

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Desenvolvimento de tecnologias alternativas
para fabricação de dispositivos microfluídicos
em papel**

Thiago Miguel Garcia Cardoso

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro

GOIÂNIA-GO

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Cardoso, Thiago Miguel Garcia
Desenvolvimento de tecnologias alternativas para fabricação de
dispositivos microfluídicos em papel [manuscrito] / Thiago Miguel
Garcia Cardoso. - 2014.
LXXX, 80 f.

Orientador: Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2014.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Micro-fabricação. 2. Microfluídica. 3. mPADs. 4. Papel. I. Coltro,
Wendell Karlos Tomazelli, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Desenvolvimento de tecnologias alternativas para
fabricação de dispositivos microfluídicos em papel**

Thiago Miguel Garcia Cardoso

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro

GOIÂNIA-GO

2014

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Thiago Miguel Garcia Cardoso		
E-mail:	tmgcgyn@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input type="checkbox"/> Sim	<input checked="" type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico	Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	DF
CNPJ:	33654831-0001/36		
Título:	Desenvolvimento de tecnologias alternativas para fabricação de dispositivos microfluídicos em papel.		
Palavras-chave:	Micro-fabricação; microfluídica; µPADs		
Título em outra língua:	Development of alternative technologies for fabrication of microfluidics paper-based devices.		
Palavras-chave em outra língua:	Micro-fabrication; microfluidic; µPADs		
Área de concentração:	Química		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	12/12/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Programa Pós-Graduação em Química		
Orientador (a):	Wendell Karlos Tomazelli Coltro		
E-mail:	wendell@ufg.br		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 15 / 05 /2015

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado em Química, apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, em 12/12/2014 pelo discente Thiago Miguel Garcia Cardoso.

Comissão Julgadora:

Wendell Coltro

Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro – orientador IQ/UFG

Thiago Regis Longo Cesar da Paixão

Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão – IQ/USP

Paulo Roberto Martins

Prof. Dr. Paulo Roberto Martins – IQ/UFG

A Lógica De!

Conta certa lenda, que estavam duas crianças patinando num lago congelado.

Era uma tarde nublada e fria, e as crianças brincavam despreocupadas. De repente, o gelo quebrou e uma delas caiu, ficando presa na fenda que se formou.

A outra, vendo seu amiguinho preso, e se congelando, tirou um dos patins e começou a golpear o gelo com todas as suas forças, conseguindo por fim, quebrá-lo e libertar o amigo.

Quando os bombeiros chegaram e viram o que havia acontecido, perguntaram ao menino:

- Como você conseguiu fazer isso? É impossível que tenha conseguido quebrar o gelo, sendo tão pequeno e com mãos tão frágeis!

Nesse instante, um ancião que passava pelo local, comentou:

- Eu sei como ele conseguiu.

Todos perguntaram:

- Pode nos dizer como?

- É simples: - respondeu o velho.

- Não havia ninguém ao seu redor para lhe dizer que não seria capaz.

[Albert Einstein](#)

Dedico este trabalho

A Deus primeiramente, aos meus pais Alberto e Lourença, aos meus irmãos Marianne e Igor, aos meus familiares, a minha namorada Danielle Carvalho, aos meus professores e aos meus amigos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida. Ao Divino Pai Eterno, por me abençoar e me ter dado forças para continuar nos momentos mais difíceis desta caminhada, ao Espírito Santo pelos dons da Sabedoria, Inteligência e Fortaleza. A Nossa Senhora, que me amparou em todos os momentos de dificuldades.

Aos meus pais, Alberto e Lourença, pelo amor incondicional, pelo carinho, orações, torcida, apoio emocional e financeiro e pelos conselhos. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim até hoje. Podem ter certeza, que se cheguei até aqui foi graças a vocês. Muito obrigado!

Aos meus irmãos Igor e Marianne, obrigado pela torcida, preocupações, amizade e incentivo.

Aos meus avôs: Zoé (Zuzu), Possidônio (*in memorian*), Miguel e Conceição; meu muito obrigado pelas orações, pelos exemplos dados, pelo incentivo, carinho e torcida.

Aos meus padrinhos: Teresinha, Antônio (*in memorian*), Bernadete e Paulo; muito obrigado pelo amor, carinho, torcida e incentivos nesta caminhada tão árdua.

