

**Universidade Federal de Goiás**  
**Instituto de Química**

**Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos em poliéster-toner  
para diagnósticos clínicos com detecção colorimétrica**

**Fabício Ribeiro de Souza**

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

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro

Goiânia-GO  
2013

“Nossas dádivas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse pelo medo de tentar.” (William Shakespeare)

***Dedico este trabalho***

*Aos meus Pais, Valdicésio e Lucília, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. E ao meu Filho Eduardo, que mostrou que com um sorriso é fácil mandar a tristeza embora e que com um abraço nada é capaz de nos atingir.*

## **Agradecimentos**

Logicamente, meu primeiro muito obrigado vai para os meus Pais, porque sem eles não seria nada fácil essa caminhada até aqui. Sei muito bem as coisas que Vocês tiveram que abrir mão na vida para que eu pudesse estar aqui.

Ao meu amigo orientador Wendell Karlos Tomazelli Coltro pelos inúmeros ensinamentos. Por ser um amigo, quando poderia ser apenas meu orientador, pelos momentos que passou escutando minhas reclamações da vida, pelos conselhos, por dar aquelas injeções de ânimo que melhoram muito o ritmo dos estudos, pelas oportunidades criadas em sua presença, por aqueles quatro ou cinco artigos que a gente sempre volta na mão quando vai à sala dele tirar dúvidas, pelas divertidas reuniões de grupo e por querer sempre o nosso bem-estar e alegria. E não é por menos que te chamo de Pai, porque te respeito muito e tenho aprendido coisas que estarão sempre presentes em minha vida.

E aproveitando a sequência, agradecer a Mãe, Monise Coltro. Sempre alegre e despreocupada, e sempre que pode, acompanhando a gente nas atividades fora do laboratório. E, lógico, agradecer também pelos conselhos amorosos, hehe. Sempre querendo casar todo mundo do laboratório.

Aos meus amigos do GME, por aguentarem os meus enjos e pegação no pé: Ellen Flávia, Karoliny Almeida, Laura Eulália (Gorette), Paula Medrado (Paula pequena), Camila Benevides (“Mas Eulício...”), Paulo de Tarso (Paulo Paulada), Gerson Junior (“My name is Gerson. Gerson Junior”), Eulício (Ridículo), Lucas (Luquete, que rima com...), Thiago Miguel (Presunto), Anderson (Gayucho), Roger (Roger do LAMES) e o João Bruno (Juliette Bravo).

Um agradecimento muito especial para a Ellen Flávia (baratinha), por todo incentivo que até hoje me passa, pela presença sempre ao meu lado, pelas palavras amigas e por ensinamentos que irei carregar por toda a minha vida. E por me proporcionar a chance de conhecer pessoas maravilhosas como sua mãe, Shirley Moreira, seu padrasto, Claudio Diniz e

seu irmão Willian Moreira, cujos quais jamais perderei a amizade, haja o que houver.

Aos meus amigos do decorrer da graduação Ramon (Baraka), Luís Henrique (Salsicha), Laís Brito, Joyci, Larissa Duarte (Jibóia), Thiago Custódio (Bomba), Camilla (que descobriu o fragmento CamiLafferty, na disciplina de elucidação de estruturas), ao casal Jerônimo e Naiara, ao casal Thiago (Biscate) e Karol Guimarães (ou Karol Ypioca), Gustavo (Pagodeiro), ao casal Lorena e Elenilson, Diego (Emo), Caio César, Hélio (Fruta), Bruno (de São Paulo), Jessé, Eduardo Nascimento e por muitos outros mais, por todos os momentos de alegria, farras, incentivo e estudo.

As senhoritas Weine Azevedo (minha melhor cunhada), Kelly e Maria Carolina, ao Tiago (Tiaguera) e sua esposa Brenda pela amizade construída ao longo da graduação e pós-graduação. Sem dúvidas você fazem muita diferença para mim.

A tia Sandra e o Gordo (Alexandre), que para mim são como pais também. Porque são pessoas que respeito muito e desde o meu ensino médio trazem muita alegria e incentivo para minha vida. E, não posso esquecer, das minhas irmãs Fernanda, Gabriela e Débora que eu amo demais, muito obrigado por todos os momentos juntos e toda preocupação que sempre tiveram comigo.

Ao meu primeiro e grande amigo Celso Ricardo (Bugiu), que para mim é um exemplo de vida e superação. Nossa amizade começou a mais ou menos 18 anos atrás, lá no Colégio Pardal. A sua mãe, Rita de Cassia, que acabei adotando como minha mãe também e ao seu irmão Iuri (ou Bugiu Mirim). Muito obrigado por todo exemplo que me passam até hoje.

Aos meus amigos Rafael Gomes e seu pai, Oliveira Gomes, por me ensinarem as maravilhas da pescaria e pelas inúmeras viagens a Serra da Mesa e ao Araguaia. E por sempre entenderem as minhas ausências devido a correria da faculdade.

A tia Dulce, diretora do Colégio pardal desde quando comecei a estudar lá. Sem dúvida seu incentivo ao longo do primário, ensino fundamental e ensino médio convergiram na minha aprovação na

Universidade Federal de Goiás. Sem dúvidas eu só cheguei aqui porque tive um incentivo muito grande da sua parte.

A toda minha família, 11 Tios por parte de mãe e 8 Tios por parte de pai, e mais umas dezenas de primos em todos os graus. Meu muito obrigado por tudo que vocês me fizeram e proporcionaram até aqui, foi muito importante para mim.

Ao Emanuel Carrilho (o Avô) e ao Sergio Machado por terem contribuído com ideias, dicas, e sugestões que melhoraram a qualidade deste trabalho.

Ao Instituto de Química e todos os docentes, técnicos de laboratórios e administrativos e a minha grande Madrinha Maria Inês.

Aos órgãos de fomento FUNAPE, FAPEG, CNPq e o INCTBio pelos auxílios financeiros.

A CAPES pela bolsa concedida, que é um incentivo muito bom para que jovens pesquisadores como eu, possam dedicar mais aos estudos.

E por fim, a todas as pessoas que contribuíram de qualquer maneira para que hoje eu estivesse aqui.

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS .....	v
LISTA DE SÍMBOLOS .....	vi
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. Introdução .....	1
1.1. Miniaturização .....	1
1.2. Microfluídica .....	4
1.3. Microfluídica em plataformas descartáveis.....	5
1.4. Transporte microfluídico .....	8
1.4.1. Forças eletrocinéticas .....	9
1.4.2. Forças hidrodinâmicas .....	10
1.4.3. Forças Capilares .....	11
1.5. Análise colorimétrica .....	12
1.6. Diagnósticos clínicos .....	14
1.6.1. Proteínas totais .....	15
1.6.2. Glicose .....	16
1.6.3. Colesterol .....	17
1.6.4. Triglicerídeos.....	19
2. Objetivos .....	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos Específicos .....	20

3. Procedimento Experimental .....	21
3.1. Materiais e reagentes .....	21
3.2. Preparo das soluções.....	21
3.3. Fabricação dos dispositivos microfluídicos.....	23
3.3.1. Zonas Impressas – Geração I.....	24
3.3.2. Dispositivo microfluídico integrado – Geração II .....	24
3.3.3. Dispositivo microfluídico integrado – Geração III .....	26
3.4. Detecção colorimétrica .....	27
<b>4. Resultados e discussão.....</b>	<b>29</b>
4.1. Comparação dos equipamentos eletrônicos para detecção colorimétrica 29	
4.2. Detecção colorimétrica utilizando o <i>scanner</i> .....	32
4.2.1. Sistema de detecção CCD .....	32
4.2.3. Detecção de Fe <sup>2+</sup> em medicamentos .....	36
4.3. Ação da força capilar no interior do canal microfluídico .....	40
4.4. Corte da folha de transparência intermediária.....	45
4.5. Ensaio colorimétricos.....	47
4.6. Robustez analítica .....	56
4.7. Análise semi-quantitativa em amostra artificial de soro humano.....	61
4.7.1. Teste de recuperação para o ensaio de glicose.....	63
4.8. Avaliação do custo de fabricação e utilização dos DPTs .....	63
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>67</b>
<b>6. Perspectivas futuras .....</b>	<b>69</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>71</b>

<b>8. Curriculum Vitae</b> .....	<b>78</b>
----------------------------------	-----------

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Micrografias ópticas demonstrando o desenvolvimento de cor para bioensaio de (A) colesterol, (B) glicose, (C) proteínas totais e (D) triglicerídeos.....	13
<b>Figura 2.</b> Representação da configuração do DPT-Geração I com nove zonas de detecção impressas.....	24
<b>Figura 3.</b> Representação do processo de fabricação dos dispositivos microfluídicos integrados em (A) 3D e (B) seção transversal. Em (C), é representado o DPT (Geração-II) pronto, exemplificando seu uso para conduzir os bioensaios.....	25
<b>Figura 4.</b> Imagem da terceira geração dos dispositivos microfluídicos...	26
<b>Figura 5.</b> Equipamentos comerciais avaliados para conduzir a detecção colorimétrica.....	27
<b>Figura 6.</b> Exemplo da zona de detecção selecionada com a máscara e do histograma gerado em função da área selecionada.....	28
<b>Figura 7.</b> Curvas analíticas para cada dispositivo avaliado. As equações obtidas da regressão linear de cada curva são: $y_{\text{microscópio}} = 1,656 + 2,078 \times [\text{corante}]$ ; $y_{\text{câmara digital}} = -0,462 + 0,609 \times [\text{corante}]$ ; $y_{\text{câmara celular}} = 1,889 + 1,558 \times [\text{corante}]$ ; $y_{\text{scanner}} = -1,645 + 1,699 \times [\text{corante}]$ .....	30
<b>Figura 8.</b> Informações colorimétricas durante 50 leituras consecutivas. Cada ponto representa duas leituras consecutivas do detector.....	33
<b>Figura 9.</b> Variação da intensidade de pixels com o tamanho da máscara utilizada.....	36
<b>Figura 10.</b> Estrutura molecular de (A) 1,10-fenantrolina e (B) complexo ferroína.....	37
<b>Figura 11.</b> Curvas analíticas obtidas com (A) espectrofotômetro, (B) <i>scanner</i> – CMYK e (C) <i>scanner</i> – RGB. As equações obtidas das curvas foram: $y_{\text{espectrofotômetro}} = 0,0007 + 0,1391 \times [\text{Fe}^{2+}]$ ; $y_{\text{scanner – CMYK}} = 0,5728 + 4,4659 \times [\text{Fe}^{2+}]$ ; e $y_{\text{scanner – RGB}} = 1,1318 + 4,8747 \times [\text{Fe}^{2+}]$ .....	38
<b>Figura 12.</b> Correlação entre as concentrações detectadas nas duas técnicas. Em (A) utilizou-se o canal de cor CMYK e em (B) o canal RGB.....	39

<b>Figura 13.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) ilustrando a secção transversal dos canais microfluídicos definidos pela barreira de toner.....	<b>41</b>
<b>Figura 14.</b> Medida da magnitude do fluxo capilar utilizando-se um detector C <sup>4</sup> D.....	<b>42</b>
<b>Figura 15.</b> Monitoramento da resposta condutométrica no transporte capilar da solução em microcanais definidos em PT.....	<b>43</b>
<b>Figura 16.</b> Efeito do (A) volume de injeção e da (B) largura do canal na vazão do fluxo induzido por força capilar. Em (A) foi utilizado um canal de 0,5 mm e em (B) o volume adicionado na zona central foi igual a 10 µL.....	<b>44</b>
<b>Figura 17.</b> Micrografias ópticas da peça intermediária produzida pelo corte com laser e com estilete.....	<b>46</b>
<b>Figura 18.</b> Micrografias ópticas do formato da gota de água com as superfícies de PDMS, poliéster e vidro.....	<b>48</b>
<b>Figura 19.</b> Micrografias ópticas mostrando as superfícies antes a após a adição de celulose.....	<b>49</b>
<b>Figura 20.</b> Imagens obtidas mostrando a repetibilidade dos ensaios colorimétricos para (A) colesterol, (B) glicose, (C) proteínas totais e (D) triglicerídeos.....	<b>50</b>
<b>Figura 21.</b> Ensaio simultâneo com mistura padrão contendo colesterol, glicose, proteínas totais e triglicerídeos.....	<b>53</b>
<b>Figura 22.</b> Curvas analíticas para (A) colesterol, (B) proteínas totais, (C) triglicerídeos e (D) glicose. Em todas as curvas o valor da leitura do branco foi subtraído das medidas. As equações obtidas das curvas foram: $y_{\text{colesterol}} = 0,167 + 35,500 \times [\text{colesterol}]$ ; $y_{\text{proteínas}} = 0,974 + 0,861 \times [\text{proteínas}]$ ; $y_{\text{triglicerídeos}} = 1,004 + 26,399 \times [\text{triglicerídeos}]$ ; $y_{\text{glicose}} = 0,500 + 38,988 \times [\text{glicose}]$ . Para todas as curvas o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi igual a 0,997.....	<b>55</b>
<b>Figura 23.</b> Imagens obtidas para comparação entre dispositivos utilizando mistura padrão de glicose, colesterol e proteínas totais.....	<b>57</b>
<b>Figura 24.</b> Dispersão nas leituras realizadas para o ensaio de glicose e para o branco. Cada ponto representa a média de 6 leituras para a glicose e 2 leituras para o branco.....	<b>58</b>

<b>Figura 25.</b> Avaliação da atividade enzimática em (A) 10 °C, (B) 25 °C e (C) 40 °C, com e sem adição de trealose.....	<b>60</b>
<b>Figura 26.</b> Decaimento na intensidade média de pixels após três séries de diluições. As intensidades obtidas para cada bioensaio foi calculada a partir da média de quatro leituras.....	<b>62</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros obtidos para os quatro equipamentos eletrônicos.....	<b>31</b>
<b>Tabela 2.</b> Intensidade dos pixels nas diferentes resoluções.....	<b>34</b>
<b>Tabela 3.</b> Valores de concentração determinados nas duas amostras de medicamento.....	<b>39</b>
<b>Tabela 4.</b> Intensidade média de pixels.....	<b>51</b>
<b>Tabela 5.</b> Média de intensidades de pixel para os bioensaios simultâneos em três dispositivos diferentes.....	<b>57</b>
<b>Tabela 6.</b> Análise de variância para o ensaio de glicose.....	<b>58</b>
<b>Tabela 7.</b> Análise semi-quantitativa de glicose, colesterol e proteínas totais em uma amostra artificial de soro humano.....	<b>62</b>
<b>Tabela 8.</b> Custo de fabricação de um DPT.....	<b>64</b>
<b>Tabela 9.</b> Laboratório especializado <i>versus</i> DPTs.....	<b>65</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AKD	<i>Alkyl ketene dimer</i> (dímero de Alquilceteno)
ANOVA	Análise de Variância
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Adenosina trifosfato)
AVC	Acidente vascular cerebral
C <sup>4</sup> D	Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente
CCD	<i>Coupled Charge Device</i> (Dispositivo de Carga Acoplada)
CT	Colesterol total
DCV	Doença cardiovascular
ddp	Diferença de potencial
dpi	<i>Dots per inch</i> (pontos por polegada)
DPR	Desvio padrão relativo
DPTs	Dispositivos em poliéster-toner
DT 1	Diabetes Tipo 1
DT 2	Diabetes Tipo 2
Fen	1,10-fenantrolina
FEO	Fluxo eletrosmótico
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
HP	Hewlett-Packard
LD	Limite de detecção
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)
MP	Mega Pixels
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PN	Pressão negativa
PP	Pressão positiva
SMS	<i>Short Message Service</i>
μTAS	<i>Micro Total Analysis Systems</i>
TG	Triglicerídeos
U.R.	Unidades Relativas
USB	Universal Serial Bus
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

$Kat$	Katal (atividade enzimática)
$U$	Unidades de enzima
$Da$	Dalton
$Hz$	Hertz
$Q$	Vazão do fluido
$\Delta P$	Diferença de pressão
$R_F$	Resistência fluídica
$\eta$	Viscosidade
$a$	Altura do canal
$b$	Largura do canal
$L$	Comprimento do canal
$R_h$	Raio hidráulico do canal
$E$	Campo elétrico

## RESUMO

O presente trabalho descreve a construção de dispositivos em poliéster-toner (DPTs) minimamente instrumentados para conduzir, pela primeira vez, diagnósticos clínicos utilizando detecção colorimétrica e transporte microfluídico com ação capilar. Uma câmera digital convencional, uma câmera de celular, um microscópio óptico e o modo *scanner* de uma impressora multifuncional foram avaliados como detectores colorimétricos. No estudo do desempenho analítico utilizou-se uma plataforma com nove zonas de detecção impressas diretamente em uma folha de poliéster. Todos os dispositivos eletrônicos avaliados podem ser aplicados como detector colorimétrico. Entretanto, o *scanner* demonstrou facilidade no controle dos dois problemas que dificultam a aquisição das imagens: quantidade de luz do ambiente e foco. Frente a essa facilidade, realizou-se um estudo comparando o desempenho analítico do *scanner* em relação a um espectrofotômetro, utilizando a determinação de  $\text{Fe}^{2+}$  pelo método da 1,10-fenantrolina. Cálculos estatísticos foram realizados e não foram observadas diferenças significativas entre o desempenho analítico dos equipamentos ( $P=0,05$ ). Após, a avaliação do desempenho analítico, o *scanner* foi escolhido para monitorar a resposta colorimétrica dos ensaios clínicos de glicose, proteínas totais, colesterol e triglicerídeos, usando os DPTs. O dispositivo proposto apresentou boa repetibilidade inter e intra-dispositivos com desvio padrão relativo abaixo de 6%. Uma análise semi-quantitativa para glicose, proteínas totais e colesterol foi conduzida utilizando uma amostra de soro humano artificial. Os níveis de concentração encontrados estavam de acordo com os dados fornecidos pelo fabricante. O tempo de meia-vida dos DPTs foi avaliado ao longo de cinco dias, utilizando o ensaio para glicose em diferentes temperaturas: 10 °C, 25 °C e 40 °C. A meia-vida dos DPTs foi estimado em três dias, considerando que nesse período houve um decréscimo de 50% na intensidade média de pixels, da cor desenvolvida. Observou-se que a adição de um dissacarídeo (trealose) assegurou a estabilidade enzimática em diferentes temperaturas ao longo de cinco dias consecutivos. O custo total de um DPT, considerando o processo de fabricação, foi estimado em R\$ 0,40.

## ABSTRACT

This report describes the fabrication of a minimally instrumented polyester-toner device (PTD) to perform by the first time, clinical diagnostics with colorimetric detection and microfluidic transport by capillary action. A conventional digital camera, a cellphone camera, an optical microscope, and a scanner mode from a multifunction printer were evaluated for using as colorimetric detector. In order to study the analytical performance it was used a platform containing nine detection zones directly printed on a polyester film. It has been observed that all electronic devices studied could be applied as colorimetric detector. However, the scanner exhibited the best performance on the control of two problems often observed in the images acquisition, which are related to the ambient light and focus. Due to the best results, the analytical feasibility of the scanner was evaluated for the determination of  $\text{Fe}^{2+}$  in drugs samples by using the 1,10-phenanthroline method. The data were compared to results achieved by a reference spectrophotometric method. Based on a statistical analysis, it was not been found significance differences ( $P=0,05$ ). Afterwards, the scanner was chosen to monitor the colorimetric response of clinical assays regarded to the detection of glucose, total protein, cholesterol, and triglycerides on a PTD. The proposed device exhibited good inter and intra-device reproducibility (relative standard deviation values lower than 6%). A semi-quantitative analysis of glucose, total protein, and cholesterol in an artificial serum sample provided results similar to the data provide by the supplier. The shelf life of PTDs was evaluated in a period of five days, using the glucose assay at three different temperature: 10 °C, 25 °C e 40 °C. The shelf life was estimated to be c.a. three days, taking into account that in this period there was a lost of 50% in the mean color intensity. Lastly, it was observed that the addition of a disaccharide (trehalose) ensures the enzymatic stability at the different temperatures during five consecutive days. The cost of a PTD has been estimated to be ca. R\$ 0.40 taking into account the fabrication process.

## 1. Introdução

### 1.1. Miniaturização

Nas duas últimas décadas observou-se um crescente avanço no desenvolvimento de sistemas analíticos miniaturizados. No campo da química analítica moderna esse processo de miniaturização tem se intensificado bastante. Em 1990, Manz e colaboradores ([MANZ, GRABER e WIDMER, 1990](#)) introduziram o conceito de microssistemas para análises totais ( $\mu$ TAS, do inglês Micro Total Analysis Systems), que também ficou conhecido pelo termo *lab-on-a-chip*. O objetivo desse novo conceito foi expressar a ideia de desenvolver várias etapas analíticas dentro de um chip ([NGE, ROGERS e WOOLLEY, 2013](#)).

Essa nova linha de pesquisa, de caráter interdisciplinar, surgiu visando o aumento da frequência analítica. Seu surgimento ofereceu inúmeras vantagens incluindo baixo consumo de amostras e reagentes (pL-nL), curto tempo de análise, portabilidade, baixo custo da análise, capacidade de integração de múltiplas etapas analíticas em um único dispositivo, facilidade de operação, dentre outras ([ARORA et al., 2010](#)). Esses microssistemas têm sido aplicados em ensaios analíticos e bioanalíticos incorporando, quando necessário, microcanais para promover a separação analítica de espécies presentes em uma amostra ([AUROUX et al., 2002](#); [REYES et al., 2002](#); [DITTRICH, TACHIKAWA e MANZ, 2006](#); [COLTRO et al., 2007](#); [WEST et al., 2008](#); [ARORA et al., 2010](#)).

Os sistemas miniaturizados são produzidos em várias configurações e em diferentes substratos ([KOVARIK et al., 2013](#)). A fotolitografia é a técnica

de fabricação convencional desses microdispositivos, que se baseia na transferência de uma imagem para uma superfície planar com auxílio da radiação ultra-violeta (UV). No entanto, essa tecnologia requer instrumentação de custo elevado, ambientes limpos e profissionais qualificados para o uso dos equipamentos ([CHEN e PÉPIN, 2001](#)), fatores que corroboram para a limitação de acesso de muitos pesquisadores a esta técnica.

