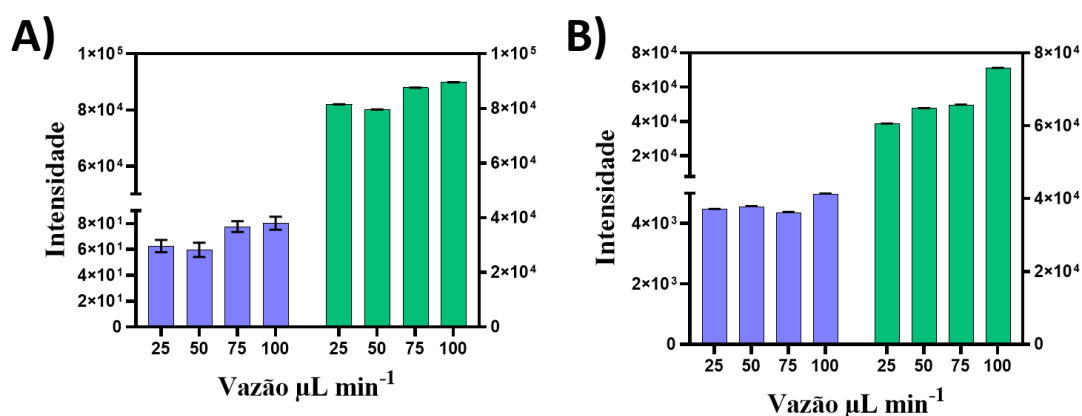


Figura 3.6. Valores de intensidades de sinal de (A) m/z 366 [M]⁺, referente ao produto da reação com glicina, e (B) m/z 380 [M]⁺, produto da reação com alanina. As intensidades estão exibidas em função da vazão (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$) conduzidas nos microrreatores com canal interno em forma de Y (barras em cor azul) e canal em forma de serpentina 3D (barras em cor verde).

Tanto a reação com a glicina, quanto a reação utilizando a alanina ocorreram prontamente nos dois dispositivos em todas as vazões. Mesmo no dispositivo com o canal em Y, onde é esperado um fluxo predominantemente laminar, devido à ausência de curvas no canal, foi possível observar a formação de produto. Isto ocorre devido a rugosidade da superfície do canal, característica do processo de impressão FDM, que

pode propiciar uma certa turbulência no seu interior capaz de promover a mistura e a reação entre os líquidos. No entanto, as abundâncias relativas obtidas com o dispositivo 3D serpentina foram uma (para m/z 380) ou três (para m/z 366) vezes maiores do que as obtidas com o dispositivo com canal Y. Esses resultados indicam que a advecção caótica foi obtida efetivamente no dispositivo 3D serpentina (BEEBE et al., 2001). Dessa forma, o fluxo turbulento gerado no interior dos canais em serpentina tridimensional foi capaz de aumentar a formação do produto durante monitoramento online da reação de Katritzky usando MS de ionização direta por *spray*. A diferença nas intensidades de íons entre as vazões em cada dispositivo não foi notável, embora a vazão a $100 \mu\text{L min}^{-1}$ tenha fornecido a maior intensidade em todas as análises. A maior vazão pode ter fornecido maior intensidade de íons porque vazões mais altas podem colaborar para aumentar a turbulência dentro do canal favorecendo a mistura (BEEBE et al., 2001). Como pode ser observado na Figura 3.6 este perfil foi obtido para ambas as reações. Por esse motivo a vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ foi escolhida para a análise subsequente.

3.4.3. Comparação entre o reator microfluídico impresso e a técnica convencional de ESI

A performance do dispositivo proposto foi avaliada comparando com a técnica tradicional ESI-MS. A reação de Katritzky foi monitorada de forma *online* pelos microrreatores a uma vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, enquanto que as análises por ESI-MS foram conduzidas de forma *offline*. O monitoramento *offline* foi realizado através da coleta de alíquotas das misturas entre TPP e glicina ou alanina em diferentes tempos de reação (0, 10 e 30 min), e injetando-as em uma fonte de ESI. Os resultados foram

avaliados de acordo com as intensidades dos íons em m/z 366 e m/z 380. Como mostrado na Figura 3.7, as intensidades dos íons da análise de ESI-MS aumentaram com o aumento do tempo de reação. No entanto, uma intensidade iônica significativa somente é obtida a partir de 30 minutos de agitação prévia. Por outro lado, quando levamos em conta as análises realizadas com o dispositivo em serpentina 3D pode-se observar que o sinal do produto reacional foi obtido prontamente com intensidade do sinal adequada e significativa indicando alta formação de produto. Esses dados demonstram a alta eficiência obtida com reator impresso em 3D, demonstrando sua potencialidade como uma ferramenta de destaque para realização de reações orgânicas em canais microfluídicos e seu monitoramento por MS.

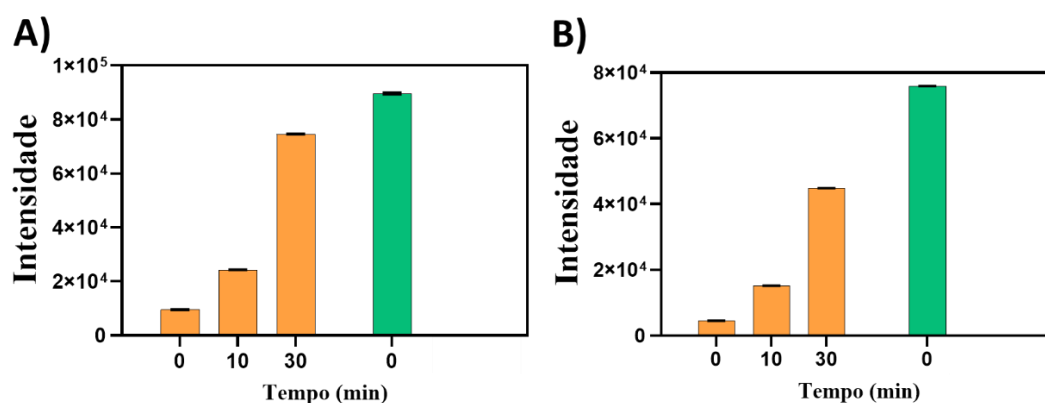


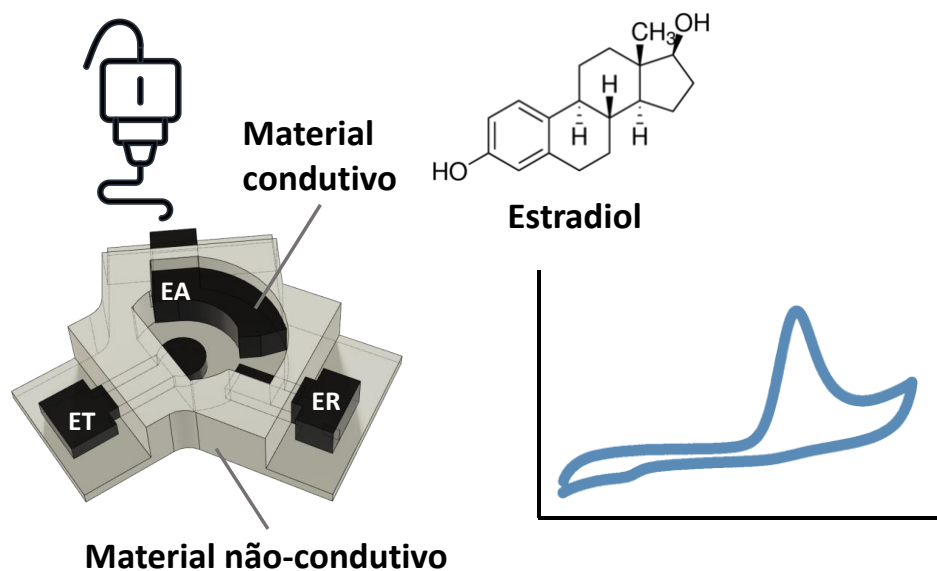
Figura 3.7. Valores de intensidades de sinal de (A) m/z 366 $[M]^+$ (produto da reação com glicina) e (B) m/z 380 $[M]^+$ (produto da reação com alanina) obtido do monitoramento *online* da reação de Katritzky por MS de ionização direta por *spray* usando o microrreator em forma de serpentina 3D (barra em cor verde) a uma vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, e do monitoramento *offline* da reação por ESI-MS convencional (barra em cor laranja) monitorado após 0, 10 e 30 min de reação em solução sob agitação.

3.5. Conclusões

O dispositivo de reação com emissor de ionização direta por spray impresso em 3D combinado com a espectrometria de massas provou ser uma ferramenta útil para monitoramento de reações em tempo real. O dispositivo foi construído sob medida, de forma totalmente automatizada dispensando etapas laboriosas de microfabricação por meio de uma impressora 3D. O tempo de impressão foi cerca de 1h30 min com um custo de US \$ 0,30, o que torna esta plataforma analítica bastante acessível. O dispositivo foi facilmente acoplado ao espectrômetro de massas e a reação de Katritzky foi avaliada. As reações entre TPP e glicina e TPP e alanina foram realizadas com sucesso no interior do microcanal. Intensidades de sinal significativas do produto foram prontamente obtidas no espectro gerado com o dispositivo de serpentina 3D, demonstrando maior taxa de formação do produto quando comparado com a técnica convencional de ESI-MS. Quando comparado com a técnica convencional de ESI-MS, o reator impresso em serpentina 3D permitiu realizar as análises em vazões mais altas promovendo a reação de Katritzky com maior taxa de formação de produto e de forma mais rápida, uma vez que, utilizando ESI-MS, a formação do produto com intensidade de sinal significativa somente ocorreu após 30 minutos de agitação prévia. Diante dos resultados apresentados e de sua simplicidade instrumental, acredita-se que o reator desenvolvido apresenta grande potencialidade para serem empregados em estudos de reações orgânicas. Com o auxílio da tecnologia de impressão 3D, o reator em serpentina tridimensional também pode ser adaptado para combinação em linha com diferentes técnicas de detecção abrindo novas possibilidades de descobertas e implementação de processos químicos controlados em microescala.

Capítulo 4

Desenvolvimento de uma célula eletroquímica construída totalmente por impressão 3D para análises de hormônios



4.1. Introdução

A tecnologia de impressão 3D é uma alternativa emergente para a produção de dispositivos microfluídicos e microestruturas complexas devido este método de fabricação apresentar diversas vantagens incluindo a liberdade de design do objeto desejado, a minimização de resíduos e a sua capacidade de produção rápida e automatizada (GROSS et al., 2014; NGO et al., 2018; O'NEIL, 2020). Dessa forma, a impressão 3D vem ganhando grande popularidade em diversas áreas envolvendo a química analítica (AMBROSI; PUMERA, 2016; CARDOSO et al., 2020a; ERKAL et al., 2014; GROSS et al., 2014; MANZANARES PALENZUELA; PUMERA, 2018; MUÑOZ; PUMERA, 2020; O'NEIL, 2020).

Devido à alta facilidade de acesso das impressoras 3D, bem como o aumento da diversidade de materiais condutores imprimíveis esta tecnologia de prototipagem rápida conquistou, rapidamente, seu espaço na área de eletroquímica com a fabricação de eletrodos para o desenvolvimento de baterias personalizadas e sensores impressos tridimensionalmente (AMBROSI; WEBSTER, 2020; CARDOSO et al., 2018; ERKAL et al., 2014; HAMZAH et al., 2018; HONEYCHURCH; RYMANSAB; IRAVANI, 2018; ZHAO et al., 2014). Os primeiros estudos que envolveram a impressão 3D para a produção de eletrodos utilizaram a impressão de metais (HAMZAH et al., 2018). Estes eletrodos metálicos foram fabricados pela tecnologia de impressão 3D de fusão seletiva a laser (*selective laser melting, SLM*) que consiste em um laser incidido sobre uma camada de pó metálico fundível. O laser incidido funde os grânulos metálicos e promove a união das partículas criando o objeto sólido. Ao fim da primeira camada, uma nova camada de material poroso é depositada e o processo é repetido, camada por camada, até a peça ser concluída (GROSS et al., 2014;

YAP et al., 2015). O aço inoxidável é o principal material empregado na SLM para a produção de eletrodos. Após a impressão a superfície do eletrodo é galvanizada com outro metal incluindo, ouro, bismuto, níquel, platina e oxido de irídio para adequá-los a diversos tipos de aplicações (AMBROSI; MOO; PUMERA, 2016; AMBROSI; PUMERA, 2018; HAMZAH et al., 2018; HO; AMBROSI; PUMERA, 2018; LEE; AMBROSI; PUMERA, 2017; LOO; CHUA; PUMERA, 2017). No entanto, este tipo de prototipagem ainda requer o uso de materiais e equipamentos de alto custo, além de exigir um processo complementar, após a fabricação, como a eletrodeposição de outro metal.