A minha namorada Danielle Carvalho; muito obrigado pelo carinho, amor, amizade, companheirismo, incentivo e torcida. Amor, obrigado por fazer os meus dias mais alegres, por ouvir minhas angústias e me acalmar nos momentos difíceis. Danielle, eu te amo!

Aos meus tios: Carlos Bittencourt, Maria Aparecida, Carlos Mellem, Lázara (*in memorian*), Amadeu (*in memorian*), Terezinha, Antônio (*in memorian*), Bernadete, Donizeti, Kênia, Paulo, Luciene e Adelma; muito obrigado pelos incentivos, conselho e torcida.

Aos meus primos, Carlos Miguel, Lucas Paulo, Liliane, Viviane, Paulo Henrique, Luciana, José Ricardo, Patrícia, Cybele, Danielle, Rodrigo,

Gustavo, Leandro, Daniela, Paulene, Rodrigo, Paula, Carlos Neto, Rafael, Mateus, Isabela, Leonardo, Bruno, Lara, Letícia, Felipe e Isabeli; muito obrigado pela torcida e conselhos.

Ao meu orientador Wendell Karlos Tomazelli Coltro; obrigado por tudo que o senhor fez por mim nesses últimos 2 anos e meio que estou sob sua orientação. Obrigado pelas suas cobranças, que graças a elas foi possível superar os meus limites e descobrir que sou capaz de ir sempre mais além. Obrigado pelos conselhos que me ajudaram a amadurecer, pelos conhecimentos transmitidos e principalmente por ter me ensinado a admirar e contribuir com esta nova área do conhecimento. O senhor é mais que um orientador é um amigo para todas as horas. Obrigado por tudo! Tenho uma admiração enorme pelo profissional que és!

Gostaria de agradecer a todos os amigos do Grupo de Métodos Eletroforéticos. Pela amizade, convivência, ajuda para o desenvolvimento deste trabalho e pelas discussões sobre temas relacionados a este trabalho. Obrigado Ellen, Karoliny, Paula, Camilla, Laura, Marillya, Simone, Fabrício, Paulo, Cyro, Gerson, Roger, Eulício, Lucas e Anderson. De forma especial gostaria de agradecer ao Paulo de Tarso, sem suas contribuições e ajuda hoje não seria possível colhermos os frutos deste trabalho. Paulo muito obrigado pela sua amizade. Foi excelente trabalhar contigo, espero poder continuar trabalhando em cooperação contigo, para que em um futuro próximo possamos colher mais frutos desta parceria.

Não posso deixar de agradecer, em especial, aos professores Márton Herbert Flora Barbosa Soares (IQ-UFG), Nyuara Araújo da Silva Mesquita (IQ-UFG) e Eduardo Luiz Dias Cavalcanti (IQ-UNB) pela amizade compartilhada, pela iniciação científica, pela ajuda nos primeiros passos, pelos conselhos e, principalmente, pelo incentivo em continuar neste caminho.

Aos professores Emanuel Carrilho (IQSC-USP) e Carlos D. Garcia (DC-UTSA), muito obrigado pelas contribuições neste trabalho, pelas discussões científica e amizade.

Aos professores, técnico-administrativos e ao pessoal dos serviços gerais do Instituto de Química pelas conversas de corredores, pelos favores, pelas trocas de conhecimentos, pela amizade e convivência nestes últimos 8 anos.

Meu agradecimento ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da UFG pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Gostaria ainda de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado, que sem este apoio financeiro, não conseguiria me dedicar exclusivamente a este trabalho que gerou tão bons frutos. A Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica (INCTBio) pelo fomento desta pesquisa, que sem a concessão de recursos não seria possível à realização desta dissertação.

E por fim meu agradecimento aos professores Thiago Regis L. C. da Paixão (IQ-USP) e Paulo Roberto Martins (IQ-UFG), que aceitaram participar da minha banca de defesa de dissertação.