Outra desvantagem da fotolitografia são os tipos de substratos utilizados. Vidro, quartzo e silício são os mais comumente empregados. Esses substratos possuem custo elevado (aproximadamente R\$ 300,00, por chip) e devem ser manuseados com bastante cuidado, pois são materiais frágeis e podem ser facilmente quebrados ou danificados. Por esse motivo, a viabilização de técnicas economicamente atrativas, bem como a utilização de novos substratos vem sendo o foco de muitos grupos de pesquisa brasileiros (USP, UFMG, UNICAMP, USP-SC, UFG, UnB, UFPB).

Frente à essa problemática da microfabricação convencional, Do Lago e colaboradores ([DO LAGO et al., 2003](#)) propuseram um método alternativo e de baixo custo para prototipagem rápida de sistemas microfluídicos baseando-se na impressão direta de microcanais em filmes de poliéster (folha de transparência). Neste método de microfabricação, a configuração dos dispositivos é desenhada em um programa gráfico e impresso por uma impressora a laser, em uma folha de transparência. Após a impressão, o dispositivo é selado termicamente utilizando uma plastificadora de documentos. Uma alternativa ao uso da plastificadora de documentos é a prensa térmica utilizada para fazer a estampagem de camisetas. Seu uso

permite a selagem simultânea de aproximadamente 80 dispositivos em poliéster-toner (DPTs) (com 4 x 4 cm de área) em aproximadamente 10 segundos.

Inúmeras vantagens são observadas nessa tecnologia alternativa, quando comparada ao processo convencional. O método da impressão direta permite confeccionar DPTs em intervalos de tempo inferiores a 20 minutos e dispensa as etapas de fotolitografia, ativação por plasma e tratamento térmico ([MARTINEZ et al., 2007](#); [DUNGCHAI, CHAILAPAKUL e HENRY, 2010](#)). Toda instrumentação necessária (computador, impressora, laminadora e programa gráfico) para a confecção dos DPTs tem custo estimado em R\$ 1.400,00, o que torna essa técnica bastante atrativa e acessível.

Esse processo de microfabricação vem sendo explorado por diferentes grupos de pesquisa na confecção de microchips para separações eletroforéticas. Os dispositivos eletroforéticos vem sendo empregados nas separações de compostos inorgânicos, ([DO LAGO et al., 2003](#); [COLTRO et al., 2004](#); [COLTRO, DA SILVA e CARRILHO, 2008a](#); [GABRIEL et al., 2012](#)), compostos farmacêuticos ([LIU et al., 2006](#)) e neurotransmissores ([YU et al., 2008](#); [LU, HU e XIA, 2009a](#)) sendo monitorados por métodos de detecção eletroquímicos, amperométricos ou condutométricos ([COLTRO, et al., 2004](#); [LIU et al., 2006](#); [COLTRO, DA SILVA e CARRILHO, 2008a](#); [YU et al., 2008](#); [LU, HU e XIA, 2009a](#); [GABRIEL et al., 2012](#); [DA SILVA et al., 2013](#)), fluorescência induzida a laser ([COLTRO, LUNTE e CARRILHO, 2008b](#); [DUARTE et al., 2011](#); [KIM et al., 2013](#)) ou espectrometria de massas ([DO LAGO et al., 2003](#)).

Outra vertente de aplicação dos DPTs, que tem-se intensificado nos últimos anos, é o seu uso para conduzir ensaios bioanalíticos. Recentemente, esses DPTs foram aplicados na extração em fase sólida de moléculas de DNA ([DUARTE et al., 2011](#); [OUYANG et al., 2013](#)), na separação de fragmentos de DNA ([DUARTE et al., 2012](#)), na realização de diagnósticos clínicos ([DE SOUZA, ALVES e COLTRO, 2012](#)) e ensaios imunoenzimáticos ([KIM et al., 2013](#)). Oliveira e colaboradores ([OLIVEIRA, et al., 2013](#)) desenvolveram uma plataforma produzida em poliéster-toner (PT) para conduzir um ensaio ELISA, para detecção de imunoglobulina M (IgM) em amostras de pacientes infectados com dengue.

Os DPTs fabricados pela técnica de impressão direta oferecem inúmeras vantagens sendo algumas importantes como redução de etapas e dos custos de fabricação e instrumentação acessível. Essas vantagens potencializam a aplicabilidade destes dispositivos em conduzir bioensaios, que necessitam ser rápidos, de baixo custo e oferecer resultados de qualidade.

## **1.2. Microfluídica**

A microfluídica surgiu como uma ciência que estuda o comportamento de fluidos em escala micrométrica. Na última década essa ferramenta tem sido vastamente utilizada em áreas como a química analítica, bioquímica e biologia. É um campo multidisciplinar e seu surgimento está relacionado com desenvolvimento de algumas áreas como microeletrônica e análise molecular ([WHITESIDES, 2006](#); [LIN e LEVCHENKO, 2012](#)).

Sistemas microfluídicos miniaturizados permitem integralizar diversas

etapas analíticas em um mesmo dispositivo. Essa vantagem possibilita realizar processos que antes eram feitos em escala maior e em operações separadas (injeção, pré-concentração, separação, detecção, entre outras). O uso dessas plataformas promove a redução no tempo de análise, no volume de reagentes e amostras, além de oferecer maior eficiência e menor custo. [\(LIN e LEVCHENKO, 2012; QASAIMAH \*et al.\*, 2013\)](#)

Um dispositivo microfluídico é constituído de um reservatório (ou zona) que possibilite a introdução de amostra nos canais, um sistema para promover o movimento do fluido através dos canais (bombas e fontes de alta tensão, por exemplo) e possibilitar o acoplamento de um sistema de detecção eletroquímico ou colorimétrico, por exemplo [\(WHITESIDES, 2006\)](#).

Para que a solução percorra os canais microfluídicos é necessária uma força para promover a impulsão. Os métodos mais utilizados para promover essa impulsão são o bombeamento hidrodinâmico [\(KARLINSEY, 2012; SAITO, COLTRO e DE JESUS, 2012\)](#), eletrocinético [\(BAKER, 1995; KARLINSEY, 2012\)](#), força centrífuga [\(CHEN e PÉPIN, 2001\)](#) e capilaridade [\(JUNCKER \*et al.\*, 2002; ZIMMERMANN \*et al.\*, 2007\)](#).

### **1.3. Microfluídica em plataformas descartáveis**

Atualmente, os dispositivos de toner, assim como os protótipos fabricados em papel, integram a atual geração de plataformas microfluídicas descartáveis [\(COLTRO \*et al.\*, 2010\)](#). O papel foi o primeiro substrato utilizado para a construção dessas plataformas microfluídicas descartáveis [\(MÜLLER e CLEGG, 1949\)](#). Neste trabalho foi desenvolvida uma geometria fluídica, em papel cromatográfico, utilizando barreiras hidrofóbicas

produzidas em parafina. Foram constatados um aumento na velocidade de difusão da amostra através do canal e uma redução no volume de reagente utilizado.

Porém, o desenvolvimento das plataformas em papel foi atribuído ao grupo de pesquisa do Prof. George M. Whitesides, da Universidade de Harvard, em 2007 ([MARTINEZ \*et al.\*, 2007](#); [BRUZEWICZ, RECHES e WHITESIDES, 2008](#); [MARTINEZ \*et al.\*, 2008a](#); [MARTINEZ, PHILLIPS e WHITESIDES, 2008b](#); [MARTINEZ \*et al.\*, 2008c](#)).

Nos últimos cinco anos, essas plataformas em papel têm sido vastamente utilizadas para conduzir bioensaios ([SCHILLING, JAUREGUI e MARTINEZ, 2013](#)). Esses dispositivos se destacaram pela simplicidade instrumental de fabricação e por adicionarem inúmeras vantagens aos ensaios realizados, como redução nos gastos de reagentes e amostras, tempo de resposta rápido, facilidade de transporte para análises remotas, entre outras ([NGE, ROGERS e WOOLLEY, 2013](#)). Os canais microfluídicos no papel são formados basicamente por barreiras hidrofóbicas como cera ou fotorresiste, por exemplo ([CARRILHO, MARTINEZ e WHITESIDES, 2009a](#); [NIE \*et al.\*, 2012](#); [SCHILLING, JAUREGUI e MARTINEZ, 2013](#)). Existem inúmeras técnicas para produção destes dispositivos, sendo que a impressão a cera e a jato de tinta utilizando dímero de alquilceteno (AKD, do inglês Alkyl Ketene Dimer) são as técnicas mais promissoras devido às suas simplicidades instrumentais, permitirem a confecção de vários dispositivos em tempo reduzido, entre outras ([LI, BALLERINI e SHEN, 2012](#)).

Plataformas em papel têm-se apresentado adequadas para análises rápidas e simples no ponto de necessidade ([SCHILLING, JAUREGUI e](#)

[MARTINEZ, 2013](#); [NGE, ROGERS e WOOLLEY, 2013](#)). Além disso, o papel é um material facilmente encontrado e as tecnologias de fabricação estimulam a produção desses microssistemas em larga escala. Na literatura podem ser encontrados diversos trabalhos utilizando plataformas em papel, demonstrando a potencialidade na condução de bioensaios. Os trabalhos envolvem métodos de detecção colorimétrica, eletroquímica ou por espectrometria de massas ([MARTINEZ et al., 2007](#); [BRUZEWICZ, RECHES e WHITESIDES, 2008](#); [MARTINEZ et al., 2008a](#); [MARTINEZ, PHILLIPS e WHITESIDES, 2008b](#); [MARTINEZ et al., 2008c](#); [CARRILHO et al., 2009b](#); [DUNGCHAI, CHAILAPAKUL e HENRY, 2010](#); [KLASNER et al., 2010](#); [MARTINEZ et al., 2010](#)). Recentemente, Pollock e colaboradores ([POLLOCK et al., 2012](#)) demonstraram o uso dos chips em papel para aplicação no monitoramento e diagnósticos das funções hepáticas, utilizando um *scanner* como detector colorimétrico.

Nos microchips a base de papel, o fluxo de solução é denominado fluxo lateral ([PELTON, 2009](#)). Nesse transporte acontece o movimento do fluido através do canal devido à força capilar. Isso acontece dada a estrutura porosa do papel, que é constituído, basicamente, de celulose. A estrutura do papel permite a realização de um pré-tratamento da amostra ou uma separação, pois partículas de tamanhos maiores ficam aprisionadas na matriz porosa. Esta característica, por exemplo, permitiu que Sangjaroen e colaboradores ([SONGJAROEN et al., 2013](#)) desenvolvessem um trabalho em que pôde ser feita a remoção das hemácias, de uma amostra de sangue, através dos poros da matriz celulósica do papel, por diferença de tamanho. Outra vantagem atribuída a esta plataforma é o aumento da área superficial,

de modo que a solução pode ser exposta a uma série consecutiva de sítios ativos ao longo do canal ([PELTON, 2009](#)). Um exemplo de produto comercial que utiliza o fluxo lateral para o transporte de fluidos são os kits para teste de gravidez.

Assim como nas plataformas em papel, o transporte capilar utilizado nos DPTs se mostrou bastante eficaz na condução do fluido através do microcanal. O transporte capilar depende, basicamente, da geometria do canal e da tensão superficial da solução. Quando comparado com outras modalidades de transporte microfluídico, o transporte capilar acrescenta vantagens devido à sua simplicidade instrumental.

#### **1.4. Transporte microfluídico**

Existem muitas maneiras de manusear o fluido através dos canais microfluídicos. As modalidades mais conhecidas incluem o uso das forças eletrocinéticas, hidrodinâmicas e capilares.

No transporte hidrodinâmico, o fluido em um reservatório sofre a ação de uma pressão que o impulsiona através do microcanal. Essa pressão pode ser gerada através de bombas de vácuo, bombas seringas, ou simplesmente criando um desnível entre o reservatório de adição de amostra e os demais reservatórios ([SAITO, COLTRO e DE JESUS, 2012](#)).

O transporte eletrocinético ocorre após se aplicar uma diferença de potencial (ddp) na solução eletrolítica dentro do microcanal ([KARLINSEY, 2012](#)). Uma fonte de alta tensão é utilizada para aplicar a ddp, seja por imersão das extremidades do capilar de vidro na solução eletrolítica (como em eletroforese capilar) ou através de um arranjo de eletrodos colocados

nos reservatórios contendo a solução (como na eletroforese em chips de poliéster-toner).

O transporte capilar, dentre os meios de transporte microfluídicos citados anteriormente, oferece uma grande vantagem, uma vez que dispensa o uso de fontes externas, como bombas e fontes de alta tensão, por exemplo, para conduzir o fluido através do canal ([JUNCKER \*et al.\*, 2002](#); [ZIMMERMANN \*et al.\*, 2007](#); [GERVAIS e DELAMARCHE, 2009](#); [YANG \*et al.\*, 2011](#); [HITZBLECK \*et al.\*, 2012](#)). Neste transporte as dimensões do microcanal influenciam majoritariamente a velocidade do fluido.

#### **1.4.1. Forças eletrocinéticas**

O transporte eletrocinético consiste na movimentação de uma solução eletrolítica através de um canal microfluídico, quando aplicado uma diferença de potencial (ddp). O movimento dos eletrólitos da solução devido à ddp é conhecido com fluxo eletrosmótico (FEO) ([KARLINSEY, 2012](#)).

Em vidro, por exemplo, o FEO é formado após se aplicar uma ddp na solução tampão, promovendo a ionização dos grupos silanóis da superfície do canal que atraem os cátions da solução eletrolítica formando uma camada positiva ao longo do canal, chamada de camada fixa. Após, é observada a formação de outra camada de cátions que é chamada de camada móvel. Através da aplicação da ddp a camada móvel é transportada em direção ao cátodo (ou ânodo, a depender do pH da solução eletrolítica) e, como as espécies positivas estão solvatadas, carregam toda a solução tampão, gerando o FEO ([BAKER, 1995](#); [BABAIE, SAIDI e SADEGHI, 2012](#)).

O uso do transporte eletrocinético do fluido é aplicado em separações eletroforéticas. A instrumentação envolve uma fonte de alta tensão, para aplicar a ddp, e um arranjo de eletrodos que fica em contato com a solução eletrolítica dentro dos reservatórios. Porém, seu uso pode ser desvantajoso, uma vez que é necessário uma fonte de alta tensão, o que pode não ser financeiramente viável. Outra desvantagem é a necessidade em se fazer uma otimização dos parâmetros para aplicação da ddp (potencial de injeção e separação), no caso de separações eletroforéticas, para que esse transporte seja adequado ao tipo de amostra. Essa etapa demanda tempo, o que torna essa técnica desvantajosa quando comparada ao transporte capilar.

#### **1.4.2. Forças hidrodinâmicas**

No transporte hidrodinâmico, uma pressão é aplicada em uma das extremidades do canal microfluídico, promovendo o deslocamento do fluido através do canal. Este tipo de transporte fluídico pode ser utilizado em plataformas miniaturizadas visando aplicações em separações eletroforéticas ([KARLINSEY, 2012; SAITO, COLTRO e DE JESUS, 2012](#)) e cromatográficas ([QUIRINO e ARANAS, 2012](#)).

O modo mais simples para realizar o bombeamento hidrodinâmico é promover um desnível entre os reservatórios ao longo do canal. Esse modo consiste em fazer com que um reservatório fique mais elevado que os demais reservatórios, de modo que a pressão devido ao desnível, impulse a solução através do canal ([KARLINSEY, 2012; SAITO, COLTRO e DE JESUS, 2012](#)).

Outros dois tipos de transporte hidrodinâmico utilizados consiste na aplicação de uma pressão positiva (PP) ou uma pressão negativa (PN) no reservatório de amostra. Na PP, é aplicada uma pressão empurrando a solução para o interior do canal. Bombas seringas e membranas são comumente utilizadas para conduzir esse bombeamento. Para a PN é aplicada uma força de sucção, ou vácuo, em um reservatório. Bombas seringas também são utilizadas para realizar esse bombeamento [\(KARLINSEY, 2012; SAITO, COLTRO e DE JESUS, 2012\)](#).

Quando comparado com o transporte via força capilar, o bombeamento hidrodinâmico apresenta algumas desvantagens, como a utilização de instrumentação sofisticada e a dificuldade em se controlar o bombeamento da solução [\(SAITO, COLTRO e DE JESUS, 2012\)](#). A dificuldade na miniaturização das bombas e problemas com vazamentos são outras desvantagens observadas no uso do bombeamento hidrodinâmico.

### **1.4.3. Forças Capilares**

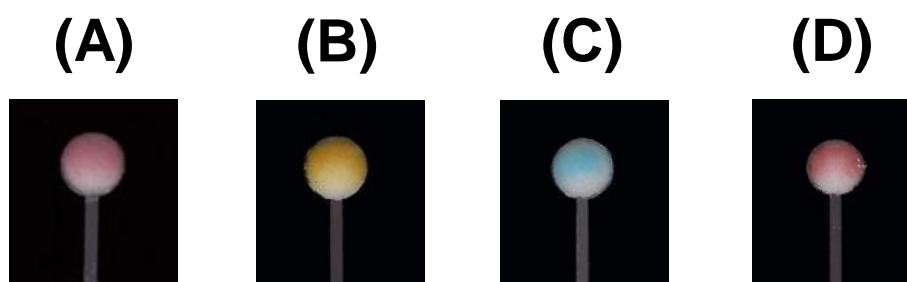
No transporte capilar o fluxo através do canal é espontâneo e depende, basicamente, da superfície e geometria do canal e da tensão superficial do líquido [\(JUNCKER \*et al.\*, 2002\)](#). Este transporte é muito utilizado em plataformas de papel, por exemplo, pois a celulose forma uma matriz porosa que favorece o fluxo capilar. Ao utilizar a força capilar para induzir o fluxo através do canal, não há a necessidade de se aplicar forças externas (como fontes de alta tensão e bombas), sendo essa a principal vantagem no uso da força capilar.

Todavia, o controle da velocidade do fluido através do canal, é a maior desvantagem desse método. Uma vez que essa velocidade é regida pelas dimensões do canal microfluídico. De modo que, para alterar a velocidade é necessária fazer a mudança nas dimensões do canal (largura, profundidade ou comprimento).

Nos DPTs os canais microfluídicos não possuem uma matriz porosa como observado no dispositivos de papel. Com isso, é observado uma redução significativa na retenção de amostra através do canal e um aumento na velocidade do fluxo dentro do canal ([TIAN et al., 2010](#)). Outra vantagem apresentada é a maior eficiência na condução da amostra devido à menor superfície de contato. Além dos fenômenos capilares, ainda existe a ação da pressão hidrostática que contribui para o movimento do fluido através do canal. A pressão hidrostática é definida pela pressão exercida pela massa de ar na superfície do líquido.

## **1.5. Análise colorimétrica**

A detecção colorimétrica consiste em identificar ou quantificar produtos que, após uma ou várias sequências de reações, desenvolvam coloração que possa ser observada (Fig. 1). Um exemplo desse processo é a reação enzimática em bioensaios ([MÄÄTTÄNEM et al., 2011](#); [DE SOUZA, ALVES e COLTRO, 2012](#)) ou uma reação de oxi-redução ([ZARGAR e HATAMIE, 2013](#)).



**Figura 1.** Micrografias ópticas demonstrando o desenvolvimento de cor para bioensaio de (A) colesterol, (B) glicose, (C) proteínas totais e (D) triglicérides.

Para realizar a detecção colorimétrica de determinado analito é feito a captura da cor desenvolvida para o bioensaio. A intensidade de cor correlaciona-se diretamente com a concentração do produto formado na reação. Com o auxílio de um programa gráfico, é possível construir uma curva de correlação entre a concentração e a intensidade de cor ([MARTINEZ et al., 2008a](#)).

O uso de equipamentos comerciais como câmeras digitais e de celulares, microscópios ópticos portáteis, *scanner* de mesa ou bancada para fazer a detecção colorimétrica tem crescido bastante ([SHEN, HAGEN e PAPAUTSKY, 2012](#)). Esses equipamentos possuem vantagens como: facilidade no manuseio, preço acessível (R\$ 200,00 a R\$ 1.000,00) além de serem equipamentos robustos, facilmente transportados e de manutenção reduzida. Outra grande vantagem é que estes equipamentos funcionam à bateria e podem ser conectados a um *laptop* via conexão USB (*Universal Serial Bus*), tanto para fazer o envio das imagens para análise quanto para carregar a bateria. Outro fator atrativo é que a transmissão dos dados pode ocorrer via *Bluetooth*, e-mail ou mensagens multimídia (MMS, *Multimídia Messaging Service*). A associação das vantagens da detecção colorimétrica

com os DPTs estimula a utilização dessa ferramenta instrumental para conduzir análises em áreas remotas.

Trabalhos reportados na literatura utilizam estes dispositivos alternativos como detectores ([GODINHO et al., 2008](#); [IQBAL e BJORKLUND, 2011](#); [LEE, et al., 2011](#); [MÄÄTTÄNEN et al., 2011](#); [WANG et al., 2011](#); [SHEN, HAGEN e PAPAUTSKY, 2012](#)). Estes trabalhos vêm demonstrando bons resultados e comprovando as vantagens no uso destes equipamentos comerciais para realizar a detecção colorimétrica.

## **1.6. Diagnósticos clínicos**

O diagnóstico clínico é muito importante e fornece informações do estado geral de saúde de um paciente. É uma ferramenta muito utilizada na investigação, prevenção, controle e acompanhamento do tratamento de algumas doenças. Basicamente, os diagnósticos clínicos são realizados em laboratórios e utilizam fluidos biológicos como plasma sanguíneo e urina.

Muitas técnicas analíticas são utilizadas para conduzir esses bioensaios como espectrofotometria (UV/Vis), eletroforese capilar e em gel de agarose, precipitações com poliânions, cromatografia (em coluna, de troca iônica, por afinidade), entre outras ([MCPHERSON, PINCUS 2011](#)). Esses equipamentos possuem um custo elevado (> R\$ 5.000,00) e necessitam de mão-de-obra especializada para seu manuseio.