Em contrapartida, a tecnologia de impressão FDM vem se destacando como um método econômico e com maior simplicidade operacional. Esta técnica consiste na deposição controlada de materiais termoplásticos semifundidos sobre uma plataforma de impressão, construindo o objeto camada por camada (GROSS et al., 2014). Para produzir eletrodos através da FDM são utilizados materiais condutores a base de carbono misturados com materiais termoplásticos. Recentemente, o uso de diversos filamentos poliméricos condutores foram relatados incluindo filamento de ácido polilático (PLA)/grafeno (FOSTER et al., 2017; MANZANARES PALENZUELA et al., 2018; ZHAO et al., 2014), ácido polilático/negro de fumo (PLA-NF) (JOÃO et al., 2020; KATSELI; ECONOMOU; KOKKINOS, 2019; VANĚČKOVÁ et al., 2020), ABS/negro de fumo (ZHANG et al., 2017), polipropileno/negro de fumo (KWOK et al., 2017), polibutilenotereftalato/nanotubo de carbono/grafeno (GNANASEKARAN et al., 2017) e nanofibra de carbono/grafite/poliestireno (HONEYCHURCH; RYMANSAIB; IRAVANI, 2018; RYMANSAIB et al., 2016). O filamento de PLA/negro de fumo vem sendo cada vez mais explorado em análises eletroquímicas

para a produção de eletrodos por meio de impressão 3D. Estes eletrodos impressos vêm demonstrando resultados promissores na detecção de dopamina e traços de metais (CARDOSO et al., 2020b; JOÃO et al., 2020; ROCHA et al., 2020a). No entanto, outros trabalhos relatam o uso de negro de fumo em eletrodos convencionais para detecção de hormônios. Gan *et al.* relatou o uso de eletrodos de diamante dopados com boro para análises de estrogênios envolvendo estradiol, nonilfenol, bisfenol A, etinilestradiol, estrona e estriol (GAN; COMPTON; FOORD, 2013). O método encontrou um limite de detecção de 1-100 μM para os compostos estrogênicos. No entanto, ao modificar o eletrodo de diamante com negro de fumo foi possível reduzir, em cerca de três vezes, a ordem de magnitude do limite de detecção para 5-100 nM. Smajdor e colaboradores empregaram eletrodos de carbono vítreo modificado com negro de fumo para a detecção de etinilestradiol com a técnica de pulso diferencial (SMAJDOR et al., 2017). As análises alcançaram um baixo limite de detecção de $0,13 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com boa repetibilidade de resposta indicada pelo valor de RSD de 2,5%. Posteriormente, Smajdor *et al.* utilizou o eletrodo modificado para a detecção de estradiol alcançando um limite de detecção de $9,2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ com repetibilidade apresentando RSD de 1,3% (SMAJDOR et al., 2018).

Neste sentido, este capítulo relata o uso da impressora 3D para construção de uma célula eletroquímica com eletrodos integrados para detecção de estradiol. O 17 β -estradiol pertence ao grupo dos hormônios esteroides naturais. É fundamental no organismo humano pois controla diversas ações fisiológicas. A deficiência de estradiol está relacionada a doenças cardíacas ou osteoporose, em contra partida, o excesso de estradiol no organismo pode gerar câncer de ovário e de mama (GROUP, 2002; HULLEY et al., 1998; ROSSOUW et al., 2002). Dessa forma, faz-se necessário o

desenvolvimento de métodos que podem auxiliar no controle de estradiol no organismo. A célula eletroquímica com eletrodos integrados foi fabricada em uma única etapa combinando dois filamentos termoplásticos (ABS e PLA-NF). O estudo ainda está em fase preliminar, porém serão apresentados aqui resultados promissores alcançados até o momento.

4.2. Objetivos

4.2.1. Geral

Este capítulo tem como objetivo principal utilizar uma impressora 3D multimaterial para fabricação em única etapa de uma célula eletroquímica contendo eletrodos integrados para detecção de hormônios.

4.2.2. Específicos

- ✓ Fabricar de maneira rápida, automatizada e de baixo custo uma célula eletroquímica contendo eletrodos integrados;
- ✓ Combinar os materiais termoplásticos ABS e PLA-NF para o desenvolvimento da célula eletroquímica;
- ✓ Avaliar o desempenho e característica da célula eletroquímica proposta;
- ✓ Avaliar o comportamento do eletrodo com o tratamento eletroquímico;
- ✓ Avaliar a performance preliminar da célula eletroquímica na detecção de 17 β -estradiol.

4.3. Materiais e Métodos

4.3.1. Reagentes utilizados

Hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de potássio (KCl), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), bem como o padrão de 17β -Estradiol foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (Saint Louis, MO, EUA). Ácido acético glacial provenientes da Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro, Brasil), ácido bórico, ácido fosfórico obtidas da Merck e hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich) foram utilizados para produzir o tampão Britton-Robinson. Todos os reagentes químicos eram de grau e pureza analítica e foram utilizados sem purificação adicional. As soluções foram preparadas usando água deionizada com resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ obtida por meio do sistema de água ultrapura (Direct-Q[®] 3, Milipore, Darmstadt, Alemanha).

4.3.2. Processo de fabricação

A Figura 4.1 apresenta célula eletroquímica contendo eletrodo de trabalho ($\phi = 3 \text{ mm}$), eletrodo auxiliar e eletrodo pseudo-referência projetada em software CAD (AutoCAD[®] 2016, Autodesk Inc., San Rafael, CA, USA) e construída utilizando a impressora 3D multimaterial Original Prusa i3 mk2/S 3D (Prusa Research s.r.o., Prague, Czech Republic) que possui a tecnologia de impressão FDM. A região dos eletrodos foi impressa com o filamento condutivo de ácido polilático/negro de fumo (PLA-NF), nome comercial Proto-Pasta, adquirido da ProtoPlant (Washington, EUA), enquanto que a região isolante foi fabricada utilizando o filamento de acrilonitrila butadieno estireno (ABS).

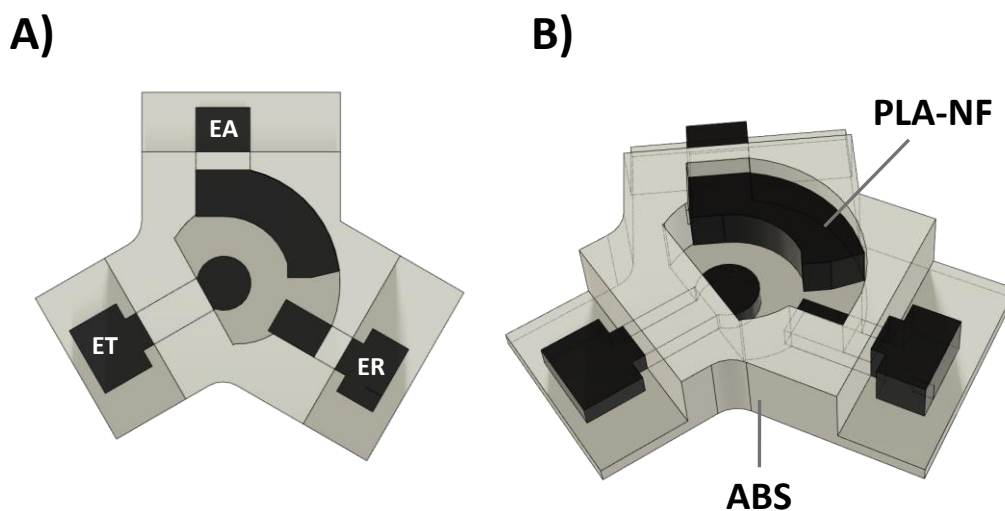


Figura 4.1. Design projetado da célula eletroquímica contendo eletrodo de trabalho (ET), eletrodo auxiliar (EA) e eletrodo pseudo-referência (PR). Os eletrodos foram impressos utilizando o filamento condutivo PLA-NF e a região isolante foi fabricada utilizando o termoplástico ABS.

4.3.3. Procedimentos eletroquímicos

As medidas eletroquímicas (voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial) foram realizadas conectando a célula eletroquímica impressa tridimensionalmente a um bipotenciostato/galvanostato $\mu Stat$ 400 (Dropsens, SL, Oviedo, Espanha) monitoradas por meio do software DropView®. O sistema eletroquímico utilizado pode ser visto na Figura 4.2. Antes de iniciar as análises os eletrodos de PLA-NF foram ativados com tratamento eletroquímico baseado no procedimento descrito anteriormente (JOÃO et al., 2020; ROCHA et al., 2020). Este processo de ativação eletroquímica consiste na adição de solução básica de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio contendo $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a aplicação de um potencial de $+1,4 \text{ V}$ por 200 segundos e posteriormente a aplicação de $-1,0 \text{ V}$ pelo mesmo tempo.

A caracterização eletroquímica dos eletrodos impressos foi realizada por voltametria cíclica utilizando uma solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio

e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl como sonda eletroquímica. O estudo foi realizado em uma janela de potencial variando de $-0,7$ a $0,5 \text{ V}$ nas velocidades de varredura de $10, 20, 30, 40, 50, 75, 100$ e 200 mV s^{-1} .

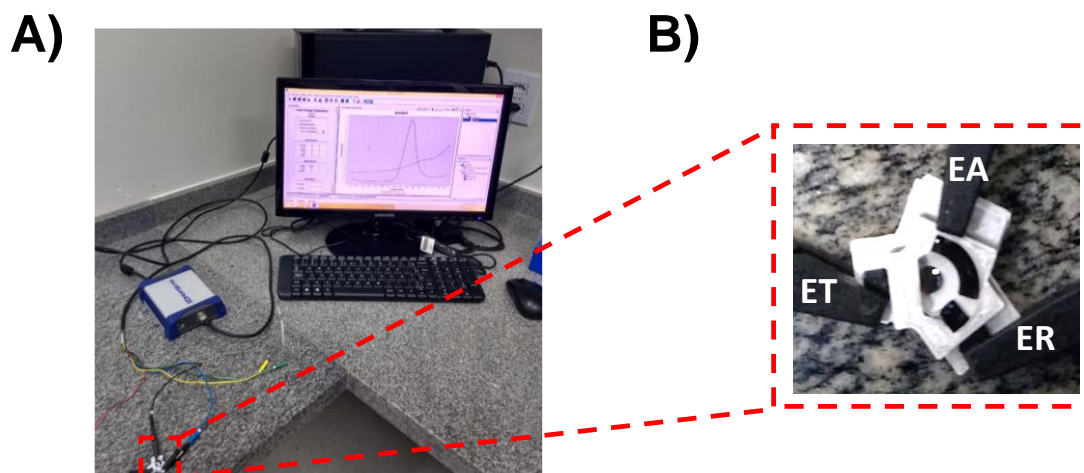


Figura 4.2. Representação do A) Sistema de detecção eletroquímica e, B) célula eletroquímica empregada usando um arranjo de 3 eletrodos fabricados com a utilização de uma impressora 3D: eletrodo de trabalho (ET), eletrodo auxiliar (EA) e eletrodo de pseudo-referência (ER).

4.3.4. Aplicação Analítica

O desempenho eletroanalítico da célula eletroquímica proposta foi avaliado para a determinação de 17β -estradiol. O perfil voltamétrico desse hormônio foi analisado antes e depois do tratamento eletroquímico em solução tampão de Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 8,0$) pela técnica de voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos foram registrados na presença e ausência de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 17β -estradiol, em uma janela de potencial variando de $-0,2$ a $1,0 \text{ V}$ em uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

A influência do pH no comportamento eletroquímico para a detecção de 17β -estradiol foi avaliada utilizando o dispositivo fabricado em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão

Britton-Robinson contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 17β -estradiol para valores de pH de 2,0, 4,0, 8,0, 10,0 e 12,0. Este estudo foi realizado em uma janela de potencial de $-0,2$ a $1,0$ V e a velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ \text{C}$).

A quantificação eletroquímica do estradiol foi realizada pela técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV). As concentrações de estradiol variaram de $0,19$ a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ diluídas previamente com tampão Britton-Robinson (pH = 8,0). Este estudo foi realizado em uma janela de potencial variando de $0,2$ a $0,85$ V, amplitude de pulso de potencial de 50 mV , potencial de *step* de 2 mV , tempo de pulso de 100 ms e velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} .