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Figuras do Anexo	v
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
1.1. Microfluídica	1
1.2. Plataformas microfluídicas	3
1.3. <i>Papel</i>	4
1.4. Métodos de fabricação de μPADs	5
1.5.1. Técnicas convencionais para fabricação de μPADs	6
<i>Fotolitografia</i>	6
<i>Impressão a Cera</i>	8
1.5.2. Técnicas alternativas para fabricação de μPADs	9
1.5.2.1. <i>Uso da parafina e desenvolvimento de carimbos</i>	16
1.5.2.2. <i>Uso da técnica de jateamento</i>	18
2. Objetivos	20
2.1. <i>Gerais</i>	20
2.2. <i>Específicos</i>	20
3. Parte Experimental	21
3.1. <i>Materiais e Reagentes</i>	21
3.2. <i>Instrumentação</i>	22
3.3. <i>Fabricação dos dispositivos analíticos em papel</i>	22

3.3.1. Prototipagem dos μ PADs	22
3.2.3) Fabricação de μ PADs com cola branca	24
3.4. <i>Detecção Colorimétrica</i>	26
3.5. <i>Determinação colorimétrica de nitrito em amostras reais</i>	26
3.5.1. Saliva	26
3.5.2. Água de Conserva	27
3.5.3. Salsicha e Presunto	27
3.5.4. Água de rio	27
3.6. <i>Etapa de pré-concentração</i>	28
3.7. <i>Método Espectrofotométrico para a análise de nitrito</i>	28
3.8. <i>Ensaio clínico multiplexado em μPADs fabricados com cola escolar</i>	28
3.8.1. Nitrito	29
3.8.2. Ureia	29
3.8.3. Bilirrubina Total	30
3.8.4. Corpos cetônicos	30
3.8.4.1. <i>Síntese do padrão de corpos cetônicos (ácido acetoacético)</i>	30
3.8.4.2. <i>Análise de corpos cetônicos</i>	31
3.8.5. pH	31
3.8.6. Glicose	31
3.8.7. Ácido úrico	32
3.8.8. Albumina	33
3.8.9. Diagnóstico de pancreatite	33
<i>Amilase</i>	34
<i>Lipase</i>	34
3.9. <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	35
3.10. <i>Microscopia Óptica.</i>	35

4. Resultados e Discussão	37
4.1. <i>Uso do Carimbo</i>	37
4.1.1. Escolha da parafina e método de prototipagem	37
4.1.2. Geração I e II dos carimbos	39
4.1.3. Caracterização	41
4.1.4. Desempenho Analítico	47
4.1.4.1. μ PADs	47
4.1.4.2. Espectrofotometria	49
4.1.4.3. Amostras Reais	50
4.2. <i>Uso da cola escolar</i>	54
4.2.1. Cola Branca ou Cola escolar	54
4.2.1. Escolha da cola e processo de jateamento	55
4.2.2. Caracterização morfológica	56
4.3. <i>Ensaio Clínicos multiplexados</i>	58
4.4. <i>Diagnóstico de Pancreatite – Ensaio Preliminares</i>	62
5. Conclusões	63
6. Perspectivas Futuras	65
6.1 <i>Otimização do processo de fabricação pelo método de jateamento.</i>	65
6.2 <i>Aplicações dos dispositivos.</i>	65
Anexos	66
7. Referências	70
8. Currículo Vitae	79

Lista de Figuras

Figura 1. Representação da coleta de amostra para um exame de glicemia utilizando um equipamento que requer apenas de uma gota de sangue para realização do exame. Imagem retirada do site <http://www.tuasaude.com/aparelho-para-medir-a-glicose/> dia 11/11/2014 às 10h30.----- 3

Figura 2. (a) Ilustra as etapas de fabricação dos μ PADs pela técnica fotolitografia e (b) ilustra o dispositivo pronto e com reagentes pipetados em suas zonas de detecção para a análise de glicose e proteínas. Figura extraída da referência (MARTINEZ *et al.*, 2008), com permissão. ----- 7

Figura 3. A figura ilustra as etapas de fabricação dos μ PADs pelo método de impressão a cera. Em (A) temos etapas de fabricação, em (B) temos como é o desenho do *layout* do dispositivo, (C) a visão de ambos os lados do papel após a impressão a cera e (D) após a folha de papel sofrer o aquecimento, onde a cera derrete e forma a barreira hidrofóbica efetiva. Figura extraída da referência (CARRILHO, MARTINEZ e WHITESIDES, 2009), com permissão. ----- 9

Figura 4. A figura ilustra as etapas de fabricação da caneta para construção das barreiras hidrofóbicas utilizando PDMS. Figura extraída da referência (BRUZEWICZ, RECHES e WHITESIDES, 2008), com permissão. ----- 10

Figura 5. A figura ilustra as etapas de fabricação dos dispositivos analíticos utilizando uma impressora a jato de tinta para delimitar os canais microfluídicos no papel modificado com poliestireno. Figura extraída da referência (ABE, SUZUKI e CITTERIO, 2008), com permissão.----- 11