Todavia, após o desenvolvimento dos dispositivos produzidos em plataformas descartáveis (papel e PT), alguns diagnósticos clínicos mais comuns já são conduzidos de uma maneira mais simplificada, rápida, com

redução de volumes de reagentes e redução no custo total da análise ([KLASNER et al., 2010](#); [MARTINEZ et al., 2008a](#); [DE SOUZA et al., 2012](#)).

A seguir, estão apresentados quatro bioensaios comumente realizados em laboratórios de análises clínicas, que foram avaliados nas plataformas desenvolvidas neste trabalho, sendo eles proteínas totais, glicose, colesterol e triglicerídeos.

### **1.6.1. Proteínas totais**

As proteínas são estruturas que possuem uma massa molecular elevada (> 5 kDa) e consistem de cadeias contínuas de átomos de carbono e nitrogênio, unidos por ligações peptídicas ([MCPHERSON e PINCUS, 2011](#)). As cadeias proteicas são constituídas de 20 aminoácidos diferentes reunidos em combinações praticamente infinitas, possibilitando a formação de milhões de estruturas diversas. As proteínas são classificadas e divididas em seis grandes grupos; transportadoras, de armazenamento, contráteis, estruturais, de defesa e reguladoras. Existem ainda proteínas de difícil classificação que pertencem a um grupo não-identificado.

A triagem de uma proteína específica no plasma sanguíneo é muito importante, uma vez que alterações em sua concentração podem evidenciar algumas doenças relacionadas com o funcionamento de alguns órgãos, como os rins e o fígado. Dois diagnósticos para proteínas podem ser realizados: um para proteínas totais e outro para proteínas específicas (teste para albumina, por exemplo). O teste para proteínas específicas fornece maior quantidade de informações do estado de saúde do paciente, enquanto o teste de proteínas totais fornece informações clínicas do estado geral do

paciente, podendo ser um pré-diagnóstico rápido na prevenção de doenças que causam complicações no funcionamento do rim.

O diagnóstico das proteínas totais pode evidenciar a hiperproteinemia (onde ocorre o aumento de todas as frações proteicas na mesma proporção) e a hipoproteinemia (neste caso observa-se o decréscimo na concentração de proteínas no soro, levando à suspeita de disfunção renal, uma vez que as concentrações de proteínas na urina aumentam consideravelmente). Neste segundo caso (disfunção conhecida com albuminúria) é necessário realizar um teste complementar, que detecta a presença de proteínas na urina ([MCPHERSON e PINCUS, 2011](#)).

### **1.6.2. Glicose**

A Diabetes Melito é uma doença crônica e pode ser caracterizada pela deficiência de produção de insulina pelo pâncreas ou quando o corpo não consegue utilizar de maneira eficaz a insulina produzida. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) existem hoje, no mundo, 347 milhões de pessoas com diabetes ([WHO, 2012](#)). A Diabetes é uma enfermidade que ataca todas as nações, tanto desenvolvidas como em desenvolvimento. O exame comum, realizado na suspeita de diabetes ou para exames de rotina, é a determinação dos níveis de açúcar (glicose) no sangue ou urina.

Existem dois tipos de diabetes, Tipo 1 e Tipo 2 (DT1 e DT2), sendo que a DT2 é mais comumente diagnosticada. Na DT1 ocorre uma destruição auto-imune de células  $\beta$  produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas, produzindo uma deficiência absoluta na produção de insulina ([MCPHERSON](#)

[e PINCUS, 2011](#)). Este tipo de diabetes não possui uma causa conhecida, todavia acredita-se que seu aparecimento está relacionado, em parte, com a suscetibilidade genética.

Assim como a DT1, a DT2 também possui causa desconhecida, mas alguns fatores como obesidade, sedentarismo, histórico familiar, idade avançada, etnia (negros, latinos, norte-americanos nativos, asiáticos e insulanos do pacífico), entre outros podem induzir ao desenvolvimento da doença. A maioria das pessoas com DT2 podem ser efetivamente tratadas com dieta, atividades físicas regulares e agentes hipoglicemiantes orais. Todavia, alguns casos ainda necessitam de terapia utilizando insulina ([MCPHERSON e PINCUS, 2011](#)).

### **1.6.3. Colesterol**

Os lipídios são estruturas de origem biológica e são insolúveis em água. Desempenham papel importante nas diversas funções do corpo. Os lipídios atuam como hormônios ou precursores hormonais, na reserva energética, componentes estruturais e funcionais das biomembranas, isolantes na condução nervosa e previnem a perda de calor ([MCPHERSON e PINCUS, 2011](#)). Os lipídios que devem ter níveis de concentrações controlados e diagnosticados são os ácidos graxos, os triglicerídeos, os fosfoglicerídeos e o colesterol livre e esterificado. Estes lipídios são encontrados no plasma sanguíneo e possuem maior importância clínica e fisiológica.

Para diagnosticar dislipidemias é feito um teste para determinar os níveis de colesterol total e suas frações no plasma sanguíneo. Os

diagnósticos comumente realizados nos laboratórios de análises clínicas são para dosagem de Colesterol Total (CT), e suas frações: Triglicerídeos (TG), Colesterol HDL (lipoproteínas de densidade alta) e Colesterol LDL (lipoproteínas de densidade baixa).

No teste para colesterol total é considerada, no plasma, toda a fração de colesterol, onde são incluídos triglicerídeos e colesterol HDL e LDL. A fração LDL atua transportando colesterol do fígado para os tecidos. É interessante ter um controle de sua concentração no plasma sanguíneo, pois em grandes quantidades pode aumentar o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) como acidente vascular cerebral (AVC), trombose venosa e embolia pulmonar, por exemplo. Por outro lado, a fração HDL desempenha um papel importante no organismo, uma vez que ela transporta o colesterol dos tecidos para o fígado onde é catabolizado e eliminado, em um processo denominado transporte reverso de colesterol. Foi observado que indivíduos com prevalência de DCV apresentavam concentrações menores de HDL, quando comparado com indivíduos normais. Os triglicerídeos ou triacilgliceróis são estruturas sintetizadas no fígado e intestino e são as formas mais importantes de armazenamento e transporte de ácidos graxos ([MCPHERSON e PINCUS, 2011](#)).

O teste para CT, incluindo suas frações, é muito importante na avaliação do risco de DCV, que é a maior causadora de mortes no mundo. Dados da OMS (atualizados em Setembro de 2012) mostram que em 2008, 30% do total de mortes registradas em todo mundo foram causadas por doenças cardiovasculares ([WHO, 2012](#)).

#### **1.6.4. Triglicerídeos**

Como comentado no [item 1.6.3](#), os triglicerídeos são uma fração do colesterol total e seu diagnóstico é muito importante. Os triglicerídeos são sintetizados pelo fígado e intestino. Sua função principal é armazenamento e transporte de ácidos graxos ([MCPHERSON e PINCUS, 2011](#)).

A alimentação é a principal fonte de ingestão de triglicerídeos. Cerca de 90% das gorduras ingeridas em uma dieta são triglicerídeos formados por ácidos graxos. Por esse motivo deve-se fazer um controle rigoroso da ingestão de lipídios, pois todo excesso ingerido e não consumido pelo corpo é transformado em triglicerídeos que são armazenados nas células de gordura, preferencialmente na região abdominal.

No plasma sanguíneo é aceitável concentrações de triglicerídeos até 150 mg/dL. Acima dessa concentração o risco de desenvolver DVCs é muito alto. O tratamento para controlar os níveis de triglicerídeos envolve mudança nos hábitos alimentares evitando ingestão de gorduras, bebidas alcoólicas e açúcares. O exercício aeróbico também é indicado e em casos que a concentração esteja muito elevada, acima de 200 mg/dL, é fortemente recomendado o uso de medicamentos.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de uma plataforma microfluídica descartável e minimamente instrumentada para conduzir diagnósticos clínicos com detecção colorimétrica.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o uso de uma câmera de celular, uma câmera digital convencional, um microscópio óptico e o modo *scanner* de uma impressora funcional como detectores colorimétricos.
- Comparar o desempenho analítico do *scanner* com o de um espectrofotômetro utilizando o ensaio para determinação de  $\text{Fe}^{2+}$ , com o método da 1,10-fenantrolina.
- Conduzir um estudo do tempo de meia-vida dos DPTs em três temperaturas diferentes, para o ensaio de glicose, com e sem a adição de um estabilizante enzimático.
- Realizar um ensaio simultâneo com uma mistura padrão de glicose, colesterol, proteínas totais e triglicerídeos.
- Simular um ensaio simultâneo para detectar glicose, colesterol e proteínas totais em uma amostra artificial de soro humano.

### **3. Procedimento Experimental**

#### **3.1. Materiais e reagentes**

Sulfato de amônio e ferro, 1,10-fenantrolina, acetato de sódio e hidroxilamina, celulose em pó, glicose oxidase (181 U/mg), D-glicose, *horseradish* peroxidase (73 U/mg), iodeto de potássio, azul de metileno, corante azul brilhante G, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, ácido láctico, ácido cítrico, bicarbonato de sódio, ureia, cloreto de cálcio, cloreto de sódio, sulfato de magnésio, sulfato de sódio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, cloreto de amônia e ácido clorídrico foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA). Amostras artificiais de soro humano, padrões de proteínas totais (40,0 mg/mL), colesterol (2,0 mg/mL), triglicerídeos (2,0 mg/mL) e os reagentes de cor para o ensaio de colesterol e triglicerídeos foram obtidos da empresa Doles<sup>®</sup> Reagentes (Goiânia, GO, Brasil). As folhas de poliéster (tamanho A4, modelo CG 3300) e o cartucho de toner (modelo CB435A) foram adquiridos da 3M (São Paulo, SP, Brasil) e Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA), respectivamente.

#### **3.2. Preparo das soluções**

Para avaliação do desempenho analítico da câmera digital, câmera de celular, microscópio óptico e *scanner* foi utilizada uma solução do corante azul de metileno. Uma solução estoque de 100 mg/mL foi previamente preparada.

Na determinação de  $\text{Fe}^{2+}$  em medicamentos foram preparadas soluções estoque de ferro, hidroxilamina e acetato de sódio, com 100 mg/mL cada e uma solução de 1,10-fenantrolina 1,0 mg/mL. A partir da solução estoque de ferro foram preparadas soluções com concentração entre 1,0 e 5,0 mg/mL, utilizadas para construir a curva de calibração.

Para realizar os ensaios de determinação de glicose preparou-se duas soluções distintas. Uma contendo iodeto de potássio 0,6 mol/L e trealose 0,3 mol/L, e a segunda contendo glicose oxidase e *horseradish* peroxidase a 1 mg/mL, ambas preparadas em tampão fosfato 100 mmol/L, pH 6,0.

Para o ensaio de proteínas totais preparou-se uma solução do corante Azul Brilhante G na concentração de 10 mmol/L.

No ensaio de colesterol foi utilizado reagente de cor comercial (Doles<sup>®</sup> Reagentes) contendo tampão Piperazina-1,4-bis(ácido 2-etenosulfônico) (PIPES) 35 mmol/L (pH 7,0), 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, colesterol esterase (300 U), colesterol oxidase (204 U) e peroxidase (828 U).

Para o ensaio de triglicerídeos foi utilizado reagente de cor comercial (Doles<sup>®</sup> Reagente) contendo solução tampão PIPES 50 mmol/L (pH 7,5), 4-clorofenol 6 mmol/L, cloreto de magnésio 5 mmol/L, 4-aminoantipirina 0,75 mmol/L, ATP 0,9 mmol/L, Lipase ( $\geq 2200$  U), glicerol quinase ( $\geq 25$  U), glicerol-3-fosfato oxidase ( $\geq 67$ U) peroxidase ( $\geq 13,8$ U).

O padrão de glicose foi preparado na concentração de 200 mmol/L e, posteriormente, diluído em 100 mL de água ultrapura.

A urina artificial foi prepara como relatado por Martinez e colaboradores (MARTINEZ *et al.*, 2008a). A urina artificial foi preparada com

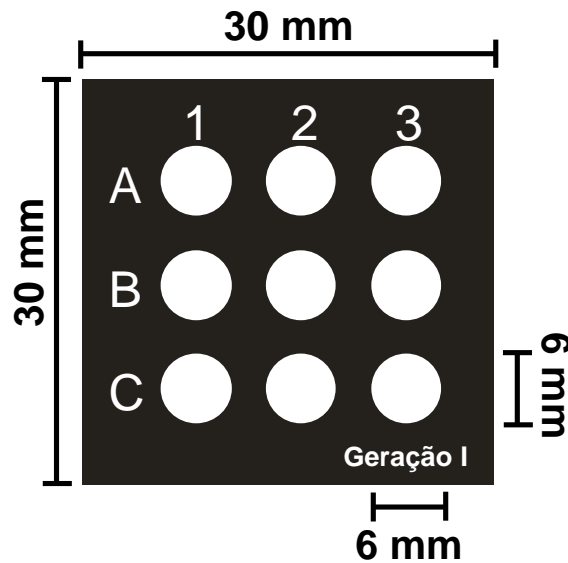
uma mistura de ácido láctico 1,0 mmol/L, ácido cítrico 2,0 mmol/L, bicarbonato de sódio 25 mmol/L, ureia 170 mmol/L, cloreto de cálcio 2,5 mmol/L, cloreto de sódio 90 mmol/L, sulfato de magnésio 2 mmol/L, sulfato de sódio 10 mmol/L, fosfato de potássio dibásico 7 mmol/L, fosfato de potássio monobásico 7 mmol/L e cloreto de amônio 25 mmol/L, misturados e água ultrapura. O pH da solução foi ajustado para 6,0 com uma solução de ácido clorídrico 1,0 mol/L.

### **3.3. Fabricação dos dispositivos microfluídicos**

Os DPTs foram fabricados utilizando o método da impressão direta, proposto por Do Lago e colaboradores ([DO LAGO et al., 2003](#)). A configuração prévia do dispositivo foi projetada em um programa gráfico (Corel Draw v. 13.0) e impressa sobre uma folha de transparência (3M) utilizando uma impressora a laser (modelo LaserJet 1102w, Hewlett Packard) com resolução de 1200 dpi (*dots per inch*) e equipada com cartucho modelo CE285A. No presente trabalho, três configurações de dispositivos foram estudadas. A primeira consistiu de um arranjo de nove zonas (ou zonas de detecção) impressas diretamente sobre uma folha de transparência (Geração I). A segunda configuração foi composta de quatro zonas de detecção interconectadas com canais microfluídicos a uma zona central para adição e distribuição da amostra (Geração II). A terceira configuração é composta de 8 zonas de detecção também interconectadas com canais microfluídicos a uma zona central de adição da amostra (Geração III).

### 3.3.1. Zonas Impressas – Geração I

Estes dispositivos foram produzidos para fazer a avaliação do desempenho analítico dos dispositivos comerciais. A Figura 2 mostra o formato destes DPTs que possuem 9 zonas de detecção com diâmetro de 6 mm. O dispositivo final possui dimensão de 30 x 30 mm.

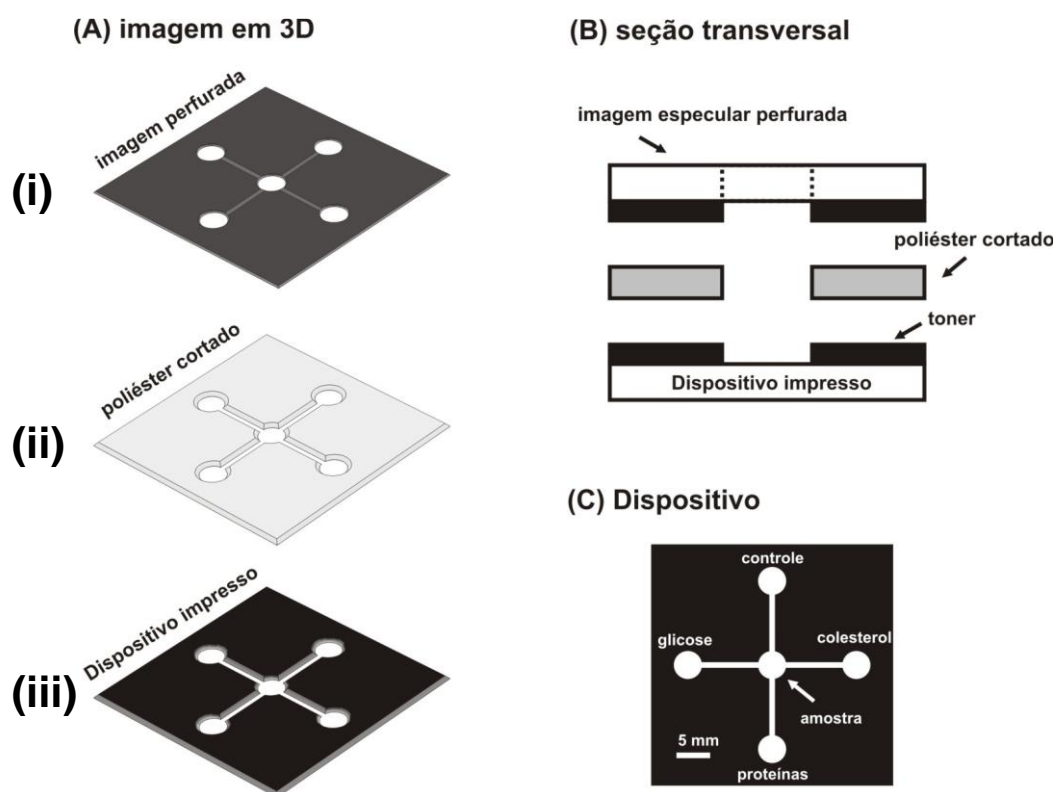


**Figura 2.** Representação da configuração do DPT-Geração I com nove zonas de detecção impressas.

### 3.3.2. Dispositivo microfluídico integrado – Geração II

A Figura 3-A apresenta um esquema de fabricação do dispositivo microfluídico em três dimensões (3D). Para construir estes DPTs, três camadas de transparência (filme de poliéster) foram alinhadas. A primeira camada possui a folha de poliéster com a impressão do *layout* do dispositivo impresso (i). Essa camada, antes de ser laminada, passa por um processo de perfuração das zonas de detecção e da zona de adição da amostra. A camada intermediária (ii) consiste em uma folha de poliéster, na qual foi

cortado, com auxílio de uma máquina de corte a laser, o mesmo *layout* do dispositivo. A terceira camada (iii) consiste de uma imagem especular da primeira camada.



**Figura 3.** Representação do processo de fabricação dos dispositivos microfluídicos integrados em (A) 3D e (B) seção transversal. Em (C), é representado o DPT (Geração-II) pronto, exemplificando seu uso para conduzir os bioensaios.

Após o alinhamento das três camadas (Fig. 3-B), o dispositivo foi selado termicamente, à temperatura de 150 °C, em uma plastificadora de documentos com velocidade de 60 cm/min. A configuração do dispositivo utilizado (35 mm x 35 mm) possui quatro zonas de detecção interconectadas por canais microfluídicos a um reservatório central, onde ocorre a introdução da amostra (Fig. 3-C). O dispositivo resultante foi projetado com canais microfluídicos de 100 µm de profundidade, 1 mm de largura e 10 mm de

comprimento. O diâmetro das zonas de detecção e adição de amostra foram de 5 mm de diâmetro.

Nas zonas de detecção dos DPTs (Geração II) adicionou-se uma pasta de celulose feita em água, na proporção de 1:4 (m/v). A adição da pasta de celulose foi feita com auxílio de uma micropipeta. Em cada zona de detecção foram adicionadas cerca de 10 µL da pasta de celulose. Após a adição, o dispositivo foi mantido à temperatura ambiente durante 30 min até a secagem da celulose.

### 3.3.3. Dispositivo microfluídico integrado – Geração III

Este dispositivo foi construído para realizar o teste de repetibilidade com o ensaio de glicose e para conduzir o ensaio de recuperação. O processo de fabricação desse dispositivo é idêntico ao dos DPTs Geração II.

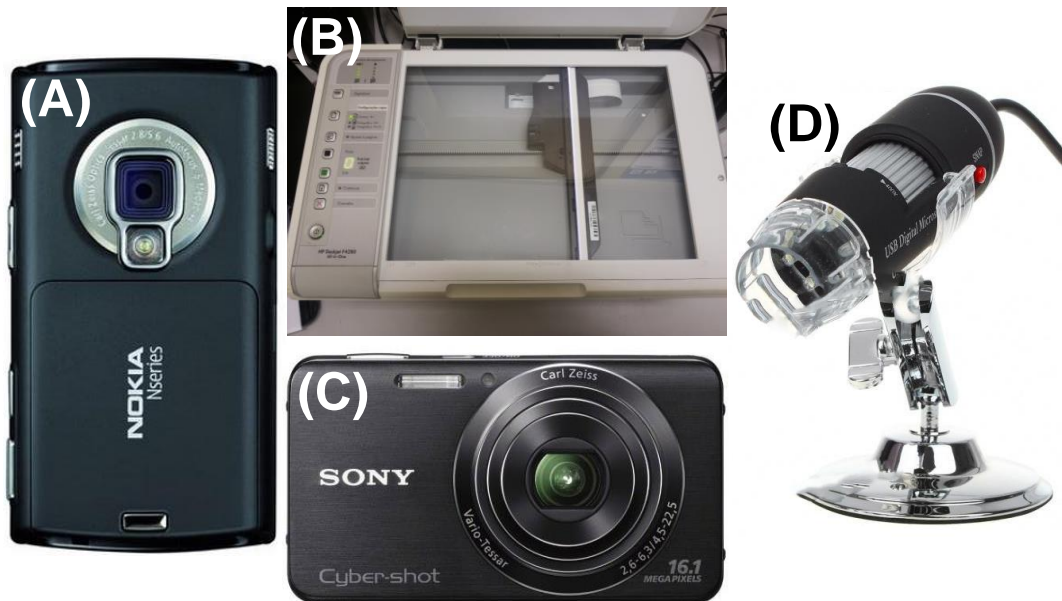
A mudança ocorre somente na configuração do dispositivo (Fig. 4). Esses DPTs, Geração III, possuem oito zonas de detecção conectadas a uma zona de adição de amostra.