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1. Processo de impressão da célula eletroquímica

A célula eletroquímica foi fabricada combinando dois tipos de materiais diferentes (ABS e PLA-NF) com o auxílio de uma impressora 3D com tecnologia FDM multimaterial. O método de impressão FDM permite a impressão de objetos com cores ou materiais diferentes podendo ser utilizados máquinas que contém uma ou mais extrusoras. Para se obter peças multicoloridas/multimateriais com uma única extrusora é necessário interromper o processo de impressão para fazer a troca do filamento. No entanto, este processo pode ser laborioso, além de incluir mais etapas durante o processo de impressão aumentando o tempo de fabricação. As impressoras 3D com tecnologia FDM multimaterial contém duas ou mais extrusoras e permitem a construção de objetos com diferentes materiais de forma automatizada em uma única etapa. Neste estudo, foi utilizado uma impressora 3D multimaterial que contém quatro

extrusoras capazes de construir objetos com até quatro materiais diferentes. O processo de fusão e deposição foi configurado previamente com o auxílio do *software* CAM, desse modo a impressora 3D reconhece o tipo e a quantidade exata de material necessária para uma região específica do objeto modelado. Além disso, a impressora 3D multimaterial possibilita a impressão de dezenas de células eletroquímicas simultaneamente. Cada dispositivo foi construído em cerca de 12 minutos com um custo de fabricação de aproximadamente US\$ 0,08.

4.4.2. Tratamento eletroquímico e caracterização eletroquímica dos eletrodos

Com o intuito de melhorar a performance analítica do dispositivo proposto, realizou-se o processo de ativação eletroquímica com a utilização de uma solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹. Para isto, os eletrodos impressos de PLA-NF foram tratados com a aplicação de um potencial de +1,4 V e -1,0 V, por 200 segundos em cada potencial. De acordo ao descrito por ROCHA *et al.* o tratamento eletroquímico degrada parte do material termoplástico de PLA tornando mais acessíveis as regiões condutoras de negro de fumo e potencializa o desempenho eletroquímico dos eletrodos impressos (ROCHA et al., 2020a). A Figura 4.3 apresenta o tratamento eletroquímico utilizado, juntamente com voltamogramas adquiridos do comportamento do eletrodo frente a uma sonda eletroquímica de ferricianeto de potássio a 50 mV s⁻¹ antes e depois da ativação.

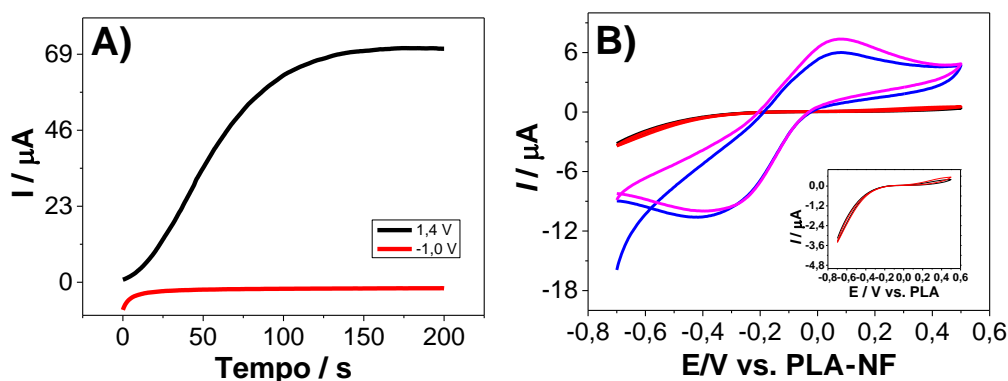


Figura 4.3. A) Tratamento eletroquímico empregado para a ativação dos eletrodos fabricados com a utilização de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; B) Voltamogramas cíclicos em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros operacionais: Em A) cronoamperometria potencial aplicado $1,4 \text{ V}$ e $-1,0 \text{ V}$ vs. PLA-NF. Em B) voltametria cíclica varredura de potencial $-0,7$ a $0,5$ vs PLA-NF.

Ao observar a Figura 4.3A pode-se notar que ocorre um aumento no sinal de corrente anódico e catódico até alcançar a estabilidade, assegurando assim a ativação das regiões condutivas de negro de fumo presente nos eletrodos de PLA. Após a ativação, as voltametrias cíclicas mostradas na Figura 4.3B apresentaram um par redox com separação entre os picos aproximadamente de $0,41 \text{ V}$. Além disso, ao comparar os voltamogramas cíclicos dos eletrodos antes e após a ativação, nota-se que ocorre um aumento da corrente de pico tanto anódica, quanto catódica, como também a presença do par redox da sonda eletroquímica, indicando a eficiência da ativação dos eletrodos com a solução de NaOH.

Neste sentido, após o tratamento eletroquímico, avaliou-se o grau de reversibilidade e a natureza do transporte de material eletroativo para a superfície do eletrodo de trabalho, pela voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura. O dispositivo proposto foi caracterizado eletroquimicamente com a sonda eletroquímica ferricianeto de potássio com a variação da velocidade de varredura de

10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 e 200 mV s^{-1} em uma janela e potencial de -0,7 V a 0,5 V conforme apresentado na Figura 4.4.

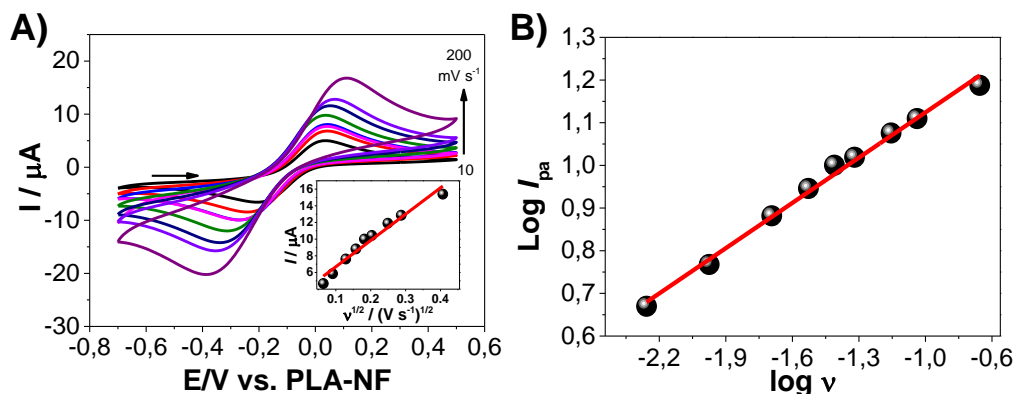


Figura 4.4. A) Voltamogramas cíclicos de eletrodo tratado eletroquimicamente em ferricianeto $1 \text{ mmol L}^{-1} + 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ em diferentes velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200 mV s^{-1}). A inserção apresenta a corrente de pico anódica em função da raiz quadrada de varredura. B) Relação entre o logaritmo da corrente de pico anódica em função do logaritmo da velocidade de varredura.

Analisando os voltamogramas cíclicos (Figura 4.4A) pode-se observar um deslocamento dos picos de oxidação e redução, aumentando a variação de potencial entre eles, indicando um sistema quase-reversível. A inserção da Figura 4.4A apresenta um gráfico de pico de corrente anódica (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, com o intuito de verificar se o processo eletroquímico em questão é a difusão. Como também, a natureza do processo eletroquímico foi confirmada, a partir da inclinação da curva apresentada pela Figura 4.4B. Para um processo controlado por adsorção, I_{pa} é proporcional a v , resultando assim em uma inclinação de 1,0. No entanto, em um processo controlado por difusão, I_a é proporcional a $v^{1/2}$, resultando em uma inclinação de 0,5 (SELVA et al., 2017). Os eletrodos fabricados neste trabalho, indicaram uma inclinação de 0,33, sugerindo assim um processo controlado por difusão.

4.4.3. Aplicação Analítica

O desempenho do dispositivo eletroquímico fabricado pela técnica de impressão 3D foi avaliado com o uso do hormônio 17β -estradiol. O comportamento eletroquímico do 17β -estradiol foi registrado antes e após o tratamento com NaOH 0,5 mol/L pela técnica de voltametria cíclica (Figura 4.5).

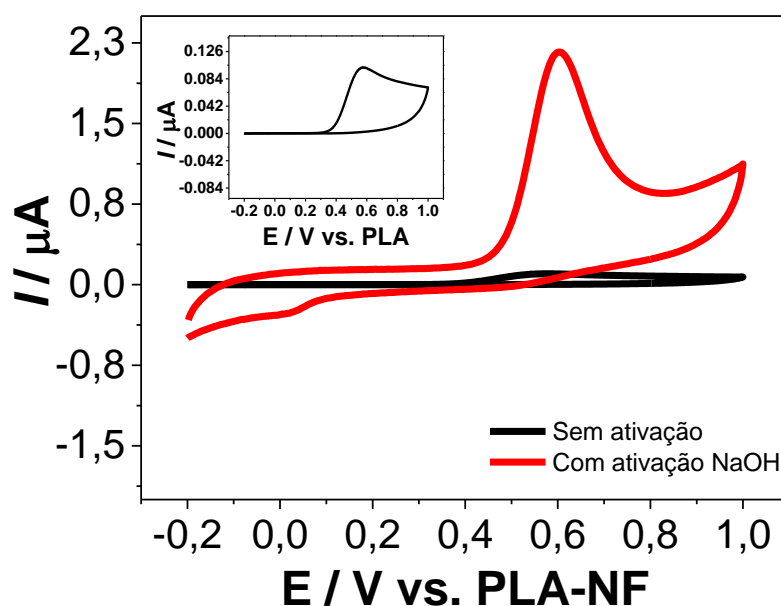


Figura 4.5. Voltamogramas cíclicos de eletrodos impressos (PLA-NF) utilizando uma impressora 3D em solução tampão de Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 8,0$) a 50 mV s^{-1} com potenciais variando de $-0,2$ a $1,0 \text{ V}$. As linhas pretas e vermelhas representam dispositivos sem e com tratamento eletroquímico, respectivamente.

Como pode ser observado, os voltamogramas cíclicos apresentaram um pico de oxidação típico do estradiol em $0,60 \text{ V}$ tanto para o eletrodo sem ativação quanto para o eletrodo previamente tratado. O eletrodo tratado eletroquimicamente apresentou melhor desempenho, pois o sinal da corrente de oxidação aumentou cerca de vinte vezes em comparação ao sinal do eletrodo sem tratamento prévio. Este comportamento indica que a transferência de elétrons do hormônio para a superfície do eletrodo PLA-NF foi facilitada com os poros gerados da degradação parcial do

termoplástico PLA que tornaram a região condutiva de negro de fumo mais disponível. Portanto, esses resultados destacam a importância do tratamento escolhido para posterior aplicação analítica desses dispositivos descartáveis.

A influência do comportamento eletroquímico do 17β -estradiol em diferentes valores de pH (2 a 12) foi avaliada por VC utilizando a célula eletroquímica impressa em 3D. A Figura 4.6 apresenta os voltamogramas cíclicos adquiridos utilizando tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 17β -estradiol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados indicaram que o processo de oxidação apresentou maior potencial positivo em baixos valores de pH. Isso pode ser atribuído à alta concentração de H^+ no meio, que limitou a oxidação da molécula: Esta tendência pode ser observada na Figura 4.6B, na qual o valor do pico decresce com o aumento do pH. No entanto, neste estudo, uma solução tampão BR com $\text{pH} = 8,0$ foi selecionada com o intuito de assegurar uma melhor seletividade (menor E_p), adequada sensibilidade e, também por ser um pH que permite a detecção sequencial de 17β -estradiol e progesterona em estudos futuros.

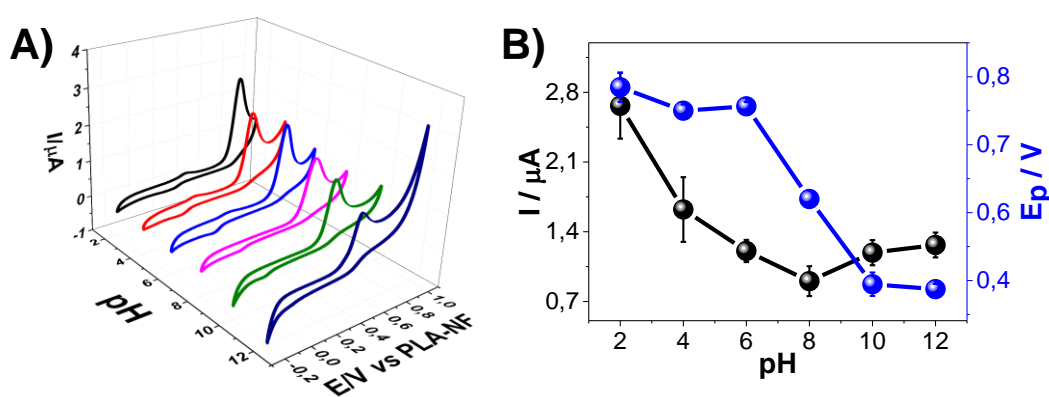


Figura 4.6. A) Voltamogramas cíclicos de uma solução $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 17β -estradiol para diferentes unidades de pH. B) Relação entre corrente de pico anódica e potencial de pico em função do pH.