Figura 6. A figura (a) ilustra um esquema de uma impressora flexográfica utilizada para a impressão das barreiras hidrofóbicas e (b) o carimbo utilizado com os *layouts* dos dispositivos. Figura extraída da referência (OLKKONEN, LEHTINEN e ERHO, 2010), com permissão.----- 12

Figura 7. Esta figura ilustra as etapas de fabricação de μ PADs pelo método de impressão serigráfica ou impressão de tela. Figura extraída da referência (DUNGCHAI, CHAILAPAKUL e HENRY, 2011), com permissão.----- 13

Figura 8. Esta figura ilustra as etapas de fabricação de μ PADs pelo método de mergulho na cera líquida, em (A) temos o mergulho do suporte com o

sanduíche formado pelo suporte a máscara de ferro, o ímã e o papel, (B) temos a visão frontal e da parte de trás do suporte com o sanduíche e um esquema mostrando a visão transversal das etapas de fabricação do dispositivo. Figura extraída da referência (SONGJAROEN et al., 2011), com permissão. ----- 15

Figura 9. Esta figura ilustra as etapas de fabricação de μ PADs pelo método plotagem em uma etapa usando marcador com tinta permanente para delimitar as barreiras hidrofóbicas. Figura extraída da referência (NIE et al., 2012), com permissão. ----- 15

Figura 10. Esta figura ilustra o método de fabricação de μ PADs pelo método da carimbagem, com um carimbo com ajuste magnético. Figura extraída da referência (ZHANG et al., 2014), com permissão. ----- 18

Figura 11. A figura ilustra o método de fabricação de barreiras hidrofóbicas utilizando a técnica de jateamento de cola com sensibilizante, (a) é a visão superior do sanduíche constituído de suporte magnético, papel e máscaras de ferro; (b) visão da secção transversal das etapas de fabricação dos dispositivos. Figura extraída da referência (NURAK, PRAPHAIRAKSIT e CHAILAPAKUL, 2013), com permissão. ----- 19

Figura 12. Processo de fabricação dos μ PADs baseado no processo de carimbagem. Em (a), um papel parafinado é colocado sobre um papel nativo; Em (b), o carimbo metálico pré-aquecido é colocado em contato com o “sanduíche” de papéis; (c) representa um μ PAD fabricado pelo método de estampagem. A micrografia óptica em (d) representa uma imagem real do μ PAD. ----- 23

Figura 13. Esquema do processo de fabricação dos μ PADs pelo método de jateamento de cola, (I) papel nativo para a fabricação, (II) uma máscara com o layout do dispositivo é colocada sobre o papel nativo, (III) uma solução de cola escolar com sensibilizante é jateada sobre o papel com a máscara, (IV) O dispositivo é exposto a radiação UV/Visível e (V) o dispositivo com as barreiras hidrofóbicas e o canal microfluídico. ----- 25

Figura 14. Máscara com a geometria do dispositivo utilizado para os ensaios de amilase e lipase. ----- 34

Figura 15. Diferença de hidrofiliicidade entre o papel de filtro quantitativo saturado com parafina e o papel nativo. Foi colocado na superfície dos dois papeis uma gota de 10 μ L de corante (azul de metileno) em água. (A) Visão lateral da gota no papel saturado de parafina. (B) Visão superior da gota no papel saturado de parafina. (C) Visão lateral da gota no papel nativo. (D) Visão superior da gota no papel nativo. ----- 38

Figura 16. (A) Imagem do carimbo geração I e o dispositivo fabricado com o respectivo carimbo, sendo um canal único com duas zonas de detecção; (B) imagem do carimbo geração II e o dispositivo fabricado com respectivo carimbo, sendo oito zonas de detecção interligadas por canais microfluídicos a uma zona central de injeção de amostra.----- 41

Figura 17. Transferência de massa de parafina para o papel em diferentes tempos de carimbagem. ----- 42

Figura 18. O tempo de carimbagem é diretamente ligado a largura das barreiras hidrofóbicas bem como a largura dos canais. Tempo de carimbagem (A) 2 segundos, (B) 5 segundos e (C) 10 segundos. ----- 43

Figura 19. Dispositivos fabricados em diferentes tempos de carimbagem (A) 2 segundos, (B) 5 segundos, (C) 10 segundos preenchidos por corante em água. As imagens a esquerda mostram a face do papel onde se encontrava em contato com o papel saturado com parafina e a direita a face inferior do papel no momento da carimbagem. ----- 44