**Figura 4.** Imagem da terceira geração dos dispositivos microfluídicos.

### 3.4. Detecção colorimétrica

Quatro equipamentos eletrônicos foram avaliados na realização dos ensaios colorimétricos. Os dispositivos eletrônicos utilizados foram (Fig. 5-A) uma câmera de celular (modelo Nokia N95) com 5,0 MP de resolução, (Fig. 5-B) o modo *scanner* de uma impressora Deskjet multifuncional (modelo F4280, Hewlett Packard), (Fig. 5-C) uma câmera digital (modelo Sony Cyber-shot) com 7,2 MP de resolução e (Fig. 5-D) um microscópio óptico portátil (iluminado com oito LEDs brancos) equipado com câmera digital de 1,3 MP (megapixel). A resolução de captura das imagens para o microscópio, *scanner* e câmera de celular foi igual a 300 dpi. A câmera digital capturou imagens com 72 dpi de resolução.

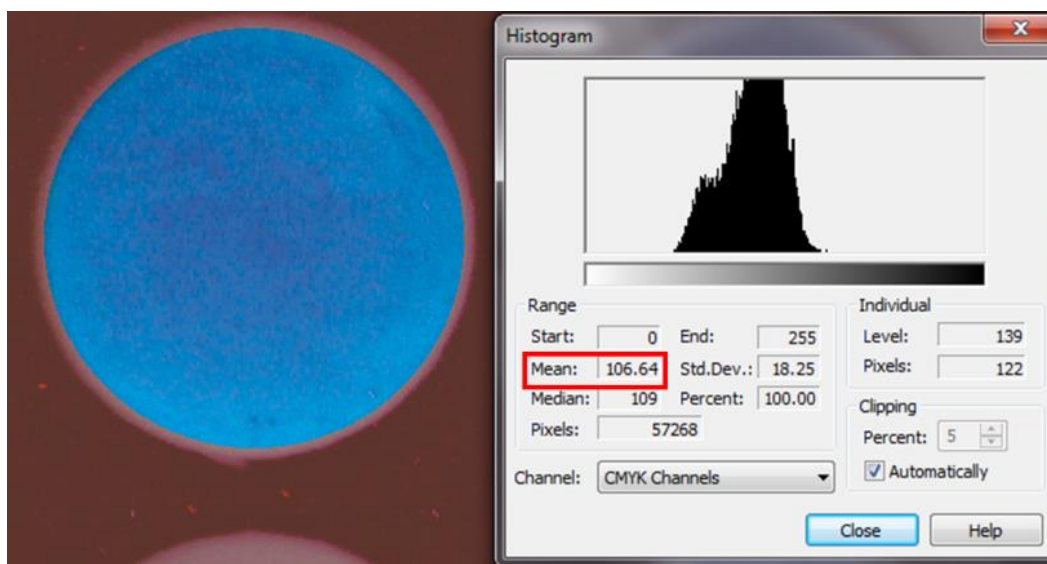


**Figura 5.** Equipamentos comerciais avaliados para conduzir a detecção colorimétrica.

Para a obtenção das informações colorimétricas, todos os equipamentos eletrônicos (exceto o *scanner*) foram posicionados a 10 cm de distância da parte superior dos DPTs. Esta posição se mostrou mais prática

para fazer a aquisição das imagens, facilitando a adição da amostra nas zonas sem que houvesse mudança na posição do detector e possibilitando o melhor controle da iluminação focalizada nas zonas de detecção. Para cada concentração, a resposta analítica foi avaliada em função do valor médio da intensidade de cor obtido das nove zonas de detecção dos DPTs Geração I. As leituras em todas as 9 zonas foram feitas simultaneamente.

As imagens capturadas pelos diferentes dispositivos eletrônicos foram convertidas para a escala de cores CMYK (**C**yan, **M**agenta, **Y**ellow e **K**ey) 32 *bits* e analisadas no programa gráfico Corel Photo-Paint®. A correlação da intensidade de cor com a concentração analítica foi avaliada a partir do uso da ferramenta histograma, disponível no programa gráfico, a qual realiza uma análise estatística da intensidade de pixels. As imagens foram analisadas a partir da definição de uma máscara padrão do programa gráfico de modo a gerar um histograma de uma área fixa (Fig. 6).



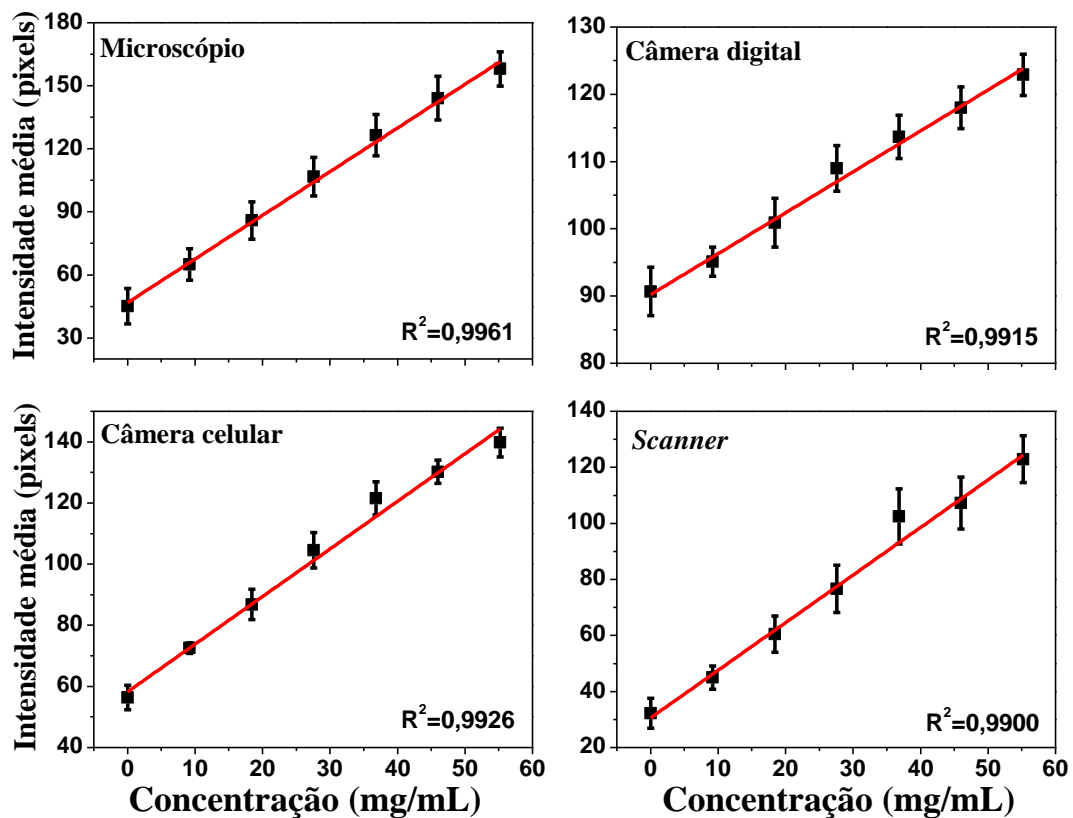
**Figura 6.** Exemplo da zona de detecção selecionada com a máscara e do histograma gerado em função da área selecionada.

## **4. Resultados e discussão**

### **4.1. Comparação dos equipamentos eletrônicos para detecção colorimétrica**

O uso de equipamentos eletrônicos para conduzir ensaios colorimétricos adicionam algumas vantagens aos DPTs, incluindo facilidade no manuseio e baixo custo para aquisição de equipamentos (R\$ 200,00 – R\$ 1.000,00). Além disso, esses equipamentos podem ser facilmente encontrados em qualquer loja de comércio de eletrônicos. Outra grande vantagem é que, assim como os DPTs, estes equipamentos podem ser facilmente transportados para uso análises em campo, pois funcionam à bateria e podem também ser alimentados via conexão USB ou tomadas de 12 V (encontrados em veículos automotivos, por exemplo). Devido aos avanços tecnológicos na telefonia móvel, a câmera de celular é, dentre os dispositivos avaliados, o sistema mais comercializado.

O desempenho analítico desses dispositivos comerciais foi avaliado com uma solução de azul de metileno nos DPTs Geração I. Para estes ensaios preparou-se soluções do corante azul de metileno com concentração variando de 10 a 55 mg/mL, utilizando um volume de 30 µL por zona de detecção. As curvas analíticas obtidas para os quatro equipamentos eletrônicos estão apresentadas na Figura 7.



**Figura 7.** Curvas analíticas para cada dispositivo avaliado. As equações obtidas da regressão linear de cada curva são:  $y_{\text{microscópio}} = 1,656 + 2,078 \times [\text{corante}]$ ;  $y_{\text{câmera digital}} = -0,462 + 0,609 \times [\text{corante}]$ ;  $y_{\text{câmera celular}} = 1,889 + 1,558 \times [\text{corante}]$ ;  $y_{\text{scanner}} = -1,645 + 1,699 \times [\text{corante}]$ .

A partir de cada curva de calibração foram encontrados os valores de LD e sensibilidade analítica. Todos os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 1. A sensibilidade analítica foi obtida a partir do coeficiente linear da curva de calibração. O LD foi calculado pela razão entre o valor correspondente a três vezes o desvio padrão ( $3 \times \text{DP}$ ) do branco e o coeficiente angular ( $b$ ) da curva analítica ( $\text{LD} = 3 \times \text{DP}/b$ ). O LD, em massa, foi calculado considerando um volume de  $30 \mu\text{L}$ , referente à alíquota de solução adicionada na zona de detecção.

**Tabela 1:** Parâmetros obtidos para os quatro equipamentos eletrônicos.

<b>Equipamentos comerciais</b>	<b>Resoluções (dpi)</b>	<b>LD (mg/mL)</b>	<b>LD (nmol/zona)</b>	<b>Sensibilidade (U.R./mg mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>Microscópio</b>	300	5,3	424	2,1
<b>Scanner</b>	300	6,5	520	0,6
<b>Celular</b>	300	7,2	580	1,6
<b>Cam. Digital</b>	72	9,4	751	1,7

A partir dos dados apresentados na Tabela 1 é possível observar que o microscópio óptico apresentou maior sensibilidade analítica. Por outro lado, esse mesmo dispositivo juntamente com a câmera digital apresentaram os maiores valores de desvio padrão relativo (DPR) variando de 5 a 13%, em leituras realizadas em triplicatas. Essas triplicatas foram realizadas conduzindo três leituras consecutivas de um mesmo DPT, contendo o corante azul de metileno. Apesar desses resultados, observou-se que todos os sistemas eletrônicos estudados possuem capacidade para serem empregados como detectores colorimétricos.

No momento da captura das imagens, dois grandes interferentes são observados, sendo eles luz externa (ou luz do ambiente) e o foco. Quando se utiliza o microscópio óptico, a câmera digital e a câmera de celular o efeito da incidência da luz fica mais acentuado. Isso acontece porque, entre o DPT e o equipamento eletrônico, existe uma distância de 10 cm. Logo, a luz ambiente incide sobre a amostra no DPT por todos os lados, de modo que a incidência da luz na zona de detecção pode ocorrer de maneiras diferentes, mudando as tonalidades das cores desenvolvidas nas reações, e aumentando consideravelmente o desvio nas leituras das amostras. Esse problema pode ser resolvido criando uma câmara, feita de material translúcido, para saturar a luz que incide na amostra.

A função foco, encontrada na câmera digital e de celular, também contribui negativamente na aquisição das imagens, uma vez que muitos desses equipamentos possuem a função auto-foco. Essa função ajusta as condições da captura de imagem automaticamente a cada imagem obtida. Isso é um problema, pois em alguns dispositivos essa função não pode ser desativada.

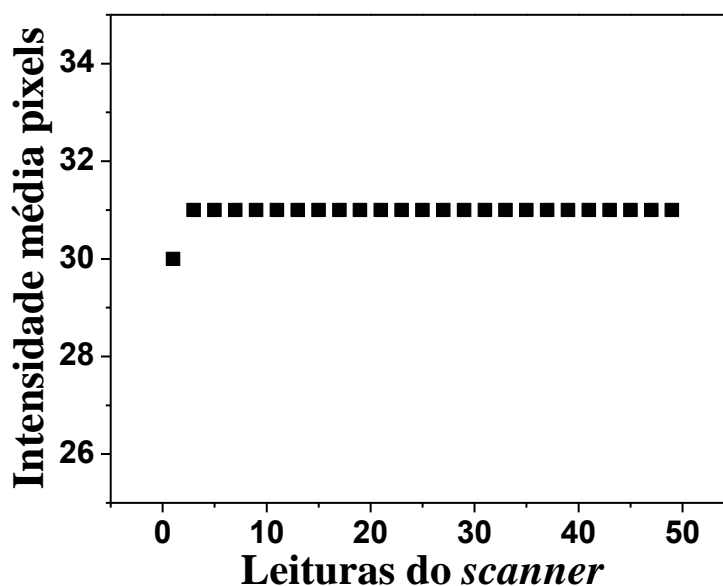
Nos resultados encontrados utilizando o scanner, observou-se que o DPR das intensidades de cor desenvolvidas nas zonas de detecção ficou abaixo de 4%, entre as nove zonas do dispositivo Geração I. Esse menor DPR encontrado é justificado pelo modo de leitura do scanner. Este equipamento possui uma tampa que permite o bloqueio da incidência de luz externa sobre o dispositivo analítico. Além disso, a luz necessária para captura da imagem é fornecida pelo detector CCD do *scanner*. Frente a essa facilidade, o *scanner* foi escolhido para conduzir os bioensaios colorimétricos. Todavia, foi conduzido um estudo para entender o comportamento do sistema de detecção desse equipamento.

## **4.2. Detecção colorimétrica utilizando o *scanner***

### **4.2.1. Sistema de detecção CCD**

O *scanner* utiliza um detector do tipo *Charge-Coupled Device* (CCD) em que a superfície deste detector é constituída basicamente de silício, onde a imagem é capturada, baseando-se no princípio fotoelétrico. A luz que incide na superfície do sensor produz cargas elétricas que passam por um sistema de amplificação e conversão do sinal analógico em digital, formando a imagem ([PETERSON, 2001](#)).

A fim de avaliar o desempenho deste detector alguns testes foram realizados utilizando o modo *scanner* de uma impressora multifuncional (HP Deskjet F4280). Um primeiro estudo foi feito para avaliar o comportamento das informações colorimétricas ao longo de várias leituras. Um DPT (Geração I) foi fixado no centro do *scanner*, preenchido com solução de azul de metileno e submetido a 50 leituras consecutivas (resolução de 300 dpi), sendo que o intervalo entre as medidas foi de aproximadamente 3 segundos, tempo necessário para o CCD voltar ao ponto inicial para proceder a próxima leitura. O modo de cor utilizado para obter as informações colorimétricas foi o CMYK. A Figura 8 apresenta os valores de intensidade de pixels para as leituras realizadas.



**Figura 8.** Informações colorimétricas durante 50 leituras consecutivas. Cada ponto representa duas leituras consecutivas do detector.

Foi observado que as duas primeiras leituras apresentaram valores diferentes das demais. Isso foi observado em outros experimentos ao longo dos vários testes realizados com o *scanner*. Isso sugere que o leitor CCD do *scanner* passa por uma estabilização nas primeiras leituras realizadas. Essa

variação observada foi de apenas uma unidade. Todavia, é ideal que sejam descartadas as três primeiras leituras para certificar a estabilidade na captura das imagens e, conseqüentemente, evitar desvios indesejáveis nas intensidades de cor em um ensaio, por exemplo.

Outro estudo foi realizado para saber o quanto as informações colorimétricas eram afetadas pelo uso de diferentes resoluções. O modo *scanner* da impressora multifuncional utilizada permite digitalizar imagens com resoluções de 75, 100, 150, 200, 300, 600, 1200, 2400 e 4800 *dpi*. Porém, neste estudo o dispositivo analítico foi digitalizado apenas com 75, 100, 150, 200, 300 e 600 *dpi* de resolução óptica.

Foram utilizados os DPTs (Geração I), contendo nove zonas preenchidas com pasta de celulose misturada com solução de azul de metileno. A pasta de celulose foi adicionada para assegurar que efeitos de dispersão da luz não interferissem nos valores de intensidade de cor. Esse efeito de dispersão foi observado quando as zonas de detecção eram preenchidas com soluções do corante azul de metileno sem a pasta de celulose. Desse modo, a digitalização foi realizada consecutivamente nas diferentes resoluções. A Tabela 2 apresenta o comportamento das informações colorimétricas nas diferentes resoluções avaliadas. As médias obtidas foram calculadas a partir das nove zonas do dispositivo Geração I.

**Tabela 2.** Intensidade dos pixels nas diferentes resoluções.

Resolução (dpi)	75	100	150	200	300	600
Intensidades (U.R.)	74,8±1,0	73,6±0,7	74,8±1,0	73,6±0,8	73,8±1,0	74,8±1,0

O limite de confiança foi calculado para as medidas realizadas nas seis resoluções avaliadas, sendo este  $74,2 \pm 0,7$  (U.R.). Observou-se que as médias obtidas para cada resolução estão dentro do limite de confiança calculado, mostrando que para um nível de significância de 95% ( $P=0,05$ ) não existem diferenças significativas entre as medidas realizadas nas diferentes resoluções.

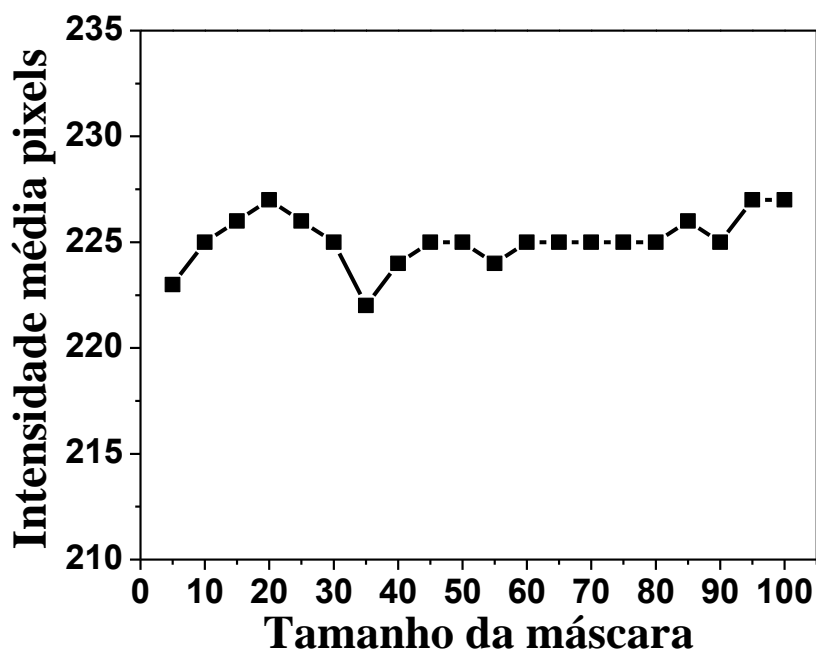
#### **4.2.2. Programa de tratamento de imagens**

O programa Corel Photo-Paint v.13 foi utilizado para fazer o tratamento das imagens e retirar as informações colorimétricas das imagens obtidas. Esse programa possui uma ferramenta chamada máscara de seleção, para extrair as informações colorimétricas de uma região específica da imagem, neste caso, nas zonas de detecção dos dispositivos analíticos utilizados.

Essa ferramenta denominada “máscara de pincel” pode ser ajustada para diversos tamanhos. Para avaliar se a mudança no tamanho da máscara afeta as informações colorimétricas, foi feita a digitalização de um dispositivo analítico com zona de 10 mm, contendo solução do corante azul de metileno. Os tamanhos utilizados para a máscara variaram de 5 a 100 unidades, com incremento de 5 unidades. A resolução utilizada foi de 300 dpi e o canal de cor utilizado foi o CMYK. A Figura 9 mostra o comportamento das medidas realizadas.

Através dos dados de cálculo de intervalo de confiança, observou-se que as medidas realizadas com diferentes tamanhos de máscaras apresentaram diferenças significativas, para nível de significância de 95%

( $P=0,05$ ). Portanto, no decorrer de uma análise deve-se utilizar o mesmo tamanho da máscara para extrair informações colorimétricas confiáveis.

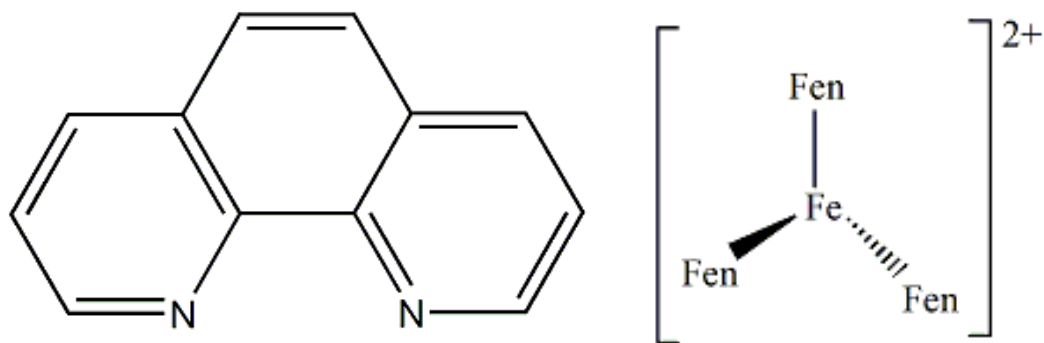


**Figura 9.** Variação da intensidade de pixels com o tamanho da máscara utilizada.

#### 4.2.3. Detecção de $Fe^{2+}$ em medicamentos

Após realizar os estudos para avaliar o comportamento da forma de detecção do *scanner* frente aos ensaios colorimétricos em dispositivos analíticos, um ensaio para determinar íons  $Fe^{2+}$  em amostras de dois medicamentos (Anemifer<sup>®</sup> e Vitafer<sup>®</sup>) foi realizado.