Diante disto, testes preliminares para a detecção de estradiol foram realizados utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV). A Figura 4.7 apresenta a curva analítica do estradiol em uma faixa de concentração de 0,19 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Este estudo foi realizado em uma janela de potencial variando de 0,2 a 0,85 V, amplitude de pulso de potencial de 50 mV, potencial de *step* de 2 mV, tempo de pulso de 100 ms e velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} . A curva analítica obtida apresentou uma faixa linear de 0,19 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, porém a partir da concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ o processo de oxidação do hormônio acarreta uma saturação da intensidade da corrente de pico registrada. O limite de detecção (LOD) obtido considerando a relação sinal-ruído igual a 3 foi de 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Estes resultados foram obtidos em condições experimentais ainda não otimizadas. Neste sentido, este estudo continuará em execução com o intuito de melhorar o desempenho analítico do dispositivo eletroquímico otimizando os parâmetros operacionais da técnica de DPV, análises em triplicatas, como também a análise sequencial de estradiol e progesterona usando uma célula eletroquímica com dois eletrodos de trabalho.

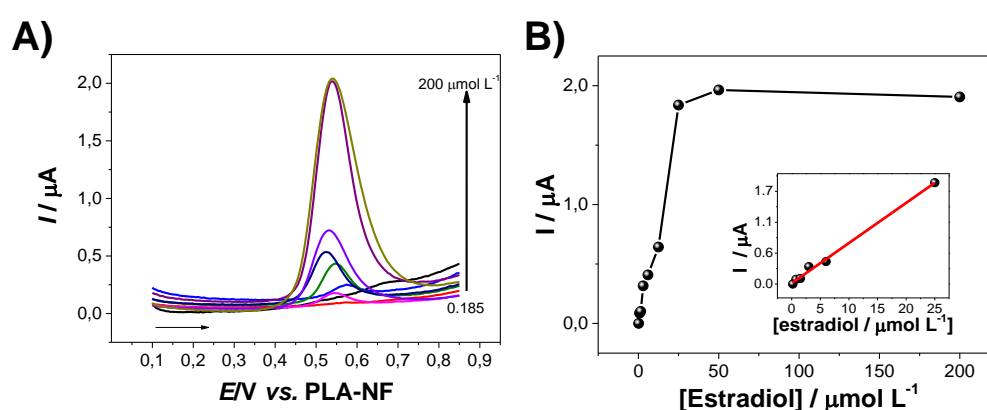


Figura 4.7. A) Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de estradiol (185 nmol L^{-1} – $200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Parâmetros: $E_{\text{step}} = 2 \text{ mV}$; Amplitude = 50 mV; velocidade de varredura = 5 mV s^{-1} . B) Relação entre a corrente de pico anódica em função da concentração de estradiol. A Inserção apresenta a região linear da curva analítica: 185 nmol L^{-1} a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.

4.5. Conclusões

A célula eletroquímica contendo 3 eletrodos de PLA-NF integrados foi inteiramente fabricada pela tecnologia de impressão 3D. Com um tempo de fabricação de 12 min a custo de US\$ 0,08 a tecnologia de impressão FDM multimaterial demonstrou ser um método simples, rápido, versátil, e de baixo custo para a fabricação de sensores eletroquímicos integrados. Além disso, o projeto da célula eletroquímica pode ser estendido a diferentes geometrias contendo dois ou mais eletrodos de trabalho, bem como a integração de uma segunda técnica de detecção como a colorimetria, por exemplo. Aplicações eletroanalíticas preliminares, com condições operacionais ainda não otimizadas, mostraram que o dispositivo proposto apresenta potencialidade para detecção de estradiol alcançando LOD de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Pretende-se dar continuidade a este trabalho com o intuito de melhorar o desempenho analítico do dispositivo otimizando os parâmetros operacionais, bem como análise sequencial de estradiol e progesterona.

Capítulo 5

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

5.1. Conclusões Gerais

De forma geral, a impressão 3D tem demonstrado ser um excelente método alternativo de fabricação de dispositivos para aplicações analíticas e bioanalíticas. A versatilidade desta técnica de prototipagem rápida foi demonstrada na presente tese explorando dispositivos com diversos arranjos geométricos, combinando diferentes materiais imprimíveis para aplicações e técnicas analíticas distintas. O método de contagem de células por meio do dispositivo microfluídico contendo sensores de detecção condutométrica sem contato apresentado no capítulo 1 demonstrou simplicidade instrumental, baixo custo, alta sensibilidade com performance analítica comparável aos sistemas existentes com abordagens de contagem de células. Portanto, este método de detecção livre de biomarcadores abre novas perspectivas para aplicações microbiológicas.

O desenvolvimento de um microrreator para monitoramento *online* da reação de Katritzky por espectrometria de massas foi relatada no capítulo 2. O microrreator constituído de um canal em formato de uma serpentina 3D contendo um emissor para ionização direta por *electrospray* promoveu a reação de forma mais rápida e com maior taxa de formação de produto em relação a técnica convencional de ESI-MS. Estes resultados demonstram que o dispositivo impresso apresenta performance adequada de mistura e eficiente acoplamento com o espectrômetro de massas provando ser uma ferramenta promissora para o monitoramento de reações orgânicas.

O desenvolvimento de sensores integrados em uma célula eletroquímica construídos inteiramente por impressão 3D foi explorado no capítulo 3. O dispositivo eletroquímico constituído de dois materiais imprimíveis (PLA-NF e ABS) foi

construído em uma única etapa em poucos minutos e empregado para detecção de estradiol. Mesmo com parâmetros operacionais ainda não otimizados a célula eletroquímica impressa demonstra ser um instrumento útil para detecção de hormônios por meio de técnicas eletroanalíticas.

5.2. Perspectivas

A versatilidade da tecnologia de impressão 3D continuará sendo explorada no sentido de viabilizar novas descobertas e implementação de diversas plataformas analíticas para aplicações distintas. O gerador de gotículas com sensor condutométrico acoplado poderá ser explorado para promover a cultura bacteriana dentro do microcanal, bem como para explorar o sistema de detecção C⁴D para distinguir diferentes tipos de bactérias. A arquitetura do reator impresso poderá ser adaptada para outras técnicas de detecção de acordo com o produto de reação de interesse. Estudos com o sensor eletroquímico continuarão em execução com a finalidade de aumentar sua performance analítica, bem como promover a detecção simultânea de estradiol e progesterona, dois hormônios que possuem papel importante na manutenção do organismo.

Referências bibliográficas

AMBROSI, Adriano; MOO, James Guo Sheng; PUMERA, Martin. Helical 3D-printed metal electrodes as custom-shaped 3D platform for electrochemical devices. **Advanced Functional Materials**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 698–703, 2016.

AMBROSI, Adriano; PUMERA, Martin. **3D-printing technologies for electrochemical applications** **Chemical Society Reviews**, 2016. DOI: 10.1039/c5cs00714c.

AMBROSI, Adriano; PUMERA, Martin. Self-Contained Polymer/Metal 3D Printed Electrochemical Platform for Tailored Water Splitting. **Advanced Functional Materials**, [S. l.], v. 28, n. 27, p. 1700655, 2018.

AMBROSI, Adriano; WEBSTER, Richard D. 3D printing for aqueous and non-aqueous redox flow batteries. **Current Opinion in Electrochemistry**, [S. l.], v. 20, p. 28–35, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.02.005>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451910320300302>.

ANDERSON, Kari B.; LOCKWOOD, Sarah Y.; MARTIN, R. Scott; SPENCE, Dana M. A 3D printed fluidic device that enables integrated features. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 85, n. 12, p. 5622–5626, 2013. DOI: 10.1021/ac4009594.

ANSARI, Mubashshir Ahmad; KIM, Kwang-Yong. Parametric study on mixing of two fluids in a three-dimensional serpentine microchannel. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 146, n. 3, p. 439–448, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.10.006>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894708006852>.

ARORA, Arun; SIMONE, Giuseppina; SALIEB-BEUGELAAR, Georgette B.; KIM, Jung Tae; MANZ, Andreas. Latest Developments in Micro Total Analysis Systems. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 82, n. 12, p. 4830–4847, 2010. DOI: 10.1021/ac100969k.

AU, Anthony K.; HUYNH, Wilson; HOROWITZ, Lisa F.; FOLCH, Albert. 3D-printed microfluidics. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 55, n. 12, p. 3862–3881, 2016.

BADU-TAWIAH, Abraham K.; CYRIAC, Jobin; COOKS, R. Graham. Reactions of organic ions at ambient surfaces in a solvent-free environment. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1007/s13361-012-0337-7.

BAEK, Sunghoon; SONG, Simon. A one-step photolithography method for fabrication of a staggered herringbone mixer using inclined UV lithography. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 77001, 2011.

BARNATT, Christopher. **3D Printing Third Edition**. [s.l.] : CreateSpace Independent Publishing Platform, 2016.

BECKER, Holger; GÄRTNER, Claudia. Polymer based micro-reactors.

Reviews in Molecular Biotechnology, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 89–99, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1389-0352\(01\)00032-0](https://doi.org/10.1016/S1389-0352(01)00032-0). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389035201000320>.

BECKER, Holger; GÄRTNER, Claudia. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 390, n. 1, p. 89–111, 2008. DOI: 10.1007/s00216-007-1692-2.

BEEBE, David J.; ADRIAN, Ronald J.; OLSEN, Michael G.; STREMLER, Mark A.; AREF, Hassan; JO, Byung-Ho. Passive mixing in microchannels: Fabrication and flow experiments. **Mécanique & industries**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 343–348, 2001.

BERMAN, Barry. 3-D printing: The new industrial revolution. **Business Horizons**, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 155–162, 2012. DOI: 10.1016/j.bushor.2011.11.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bushor.2011.11.003>.

BJORK, Sara M.; SJOSTROM, Staffan L.; ANDERSSON-SVAHN, Helene; JOENSSON, Haakan N. Metabolite profiling of microfluidic cell culture conditions for droplet based screening. **Biomicrofluidics**, [S. l.], v. 9, n. 4, 2015. DOI: 10.1063/1.4929520.

BOEDICKER, James Q.; LI, Liang; KLINE, Timothy R.; ISMAGILOV, Rustem F. Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 1265–1272, 2008. DOI: 10.1039/b804911d. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b804911d>.

BRESSAN, Lucas P.; ROBLES-NAJAR, Jessica; ADAMO, Cristina B.; QUERO, Reverso F.; COSTA, Brenda M. C.; DE JESUS, Dosil P.; DA SILVA, José A. F. 3D-printed microfluidic device for the synthesis of silver and gold nanoparticles. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 146, n. October 2018, p. 1083–1089, 2019. DOI: 10.1016/j.microc.2019.02.043. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.043>.

BROWN, Alfred. E. **Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology**. [s.l.] : McGraw-Hill Higher Education, 2005.

BROWNE, Duncan L.; WRIGHT, Steven; DEADMAN, Benjamin J.; DUNNAGE, Samantha; BAXENDALE, Ian R.; TURNER, Richard M.; LEY, Steven V. Continuous flow reaction monitoring using an on-line miniature mass spectrometer. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 26, n. 17, p. 1999–2010, 2012. DOI: 10.1002/rcm.6312. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rcm.6312>.

BRUGGER, Silvio D.; BAUMBERGER, Christian; JOST, Marcel; JENNI, Werner; BRUGGER, Urs; MÜHLEMANN, Kathrin. Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 1–6, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0033695.

CARDOSO, Rafael M. et al. Additive-manufactured (3D-printed) electrochemical sensors: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 1118, p. 73–91, 2020. a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.028>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267020303378>.

CARDOSO, Rafael M.; CASTRO, Sílvia V. F.; STEFANO, Jéssica S.; MUÑOZ, Rodrigo A. A. Drawing Electrochemical Sensors Using a 3D Printing Pen. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 31, n. 9, p. 1764–1770, 2020. b.

CARDOSO, Rafael M.; MENDONÇA, Dianderson M. H.; SILVA, Weberson P.; SILVA, Murilo N. T.; NOSSOL, Edson; DA SILVA, Rodrigo A. B.; RICHTER, Eduardo M.; MUÑOZ, Rodrigo A. A. 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/j.aca.2018.06.021.

CECCHINI, Michael P.; HONG, Jongin; LIM, Chaesung; CHOO, Jaebum; ALBRECHT, Tim; DEMELLO, Andrew J.; EDEL, Joshua B. Ultrafast surface enhanced resonance raman scattering detection in droplet-based microfluidic systems. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 83, n. 8, p. 3076–3081, 2011. DOI: 10.1021/ac103329b.