Figura 20. Medidas de largura dos canais de 50 dispositivos diferentes.--- 45

Figura 21. Imagens de MEV mostrando a estrutura do papel (A) antes e (B) após etapa de carimbagem, qual possibilita o recobrimento das fibras com parafina e (C) visão perpendicular do papel onde (i) barreira hidrofóbica de parafina e (ii) canal hidrofílico. ----- 46

Figura 22. Teste de robustez dos μ PADs mostrando a estabilidade térmica da morfologia dos dispositivos. ----- 47

Figura 23. Imagens ópticas dos μ PADs utilizados para análise de nitrito em amostra reais; (A) imagem de um μ PADs antes da aplicação da amostra com cinco zonas com reagentes cromógenos em sua zona e três zonas sem nada com a função de zona controle; (B) imagem de um μ PADs após 15 minutos da injeção de uma amostra de padrão de 300 μ M de nitrito. ----- 48

- Figura 24.** Curva analítica para determinação de nitrito usando μ PADs sem pré-concentração. Equação da curva: Intensidade do sinal= $-0,2985 + 0,1763$ $[\text{NO}_2^-]$. $R^2= 0,993$. (n= 5)----- 48
- Figura 25.** Curva analítica para determinação de nitrito usando o espectrofotômetro. Equação da curva: Intensidade do sinal= $0,001 + 0,047$ $[\text{NO}_2^-]$. $R^2= 0,997$. (n= 5). ----- 49
- Figura 26.** Curva analítica para determinação de nitrito usando pré-concentração nos μ PADs. Equação da curva: Intensidade do sinal= $0,1040 + 0,5636$ $[\text{NO}_2^-]$. $R^2= 0,997$. (n= 5)----- 52
- Figura 27.** Imagens ópticas de dispositivos fabricados com máscaras de diferentes larguras de canais, (A) 4 mm (B) 3 mm (C) 2 mm e (D) 1 mm. -- 57
- Figura 28.** Imagem de microscopia óptica (A) fibras do papel nativo, (B) das fibras do papel com cola e sensibilizante, (C) de uma região de interface entre um canal microfluídico e a barreira hidrofóbica de cola com sensibilizante e (D) de uma região de interface entre um canal microfluídico e a barreira hidrofóbica de cola com sensibilizante e com o canal hidrofílico preenchido com solução aquosa de azul de metileno (corante azul). ----- 58
- Figura 29.** A imagem mostra um ensaio multiplexado para uma urinálise em um μ PADs fabricado pela técnica de jateamento de cola com sensibilizante, com fluxo lateral para o transporte da amostra, os analitos analisados foram: (1) glicose, (2) ácido úrico, (3) albumina, (4) nitrito, (5) ureia, (6) bilirrubina, (7) corpos cetônicos e (8) pH. ----- 59
- Figura 30.** A imagem mostra um dispositivo fabricado pela técnica de jateamento de cola com sensibilizante, com fluxo vertical para o transporte da amostra, os analitos analisados foram (I) amilase e (II) lipase. Imagens com as etapas da análise são (A) o μ PADs com os reagentes cromógenos específicos nas zonas de detecção, (B) aplicação da amostra por fluxo vertical e (C) o μ PADs após 15 minutos de injeção da amostra. ----- 62

Lista de Figuras do Anexo

Figura A- 1. Esquema reacional para detecção de nitrito. Figura adaptada de (BHAKTA <i>et al.</i> , 2014) com permissão.....	66
Figura A- 2. Esquema reacional para detecção de glicose. Figura adaptada de (FRANSSEN <i>et al.</i> , 2013) com permissão.	66
Figura A- 3. Esquema reacional para a detecção de ácido úrico. Figura adaptada (FOSSATI, PRENCIPE e BERTI, 1980) com permissão.	67
Figura A- 4. Esquema reacional para a detecção de albumina.....	67
Figura A- 5. Esquema reacional para a detecção dos corpos cetônicos. Figura adaptada (KLASNER <i>et al.</i> , 2010) com permissão.....	67
Figura A- 6. Esquema reacional da detecção de ureia.	68
Figura A- 7. Esquema reacional da detecção de bilirrubina.....	68
Figura A- 8. Esquema reacional da detecção de amilase.....	68
Figura A- 9. Esquema reacional da detecção de Lipase.....	69