A 1,10-fenantrolina (Fen) é um ligante bidentado (Fig. 10-A) que na presença de íons  $Fe^{2+}$  forma um complexo denominado ferroína –  $[Fe(Fen)_3]^{2+}$  (Fig. 10-B), de coloração vermelho-alaranjado. Este complexo apresenta uma boa estabilidade na faixa de pH entre 2 e 9. Porém, recomenda-se que o complexo seja formado em meio ácido (pH 3,5), evitando assim a precipitação de hidróxido de ferro ([CAMBUIM, 2009](#)).

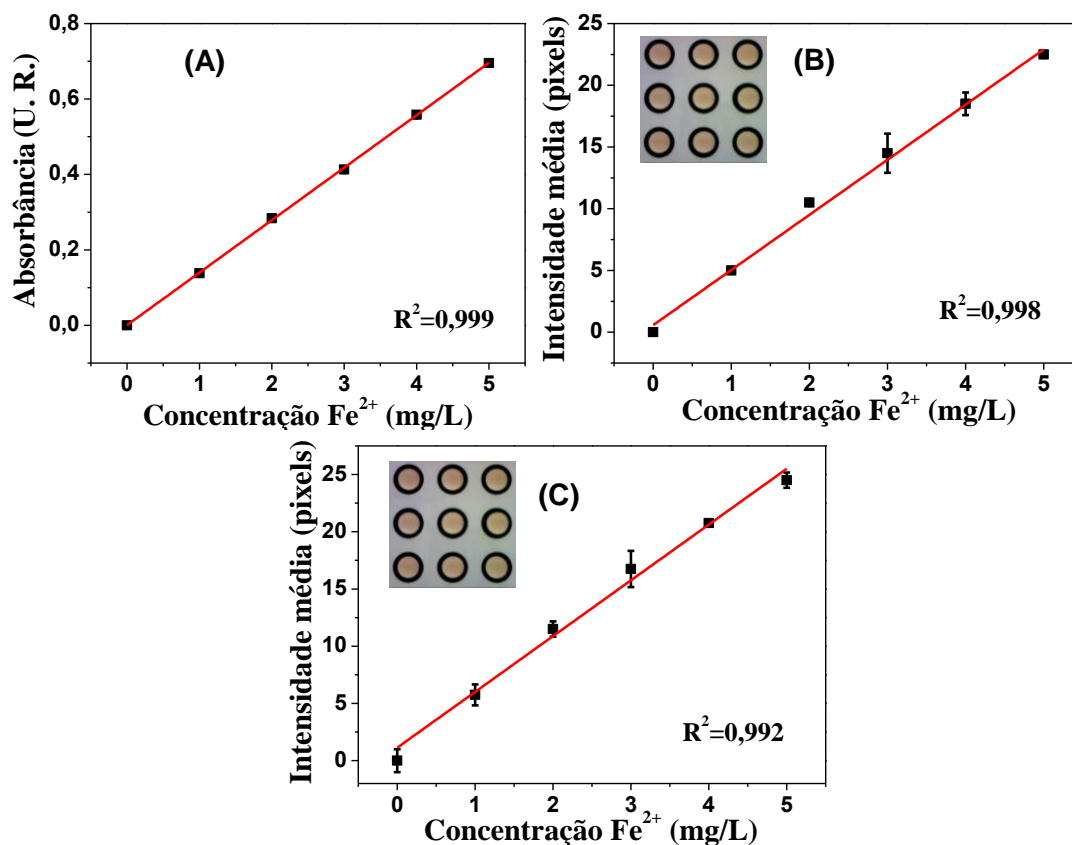


**Figura 10.** Estrutura molecular de (A) 1,10-fenantrolina e (B) complexo ferroína.

Neste experimento, além de determinar a concentração de íons ferro (II) nas amostras, foi conduzido um ensaio para comparar o método proposto com um método de referência, utilizando um espectrofotômetro. Para o *scanner* utilizou-se o canal de cor CMYK e RGB (**R**ed, **G**reen, **B**lue). A comparação foi realizada utilizando o teste da curva de correlação dos resultados obtidos entre as duas técnicas ([Miller e Miller, 2010](#)).

Neste ensaio utilizou-se uma mesma solução contendo íons  $\text{Fe}^{2+}$  para construir as curvas de calibração empregando as duas técnicas. A curva de calibração foi obtida com soluções de concentração variando de 0 a 5 mg/L de  $\text{Fe}^{2+}$ . A Figura 11 mostra as curvas de calibração para o espectrofotômetro e o *scanner* nos dois canais de cores utilizados.

Conforme apresentado na Figura 11, para os dois sistemas de detecção obteve-se um bom coeficiente de correlação quadrático ( $R^2$ ). Para o espectrofotômetro o LD obtido foi de 0,09 mg/L, enquanto que para o *scanner* encontrou-se um LD de 0,50 mg/L e 0,67 mg/L, no canal de cor CMYK e RGB, respectivamente. Considerando o volume de solução utilizado nas zonas de detecção, de 40  $\mu\text{L}$ , o LD (em massa) foi de 361 pM e 477 pM para os canais de cor CMYK e RGB, respectivamente.



**Figura 11.** Curvas analíticas obtidas com (A) espectrofotômetro, (B) *scanner* – CMYK e (C) *scanner* – RGB. As equações obtidas das curvas foram:  $y_{\text{espectrofotômetro}} = 0,0007 + 0,1391 \times [\text{Fe}^{2+}]$ ;  $y_{\text{scanner - CMYK}} = 0,5728 + 4,4659 \times [\text{Fe}^{2+}]$ ; e  $y_{\text{scanner - RGB}} = 1,1318 + 4,8747 \times [\text{Fe}^{2+}]$ .

Ainda utilizando as duas técnicas, foi realizado um ensaio para determinar a concentração de sulfato ferroso em amostra de dois medicamentos. Uma solução estoque foi preparada a partir de uma drágea de cada medicamento, que foi aberta em ácido sulfúrico 3,0 mol/L durante 30 minutos. Após resfriar, a solução foi filtrada e diluída para um volume de 100 mL. A solução utilizada na determinação das concentrações foi feita a partir de uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  da solução estoque que, posteriormente foi diluída para um volume de 10 mL.

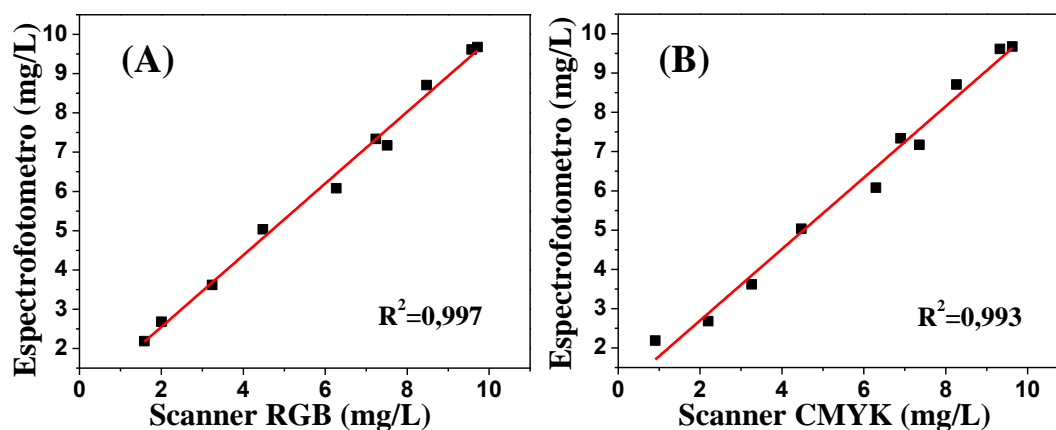
A Tabela 3 apresenta as concentrações de sulfato ferroso encontrado em cada medicamento. O erro percentual foi calculado em relação às

concentrações fornecidas pelo fabricante no rótulo de cada medicamento. Para o medicamento Vitafer® o valor de referência é 109 mg/drágea e para o medicamento Anemifer® é 190 mg/drágea.

**Tabela 3.** Valores de concentração determinados nas duas amostras de medicamento.

	Vitafer mg/drágea	Erro (%)	Anemifer mg/drágea	Erro (%)
<b>Espectrofotômetro</b>	119	9	149	-22
<b>Scanner CMYK</b>	123	13	157	-17
<b>Scanner RGB</b>	123	13	160	-16

A fim de realizar a comparação entre o método proposto e o método de referência, 10 amostras contendo diferentes concentrações do medicamento Vitafer® foram analisadas utilizando o espectrofotômetro e o scanner (300 dpi). A Figura 12 apresenta o gráfico de correlação dos dados obtidos pelas duas técnicas.



**Figura 12.** Correlação entre as concentrações detectadas nas duas técnicas. Em (A) utilizou-se o canal de cor CMYK e em (B) o canal RGB.

A comparação das duas técnicas se deu por meio da curva de ajuste que descreve a correlação dos resultados obtidos em ambas as técnicas (Fig. 12). Para o canal de cor CMYK a equação da curva de ajuste foi:  $y = -$

$0,8730 \pm 3,4696 + (1,0844 \pm 0,5146)x$ . Para o canal de cor RGB a equação da curva foi:  $y = -0,7459 \pm 2,9458 + (1,0877 \pm 0,4370)x$ .

Em uma regressão linear perfeita é esperado obter valores para o coeficiente linear e angular igual a 0 e 1, respectivamente. Para as duas curvas de correlação foram calculados os limites de confiança para o coeficiente linear e angular. Pode notar-se que, o intervalo de confiança para o coeficiente linear inclui o valor 0 e o intervalo de confiança para o coeficiente angular inclui o valor 1. Isso permite dizer que para um nível de confiança de 95% ( $P=0,05$ ), o método proposto (utilizando o *scanner* nos dois modos de cor, RGB e CMYK) não difere significativamente da técnica analítica utilizando o espectrofotômetro.

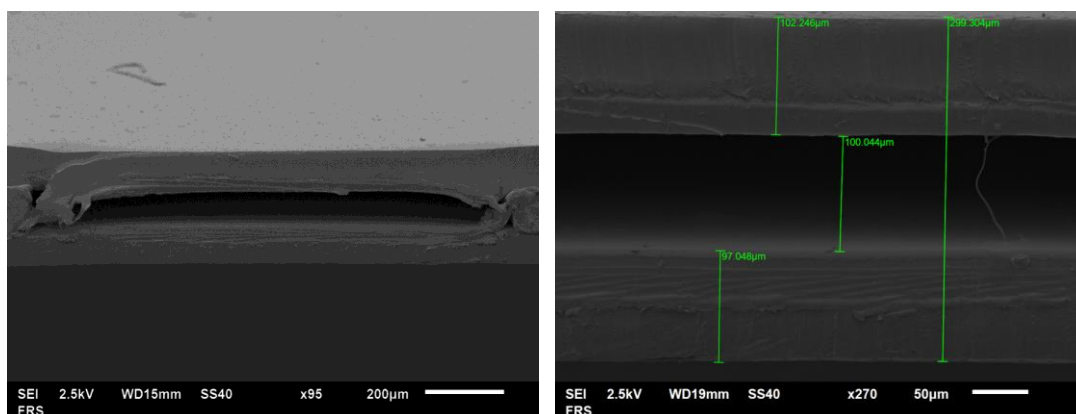
### **4.3. Ação da força capilar no interior do canal microfluídico**

Nesse trabalho é demonstrado, pela primeira vez, o uso de uma plataforma microfluídica minimamente instrumentada, a base de PT, para conduzir ensaios bioanalíticos com custo bastante reduzido.

Dentro dos canais microfluídicos é a força capilar que promove o transporte da solução. Sua formação tem relação direta com a viscosidade do líquido e com a geometria do canal. A equação de Washburn ([DARHUBER e TROIAN, 2005](#)) define o avanço do líquido em canais horizontais e verticais.

O uso da ação capilar como força de impulsão é vantajoso, uma vez que dispensa o uso de equipamentos externos (como fonte de alta tensão ou bombas) para impulsionar o líquido dentro do canal. Nos DPTs, os canais microfluídicos são constituídos por folhas de transparência e barreiras de

toner. Uma folha adicional foi incluída entre as camadas de toner, formando um dispositivo com duas camadas de toner e três camadas de transparência. Essa estratégia possibilitou obter canais microfluídicos com aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de altura (Fig. 13), garantindo o transporte capilar espontâneo da solução dentro do canal [\(JUNCKER \*et al.\*, 2002\)](#). Outro fator que também contribuiu para a ocorrência do transporte capilar é a pressão hidrostática [\(ZIMMERMANN \*et al.\*, 2007\)](#). Os DPTs quando comparado com os dispositivos à base de papel apresentam uma vantagem, uma vez que dispensam qualquer etapa para promover a mudança da natureza hidrofóbica dos canais [\(MARTINEZ \*et al.\*, 2007; DUNGCHAI, CHAILAPAKUL e HENRY, 2010\)](#).

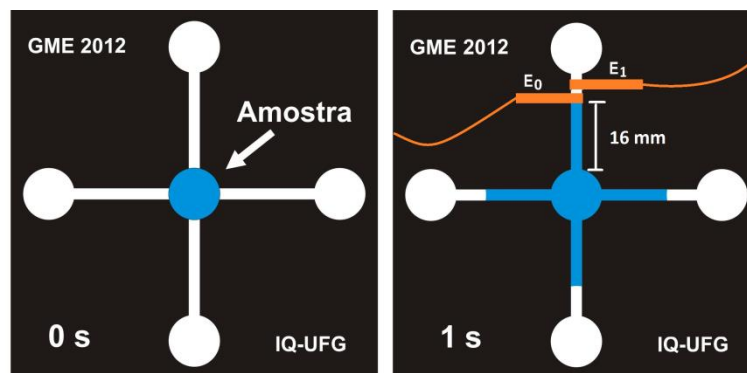


**Figura 13.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) ilustrando a secção transversal dos canais microfluídicos definidos pela barreira de toner.

Foram avaliados parâmetros que afetam a velocidade do fluido dentro do canal e verificou-se que há uma dependência da velocidade do fluido com a largura do canal bem como com o volume de amostra introduzida.

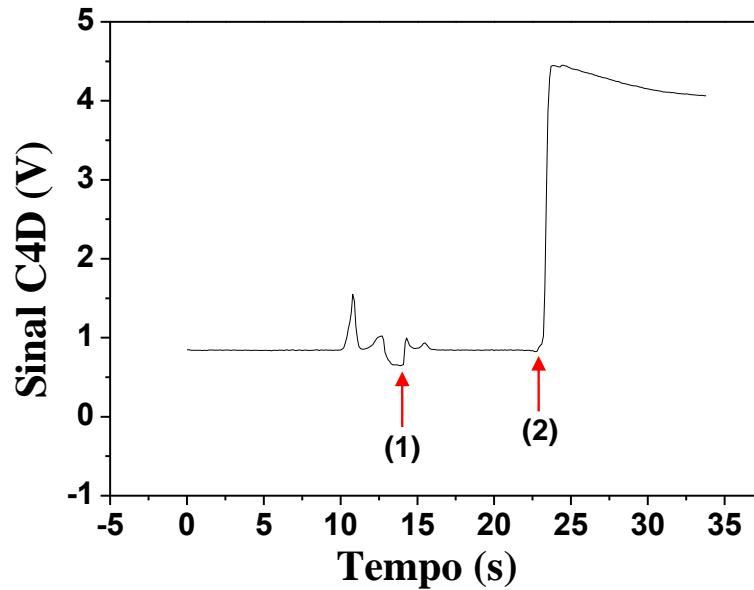
Para fazer essa avaliação os dispositivos foram acoplados com um sistema de detecção condutométrica sem contato (C<sup>4</sup>D) [\(COLTRO, DA SILVA e CARRILHO, 2011\)](#). O detector C<sup>4</sup>D utilizado foi produzido em

placas de circuito impresso, as quais contêm uma camada de cobre de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ . Eletrodos planares foram fabricados por processo fotolitográfico seguido por corrosão química por via úmida ([COLTRO, DA SILVA e CARRILHO, 2011](#)). Neste detector, um sinal senoidal de alta frequência (400 kHz) é aplicado a um eletrodo ( $E_0$ ) e o sinal resultante é registrado em um eletrodo receptor ( $E_1$ ) usando-se um *software* desenvolvido em *LabVIEW*<sup>®</sup>. A Figura 14 mostra como foi acoplado o dispositivo ao sistema de detecção C<sup>4</sup>D. Uma solução de azul de metileno foi utilizada para conduzir este teste.



**Figura 14.** Medida da magnitude do fluxo capilar utilizando-se um detector C<sup>4</sup>D.

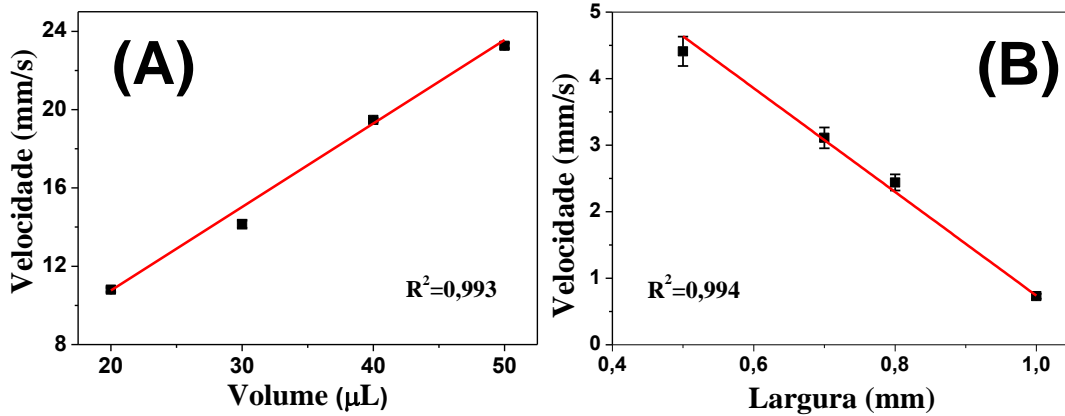
Com esse detector C<sup>4</sup>D foi possível determinar o tempo em que a amostra foi adicionada nos DPTs e o tempo em que ela atingiu os eletrodos de detecção (Fig.15).



**Figura 15.** Monitoramento da resposta condutométrica no transporte capilar da solução em microcanais definidos em PT.

O ponto (1) mostra o momento da adição da solução, na zona central do dispositivo. O ponto (2) é o momento em que a solução de azul de metileno passa pelo detector, gerando um aumento na resposta condutométrica indicando assim o tempo necessário para o preenchimento do canal. Conhecendo o tempo de preenchimento do canal microfluídico e a distância do ponto de adição até o detector, foi possível determinar a velocidade do fluido dentro do microcanal e, conseqüentemente a correlação entre essa velocidade de preenchimento e a geometria do canal e o volume de adição de amostra.

As medidas de velocidade do fluido estão apresentadas na Figura 16. Como pode ser observado, o aumento do volume de injeção de amostra implica em um aumento na velocidade do fluido (Fig. 16-A). Este resultado é esperado uma vez que a pressão capilar é diretamente proporcional ao volume de injeção ([ZIMMERMANN et al., 2007](#); [JUNCKER et al., 2002](#)).



**Figura 16.** Efeito do (A) volume de injeção e da (B) largura do canal na vazão do fluxo induzido por força capilar. Em (A) foi utilizado um canal de 0,5 mm e em (B) o volume adicionado na zona central foi igual a 10 µL.

Para verificar o efeito da dimensão do canal (Fig. 16-B), foram produzidos canais de 0,5 a 1,0 mm de largura. Observou-se que o fluxo tende a aumentar com o decréscimo na largura do canal. De acordo com o modelo matemático proposto por Zimmermann e colaboradores ([ZIMMERMANN et al., 2007](#)), representado pela Equação 1, o fluxo ( $Q$ ) dentro do canal pode ser calculado dividindo-se a diferença de pressão capilar ( $\Delta P$ ) pelo produto entre a resistência fluídica ( $R_F$ ) e a viscosidade ( $\eta$ ).

$$Q = \frac{1 \Delta P}{\eta R_F} \quad (\text{Equação 1})$$

Os valores de  $R_F$  estão diretamente correlacionados com a altura e largura do canal,  $a$  e  $b$ , respectivamente. Assim como também se correlacionam com o comprimento  $L$  e o raio hidráulico  $R_h$  do canal. A Equação 2 mostra como estes parâmetros se correlacionam.

$$R_F = \left[ \frac{1}{12} \left( 1 + \frac{5a}{6b} \right) \frac{abR_h^2}{L} \right]^{-1} \quad (\text{Equação 2})$$

Além disso, a resistência fluídica é dependente da largura do canal. Com base nesse modelo matemático ([ZIMMERMANN et al., 2007](#)), canais mais largos promovem maiores valores de resistência de fluxo. Como consequência, em canais mais largos a velocidade do fluido será menor. Dessa maneira, pode-se afirmar que os resultados obtidos nesse trabalho estão de acordo com a fundamentação encontrada na literatura ([GERVAIS e DELAMARCHE, 2009](#); [JUNCKER et al., 2002](#); [YANG et al., 2011](#)).

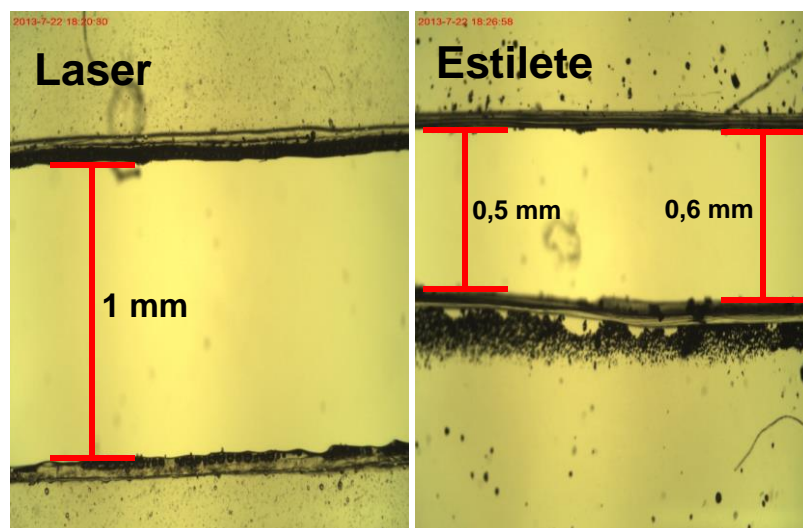
#### **4.4. Corte da folha de transparência intermediária**

Para garantir o transporte capilar no interior dos canais microfluídicos foi utilizado uma folha intermediária de transparência. Com esta folha adicional foi possível obter canais de 100  $\mu\text{m}$  de profundidade. Em trabalhos preliminares, destinados às separações eletroforéticas, os canais foram definidos com uma ou duas camadas de toner. Nestes exemplos, a altura da estrutura microfluídica apresentou valores iguais a 6  $\mu\text{m}$  (uma camada de toner) e 12  $\mu\text{m}$  (duas camadas de toner) ([COLTRO et al., 2010](#)).