CHAN, K. L. Andre.; NIU, X.; DEMELLO, A. J.; KAZARIAN, S. G. Generation of chemical movies: FT-IR spectroscopic imaging of segmented flows. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 83, n. 9, p. 3606–3609, 2011. DOI: 10.1021/ac200497a.

CHAN, K. L. Andrew; KAZARIAN, Sergei G. FT-IR Spectroscopic Imaging of Reactions in Multiphase Flow in Microfluidic Channels. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 84, n. 9, p. 4052–4056, 2012. DOI: 10.1021/ac300019m. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac300019m>.

CHEN, Chengpeng; MEHL, Benjamin T.; MUNSHI, Akash S.; TOWNSEND, Alexandra D.; SPENCE, Dana M.; MARTIN, R. Scott. 3D-printed microfluidic devices: fabrication, advantages and limitations—a mini review. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 8, n. 31, p. 6005–6012, 2016.

CHEN, Chengpeng; WANG, Yimeng; LOCKWOOD, Sarah Y.; SPENCE, Dana M. 3D-printed fluidic devices enable quantitative evaluation of blood components in modified storage solutions for use in transfusion medicine. **Analyst**, [S. l.], v. 139, n. 13, p. 3219–3226, 2014. DOI: 10.1039/c3an02357e.

CHUNG, Chunhui; CHEN, Yann-Jiun; CHEN, Pin-Chaun; CHEN, Chia-Yuan. Fabrication of PDMS passive micromixer by lost-wax casting. **International journal of precision engineering and manufacturing**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 2033–2039, 2015.

CHURSKI, Krzysztof; KAMINSKI, Tomasz S.; JAKIELA, Slawomir; KAMYŚZ, Wojciech; BARANSKA-RYBAK, Wioletta; WEIBEL, Douglas B.; GARSTECKI, Piotr. Rapid screening of antibiotic toxicity in an automated

microdroplet system. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 1629–1637, 2012. DOI: 10.1039/c2lc21284f.

CLAUSELL-TORMOS, Jenifer et al. Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms. **Chemistry and Biology**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 427–437, 2008. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.04.004.

COLLINS, David J.; NEILD, Adrian; DEMELLO, Andrew; LIU, Ai-Qun; AI, Ye. The Poisson distribution and beyond: methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation. **Lab Chip**, [S. l.], p. 3439–3459, 2015. DOI: 10.1039/C5LC00614G. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/lc/c5lc00614g>.

COLTRO, Wendell Karlos Tomazelli; LIMA, Renato Sousa; SEGATO, Thiago Pinotti; CARRILHO, Emanuel; DE JESUS, Dosil Pereira; DO LAGO, Claudimir Lucio; DA SILVA, José Alberto Fracassi. Capacitively coupled contactless conductivity detection on microfluidic systems - Ten years of development. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 25–33, 2012. DOI: 10.1039/c1ay05364g.

COMINA, Germán; SUSKA, Anke; FILIPPINI, Daniel. Low cost lab-on-a-chip prototyping with a consumer grade 3D printer. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 14, n. 16, p. 2978–2982, 2014. DOI: 10.1039/c4lc00394b.

COMINA, Germán; SUSKA, Anke; FILIPPINI, Daniel. 3D printed unibody lab-on-a-chip: Features survey and check-valves integration. **Micromachines**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 437–451, 2015. DOI: 10.3390/mi6040437.

CULBERTSON, Christopher T.; MICKLEBURGH, Tom G.; STEWART-JAMES, Samantha A.; SELLENS, Kathleen A.; PRESSNALL, Melissa. Micro total analysis systems: Fundamental advances and biological applications. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 95–118, 2014. DOI: 10.1021/ac403688g.

DEMELLO, Andrew J. **Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems** *Nature*, 2006. DOI: 10.1038/nature05062.

DICKEY, Cynthia K.; ELMORE, Bill B.; JONES, Francis. Enzyme catalyzed biochemical production in a polydimethylsiloxane microreactor. *In: MICROFLUIDIC DEVICES AND SYSTEMS III 2000*, **Anais** [...]. : International Society for Optics and Photonics, 2000. p. 25–33.

DITTRICH, Petra S.; TACHIKAWA, Kaoru; MANZ, Andreas. Micro Total Analysis Systems. Latest Advancements and Trends. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 78, n. 12, p. 3887–3908, 2006. DOI: 10.1021/ac0605602.

DUARTE, Lucas C.; CHAGAS, Cyro L. S.; RIBEIRO, Luiz E. B.; COLTRO, Wendell K. T. 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**, [S. l.], v. 251, p. 427–432, 2017. DOI: 10.1016/j.snb.2017.05.011. Disponível em:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400517308249>.

DUARTE, Lucas Costa; COLTRO, Wendell Karlos Tomazelli. **Impressão 3D: uma alternativa para fabricação de dispositivos analíticos miniaturizados**. 2016. Universidade Federal de Goiás, [S. l.], 2016. Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/6890>. Acesso em: 24 out. 2020.

DUARTE, Lucas Costa; DE CARVALHO, Thays Colletes; LOBO-JÚNIOR, Eulício Oliveira; ABDELNUR, Patrícia V.; VAZ, Boniek G.; COLTRO, Wendell K. T. 3D printing of microfluidic devices for paper-assisted direct spray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 496–503, 2016. DOI: 10.1039/c5ay03074a.

EL-ALI, Jamil; SORGER, Peter K.; JENSEN, Klavs F. **Cells on chips** *Nature*, 2006. DOI: 10.1038/nature05063.

ERKAL, Jayda L.; SELIMOVIC, Asmira; GROSS, Bethany C.; LOCKWOOD, Sarah Y.; WALTON, Eric L.; MCNAMARA, Stephen; MARTIN, R. Scott; SPENCE, Dana M. 3D printed microfluidic devices with integrated versatile and reusable electrodes. **Lab on a Chip**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1039/c4lc00171k.

FIDALGO, Luis M.; WHYTE, Graeme; RUOTOLO, Brandon T.; BENESCH, Justin L. P.; STENGEL, Florian; ABELL, Chris; ROBINSON, Carol V; HUCK, Wilhelm T. S. Coupling Microdroplet Microreactors with Mass Spectrometry: Reading the Contents of Single Droplets Online. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 48, n. 20, p. 3665–3668, 2009. DOI: 10.1002/anie.200806103. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200806103>.

FOSTER, Christopher W.; DOWN, Michael P.; ZHANG, Yan; JI, Xiaobo; ROWLEY-NEALE, Samuel J.; SMITH, Graham C.; KELLY, Peter J.; BANKS, Craig E. 3D printed graphene based energy storage devices. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, p. 42233, 2017.

FOSTER, K. R.; SCHWAN, H. P. Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review. **Critical reviews in biomedical engineering**, United States, v. 17, n. 1, p. 25–104, 1989.

FRACASSI DA SILVA, José A.; GUZMAN, Norberto; DO LAGO, Claudimir L. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 942, n. 1–2, p. 249–258, 2002. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01380-2.

FROEDER ARCURI, Edna; LIMA DA SILVA, Priscilla Diniz; VASCONCELOS PAIVA BRITO, Maria Aparecida; RENALDI FEITOSA BRITO, José; LANGE, Carla Christine; ANJOS MAGALHÃES, Margarida Maria Dos. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 38, n. 8, 2008.

GAN, Patrick; COMPTON, Richard G.; FOORD, John S. The voltammetry and electroanalysis of some estrogenic compounds at modified diamond electrodes.

Electroanalysis, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 2423–2434, 2013.

GARSTECKI, Piotr; FUERSTMAN, Michael J.; STONE, Howard A.; WHITESIDES, George M. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—scaling and mechanism of break-up. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 437, 2006. DOI: 10.1039/b510841a. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b510841a>.

GAWAD, S.; SCHILD, L.; RENAUD, Ph. Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 76–82, 2001. DOI: 10.1039/B103933B. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/B103933B>.

GAWAD, Shady; CHEUNG, Karen; SEGER, Urban; BERTSCH, Arnaud; RENAUD, Philippe. Dielectric spectroscopy in a micromachined flow cytometer: Theoretical and practical considerations. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 241–251, 2004. DOI: 10.1039/b313761a.

GNANASEKARAN, Karthikeyan; HEIJMANS, T.; VAN BENNEKOM, S.; WOLDHUIS, H.; WIJNIA, S.; DE WITH, G.; FRIEDRICH, H. 3D printing of CNT- and graphene-based conductive polymer nanocomposites by fused deposition modeling. **Applied materials today**, [S. l.], v. 9, p. 21–28, 2017.

GROSS, Bethany C.; ERKAL, Jayda L.; LOCKWOOD, Sarah Y.; CHEN, Chengpeng; SPENCE, Dana M. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 86, n. 7, p. 3240–3253, 2014. DOI: 10.1021/ac403397r.

GROSS, Bethany; LOCKWOOD, Sarah Y.; SPENCE, Dana M. Recent Advances in Analytical Chemistry by 3D Printing. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 89, n. 1, p. 57–70, 2017. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04344. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.6b04344>.

GROUP, Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 94, n. 8, p. 606–616, 2002.

GUCKENBERGER, David J.; DE GROOT, Theodorus E.; WAN, Alwin M. D.; BEEBE, David J.; YOUNG, Edmond W. K. Micromilling: A method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 2364–2378, 2015. DOI: 10.1039/c51c00234f.

GUO, Mingzhao; HU, Xingjian; YANG, Fan; JIAO, Song; WANG, Yujun; ZHAO, Haiyan; LUO, Guangsheng; YU, Huimin. Mixing Performance and Application of a Three-Dimensional Serpentine Microchannel Reactor with a Periodic Vortex-Inducing Structure. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [S. l.], v. 58, n. 29, p. 13357–13365, 2019. DOI: 10.1021/acs.iecr.9b01573. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b01573>.

HAIDER, R.; MARMIROLI, B.; GAVALAS, I.; WOLF, M.; MATTEUCCI, M.; TABORYSKI, R.; BOISEN, A.; STRATAKIS, E.; AMENITSCH, H. Laser ablation and injection moulding as techniques for producing micro channels compatible with Small Angle X-Ray Scattering. **Microelectronic Engineering**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/j.mee.2018.03.015.

HAMZAH, Hairul Hisham; SHAFIEE, Saiful Arifin; ABDALLA, Aya; PATEL, Bhavik Anil. 3D printable conductive materials for the fabrication of electrochemical sensors: A mini review. **Electrochemistry Communications**, [S. l.], v. 96, p. 27–31, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2018.09.006>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248118302212>.

HARRISON, D. Jed; MANZ, Andreas; LÜDI, Hans; WIDMER, H. Michael; FAN, Zhonghui. Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 64, n. 17, p. 1926–1932, 1992. DOI: 10.1021/ac00041a030.

HE, Yong; WU, Yan; FU, Jian-zhong; GAO, Qing; QIU, Jing-jiang. Developments of 3D printing microfluidics and applications in chemistry and biology: a review. **Electroanalysis**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 1658–1678, 2016.

HEIDARIZADEH, Fariba; ABADAST, Fatemeh. Reactions of some nucleophiles with pyrylium salts. **Oriental Journal of Chemistry**, [S. l.], 2011.

HESSEL, Volker; LÖWE, Holger; SCHÖNFELD, Friedhelm. Micromixers— a review on passive and active mixing principles. **Chemical Engineering Science**, [S. l.], v. 60, n. 8, p. 2479–2501, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.11.033>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250904009364>.

HO, Chee Meng Benjamin; NG, Sum Huan; LI, King Ho Holden; YOON, Yong Jin. 3D printed microfluidics for biological applications. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 15, n. 18, p. 3627–3637, 2015. DOI: 10.1039/c5lc00685f.

HO, Eugene Hong Zhuang; AMBROSI, Adriano; PUMERA, Martin. Additive manufacturing of electrochemical interfaces: Simultaneous detection of biomarkers. **Applied Materials Today**, [S. l.], v. 12, p. 43–50, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2018.03.008>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352940718300349>.

HÖLZEL, Ralph. Non-invasive determination of bacterial single cell properties by electrorotation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1450, n. 1, p. 53–60, 1999. DOI: 10.1016/S0167-4889(99)00036-1.

HONEYCHURCH, Kevin C.; RYMANSOIB, Zuhayr; IRAVANI, Pejman. Anodic stripping voltammetric determination of zinc at a 3-D printed carbon nanofiber–graphite–polystyrene electrode using a carbon pseudo-reference electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/j.snb.2018.04.054.

HOQUE, M. Enamul; CHUAN, Y. Leng; PASHBY, Ian. Extrusion based rapid prototyping technique: An advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication. **Biopolymers**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 83–93, 2012. DOI: 10.1002/bip.21701.