Nos primeiros dispositivos que foram construídos a camada intermediária era cortada com auxílio de um estilete. Porém, o corte manual resultava em canais irregulares, com diversos tamanhos ao longo do seu comprimento total. Além disso, o corte manual permitia apenas a confecção de canais retos, em geometrias extremamente simples. Para resolver este problema, utilizou-se uma máquina de corte a laser, em uma empresa especializada (Ordones Laser, Goiânia, GO), para desenvolver a peça intermediária. Devido ao custo elevado, o acesso à uma máquina de corte a laser pode ser limitada a poucos grupos de pesquisa. Todavia, observou-se

que o custo estimado das peças intermediárias, produzidas em massa, foi de R\$ 0,20. Esse custo reduzido das peças intermediárias torna o processo de corte a laser acessível a qualquer grupo de pesquisa. Outra vantagem obtida com esta técnica de corte foi a possibilidade de produzir 35 dispositivos por folha de transparência (tamanho A4) em um intervalo de tempo inferior a 2 minutos.

Algumas vantagens foram alcançadas utilizando o corte a laser para produzir as peças intermediárias. Em um intervalo de tempo menor foi possível produzir quantidades maiores e, quando comparado com o corte utilizando o estilete, as peças cortadas a laser possuem maior uniformidade. Na Figura 17 é possível observar a diferença no corte a laser e no corte manual (utilizando o estilete).



**Figura 17.** Micrografias ópticas da peça intermediária produzida pelo corte com laser e com estilete.

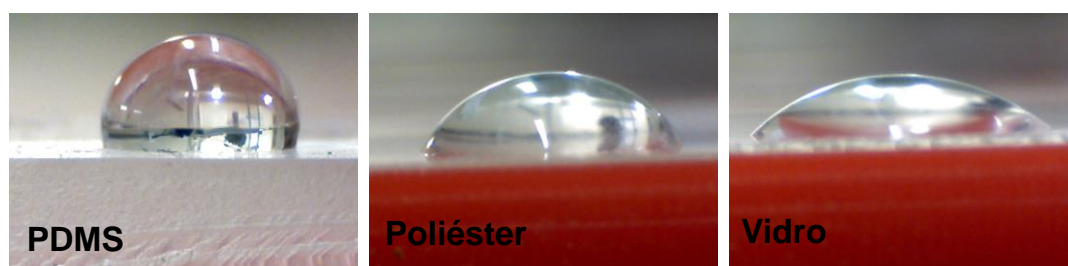
#### 4.5. Ensaio colorimétricos

Conforme mencionado no [item 1.5](#), a detecção colorimétrica envolve reações químicas que levam ao desenvolvimento de produtos com alteração na coloração da solução inicial ([Määttänem et al., 2011](#)). Nos bioensaios realizados nas plataformas microfluídicas utilizou-se o modo *scanner* (resolução de 300 dpi, formato da imagem *Bitmap*) de uma impressora multifuncional para fazer a aquisição dos dados.

No [item 4.1](#) foi observado que todos os quatro equipamentos avaliados podem ser utilizados como detectores. No entanto, para o microscópio óptico e câmeras utilizadas, interferências relacionadas à aquisição das imagens foram frequentemente observadas. Este problema está relacionado com a quantidade de luz do ambiente e a função foco do equipamento. Todavia, no *scanner*, a luz ambiente pode ser facilmente controlada, uma vez que para fazer a aquisição da imagem neste equipamento é necessária uma tampa, para isolar totalmente a luz externa. Outra vantagem observada é que o *scanner* faz a leitura constante, ou seja, não são observadas variações no foco. Por este motivo o modo *scanner* de uma impressora multifuncional foi utilizado para fazer a aquisição das informações colorimétricas dos bioensaios.

Nos primeiros bioensaios realizados com a Geração-II dos DPTs, foi observado que parte da solução de cor adicionada na zona de detecção fluía para dentro do canal, devido à pressão hidrostática e à natureza hidrofílica da superfície do poliéster. Assim, quando se adicionou a amostra para o bioensaio, observou-se o desenvolvimento de cor no interior do canal. Esse efeito afetava a repetibilidade dos bioensaios.

A fim de avaliar a hidrofobicidade da folha de transparência, foram medidos os ângulos de contato, como descrito por Piccin e colaboradores ([Piccin et al., 2007](#)), de uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de água com as superfícies de três diferentes substratos: poliéster, poli(dimetilsiloxano)(PDMS) e vidro. As medidas dos ângulos de contato para os substratos de PDMS, poliéster e vidro foram  $88 \pm 1^\circ$ ,  $60 \pm 2^\circ$  e  $42 \pm 1^\circ$  ( $n=3$ ), respectivamente. Estas medidas mostram que o poliéster é mais hidrofílico que o PDMS e mais hidrofóbico que o vidro. A Figura 18 apresenta o comportamento de uma gota de água na superfície dos três substratos.



**Figura 18.** Micrografias ópticas do formato da gota de água com as superfícies de PDMS, poliéster e vidro.

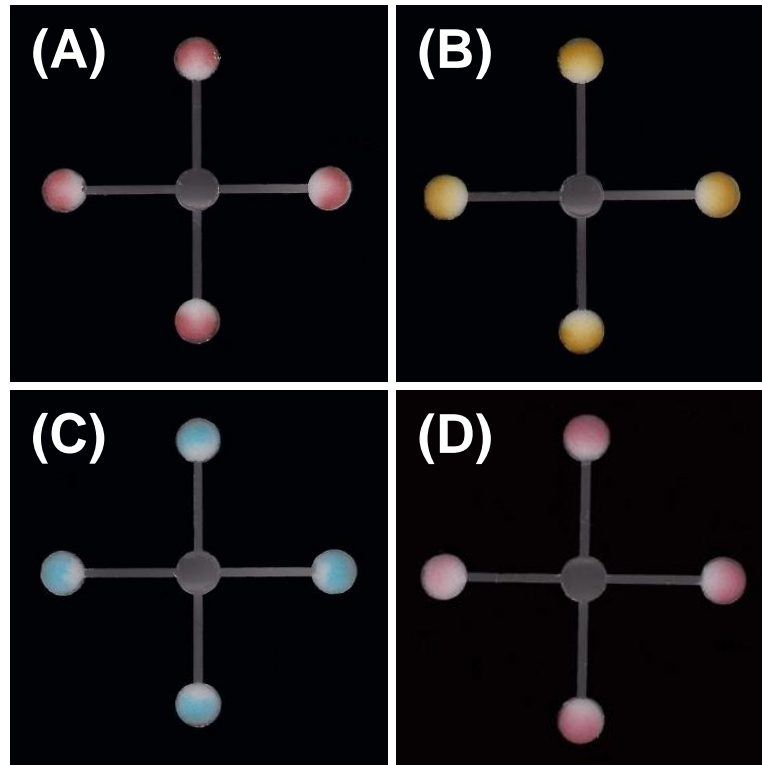
Para contornar o problema da baixa repetibilidade mencionada anteriormente, adicionou-se uma pasta de celulose nas zonas de detecção, que possibilitou que a solução ficasse acondicionada somente nas zonas de detecção. Para cada ensaio realizado, uma alíquota de aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  foi adicionada em cada zona de detecção, com auxílio de uma micropipeta. A pasta de celulose, após secar, forma uma estrutura porosa (Fig. 19) que consegue reter todo reagente de cor e amostra, de modo que toda cor desenvolvida pela reação fique confinada na zona de detecção.



**Figura 19.** Micrografias ópticas mostrando as superfícies antes a após a adição de celulose.

Quando comparado com dispositivos produzidos em papel ([MARTINEZ \*et al.\*, 2007](#); [MARTINEZ \*et al.\*, 2008a](#); [ELLERBEE \*et al.\*, 2009](#)), estes DPTs contendo celulose mostram-se bastante versáteis, descartando etapas para mudar a natureza hidrofóbica da superfície dos canais microfluídicos. Estes DPTs exibiram algumas vantagens, incluindo especificidade, repetibilidade e capacidade de realizar simultaneamente, pela primeira vez, três bioensaios clinicamente relevantes.

Um teste para avaliar a repetibilidade intra-dispositivo foi realizado com os ensaios colorimétricos para colesterol, glicose, proteínas totais e triglicerídeos. Os valores de intensidade média de pixels da cor gerada nas quatro zonas do dispositivo foram avaliadas para cada ensaio. A Figura 20 (A-D) mostra os DPTs (Geração II) com o ensaio de colesterol, glicose, proteínas totais e triglicerídeos.



**Figura 20.** Imagens obtidas mostrando a repetibilidade dos ensaios colorimétricos para (A) colesterol, (B) glicose, (C) proteínas totais e (D) triglicerídeos.

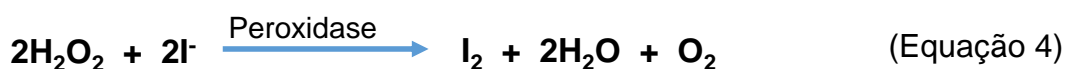
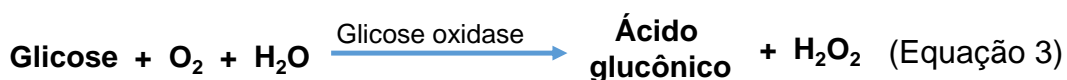
A partir das imagens obtidas para cada ensaio, realizou-se a aquisição das informações colorimétricas a fim de avaliar a repetibilidade entre as zonas de um mesmo dispositivo. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4. Conforme visualizado, o valor do DPR variou de 2 a 5%, para leituras em quadruplicatas. Esses valores permitem afirmar que os dispositivos exibiram boa repetibilidade intra-dispositivo para os quatro ensaios.

Os ensaios para glicose e proteínas totais desenvolvem cores amarela e azul, respectivamente, sendo que concentrações maiores de glicose desenvolvem coloração marrom. Nos ensaios para colesterol e triglicerídeos o reagente cromóforo é a 4-antipirilquinonimina, que gera coloração avermelhada.

**Tabela 4.** Intensidade média de pixels.

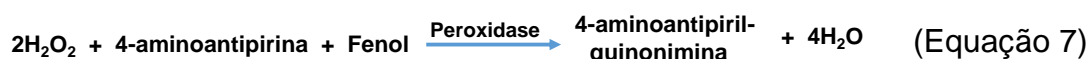
Zona	Glicose	Proteína	Colesterol	Triglicerídeos
1	119	74	159	118
2	114	73	145	116
3	116	74	159	122
4	119	79	154	123
<b>Média ± DP</b>	<b>117±2</b>	<b>75±3</b>	<b>154±7</b>	<b>119±3</b>
<b>DPR</b>	<b>2%</b>	<b>4%</b>	<b>5%</b>	<b>3%</b>

As equações 3 e 4 mostram o esquema de reação do ensaio para determinar níveis de glicose. Inicialmente o oxigênio oxida a glicose a ácido glucônico, catalisado pela enzima glicose oxidase, liberando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Posteriormente, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxida o iodeto a iodo, catalisado pela enzima *horseradish* peroxidase. O iodo formado é responsável pelo desenvolvimento da cor amarela ([MARTINEZ et al., 2008a](#)).

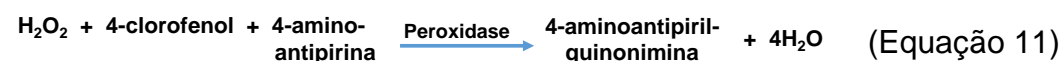


No ensaio para colesterol ocorrem três reações, como observado nas Equações 5, 6 e 7. Na primeira etapa (Eq. 5) ocorre a formação de colesterol livre e ácidos graxos, devido à quebra dos ésteres de colesterol, na presença de colesterol esterase. Na segunda etapa (Eq. 6) o colesterol livre, na presença de oxigênio e colesterol oxidase, forma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e colesterona. Na última etapa (Eq. 7) ocorre a oxidação da 4-aminoantipirina, pelo peróxido de

hidrogênio formado na segunda etapa, formando o produto 4-antipirilquinonimina, que é o reagente cromóforo que gera a coloração vermelha do ensaio para determinar níveis de colesterol.



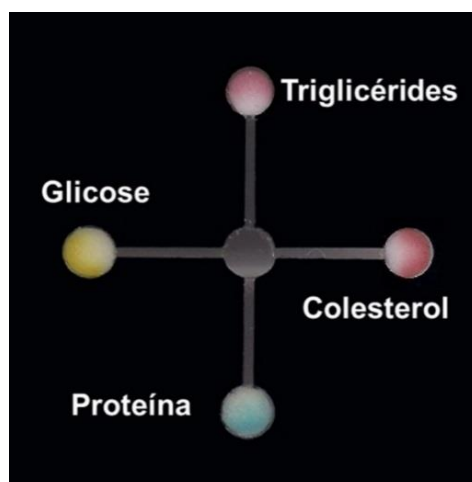
No ensaio para determinar níveis de triglicerídeos quatro reações são observadas (Eq. 8, 9, 10 e 11). Na primeira (Eq. 8) triglicérides é convertido em glicerol, na presença da enzima lipase. Na segunda reação (Eq. 9) o glicerol, na presença de glicerol quinase, é convertido a glicerol-3-fosfato. O glicerol-3-fosfato na presença da enzima glicerol-3-fosfato oxidase é oxidado a peróxido de hidrogênio (Eq. 10). Por último o peróxido de hidrogênio oxida a 4-aminoantipirina a 4-antipirilquinonimina (Eq. 11), que apresenta coloração vermelha, proporcional à concentração de triglicerídeos na amostra.



Na determinação de proteínas totais ocorre a formação de um complexo de coloração azul, onde a intensidade da cor é proporcional à quantidade de proteínas na amostra.

Devido à boa repetibilidade de cada ensaio, utilizou-se a mesma configuração dos dispositivos para avaliar quatro ensaios simultaneamente. Para a análise simultânea, foi preparado uma mistura padrão contendo proteínas totais (10,0 mg/mL), colesterol (1,0 mg/mL), glicose (1,8 mg/mL) e triglicerídeos (1,0 mg/mL). Em seguida, adicionou-se uma alíquota de 40  $\mu$ L dessa amostra na zona central do dispositivo. Pelos efeitos já discutidos no [item 4.3](#), o transporte capilar fez com que essa amostra fosse distribuída para as quatro zonas contendo os reagentes específicos para cada bioensaio.

Após o contato com a solução, observou-se o desenvolvimento das cores amarela e azul para os testes de glicose e proteínas totais, respectivamente, e o desenvolvimento de coloração vermelha para o teste de colesterol e triglicerídeos. A Figura 21 apresenta o DPT com o ensaio simultâneo para colesterol, glicose, proteínas totais e triglicerídeos.



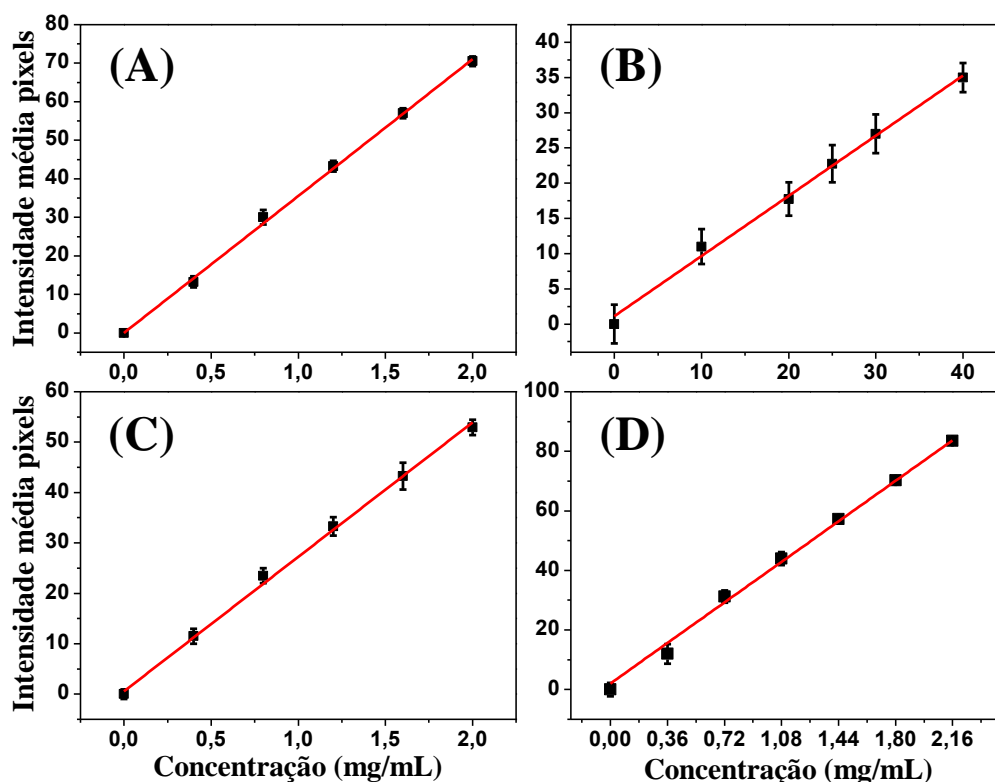
**Figura 21.** Ensaio simultâneo com mistura padrão contendo colesterol, glicose, proteínas totais e triglicerídeos.

Todas as imagens foram capturadas após 10 minutos de reação. As curvas de calibração foram construídas a fim de calcular a faixa linear e os valores dos LDs para cada ensaio. Esses valores foram calculados através da razão entre o valor correspondente a três vezes o desvio padrão do branco e o coeficiente angular da curva analítica. A Figura 22 apresenta as curvas analíticas para cada bioensaio realizado.

O ensaio de glicose apresentou linearidade no intervalo de concentração entre 0 e 2,2 mg/mL com um LD igual a 0,15 mg/mL (Fig. 22-A). Essa faixa de concentração é ideal para uso clínico, uma vez que concentrações de glicose abaixo de 0,5 mg/mL e acima de 1,3 mg/mL podem ser um indicativo de hipo ou hiperglicemia, respectivamente ([MCPHERSON e PINCUS, 2011](#)). Assim como realizado nos DPTs, utilizando soro, níveis de glicose podem também ser quantificados em outros fluidos biológicos, como a urina. Como relatado por Martinez e colaboradores ([MARTINEZ et al., 2008a](#)), a urina é um dos fluidos biológicos mais representativos, e a detecção de glicose em níveis superiores a 1,4 mM (0,25 mg/mL) na urina pode ser um indicativo de doenças ou desordens fisiológicas.

A faixa linear do ensaio de colesterol variou de 0 a 2,0 mg/mL com um LD de 0,08 mg/mL (Fig. 22-B). Este intervalo representa os níveis normais de colesterol em soro. Todavia, em laboratórios de diagnósticos clínicos a faixa de detecção de colesterol compreende o intervalo de 1 a 4,0 mg/mL. Pacientes com níveis de colesterol superiores a 2,4 mg/mL são considerados de alto risco para desenvolvimento de DCV ([MCPHERSON e](#)

[PINCUS, 2011](#)). Teste para quantificar níveis de colesterol acima de 2,0 mg/mL não foram realizados. Todavia, este teste pode ser conduzido fazendo uma diluição da amostra.



**Figura 22.** Curvas analíticas para (A) colesterol, (B) proteínas totais, (C) triglicerídeos e (D) glicose. Em todas as curvas o valor da leitura do branco foi subtraído das medidas. As equações obtidas das curvas foram:  $y_{\text{colesterol}} = 0,167 + 35,500 \times [\text{colesterol}]$ ;  $y_{\text{proteínas}} = 0,974 + 0,861 \times [\text{proteínas}]$ ;  $y_{\text{triglicerídeos}} = 1,004 + 26,399 \times [\text{triglicerídeos}]$ ;  $y_{\text{glicose}} = 0,500 + 38,988 \times [\text{glicose}]$ . Para todas as curvas o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi igual a 0,997.

O ensaio para detectar proteínas totais apresentou linearidade para concentrações entre 0 e 40 mg/mL, obtendo um LD de 3,2 mg/mL (Fig. 22-C). Nesta faixa é possível avaliar algumas condições clínicas do paciente. Níveis de proteínas totais abaixo de 30 mg/mL representam uma condição de hipoproteïnemia ([MCPHERSON e PINCUS, 2011](#)). Este quadro pode

caracterizar produção ineficaz de proteínas (disfunções hepáticas) ou perda de parte da função renal, onde ocorre perda de proteínas na urina (albuminúria) ([MARTINEZ et al., 2008a](#); [MCPHERSON e PINCUS, 2011](#)). O ensaio para proteínas totais permite obter informações do estado geral do paciente, no entanto exames complementares para determinar níveis de proteínas específicas (albumina e globulina, por exemplo) utilizando outros indicadores colorimétricos ([MARTINEZ et al., 2008a](#)) precisam ser realizados de modo a completar o diagnóstico clínico em função dos níveis de proteínas totais.

O ensaio para triglicerídeos foi linear para concentrações entre 0 e 2,0 mg/mL, com um LD igual a 0,11 mg/mL (Figura 22-D). Esse intervalo compreende a faixa normal de triglicerídeos no plasma sanguíneo (<1,5 mg/mL) e a faixa limite (1,5 - 2,0 mg/mL). Pacientes com concentrações acima da faixa normal já são considerados pacientes com risco de desenvolver DCV ([MCPHERSON e PINCUS, 2011](#)). Não foi realizado ensaios para concentração maiores que 2,0 mg/mL, porém uma diluição da amostra pode ser feita para conduzir o ensaio.