HUANG, Shuqiang; SRIMANI, Jaydeep K.; LEE, Anna J.; ZHANG, Ying; LOPATKIN, Allison J.; LEONG, Kam W.; YOU, Lingchong. Dynamic control and quantification of bacterial population dynamics in droplets. **Biomaterials**, [S. l.], v. 61, p. 239–245, 2015. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.05.038. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.038>.

HULLEY, Stephen; GRADY, Deborah; BUSH, Trudy; FURBERG, Curt; HERRINGTON, David; RIGGS, Betty; VITTINGHOFF, Eric; GROUP, Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. **Jama**, [S. l.], v. 280, n. 7, p. 605–613, 1998.

HWANG, Seyeon; REYES, Edgar I.; MOON, Kyoung sik; RUMPF, Raymond C.; KIM, Nam Soo. Thermo-mechanical Characterization of Metal/Polymer Composite Filaments and Printing Parameter Study for Fused Deposition Modeling in the 3D Printing Process. **Journal of Electronic Materials**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 771–777, 2015. DOI: 10.1007/s11664-014-3425-6.

ILIESCU, Ciprian; TAYLOR, Hayden; AVRAM, Marioara; MIAO, Jianmin; FRANSSILA, Sami. A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon I. WHY USE SILICON AND GLASS IN MICRO-AND NANO-FLUIDIC APPLICATIONS? [S. l.], v. 016505, p. 1–16, 2012. DOI: 10.1063/1.3689939.

ILLG, Tobias; HESSEL, Volker; LÖB, Patrick; SCHOUTEN, Jaap C. Novel Process Window for the safe and continuous synthesis of tert.-butyl peroxy pivalate in a micro-reactor. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 167, n. 2, p. 504–509, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.08.081>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138589471000971X>.

JÄHNISCH, Klaus; HESSEL, Volker; LÖWE, Holger; BAERNS, Manfred. Chemistry in microstructured reactors. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 406–446, 2004.

JAKIELA, Slawomir; KAMINSKI, Tomasz S.; CYBULSKI, Olgierd; WEIBEL, Douglas B.; GARSTECKI, Piotr. Bacterial Growth and Adaptation in Microdroplet Chemostats. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 52, n. 34, p. 8908–8911, 2013. DOI: 10.1002/anie.201301524. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201301524>.

JIN, Jing; NGUYEN, Nam Trung. Manipulation schemes and applications of liquid marbles for micro total analysis systems. **Microelectronic Engineering**, [S. l.], v. 197, n. December 2017, p. 87–95, 2018. DOI: 10.1016/j.mee.2018.06.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mee.2018.06.003>.

JOÃO, Afonso F.; CASTRO, Sílvia V. F.; CARDOSO, Rafael M.; GAMELA,

Raimundo R.; ROCHA, Diego P.; RICHTER, Eduardo M.; MUÑOZ, Rodrigo A. A. 3D printing pen using conductive filaments to fabricate affordable electrochemical sensors for trace metal monitoring. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [S. l.], p. 114701, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114701>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572665720309292>.

KAMINSKI, Tomasz S.; SCHELER, Ott; GARSTECKI, Piotr. Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 16, n. 12, p. 2168–2187, 2016. DOI: 10.1039/C6LC00367B.

KANG, Dong-Ku; ALI, M. Monsur; ZHANG, Kaixiang; HUANG, Susan S.; PETERSON, Ellena; DIGMAN, Michelle a; GRATTON, Enrico; ZHAO, Weian. Rapid detection of single bacteria in unprocessed blood using Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection. **Nature communications**, [S. l.], v. 5, p. 5427, 2014. DOI: 10.1038/ncomms6427. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25391809>.

KATRITZKY, Alan R.; MARSON, Charles M. **Pyrylium Mediated Transformations of Primary Amino Groups into Other Functional Groups. New Synthetic Methods (41)Angewandte Chemie International Edition in English**, 1984. DOI: 10.1002/anie.198404201.

KATSELI, Vassiliki; ECONOMOU, Anastasios; KOKKINOS, Christos. Single-step fabrication of an integrated 3D-printed device for electrochemical sensing applications. **Electrochemistry Communications**, [S. l.], v. 103, p. 100–103, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.05.008>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138824811930116X>.

KITSON, Philip J.; MARSHALL, Ross J.; LONG, Deliang; FORGAN, Ross S.; CRONIN, Leroy. 3D printed high-throughput hydrothermal reactionware for discovery, optimization, and scale-up. **Angewandte Chemie - International Edition**, [S. l.], v. 53, n. 47, p. 12723–12728, 2014. DOI: 10.1002/anie.201402654.

KITSON, Philip J.; ROSNES, Mali H.; SANS, Victor; DRAGONE, Vincenza; CRONIN, Leroy. Configurable 3D-Printed millifluidic and microfluidic “lab on a chip” reactionware devices. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 12, n. 18, p. 3267–3271, 2012. DOI: 10.1039/c2lc40761b.

KÖSTER, Sarah et al. Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 1110–1115, 2008. DOI: 10.1039/b802941e. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b802941e>.

KOVARIK, Michelle L.; GACH, Philip C.; ORNOFF, Douglas M.; WANG, Yuli; BALOWSKI, Joseph; FARRAG, Lila; ALLBRITTON, Nancy L. Micro total analysis systems for cell biology and biochemical assays. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 84, n. 2, p. 516–540, 2012. DOI: 10.1021/ac202611x.

KOVARIK, Michelle L.; ORNOFF, Douglas M.; MELVIN, Adam T.; DOBES, Nicholas C.; WANG, Yuli; DICKINSON, Alexandra J.; GACH, Philip C.; SHAH, Pavak K.; ALLBRITTON, Nancy L. Micro total analysis systems:

Fundamental advances and applications in the laboratory, clinic, and field. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 85, n. 2, p. 451–472, 2013. DOI: 10.1021/ac3031543.

KUBA, Pavel; HAUSER, Peter C. Ten years of axial capacitively coupled contactless conductivity detection for CZE – a review. [S. l.], p. 176–188, 2009. DOI: 10.1002/elps.200800478.

KWOK, Sen Wai et al. Electrically conductive filament for 3D-printed circuits and sensors. **Applied Materials Today**, [S. l.], v. 9, p. 167–175, 2017.

LEE, Ke Yau; AMBROSI, Adriano; PUMERA, Martin. 3D-printed Metal Electrodes for Heavy Metals Detection by Anodic Stripping Voltammetry. **Electroanalysis**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1002/elan.201700388.

LEE, Seok Woo; KIM, Dong Sung; LEE, Seung S.; KWON, Tai Hun. A split and recombination micromixer fabricated in a PDMS three-dimensional structure. **Journal of micromechanics and microengineering**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 1067, 2006.

LEUNG, Shee-Ann; WINKLE, Richard F.; WOOTTON, Robert C. R.; DEMELLO, Andrew J. A method for rapid reaction optimisation in continuous-flow microfluidic reactors using online Raman spectroscopic detection. **Analyst**, [S. l.], v. 130, n. 1, p. 46–51, 2005.

LI, Na; GAO, Yan'an; ZHENG, Liqiang; ZHANG, Jin; YU, Li; LI, Xinwei. Studies on the micropolarities of bmimBF₄/TX-100/toluene ionic liquid microemulsions and their behaviors characterized by UV-visible spectroscopy. **Langmuir**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 1091–1097, 2007. DOI: 10.1021/la062480z.

LIN, Yang; GAO, Can; GRITSENKO, Dmitry; ZHOU, Ran; XU, Jie. Soft lithography based on photolithography and two-photon polymerization. **Microfluidics and Nanofluidics**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 97, 2018. DOI: 10.1007/s10404-018-2118-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10404-018-2118-5>.

LIU, X. et al. High-throughput screening of antibiotic-resistant bacteria in picodroplets. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 1636–1643, 2016. DOI: 10.1039/C6LC00180G.

LIU, Ying Zheng; KIM, Byoung Jae; SUNG, Hyung Jin. Two-fluid mixing in a microchannel. **International Journal of Heat and Fluid Flow**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 986–995, 2004. a. DOI: 10.1016/j.ijheatfluidflow.2004.03.006.

LIU, Ying Zheng; KIM, Byoung Jae; SUNG, Hyung Jin. Two-fluid mixing in a microchannel. **International Journal of Heat and Fluid Flow**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 986–995, 2004. b. DOI: 10.1016/j.ijheatfluidflow.2004.03.006.

LOO, Adeline Huiling; CHUA, Chun Kiang; PUMERA, Martin. DNA biosensing with 3D printing technology. **Analyst**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1039/c6an02038k.

LOTTER, Carsten; POEHLER, Elisabeth; HEILAND, Josef J.; MAURITZ,

Laura; BELDER, Detlev. Enantioselective reaction monitoring utilizing two-dimensional heart-cut liquid chromatography on an integrated microfluidic chip. **Lab Chip**, [S. l.], v. 16, n. 24, p. 4648–4652, 2016. DOI: 10.1039/C6LC01138A. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C6LC01138A>.

MACDONALD, Niall P.; CABOT, Joan M.; SMEJKAL, Petr; GUIJT, Rosanne M.; PAULL, Brett; BREADMORE, Michael C. Comparing Microfluidic Performance of Three-Dimensional (3D) Printing Platforms. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 89, n. 7, p. 3858–3866, 2017. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00136.

MALECHA, Karol; GOLONKA, Leszek J.; BAŁDYGA, Jerzy; JASIŃSKA, Magdalena; SOBIESZUK, Paweł. Serpentine microfluidic mixer made in LTCC. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 143, n. 1, p. 400–413, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.08.010>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400509006285>.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 1, n. 1–6, p. 244–248, 1990. DOI: 10.1016/0925-4005(90)80209-I. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/092540059080209I>.

MANZANARES PALENZUELA, C. Lorena; NOVOTNÝ, Filip; KRUPIČKA, Petr; SOFER, Zdeněk; PUMERA, Martin. 3D-printed graphene/polylactic acid electrodes promise high sensitivity in electroanalysis. **Analytical chemistry**, [S. l.], v. 90, n. 9, p. 5753–5757, 2018.

MANZANARES PALENZUELA, C. Lorena; PUMERA, Martin. (Bio)Analytical chemistry enabled by 3D printing: Sensors and biosensorsTrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2018. DOI: 10.1016/j.trac.2018.03.016.

MARMIROLI, Benedetta; GRENCI, Gianluca; CACHO-NERIN, Fernando; SARTORI, Barbara; FERRARI, Enrico; LAGGNER, Peter; BUSINARO, Luca; AMENITSCH, Heinz. Free jet micromixer to study fast chemical reactions by small angle X-ray scattering. **Lab Chip**, [S. l.], v. 9, n. 14, p. 2063–2069, 2009. DOI: 10.1039/B904296B. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/B904296B>.

MATHIESON, Jennifer S.; ROSNES, Mali H.; SANS, Victor; KITSON, Philip J.; CRONIN, Leroy. Continuous parallel ESI-MS analysis of reactions carried out in a bespoke 3D printed device. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, [S. l.], 2013. DOI: 10.3762/bjnano.4.31.

MCCREEDY, Tom. Fabrication techniques and materials commonly used for the production of microreactors and micro total analytical systems. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 396–401, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00176-4). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993699001764>.

MCGRATH, J. S.; HONRADO, C.; SPENCER, D.; HORTON, B.; BRIDLE, H. L.; MORGAN, H. Analysis of Parasitic Protozoa at the Single-cell Level using Microfluidic Impedance Cytometry. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 2601,

2017. DOI: 10.1038/s41598-017-02715-y.

MONAGHAN, T.; HARDING, M. J.; HARRIS, R. A.; FRIEL, R. J.; CHRISTIE, S. D. R. Customisable 3D printed microfluidics for integrated analysis and optimisation. **Lab Chip**, [S. l.], v. 16, n. 17, p. 3362–3373, 2016. DOI: 10.1039/C6LC00562D. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C6LC00562D>.

MOORE, Jason S.; JENSEN, Klavs F. “Batch” kinetics in flow: online IR analysis and continuous control. **Angewandte Chemie**, [S. l.], v. 126, n. 2, p. 480–483, 2014.

MORGAN, Hywel; SUN, Tao; HOLMES, David; GAWAD, Shady; GREEN, Nicolas G. Single cell dielectric spectroscopy. **Journal of Physics D: Applied Physics**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 61–70, 2007. DOI: 10.1088/0022-3727/40/1/S10.

MORTARI, Alessia; ADAMI, Andrea; LORENZELLI, Leandro. An unconventional approach to impedance microbiology: Detection of culture media conductivity variations due to bacteriophage generated lyses of host bacteria. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 67, p. 615–620, 2015. DOI: 10.1016/j.bios.2014.09.075.