#### **4.6. Robustez analítica**

A robustez analítica foi avaliada através da comparação das respostas colorimétricas para três bioensaios realizados em três dispositivos diferentes. Foi utilizada uma mistura padrão contendo glicose (1,8 mg/mL), proteínas totais (10,0 mg/mL) e colesterol (1,0 mg/mL). Como pode ser visto na Figura 23 os ensaios realizados em três dispositivos distintos exibiram

boa reprodutibilidade (n=3) nas intensidades de cor para todos os bioensaios.



**Figura 23.** Imagens obtidas para comparação entre dispositivos utilizando mistura padrão de glicose, colesterol e proteínas totais.

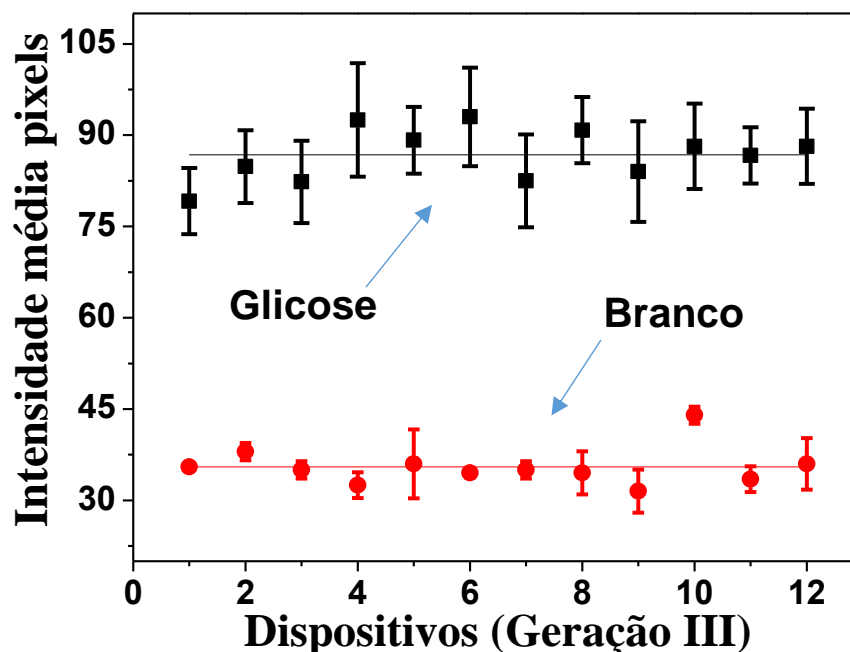
A partir das imagens obtidas, avaliou-se a média e o DPR de cada ensaio nos três dispositivos. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 5. Como pode ser observado, os valores de DPR para os ensaios de proteínas totais, colesterol e glicose foram iguais a 6%, 1% e 3%, respectivamente.

**Tabela 5.** Média de intensidades de pixel para os bioensaios simultâneos em três dispositivos diferentes.

Dispositivo	Controle	Glicose	Proteína	Colesterol
1	45	143	64	136
2	43	149	71	137
3	51	150	72	135
<b>Média ± DP</b>	46±4	147±4	69±4	136±1
<b>DPR</b>	9%	3%	6%	1%

Para o ensaio de glicose foi realizado um estudo para avaliar a resposta analítica em diferentes dispositivos. Um ensaio com uma solução padrão de glicose foi conduzido simultaneamente em 12 DPTs (Geração III).

A Figura 24 mostra a dispersão nas leituras realizadas para o branco e para o ensaio de glicose nos 12 dispositivos utilizados.



**Figura 24.** Dispersão nas leituras realizadas para o ensaio de glicose e para o branco. Cada ponto representa a média de 6 leituras para a glicose e 2 leituras para o branco.

Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para os 12 DPTs para investigar o comportamento das intensidades de cor entre as zonas do dispositivo e entre os dispositivos. Na Tabela 6 é apresentado os dados utilizados para o cálculo da ANOVA.

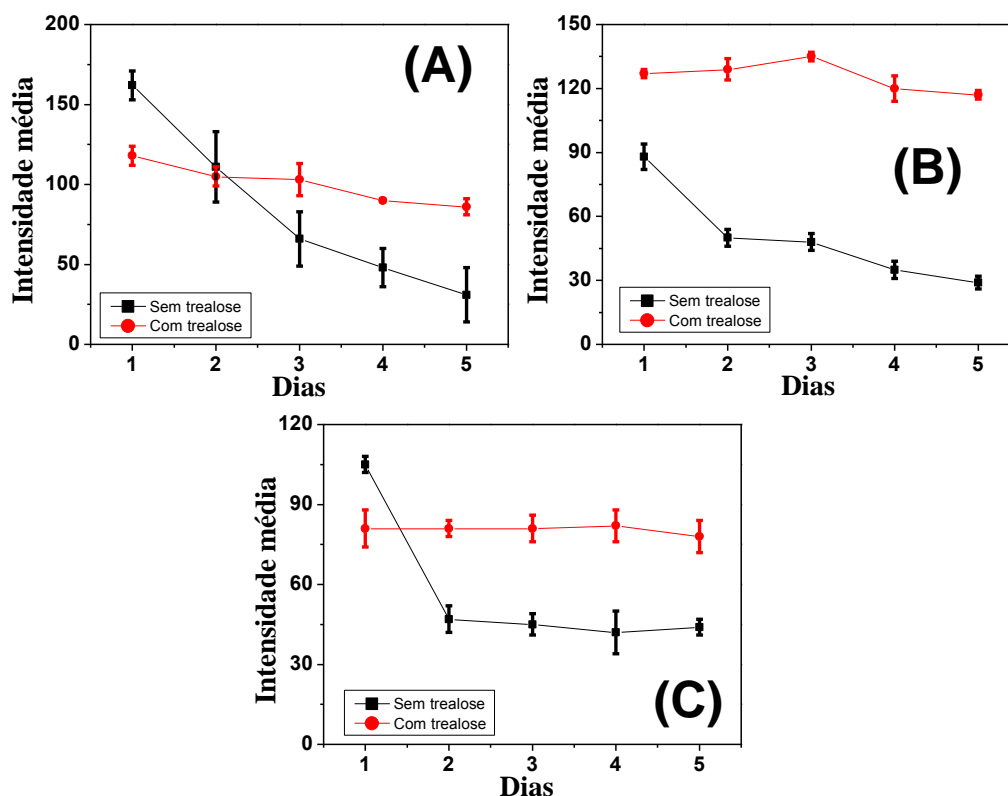
**Tabela 6.** Análise de variância para o ensaio de glicose.

Varição	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática
Intra	3415,18	60	56,92
Inter	350,28	11	31,84
Total	3765,46	71	
<b>F calculado = 1,787</b>			

O valor de  $F_{60,11}$  crítico obtido foi igual a 2,490 ( $P=0,05$ ), ou seja, é maior que o  $F$  calculado para o experimentos. Desse modo, conclui-se que não existem diferenças significativas, com 95% de confiança, entre as intensidades de cor desenvolvidas intra e inter os dispositivos, para o ensaio de glicose.

O tempo de meia-vida dos dispositivos foi avaliado ao longo de cinco dias consecutivos em três diferentes temperaturas de armazenamento (10 °C, 25 °C e 40 °C). Neste estudo foram preparados 30 dispositivos, sendo que 15 foram utilizados no estudo da adição de trealose (estabilizante enzimático). Para realizar este estudo utilizou-se, diariamente, uma mistura padrão de glicose (1,8 mg/mL), proteínas totais (10,0 mg/mL) e colesterol (1,0 mg/mL). No ensaio para proteínas totais acontece uma reação de complexação, por isso a reação não é afetada pela adição da trealose. Na figura 25, é apresentado as intensidades média para o ensaio de glicose. Como pode ser observada, a intensidade média dos pixels em todas as temperaturas, sem adição de trealose, diminui rapidamente.

O decaimento para as intensidades média dos pixels variaram de 45 a 65%, em 5 dias. O tempo de meia-vida destes dispositivos, sem adição de trealose, foi estimado em 3 dias. Esse valor foi estimado considerando que, nestes três dias, houve um decréscimo de 50% na média das intensidades de cor dos ensaios realizados. A adição da trealose prolongou o tempo de vida dos dispositivos microfluídicos. Na presença deste estabilizante os valores de DPR em 10 °C, 25 °C e 40 °C, foram, respectivamente, 13%, 2% e 6%, durante os cinco dias consecutivos.



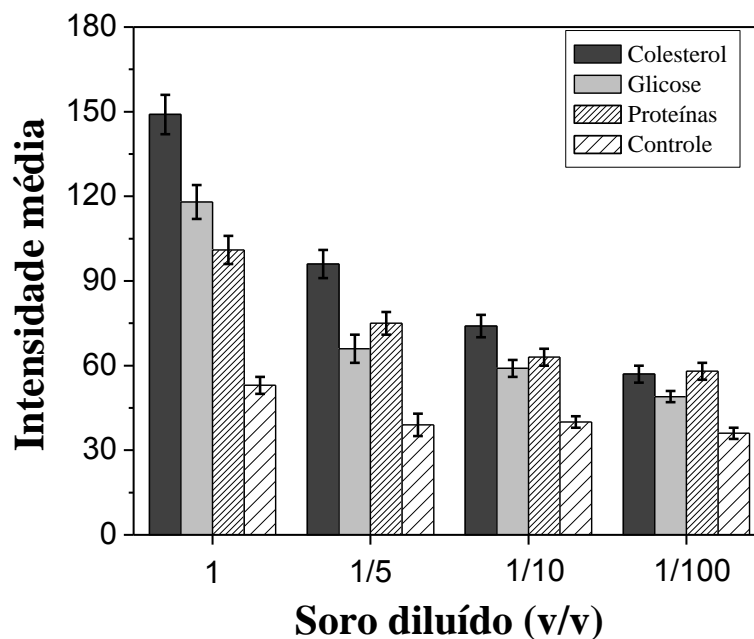
**Figura 25.** Avaliação da atividade enzimática em (A) 10 °C, (B) 25 °C e (C) 40 °C, com e sem adição de trealose.

Como pode ser observado na Figura 25-C houve o decaimento da intensidade de cor (na curva sem adição de trealose), apenas do primeiro para o segundo dia. Após o segundo dia, a intensidade de cor se manteve constante. Assim, poderia concluir que os dispositivos armazenados a 40 °C, sem adição de trealose poderiam ser utilizados com vantagem, visto que dispensa o uso do estabilizante enzimático. Porém, pode-se notar que o valor da intensidade média teve um decréscimo de 43%, aproximadamente, ficando próximo do valor de intensidade para o branco da reação (aproximadamente 30 U.R.). Nota-se então que os DPTs armazenados em temperatura igual a 40 °C, sem adição da trealose, não podem ser utilizados após um dia de estocagem.

Então, de acordo com os dados obtidos é possível concluir que a trealose assegura a estabilidade enzimática em diferentes temperaturas de armazenamento, durante cinco dias consecutivos. Os resultados obtidos com a adição do estabilizante enzimático estão de acordo com trabalhos semelhantes, relacionados com bioensaios, em plataformas microfluídicas a base de papel ([MARTINEZ et al., 2008a](#); [DUNGCHAI, CHAILAPAKUL e HENRY, 2012](#)).

#### **4.7. Análise semi-quantitativa em amostra artificial de soro humano**

Utilizando os DPTs (Geração II) e o *scanner* (300 dpi de resolução) como detector colorimétrico, um ensaio para determinar níveis de glicose, colesterol e proteínas totais foi realizado em uma amostra artificial de soro humano. Em um estudo preliminar para glicose, colesterol e proteínas totais foi possível detectar todos os analitos antes e depois de três diferentes diluições (1/5, 1/10 e 1/100 v/v). A Figura 26 mostra as intensidades médias dos pixels para cada ensaio, com as soluções diluídas.



**Figura 26.** Decaimento na intensidade média de pixels após três séries de diluições. As intensidades obtidas para cada bioensaio foi calculada a partir da média de quatro leituras.

Com a intensidade média dos pixels obtida para cada ensaio e utilizando as curvas analíticas obtidas (Fig. 22) foi possível determinar os teores de glicose, colesterol e proteínas totais em uma amostra artificial de soro humano. Os valores de concentrações encontrados pelo método proposto e a faixa de concentração especificada pelo fabricante (Doles Reagentes) do soro artificial é apresentado na Tabela 7.

**Tabela 7.** Análise semi-quantitativa de glicose, colesterol e proteínas totais em uma amostra artificial de soro humano.

Analitos	Valores Certificados (mg/mL)	Valores encontrados (mg/mL)
<b>Glicose</b>	0,6 – 0,8	0,7 ± 0,1
<b>Colesterol</b>	1,1 – 1,4	1,1 ± 0,2
<b>Proteínas</b>	39,2 – 49,8	46,6 ± 6,0

Como pôde ser observado na Tabela 7, os valores de concentrações dos analitos avaliados pelo método proposto, encontram-se dentro da faixa de concentração certificada pelo fabricante do soro. Este estudo torna mais evidente a funcionalidade destes DPTs para aplicações em bioensaios clínicos.

#### **4.7.1. Teste de recuperação para o ensaio de glicose**

Foi realizado um ensaio de recuperação para determinar a exatidão do método proposto. Neste ensaio utilizou-se a Geração-III dos DPTs e uma amostra de urina artificial. O ensaio foi conduzido utilizando-se o método da adição de padrão em três níveis de concentração (1,5, 3,0 e 4,5 mmol/L) de uma solução padrão de glicose.

Os DPTs obtiveram exatidão na faixa de 103 a 107%. O fator de recuperação acima de 100% pode ser justificado pela adição da trealose. Quando se adiciona esse dissacarídeo, a perda da atividade enzimática é diminuída, aumentando a eficiência de quebra da glicose em peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, aumentando a conversão de iodeto a iodo, desenvolvendo intensidades de cor mais acentuadas.

#### **4.8. Avaliação do custo de fabricação e utilização dos DPTs**

Estes DPTs, em todos os estudos realizados, vêm demonstrando resultados satisfatórios e seu uso está se fazendo bastante promissor para conduzir bioensaios clínicos.

Todavia, além de mostrar o desempenho analítico destes DPTs, realizou-se a estimativa do custo total do processo de fabricação, levando

em consideração o material gasto em todo processo. A Tabela 8 mostra o custo de cada etapa de fabricação de um DPT.

**Tabela 8.** Custo de fabricação de um DPT.

<b>Etapa de fabricação</b>	<b>Custo estimado em reais (R\$)</b>	<b>Custo dispositivo pronto</b>
<b>Folha de transparência</b>	2,00	0,17
<b>Impressão utilizando toner</b>	0,02	0,0001
<b>Folha de poliéster intermediária</b>	0,20	0,20
<b>Celulose (500g)</b>	300,00	0,03
<b>Preço total de um dispositivo</b>		<b>0,40</b>

Como pode ser observado o custo de cada dispositivo, considerando todo processo de fabricação, é muito baixo. Toda instrumentação utilizada no processo de fabricação (computador, impressora, laminadora e software gráfico) tem custo estimado em R\$ 1400,00. Essa instrumentação de baixo custo torna a implementação desse método bastante acessível a, praticamente, todos os Centros de Pesquisa e Órgãos de Saúde com recursos financeiros limitados.

Outro comparativo foi realizado mostrando o custo de uma análise realizada em um laboratório especializado e o custo do mesmo ensaio realizado nos DPTs. A Tabela 9 apresenta o custo total e o tempo estimado para obter o resultado para cada ensaio clínico.

**Tabela 9.** Laboratório especializado *versus* DPTs.

<u>Bioensaio</u>	<u>Laboratório especializado (R\$)</u>	<u>DPTs (R\$)</u>
<b>Colesterol</b>	10,00	0,01
<b>Glicose</b>	10,00	0,10
<b>Proteínas totais</b>	9,00	0,01
<b>Triglicerídeos</b>	10,00	0,01
<b>Dispositivo</b>	*****	0,40
<b>Total</b>	<b>39,00</b>	<b>0,53</b>

<u>Tempo da análise</u>	<u>Laboratório especializado</u>	<u>Método proposto</u>
<b>Colesterol</b>	24 Horas	< 30 min
<b>Glicose</b>	24 Horas	< 30 min
<b>Proteínas totais</b>	24 Horas	< 30 min
<b>Triglicerídeos</b>	24 Horas	< 30 min

Como pode ser observado na Tabela 10 o uso dos DPTs para realizar bioensaios faz com que o preço da análise convencional seja reduzido em mais de cem vezes. Foram realizados quatro bioensaios clínicos com um custo extremamente reduzido, na ordem de centavos de reais. Outro fator que deve ser levado em consideração é o tempo para se obter o resultado do bioensaio. Como pode ser visto o uso dos DPTs, além de promover uma redução acentuada no custo da análise, comparado com laboratórios especializados, obteve um tempo consideravelmente menor para fornecer o resultado final da análise.

Foi possível então, utilizando os DPTs, conduzir um ensaio clínico simultâneo para glicose, colesterol, proteínas totais e triglicerídeos, com

custo e tempo de análise bastante reduzidos, quando comparado com laboratórios especializados.

Outra vantagem obtida com o uso dos DPTs é que toda a etapa de coleta e processamento da amostra pode ser feita no local onde o paciente se encontra. E, se possível, as imagens podem ser enviadas para um laboratório (via e-mail, por exemplo) onde serão processadas ou essas imagens podem ser processadas no local da coleta da amostra, podendo obter o resultado da análise momentos depois da coleta.

## 5. Conclusões

O uso de DPTs para conduzir bioensaios com detecção colorimétrica foi demonstrado, pela primeira vez, neste trabalho. O uso da força capilar foi vantajoso, uma vez que não foi necessário o uso de equipamentos externos para conduzir o fluido através do microcanal. Foram desenvolvidos neste trabalho três diferentes geometrias (Geração I, II e III) para conduzir ensaios analíticos e bioanalíticos.

Dentre os equipamentos eletrônicos avaliados como detector colorimétrico, o *scanner* foi o equipamento comercial que apresentou maior facilidade para conduzir a detecção colorimétrica dos bioensaios. Além disso, após análise estatística, foi possível mostrar que o *scanner* não forneceu resposta analítica com diferenças significativas ( $P=0,05$ ) de um espectrofotômetro. As barreiras hidrofóbicas criadas pelo toner, de espessura aproximada de 6  $\mu\text{m}$ , foram suficientes para manter a solução confinada nas zonas de detecção.

Os dispositivos Geração II foram escolhidos para conduzir os primeiros ensaios bioanalíticos para detecção de glicose, proteínas totais, colesterol e triglicerídeos, utilizando o *scanner* como detector colorimétrico. A adição da pasta de celulose nas zonas de detecção foi uma alternativa eficaz para evitar o desenvolvimento de cor nos canais microfluídicos. Isso ocorre, porque após secar, a celulose forma uma estrutura porosa que consegue confinar os reagentes de cor dos bioensaios. Isso refletiu na melhora da repetibilidade dos ensaios, que obtiveram DPRs, intra-dispositivos, abaixo de 5%. Um ensaio simultâneo com solução padrão de glicose, proteínas totais e colesterol foi realizado e observou-se que o DPR inter-dispositivos ficou abaixo de 6% ( $n=3$ ).

O estudo para avaliar o tempo de meia-vida dos DPTs foi realizado com o bioensaio para determinar glicose. Foi observado que a adição de trealose, diminui a perda da atividade enzimática das enzimas, sendo possível determinar o tempo de meia-vida dos dispositivos, estimado em três dias.

As concentrações determinadas nos dispositivos estavam dentro da faixa de concentração certificada pelo fabricante do soro controle.

O custo de fabricação dos dispositivos foi estimado considerando o gasto com a folha de transparência, do toner da impressão, do corte a laser da folha intermediária e da celulose adicionada nas zonas de detecção. A folha intermediária foi adicionada, uma vez que ela assegura o transporte capilar espontâneo, pelo aumento da razão de aspecto do canal. Apesar da máquina de corte a laser possuir custo elevado, o corte em batelada das peças intermediárias, teve custo estimado em R\$ 0,20. Assim, o custo estimado de um DPT foi de R\$ 0,40. O tempo de análise e o custo dos bioensaios no dispositivo proposto foram comparados aos de um laboratório especializado. Observou-se uma redução acentuada no tempo e no custo das análises conduzidas nos DPTs. A simplicidade instrumental, a redução nos custos dos bioensaios, na fabricação e no tempo de análise e a portabilidade são vantagens que tornam o uso dos DPTs uma alternativa muito interessante e acessível a regiões onde o recurso financeiro é limitado e em regiões onde é necessário fazer um controle rápido das condições de saúde da população.

## 6. Perspectivas futuras

O uso do PT como substrato para dispositivos analíticos e bioanalíticos é bastante promissor, com muitas aplicações a serem desenvolvidas. Os DPTs desenvolvidos neste estudo poderão ser aplicados para conduzir uma quantidade maior de ensaios bioclínicos, como por exemplo, testes rápidos para lactato, uréia, albumina, creatinina e doenças infecciosas como dengue, tuberculose, leishmaniose, doença de Chagas e AIDS.

Ainda nesse contexto das análises clínicas, os DPTs podem conduzir um ensaio que permita a separação do plasma sanguíneo. Isso pode ser feito adicionando-se uma estrutura porosa que atuará como um filtro, retendo os glóbulos vermelhos. Songjaroen e colaboradores ([SONGJAROEN et al., 2012](#)) conseguiram retirar as hemácias de uma amostra de sangue em um dispositivo de papel. Essa separação é importante, uma vez que os glóbulos vermelhos interferem diretamente nos diagnósticos clínicos. Essa separação é comumente realizada por centrifugação ou sedimentação, sendo uma etapa a mais no diagnóstico. Essa estratégia permitirá realizar o diagnóstico simultâneo no ponto de necessidade utilizando apenas uma alíquota de sangue.