MUÑOZ, Jose; PUMERA, Martin. 3D-printed biosensors for electrochemical and optical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 128, p. 115933, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115933>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016599362030162X>.

NGO, Tuan D.; KASHANI, Alireza; IMBALZANO, Gabriele; NGUYEN, Kate T. Q.; HUI, David. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. **Composites Part B: Engineering**, [S. l.], v. 143, p. 172–196, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.02.012>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359836817342944>.

NGUYEN, Nam-Trung; WU, Zhigang. Micromixers{\textemdash}a review. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. R1–R16, 2004. DOI: 10.1088/0960-1317/15/2/r01. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/0960-1317/15/2/r01>.

NIE, Jing; FU, Jian-zhong; SUN, Miao; GAO, Qing; QIU, Jing-jiang; SHAO, Lei; LIU, An; ZHAO, Peng; HE, Yong. 3D printed Lego® -like modular microfluidic devices based on capillary driving. **Biofabrication**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 035001, 2018. DOI: 10.1088/1758-5090/aaadd3.

O’NEIL, Glen D. Toward single-step production of functional electrochemical devices using 3D printing: Progress, challenges, and opportunities. **Current Opinion in Electrochemistry**, [S. l.], v. 20, p. 60–65, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.02.023>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451910320300545>.

O’NEILL, P. F.; BEN AZOUZ, A.; VÁZQUEZ, M.; LIU, J.; MARCZAK, S.;

SLOUKA, Z.; CHANG, H. C.; DIAMOND, D.; BRABAZON, D. Advances in three-dimensional rapid prototyping of microfluidic devices for biological applications. **Biomicrofluidics**, [S. l.], v. 8, n. 5, 2014. DOI: 10.1063/1.4898632.

OTTINO, J. M.; WIGGINS, S. R.; WIGGINS, Stephen; OTTINO, Julio M. Foundations of chaotic mixing. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, [S. l.], v. 362, n. 1818, p. 937–970, 2004. DOI: 10.1098/rsta.2003.1356. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rsta.2003.1356>.

PABIT, Suzette A.; HAGEN, Stephen J. Laminar-Flow Fluid Mixer for Fast Fluorescence Kinetics Studies. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 83, n. 5, p. 2872–2878, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75296-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75296-X). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000634950275296X>.

PATABADIGE, Damith E. W.; JIA, Shu; SIBBITTS, Jay; SADEGHI, Jalal; SELLENS, Kathleen; CULBERTSON, Christopher T. Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Applications. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 320–338, 2016. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04310.

PESSOA DE SANTANA, Phillipe; SEGATO, Thiago Pinotti; CARRILHO, Emanuel; LIMA, Renato Sousa; DOSSI, Nicolò; KAMOGAWA, Marcos Yassuo; GOBBI, Angelo Luiz; PIAZZETA, Maria Helena; PICCIN, Evandro. Fabrication of glass microchannels by xurography for electrophoresis applications. **Analyst**, [S. l.], v. 138, n. 6, p. 1660–1664, 2013. DOI: 10.1039/c3an36540a.

POONOOSAMY, Jenna; SOULAINÉ, Cyprien; BURMEISTER, Alina; DEISSMANN, Guido; BOSBACH, Dirk; ROMAN, Sophie. Microfluidic flow-through reactor and 3D Raman imaging for in situ assessment of mineral reactivity in porous and fractured porous media. **Lab Chip**, [S. l.], v. 20, n. 14, p. 2562–2571, 2020. DOI: 10.1039/D0LC00360C. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/D0LC00360C>.

RIahi, Mohammadreza. Fabrication of a passive 3D mixer using CO2 laser ablation of PMMA and PDMS moldings. **Microchemical Journal**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1016/j.microc.2011.08.002.

ROCHA, Diego P.; SQUISSATO, André L.; DA SILVA, Sarah M.; RICHTER, Eduardo M.; MUNOZ, Rodrigo A. A. Improved electrochemical detection of metals in biological samples using 3D-printed electrode: Chemical/electrochemical treatment exposes carbon-black conductive sites. **Electrochimica Acta**, [S. l.], v. 335, p. 135688, 2020. a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.135688>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468620300797>.

ROCHA, Raquel G.; CARDOSO, Rafael M.; ZAMBIAZI, Priscilla J.; CASTRO, Silvia V. F.; FERRAZ, Thiago V. B.; APARECIDO, Gabriel de O.; BONACIN, Juliano A.; MUNOZ, Rodrigo A. A.; RICHTER, Eduardo M. Production of 3D-printed disposable electrochemical sensors for glucose detection using a conductive filament modified with nickel microparticles. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 1132, p. 1–9, 2020. b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.028>.

Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267020307601>.

ROSSOUW, Jacques E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1001/jama.288.3.321.

RUEPING, Magnus; BOOTWICHA, Teerawut; SUGIONO, Erli. Continuous-flow catalytic asymmetric hydrogenations: Reaction optimization using FTIR inline analysis. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, [S. l.], v. 8, p. 300–307, 2012. DOI: 10.3762/bjoc.8.32.

RYMANSAIB, Zuhayr; IRAVANI, Pejman; EMSLIE, Edward; MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ, Martina; SAK-BOSNAR, Milan; VERDEJO, Raquel; MARKEN, Frank. All-Polystyrene 3D-Printed Electrochemical Device with Embedded Carbon Nanofiber-Graphite-Polystyrene Composite Conductor. **Electroanalysis**, [S. l.], v. 28, n. 7, p. 1517–1523, 2016.

SA'UDE, N.; MASOOD, S. H.; NIKZAD, M.; IBRAHIM, M. Dynamic Mechanical Properties of Copper-ABS Composites for FDM Feedstock. **International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA)**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 1257–1263, 2013. Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Dynamic+Mechanical+Properties+of+Copper-ABS+Composites+for+FDM+Feedstock#0>.

SALENTIJN, G. I. J.; OLESCHUK, R. D.; VERPOORTE, E. 3D-Printed Paper Spray Ionization Cartridge with Integrated Desolvation Feature and Ion Optics. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 89, n. 21, p. 11419–11426, 2017. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b02490. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02490>.

SALENTIJN, Gert I. J.; PERMENTIER, Hjalmar P.; VERPOORTE, Elisabeth. 3D-Printed Paper Spray Ionization Cartridge with Fast Wetting and Continuous Solvent Supply Features. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 86, n. 23, p. 11657–11665, 2014. DOI: 10.1021/ac502785j. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac502785j>.

SARAGIH, Agung Shamsuddin; KO, Tae Jo. Fabrication of passive glass micromixer with third-dimensional feature by employing SU8 mask on micro-abrasive jet machining. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, [S. l.], v. 42, n. 5–6, p. 474–481, 2009.

SCOTTI, Gianmario; NILSSON, Sofia M. E.; HAAPALA, Markus; PÖHÖ, Päivi; BOIJE AF GENNÄS, Gustav; YLI-KAUHALUOMA, Jari; KOTIAHO, Tapio. A miniaturised 3D printed polypropylene reactor for online reaction analysis by mass spectrometry. **Reaction Chemistry and Engineering**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 299–303, 2017. DOI: 10.1039/c7re00015d.

SCOTTI, Gianmario; NILSSON, Sofia M. E.; MATILAINEN, Ville Pekka;

HAAPALA, Markus; BOIJE AF GENNÄS, Gustav; YLI-KAUHALUOMA, Jari; SALMINEN, Antti; KOTIAHO, Tapio. Simple 3D printed stainless steel microreactors for online mass spectrometric analysis. **Heliyon**, [S. l.], v. 5, n. 7, p. 1–7, 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02002.

SELVA, Thiago Matheus Guimarães; DE ARAUJO, William Reis; BACIL, Raphael Prata; PAIXÃO, Thiago Regis Longo Cesar. Study of Electrochemical Oxidation and Quantification of the Pesticide Pirimicarb Using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Electrochimica Acta**, [S. l.], v. 246, p. 588–596, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.06.051>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468617312896>.

SHALLAN, Aliaa I.; SMEJKAL, Petr; CORBAN, Monika; GUIJT, Rosanne M.; BREADMORE, Michael C. Cost-effective three-dimensional printing of visibly transparent microchips within minutes. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 86, n. 6, p. 3124–3130, 2014. DOI: 10.1021/ac4041857.

SHI, Bing; LI, Yuanming; WU, Di; WU, Wenming. A handheld continuous-flow real-time fluorescence qPCR system with a PVC microreactor. **Analyst**, [S. l.], v. 145, n. 7, p. 2767–2773, 2020.

SILVA, Lidya Cardozo Da; PEREIRA, Igor; CARVALHO, Thays Colletes De; ALLOCHIO FILHO, João Francisco; ROMÃO, Wanderson; GONTIJO VAZ, Boniek. Paper spray ionization and portable mass spectrometers: a review. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 999–1013, 2019. DOI: 10.1039/C8AY02270D. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C8AY02270D>.

SILVA, Vinicius A. O. P.; FERNANDES-JUNIOR, Wilson S.; ROCHA, Diego P.; STEFANO, Jéssica S.; MUNOZ, Rodrigo A. A.; BONACIN, Juliano A.; JANEGITZ, Bruno C. 3D-printed reduced graphene oxide/polylactic acid electrodes: A new prototyped platform for sensing and biosensing applications. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 170, p. 112684, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112684>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566320306734>.

SINGH, Ajay K.; KO, Dong-Hyeon; VISHWAKARMA, Niraj K.; JANG, Seungwook; MIN, Kyoung-Ik; KIM, Dong-Pyo. Micro-total envelope system with silicon nanowire separator for safe carcinogenic chemistry. **Nature Communications**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 10741, 2016. DOI: 10.1038/ncomms10741. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms10741>.

SMAJDOR, Joanna; PIECH, Robert; ŁAWRYWIANIEC, Martyna; PACZOSA-BATOR, Beata. Glassy carbon electrode modified with carbon black for sensitive estradiol determination by means of voltammetry and flow injection analysis with amperometric detection. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 544, p. 7–12, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.025>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269717305286>.

SMAJDOR, Joanna; PIECH, Robert; PIĘK, Magdalena; PACZOSA-BATOR, Beata. Sensitive Voltammetric Determination of Ethinyl Estradiol on Carbon Black

Modified Electrode. **Journal of The Electrochemical Society**, [S. l.], v. 164, n. 13, p. H885–H889, 2017. DOI: 10.1149/2.0851713jes.

SONG, Helen; TICE, Joshua D.; ISMAGILOV, Rustem F. A Microfluidic System for Controlling Reaction Networks in Time. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 42, n. 7, p. 768–772, 2003. DOI: 10.1002/anie.200390203. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200390203>.

SPENCER, Daniel; HOLLIS, Veronica; MORGAN, Hywel. Microfluidic impedance cytometry of tumour cells in blood. **Biomicrofluidics**, [S. l.], v. 8, n. 6, 2014. DOI: 10.1063/1.4904405.

SRISA-ART, Monpichar; DEMELLO, Andrew J.; EDEL, Joshua B. High-throughput DNA droplet assays using picoliter reactor volumes. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 79, n. 17, p. 6682–6689, 2007. DOI: 10.1021/ac070987o.

SUKHORUKOV, Vladimir L.; MEEDT, Gustav; KÜRSCHNER, Markus; ZIMMERMANN, Ulrich. A single-shell model for biological cells extended to account for the dielectric anisotropy of the plasma membrane. **Journal of Electrostatics**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 191–204, 2001. DOI: 10.1016/S0304-3886(00)00037-1.

SYMES, Mark D.; KITSON, Philip J.; YAN, Jun; RICHMOND, Craig J.; COOPER, Geoffrey J. T.; BOWMAN, Richard W.; VILBRANDT, Turlif; CRONIN, Leroy. Integrated 3D-printed reactionware for chemical synthesis and analysis. **Nature Chemistry**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 349–354, 2012. DOI: 10.1038/nchem.1313. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchem.1313>.

TEMIZ, Yuksel; LOVCHIK, Robert D.; KAIGALA, Govind V.; DELAMARCHE, Emmanuel. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? **Microelectronic Engineering**, [S. l.], v. 132, p. 156–175, 2015. DOI: 10.1016/j.mee.2014.10.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mee.2014.10.013>.

URAKAWA, Atsushi; TRACHSEL, Franz; VON ROHR, Philipp Rudolf; BAIKER, Alfons. On-chip Raman analysis of heterogeneous catalytic reaction in supercritical CO₂: phase behaviour monitoring and activity profiling. **Analyst**, [S. l.], v. 133, n. 10, p. 1352–1354, 2008. DOI: 10.1039/B808984C. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/B808984C>.

VANĚČKOVÁ, Eva; BOUŠA, Milan; NOVÁKOVÁ LACHMANOVÁ, Štěpánka; RATHOUSKÝ, Jiří; GÁL, Miroslav; SEBECHLEBSKÁ, Táňa; KOLIVOŠKA, Viliam. 3D printed polylactic acid/carbon black electrodes with nearly ideal electrochemical behaviour. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 857, p. 113745, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113745>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572665719310136>.

VIJAYENDRAN, Ravi A.; MOTSEGOOD, Kathleen M.; BEEBE, David J.;

LECKBAND, Deborah E. Evaluation of a Three-Dimensional Micromixer in a Surface-Based Biosensor. **Langmuir**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 1824–1828, 2003. DOI: 10.1021/la0262250. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la0262250>.

VILKNER, Torsten; JANASEK, Dirk; MANZ, Andreas. Micro Total Analysis Systems. Recent Developments. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 76, n. 12, p. 3373–3386, 2004. DOI: 10.1021/ac040063q.

WAHEED, Sidra; CABOT, Joan M.; MACDONALD, Niall P.; LEWIS, Trevor; GUIJT, Rosanne M.; PAULL, Brett; BREADMORE, Michael C. 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers. **Lab Chip**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 1993–2013, 2016. DOI: 10.1039/C6LC00284F. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6LC00284F>.

WALICZEK, Mateusz; KIJEWSKA, Monika; RUDOWSKA, Magdalena; SETNER, Bartosz; STEFANOWICZ, Piotr; SZEWCZUK, Zbigniew. Peptides Labeled with Pyridinium Salts for Sensitive Detection and Sequencing by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Scientific Reports**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1038/srep37720.

WELCH, Christopher J.; GONG, Xiaoyi; CUFF, James; DOLMAN, Sarah; NYROP, Jason; LIN, Fiona; ROGERS, Hallena. Online Analysis of Flowing Streams Using Microflow HPLC. **Organic Process Research & Development**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 1022–1025, 2009. DOI: 10.1021/op9001017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/op9001017>.

WEST, Jonathan; BECKER, Marco; TOMBRINK, Sven; MANZ, Andreas. Micro Total Analysis Systems: Latest Achievements. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 80, n. 12, p. 4403–4419, 2008. DOI: 10.1021/ac800680j.

YANG, Jun; QI, Li; CHEN, Yi; MA, Huimin. Design and Fabrication of a Three Dimensional Spiral Micromixer. **Chinese Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 209–214, 2013. DOI: 10.1002/cjoc.201200922. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cjoc.201200922>.

YAP, C. Y.; CHUA, C. K.; DONG, Z. L.; LIU, Z. H.; ZHANG, D. Q.; LOH, L. E.; SING, S. L. **Review of selective laser melting: Materials and applications** *Applied Physics Reviews*, 2015. DOI: 10.1063/1.4935926.

YI, Mingqiang; BAU, Haim H. The kinematics of bend-induced mixing in micro-conduits. **International Journal of Heat and Fluid Flow**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 645–656, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-727X\(03\)00026-2](https://doi.org/10.1016/S0142-727X(03)00026-2). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142727X03000262>.

YUE, Jun; FALKE, Floris H.; SCHOUTEN, Jaap C.; NIJHUIS, T. Alexander. Microreactors with integrated UV/Vis spectroscopic detection for online process analysis under segmented flow. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 13, n. 24, p. 4855–4863, 2013.

ZAFIR MOHAMAD NASIR, Muhammad; NOVOTNÝ, Filip; ALDUHAISH,

Osamah; PUMERA, Martin. 3D-printed electrodes for the detection of mycotoxins in food. **Electrochemistry Communications**, [S. l.], v. 115, p. 106735, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106735>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248120300862>.

ZHANG, Jie; YANG, Bin; FU, Feng; YOU, Fusheng; DONG, Xiuzhen; DAI, Meng. Resistivity and its anisotropy characterization of 3D-printed acrylonitrile butadiene styrene copolymer (ABS)/carbon black (CB) composites. **Applied Sciences**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 20, 2017.

ZHANG, Shuai; CHEN, Xueye. Secondary bonding of PMMA micromixer with high-pressure. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 144, p. 339–344, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.09.026>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X18310920>.

ZHAO, Chen; WANG, Caiyun; GORKIN, Robert; BEIRNE, Stephen; SHU, Kewei; WALLACE, Gordon G. Three dimensional (3D) printed electrodes for interdigitated supercapacitors. **Electrochemistry Communications**, [S. l.], v. 41, p. 20–23, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.01.013>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248114000216>.

ZHU, Ying; FANG, Qun. Integrated droplet analysis system with electrospray ionization-mass spectrometry using a hydrophilic tongue-based droplet extraction interface. **Analytical Chemistry**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1021/ac101902c.

Súmula curricular

Nome completo: Lucas da Costa Duarte

Dados pessoais

Filiação Geraldo do Carmo Duarte e Maria de Fatima Costa Duarte

Nascimento 19/02/1991 - Goiânia/GO - Brasil

Endereço eletrônico: lucascd@outlook.com

Formação acadêmica/titulação

- 2016** Doutorado em Química.
Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiania, Brasil
Orientador: Wendell Karlos Tomazelli Coltro
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2014 - 2016** Mestrado em Química.
Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiania, Brasil
Título: Impressão 3D: uma alternativa para fabricação de dispositivos analíticos miniaturizados, Ano de obtenção: 2016
Orientador: Wendell Karlos Tomazelli Coltro
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Palavras-chave: microfluídica, impressão 3D, espectrometria de massas, droplets, microfabricação, detecção condutométrica sem contato
Áreas do conhecimento: Instrumentação Analítica
- 2009 - 2013** Graduação em Química Industrial.
Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiania, Brasil

Atuação profissional

1. Instituto federal de Goiás - IFG

Vínculo institucional

2018 - 2018 Enquadramento funcional: Professor Substituto, Carga horária: 40

2. Universidade Federal de Goiás - UFG

Vínculo institucional

- 2016 - 2016** Vínculo: Voluntário- Cursinho Federal Goiás, Enquadramento funcional: Professor, Regime: Parcial
- 2016 - Atual** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Doutorado, Carga horária: 40, Regime: Integral
- 2015 - 2015** Vínculo: Voluntário- Cursinho Faz Arte, Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 15, Regime: Parcial
- 2014 - 2016** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
- 2012 - 2013** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico, Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2010 - 2012** Vínculo: Aluno de graduação, Enquadramento funcional: Iniciação Científica Voluntária, Carga horária: 12, Regime: Parcial
- Outras informações:
Participante em Projeto de Pesquisa na área de Microfluídica.
-

Atividades

- 06/2010 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química
Linhas de pesquisa:
Química Analítica, Instrumentação Analítica, Microfabricação, Eletroforese, Microfluídica

3. Instituto de Ciências Farmacêuticas de Estudos e Pesquisas - ICF

Vínculo institucional

- 2013 - 2013** Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Estágio em equivalência farmacêutica, Carga horária: 30, Regime: Parcial
-

Prêmios e títulos

- 2019** VI Prêmio SBPC/GO de Popularização da Ciência 2019, Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência – Regional Goiás
- 2018** Prêmio de melhor trabalho de Química Analítica apresentado na 41^a
-

RASBQ, Sociedade Brasileira de Química

- 2017** Tony B. Academic Travel Award Winners, SLAS 2017, Washington, DC, USA., Society for Laboratory Automation and Screening
- 2015** Trabalho capa da revista Electrophoresis, volume 36, edição 16, ano 2015. Trabalho: Hand drawing of pencil electrodes on paper platforms for contactless conductivity detection of inorganic cations in human tear samples using electrophoresis chips. Chagas, C. L. S.; **Duarte, L. C.**; Lobo-Júnior, E. O.; Piccin, E.; Dossi, N.; Coltro, W. K. T.
- 2013** I Prêmio UFG de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, Universidade Federal de Goiás

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. CHAVES, IGOR L.; **DUARTE, LUCAS C.**; COLTRO, WENDELL K.T.; SANTOS, DYRNEY A. Droplet Length and Generation Rate Investigation inside Microfluidic Devices by means of CFD simulations and Experiments. CHEMICAL ENGINEERING RESEARCH & DESIGN. v. 161, p. 260-270, 2020.
2. LOBO'JÚNIOR, EULÍCIO O.; CHAGAS, CYRO L. S.; **DUARTE, LUCAS C.**; CARDOSO, THIAGO M. G.; SOUZA, FABRÍCIO R.; LIMA, RENATO S.; COLTRO, WENDELL K. T. Inexpensive and nonconventional fabrication of microfluidic devices in PMMA based on a soft-embossing protocol. ELECTROPHORESIS. v. 41, p. 1641-1650, 2020.
3. SOUSA, LUCAS R.; **DUARTE, LUCAS C.**; COLTRO, WENDELL 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.
4. DE CASTRO, LUCAS F.; DE FREITAS, SORAIA V.; **DUARTE, LUCAS C.**; DE SOUZA, JOÃO ANTÔNIO C.; PAIXÃO, THIAGO R. L. C.; COLTRO, WENDELL K. T. Salivary diagnostics on paper microfluidic devices and their use as wearable sensors for glucose monitoring. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY., v.411, p.4919 - 4928, 2019.
5. **DUARTE, LUCAS C.**; FIGUEREDO, FEDERICO; RIBEIRO, LUIZ E.B.; CORTÓN, EDUARDO; COLTRO, WENDELL K.T. Label-free counting of Escherichia coli cells in nanoliter droplets using 3D printed microfluidic devices with integrated contactless conductivity detection. ANALYTICA CHIMICA ACTA., v.1071, p.36 - 43, 2019.

6. **DUARTE, LUCAS C.**; CHAGAS, CYRO L.S.; RIBEIRO, LUIZ E.B.; COLTRO, WENDELL K.T. 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.

7. **DUARTE, LUCAS COSTA**; COLLETES DE CARVALHO, THAYS; LOBO-JÚNIOR, EULÍCIO OLIVEIRA; ABDELNUR, PATRÍCIA V.; VAZ, BONIEK G.; COLTRO, WENDELL K. T. 3D printing of microfluidic devices for paper-assisted direct spray ionization mass spectrometry. *Analytical Methods.* v.8, p.496 - 503, 2016.

8. DIAS, ANDERSON A.; CARDOSO, THIAGO M.G.; CARDOSO, RAFAEL M.; **DUARTE, LUCAS C.**; MUÑOZ, RODRIGO A.A.; RICHTER, EDUARDO M.; COLTRO, WENDELL K.T. Paper-based enzymatic reactors for batch injection analysis of glucose on 3D printed cell coupled with amperometric detection. *Sensors and Actuators. B, Chemical.* v.226, p.196 - 203, 2016.

9. CHAGAS, CYRO L. S.; **DUARTE, LUCAS DA COSTA**; DE OLIVEIRA LOBO, EULÍCIO; PICCIN, EVANDRO; DOSSI, NICOLÒ; COLTRO, WENDELL K. T. Hand drawing of pencil electrodes on paper platforms for contactless conductivity detection of inorganic cations in human tear samples using electrophoresis chips. *Electrophoresis (Weinheim. Print).* v.36, p.1837 - 1844, 2015.

10. LOBO JÚNIOR, EULÍCIO DE OLIVEIRA; **DUARTE, LUCAS DA COSTA**; PAULA BRAGA, LAURA EULÁLIA DE; GOBBI, ÂNGELO LUIZ; DE JESUS, DOSIL PEREIRA; COLTRO, WENDELL KARLOS TOMAZELLI. High fidelity prototyping of PDMS electrophoresis microchips using laser-printed masters. *Microsystem Technologies.* v.21, p.1345 - 1352, 2015.

Capítulo de livro

1. Pinheiro, Kemilly M.P.; REZENDE, KARIOLANDA C.A.; **DUARTE, LUCAS C.**; **DUARTE-JUNIOR, GERSON F.**; Coltro, Wendell K.T. Contactless conductivity detection on lab-on-a-chip devices: A simple, inexpensive, and powerful analytical tool for microfluidic applications. *Handbook on Miniaturization in Analytical Chemistry*, 1ed. New York: Elsevier, 2020, v., p. 155-183.

Artigos em fase de redação

1. **DUARTE, LUCAS C.**; SILVA, IGOR P.; MACIEL, LANAIA I. L.; VAZ, BONIEK G. COLTRO, WENDELL K. T. 3D printed micro-reactor for real-time monitoring of organic reactions by direct spray ionization mass spectrometry

2. ROCHA, DANIELLY S.; **DUARTE, LUCAS C.**; SILVA-NETO, HABDIAS A.; CHAGAS, CYRO L.S.; SANTANA, MÁRIO H. P.; ANTONIOSI FILHO, NELSON R.; COLTRO, WENDELL K. T. Electrochemical sandpaper-based devices assembled on a reusable 3D-printed holder to detect date rape drug in beverages