O efeito de lavagem observado nas zonas de detecção é outro fator que pode ser minimizado nos DPTs. Uma alternativa para reduzir esse efeito é tentar realizar uma imobilização das enzimas na celulose. Com isso desenvolvimento da coloração dos bioensaios deverá ser mais homogêneo em toda zona de detecção e poderá ocorrer uma melhora na repetibilidade dos ensaios.

Os DPTs poderão ser uma ferramenta eficaz para auxiliar no controle da qualidade de saúde da população de países ainda em desenvolvimento por

apresentarem custo reduzido, simplicidade instrumental e, ainda que seja preciso mais estudos, por apresentarem resultados muito promissores.

## 7. Referências Bibliográficas

ARORA, A.; SIMONE, G.; SALIEB-BEUGELAAR, G. B.; KIM, J. T.; MANZ, A. Latest developments in micro total analysis systems. *Analytical Chemistry*, v. 82, n. 12, p. 4830-4847, 2010.

AUROUX, P. A.; IOSSIFIDIS, D.; REYES, D. R.; MANZ, A. Micro Total Analysis systems. 2. Analytical Standard Operations and applications. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 12, p. 2637-2652, 2002.

BABAIE, A.; SAIDI, M. H.; SADEGHI, A. Electroosmotic flow of power-law fluids with temperature dependent properties. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, v. 185, p. 49-57, 2012.

BAKER, D. *Capillary Electrophoresis*. New York: John Wiley, 244 p, 1995.

BRUZEWICZ, D. A.; RECHES, M.; WHITESIDES, G. M.; Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. *Analytical Chemistry*, v. 80, n. 9, p. 3387-3392, 2008.

CAMBUIM, K. B. Carvão do endocarpo de coco da Baía ativado quimicamente com  $H_3PO_4$  e fisicamente com vapor de d'água: produção, caracterização e aplicações. João Pessoa, 2009. 137p. Tese (Doutorado) – Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba.

CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 16, p. 7091-7095, 2009a.

CARRILHO, E.; PHILLIPS, S. T.; VELLA, S. J.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M.; Paper microzones plates, *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 15, p. 5990-5998, 2009b.

CHEN, H.; LI, X.; WANG, L.; LI, P.C.H. A rotating microfluidic array chip for staining assays, *Talanta*, v. 81, n. 4-5, p. 1203-1208, 2010.

CHEN, Y.; PÉPIN, A.; Nanofabrication: Conventional and nonconventional methods. *Electrophoresis*, v. 22, n. 2, p. 187-207, 2001.

COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E. Rapid prototyping of polymeric electrophoresis microchips with integrated copper electrodes for contactless conductivity detection. *Analytical Methods*, v. 3, n. 1, p. 168-172, 2011.

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

COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; DA SILVA, H. D. T.; RICHTER, E. M.; FURLAN, R.; ANGNES, L.; DO LAGO, C. L.; MAZO, L. H.; CARRILHO, E.; Electrophoresis Microchip fabricated by direct-printing process with end-channel amperometric detection. *Electrophoresis*, v. 25, n. 21-22, p. 3832-3839, 2004.

COLTRO, W. K. T.; DE JESUS, D. P.; DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L.; CARRILHO, E.; Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. *Electrophoresis*, v. 31, n. 15, p. 2487-2498, 2010.

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

COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; CARRILHO, E.; DE JESUS, D. P.; DA SILVA, J. A. F.; DA SILVA, H. D. T.; DO LAGO, C. L.; Micro chemical analysis systems. Introduction, fabrication technologies, instrumentation and applications. *Química Nova*, v. 30, n. 8, p. 1986-2000, 2007.

COMER, J. P. Semiquantitative specific test paper for glucose in urine. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 11, p.1748-1750, 1956.

DARHUBER, A. A.; TROIAN, S. M. Principles of microfluidic actuation by modulation of surface stresses. *Annual Review of Fluid Mechanics*, v. 37, p. 425-455, 2005.

DA SILVA, E. R. SEGATO, T. P.; COLTRO, W. K. T.; LIMA, R. S.; CARRILHO, E.; MAZO, L. H. Determination of glyphosate and AMPA on polyester-toner electrophoresis microchip with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, v. 34, n. 14, p. 2107-2111, 2013.

DE SOUZA, F. R.; ALVES, G. L.; COLTRO, W. K. T. Capillary-driven toner-based microfluidic devices for clinical diagnostics with colorimetric detection. *Analytical Chemistry*, v. 84, n. 21, p. 9002-9007, 2012.

DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A. Micro Total Analysis Systems. Latest Advancements and trends. *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 12, p. 3887-3907, 2006.

DO LAGO, C. L.; DA SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA, J. A. F.; A dry process for production of microfluidic devices based on the lamination of laser-printed polyester. *Analytical Chemistry*, v. 75, n. 15, p. 3853-3858, 2003.

DUARTE, G. R. M.; COLTRO, W. K. T.; BORBA, J. C.; PRICE, C. W.; LANDERS, J. P.; Disposable polyester-toner electrophoresis microchips for DNA analysis. *Analyst*, v. 137, n. 11, p. 2692-2698, 2012.

DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; AUGUSTINE, B. H.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P.; Dynamic Solid Phase DNA Extraction and PCR

Amplification in Polyester-Toner Based Microchip. *Analytical Chemistry*, v. 83, n. 13, p. 5182-5189, 2011.

DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S.; Use of multiple colorimetric indicators for paperbased microfluidic devices. *Analytical Chimica Acta*, v. 674, n. 2, p. 227-233, 2010.

ELLERBEE, A. K.; PHILLIPS, S. T.; SIEGEL, A. C.; MIRICA, K. A.; MARTINEZ, A. W.; STRIEHL, P.; JAIN, N.; PRENTISS, M.; WHITESIDES, G. M.; Quantifying Colorimetric Assays in Paper-Based Microfluidic Devices by Measuring the Transmission of Light through Paper. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 20, p. 8447-8452, 2009.

GABRIEL, E. F. M.; DUARTE JUNIOR, G. F.; GARCIA, P. T.; DE JESUS, D. P.; COLTRO, W. K. T.; Polyester-toner electrophoresis microchips with improved analytical performance and extended lifetime. *Electrophoresis*, v. 33, n. 17, 2660-2667, 2012.

GARCÍA, A.; ERENAS, M. M.; MARINETTO, E. D.; ABAD, C. A.; ORBE-PAYA, I.; PALMA, A. J.; CAPITÁN-VALLVEY, L. F.; Mobile phone platform as portable chemical analyzer. *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 156, n. 1, p. 350-359, 2011.

GERVAIS, L.; DELAMARCHE, E. Toward one-step point-of-care immunodiagnosics using capillary-driven microfluidics and PDMS substrates. *Lab on a Chip*, v. 9, n. 23, p. 3330-3337, 2009.

GODINHO, M. S.; PEREIRA, R. O.; RIBEIRO, K. O.; SCHIMIDT, F.; DE OLIVEIRA, A. E.; DE OLIVEIRA, S. B. Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes principais (PCA). *Química Nova*, v. 31, n. 6, p. 1485-1489, 2008.

HITZBLECK, M.; AVRAN, L.; SMEKENS, V.; LOVCHIK, R. D.; MERTENS, P.; DELAMARCHE, E. Capillary soft valves for microfluidics. *Lab on a Chip*, v. 12, n. 11, p. 1972-1978, 2012.

IQBAL, Z.; BJORKLUND, R. B.; Colorimetric analysis of water and sand samples performed on a mobile phone. *Talanta*, v. 84, n. 4, p. 1118-1123, 2011.

JUNCKER, D.; SCHMID, H.; DRECHSLER, U.; WOLF, H.; WOLF, M.; MICHEL, B.; DE ROOIJ, N.; DELAMARCHE, E. Autonomous microfluidic capillary system. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 24, p. 6139-6144, 2002.

KARLINSEY, J. M. Sample introduction techniques for microchip electrophoresis: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 725, p. 1-13, 2012.

KIM, A. R.; KIM, J. Y.; CHOI, K.; CHUNG, D. S. On-chip immunoassay of a cardiac biomarker in serum using a polyester-toner microchip. *Talanta*, v. 109, p. 20-25, 2013.

KLASNER, S. A.; PRICE, A. K.; HOEMAN, K. W.; WILSON, R. S.; BELL, K. J.; CULBERTSON, C. T.; Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, n. 5, p. 1821-1829, 2010.

KOVARIK, M. L.; ORNOFF, D. M.; MELVIN, A. T.; DOBES, N. C.; WANG, Y.; DICKINSON, A. J.; GACH, P. C.; SHAH, P. K.; ALLBRITTON, N. L.; *Micro Total Analysis Systems: Fundamentals Advances and Applications in the Laboratory, Clinic, and Field. Analytical Chemistry*, v. 85, n. 2, p. 451-472, 2013.

LEE, D.; CHOU, W. P.; YEH, S. H.; CHEN, P. J.; CHEN, P.H.; DNA detection using commercial mobile phones. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 26, n. 11, p. 4349-4354, 2011.

LI, X.; BALLERINI, D. R.; SHEN, W. A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. *Biomicrofluidics*, v. 6, n. 1, p. 1-13 (011301), 2012.

LIN, B.; LEVCHENKO, A.; Microfluidic technologies for studying synthetic circuits. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 16, n. 3-4, p. 307-317, 2012.

LIU, A. L.; HE, F. Y.; HU, Y. L.; XIA, X. H.; Plastified poly(ethylene terephthalate) (PET)-toner microfluidic chip by direct-printing integrated with electrochemical detection for pharmaceutical analysis. *Talanta*, v. 68, n. 4, p. 1303-1308, 2006.

LU, Y.; HU, Y. L.; XIA, X. H.; Effect of surface microstructures on the separation efficiency of neurotransmitters on a direct-printed capillary electrophoresis microchip. *Talanta*, v. 79, n. 5, p. 1270-1275, 2009a.

LU, Y.; SHI, W.; QIN, J.; LIN, B.; Low cost, portable detection of gold nanoparticle-labeled microfluidic immunoassay with camera cell phone. *Electrophoresis*, v. 30, n. 4, p. 579-582, 2009b.

MÄÄTTÄNEM, A.; FORS, D.; WANG, S.; VALTAKARI, D.; IHALAINEN, P.; PELTONEN, J. Paper-based planar reaction arrays for printed diagnostics. *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 160, n. 1, p. 1404-1412, 2011.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M.; Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical Sensing. v. 1, n. 1-6, p. 244-248, 1990.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; BUTTE, M. J.; WHITESIDES, G. M.; Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 46, n. 8, p. 1318-1320, 2007.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS III, S. W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G. M.; Simple telemedicine for developing regions:

Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Analytical Chemistry*, v. 80, n. 10, p. 3699-3707, 2008a.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M.; CARRILHO, E.; Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*, v. 82, n. 1, p. 3-10, 2010.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M.; Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 50, p.19606-19611, 2008b.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WILEY, B. J.; GUPTA, M.; WHITESIDES, G. M.; FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, v. 8, n. 12, p. 2146-2150, 2008c.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Elsevier Saunders: Philadelphia, 2011, 1568p.

MILLER, J. N. MILLER J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. England: Pearson, 2010, 130p.

MULLER, R. H.; CLEGG, D. L.; Automatic paper chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 21, n. 9, p. 1123-1125, 1949.

NGE, P. N.; ROGERS, C. I.; WOOLLEY, A. T.; Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications. *Analytical Chemistry*, v.113, n. 4, p. 2550-2583, 2013.

NIE, J.; ZHANG, Y.; LIN, L.; ZHOU, C.; LI, S.; ZHANG, L.; LI, J. Low-cost fabrication of paper-based microfluidic devices by one-step plotting. *Analytical Chemistry*, v. 84, n. 15, p. 6331-6335, 2012.

OLIVEIRA, K. A.; DE OLIVEIRA, C.R.; DA SILVEIRA, L.A.; COLTRO, W.K.T. Laser-printing of toner-based 96-microzone plates for immunoassays. *Analyst*, v. 138, n. 4, p. 1114-1121, 2013.

OUYANG, Y. W.; WANG, S. B.; LI, J. Y.; RIEHL, P. S.; BEGLEY, M.; LANDERS, J. P. Rapid Patterning of "tunable" hydrophobic valves on disposable microchips by laser printer lithography. *Lab on a Chip*, v. 13, n. 9, p. 1762-1771, 2013.

PELTON, R. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 8, p. 925-942, 2009.

PETERSON, C. How it works: The Charge-Coupled Device. *Journal of Young Investigators*, v. 3, n. 1, 2001.

PICCIN, E.; COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; NETO, S. C.; MAZO, L. H.; CARRILHO, E. Polyurethane from biosource as a new material for

fabrication of microfluidic devices by rapid prototyping. *Journal of Chromatography A*, v. 1173, n. 1-2, p. 151-158, 2007.

POLLOCK, N. R.; ROLLAND, J. P.; KUMAR, S.; BEATTIE, P. D.; JAIN, S.; NOUBARY, F.; WONG, V. L.; POHLMANN, R. A.; RYAN, U. S.; WHITESIDES, G. M. A paper-based multiplexed transaminase test for low-cost, point-of-care liver function testing, *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 152, 2012.

QASAIMEH, M. A.; RICOULT, S. G.; JUNCKER, D. Microfluidic probes for use in life sciences and medicine. *Lab on a chip*, v. 13, n. 1, p. 40-50, 2013.

QUIRINO, J. P.; ARANAS, A. T. Simultaneous electrokinetic and hydrodynamic injection with on-line sample concentration via micelle to solvent stacking in micellar electrokinetic chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 733, p. 84-89, 2012.

REYES, D. R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P. A.; MANZ, A. Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, theory and technology. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 12, p. 2623-2636, 2002.

SAITO, R. M.; COLTRO, W. K. T.; DE JESUS, D. P. Instrumentation design for hydrodynamic sample injection in microchip electrophoresis: A review. *Electrophoresis*, v. 33, n. 17, p. 2614–2623, 2012.

SCHILLING, K. M.; JAUREGUI, D.; MARTINEZ, A. W. Paper and toner three-dimensional fluidic devices: programming fluid flow to improve point-of-care diagnostics. *Lab on a Chip*, v. 13, n. 4, p. 628-631, 2013.

SHEN, L.; HAGEN, J. A.; PAPAUTSKY, I. Point-of-care colorimetric detection with a smartphone. *Lab on a Chip*, v. 12, n. 21, p. 4240-4243, 2012.

SONGJAROEN, T.; DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S.; LAIWATTANAPAISAL, W. Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. *Lab on a Chip*, v. 12, n. 18, p. 3392-3398, 2012.

TIAN, J.; KANNANGARA, D.; LI, X.; SHEN, W.; Capillary driven low-cost V-groove microfluidic device with high sample transport efficiency. *Lab on a Chip*, v. 10, n. 17, p. 2258-2264, 2010.

VON LODE, P. Point-of-care immunotesting: Approaching the analytical performance of central laboratory methods. *Clinical Biochemistry*, v. 38, n. 07, p. 591-606, 2005.

WANG, H.; LIU, J.J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z.; Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 49, n. 5, p. 877-880, 2010.

WANG, S.Q.; ZHAO, X.H.; KHIMJI, I.; AKBAS, R.; QIU, W.; EDWARDS, D.; CRAMER, D. W.; YE, B.; DEMIRCI, U.; Integration of cell phone imaging with

microchip ELISA to detect ovarian cancer HE4 biomarker in urine at the point-of-care. *Lab on a Chip*, v. 11, n. 20, p. 3411-3418, 2011.

WEST, J.; BECKER, M; TOMBRINK, S.; MANZ, A.; Micro total analysis systems: Latest achievements. *Analytical Chemistry*, v. 80, n. 12, p.4403-4419, 2008.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. England, Nature Publishing Group, p. 368-373, 2006.

WHO, World Health Organization <[www.who.int](http://www.who.int)>

YANG, D.; KRASOWSKA, M.; PRIEST, C.; POPESCU, M. N.; RALSTON, J. Dynamics of capillary-driven flow in open microchannels, *Journal of Physical Chemistry C*, v. 115, n. 38, p. 18761-18769, 2011.

YU, H.; HE, F. Y.; LU, Y.; HU, Y. L.; ZHONG, H. Y.; XIA, X. H.; Improved separation efficiency of neurotransmitters on a native printed capillary electrophoresis microchip simply by manipulating electroosmotic flow. *Talanta*, v. 75, n. 1, p. 43-48, 2008.

ZARGAR, B.; HATAMIE, A. A simples and fast colorimetric method or detection of hydrazine in water samples based on formation of gold nanoparticles as a colorimetric probe. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v.182, p. 706-710, 2013.

ZIMMERMANN, M.; SHMID, H.; HUNZIKER, P.; DELAMARCHE, E. Capillary pumps for autonomous capillary systems. *Lab on a Chip*, v. 7, n. 1, p. 119-125, 2007.

## 8. CURRICULUM VITAE

### 1. Informações Pessoais

**Nome Completo:** Fabrício Ribeiro de Souza

**Endereço eletrônico:** [frsouza\\_88@yahoo.com.br](mailto:frsouza_88@yahoo.com.br)

**Naturalidade:** Goianira – GO

**Data de Nascimento:** 10/09/1988

**Filiação:** Valdicésio Ribeiro de Faria e Lucilia de Souza Ribeiro

### 2. Formação Acadêmica

Bacharel em Química  
Universidade Federal de Goiás  
Goiânia – Goiás  
2007 – 2011

### 3. Produção Científica e Tecnológica

#### 3.1. Processos ou técnicas

1. Souza, F. R.; Alves, G. L.; Coltro, W. K. T. **Sistema microfluídico, baseado em poliéster-toner, para diagnósticos clínicos com detecção colorimétrica e transporte da amostra via força capilar.** 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020120122936, data de depósito: 03/05/2012.

#### 3.2. Artigos publicados, submetidos ou em redação

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

2. OLIVEIRA, K. A.; MEDRADO E SILVA, P. B.; SOUZA, F. R.; MARTINS, F. T.; COLTRO, W. K. T. **Monitoring of the glucose oxidase kinetics on capillary-driven toner-based microfluidic devices with colorimetric detection.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, em redação.

3. DE SOUZA, F. R.; DUARTE JUNIOR, G. F.; GARCIA, P. T.; COLTRO, W. K. T.; **Avaliação de dispositivos eletrônicos para detecção colorimétrica em microssistemas analíticos fabricados em poliéster-toner.** Química Nova, 2013, em redação.

### 3.3. Trabalhos apresentados em reuniões científicas

(1) SOUZA, F. R.; COLTRO, W. K. T. Diagnósticos clínicos em plataformas microfluídicas fabricadas em poliéster-toner. 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013.

(2) SOUZA, F. R.; GARCIA, P. T.; DUARTE JUNIOR, G. F.; COLTRO, W. K. T. Determinação de  $Fe^{2+}$  em formulações farmacêuticas usando análises digitais em microzonas impressas. 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013.

(3) SOUZA, F. R.; OLIVEIRA, K. A.; COLTRO, W. K. T. **Laser Printing of Toner-Based Devices for Clinical Assays with Colorimetric Detection.** 2<sup>nd</sup> Annual Conference & Exhibition of Society for Laboratory Automation and Screening, 2013.

(4) SOUZA, F. R.; ALVES, G. L.; OLIVEIRA, K. A.; SILVA, P. B. M.; COLTRO, W. K. T. **Fabrication of capillary-driven toner-based microfluidic devices for diagnostics with colorimetric detection.** The 16<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2012.

(5) SOUZA, F. R.; COLTRO, W. K. T. **Construção de um sistema microfluídico minimamente instrumentado para ensaios bioanalíticos.** 1ª Escola de Bioanalítica, 2012.

(6) SOUZA, F. R.; COLTRO, W. K. T. **Plataforma microfluídica usando força capilar para aplicação em diagnósticos com detecção colorimétrica.** II Workshop em Microfluídica, 2012.

(4) SOUZA, F. R. ; Coltro, W. K. T . **Instrumentação de baixo custo para detecção colorimétrica em microssistemas confeccionados em poliéster-toner.** 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

(5) DUARTE JUNIOR, G. F.; GARCIA, P. T.; SOUZA, F. R.; COLTRO, W. K. T . **Determinação colorimétrica de  $Fe^{2+}$  em fármacos utilizando microssistemas analíticos.** 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

(6) SOUZA, F. R. ; Coltro, W. K. T . **Análise de dispositivos eletrônicos para detecção colorimétrica em microssistemas de poliéster-toner.** 16º Encontro Nacional de Química Analítica, 2011.

(7) ALVES, G. L. ; SOUZA, F. R. ; COLTRO, W. K. T. **Construção de microssistemas analíticos multicamadas em poliéster-toner para aplicações bioanalíticas.** 16º Encontro Nacional de Química Analítica, 2011.

(8) KALINKE, L. H. G. ; VILELA, R. S. ; SOUZA, F. R. ; SANTOS, J. R. ; SOUZA, P. S. **Determinação de Cu, Zn e Na em sucos de uva comercializados em Goiás.** 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.

### 3.4. Prêmios

1. Tony B. Academic Travel Award. *2<sup>nd</sup> Annual Conference & Exhibition of Society for Laboratory Automation and Screening*, 12-16 de Janeiro de 2013, Orlando-FL, EUA.

### 3.5. Divulgação para a sociedade

1. TV-UFG, Programa Conhecendo a UFG.

**“Grupo de Métodos Eletroforéticos”**

[http://tvufg.org.br/conhecendoaufg/?page\\_id=48](http://tvufg.org.br/conhecendoaufg/?page_id=48)

<http://www.youtube.com/watch?v=ZVK5iEn9A8k>

**Data de publicação online:** 04/06/2013.

2. TV-UFG, Programa Ei! Ciência.

**“Biochips”**

[http://tvufg.org.br/eiseliganaufg/?page\\_id=39](http://tvufg.org.br/eiseliganaufg/?page_id=39)

[http://www.youtube.com/watch?v=BV\\_XHw\\_uY4](http://www.youtube.com/watch?v=BV_XHw_uY4)

**Data de publicação online:** 20/03/2013.