Lista de Tabelas

Tabela 1. Análise comparativa da instrumentação e dos parâmetros analíticos associados com os μ PADs e a análise espectrofotométrica..... 50

Tabela 2. Valores das concentrações de nitrito encontradas em amostras reais através da análise colorimétrica nos μ PADs e no espectrofotômetro. 53

Lista de Abreviaturas

μ PADs	Dispositivos microfluídicos de papel (do inglês, <i>microfluidic paper-based analytical devices</i>)
μ TAS	Microssistemas de análises totais (do inglês, <i>micro-total analysis systems</i>)
4-AAP	4-aminoantipirina
AKD	Dímero Alquil Centena (do inglês, <i>alkyl ketene dimer</i>)
BSA	Albumina bovina sérica (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
DHBS	3,5-dicloro-2-hidroxi-benzesulfônico
DMF	Dimetilformamida
DPR	Desvio padrão relativo
DTNB	Ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
FISPQ	Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos
LD	Limite de detecção
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NED	n(1-naftil) etilenodiamina
PC	Poli (carbonato)
PDMS	Poli (dimetilsiloxano)
PET	Poli (tereftalato de etileno)
PMMA	Poli (metilmetacrilato)
PMSF	Fenil-metil-sufonil fluoreto (do inglês, <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
POC	Uso no local de necessidade (do inglês, <i>point-of-care</i>)
PT	Poli (éster)-toner
PU	Poli (uretana)
UV	Ultra-violeta

Resumo

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de tecnologias alternativas para fabricação de dispositivos microfluídicos em papel. A primeira tecnologia se refere à confecção de um carimbo metálico para prototipagem de dispositivos microfluídicos em papel. Basicamente, a metodologia baseia-se na transferência de parafina para a superfície do papel por um processo de aquecimento. O uso da parafina faz-se necessário para criação da barreira hidrofóbica, no qual delimita canais microfluídicos para o transporte do fluido através do fluxo lateral. As vantagens em utilizar o carimbo estão entre a facilidade de manuseio, a robutez e a portabilidade. Em relação ao uso da parafina, destaca-se como sendo um agente hidrofóbico e termoplástico, que pode ser facilmente moldado, além de ser um material altamente resistente a diferentes compostos químicos. A combinação do uso desses dois materiais, carimbo e parafina, possibilitou a fabricação rápida e barata dos dispositivos microfluídicos à base de papel (μ PADs). Para avaliar o desempenho do processo de carimbagem foram fabricados 50 dispositivos no qual o desvio padrão relativo (DPR) encontrado para a largura do canal foi de 3,5%. O desempenho analítico dos μ PADs associado a detecção colorimétrica foi avaliado na análise de nitrito em amostras clínicas, alimentícias e ambientais. O limite de detecção da análise de nitrito sem etapa de pré-concentração foi de 11,3 μ M, para a análise de amostras ambientais foi desenvolvido uma etapa de pré-concentração, onde foi obtido um limite de detecção de 5,6 μ M. Os resultados obtidos foram comparados à técnica de espectrofotometria e o teste estatístico demonstrou que não existe diferença significativa entre os dois métodos. O método de carimbagem demonstrou potencialidade para fabricação dos μ PADs em laboratórios com recursos limitados, pois exige um mínimo de instrumentação. Além do processo de carimbagem, uma outra metodologia, também de baixo custo, foi explorada para fabricação dos μ PADs. Essa metodologia consiste no jateamento de cola branca misturada a um agente sensibilizante serigráfico para fabricação da barreira hidrofóbica. Basicamente, o processo consiste em jatear essa mistura sobre o substrato de papel que foi fixada a uma máscara magnética. Após o jateamento, o dispositivo foi exposto à radiação visível para polimerização da cola e obtenção das barreiras hidrofóbicas. A reprodutibilidade da largura dos canais foi avaliado em 25 microdispositivos e DPR encontrado foi de 5,7%. A potencialidade dos μ PADs fabricados por essa metodologia foi avaliada na aplicação em teste para urinálise (glicose, ácido úrico, bilirrubina, nitrito, pH, albumina, ureia e corpos cetônicos) e pancreatite (amilase e lipase). Os dois métodos alternativos de fabricação apresentaram-se viáveis para fabricação dos μ PADs e com grande potencialidade para produção em escala industrial. Além disso, demonstraram-se aplicáveis para análise biológicas, alimentícias e ambientais.

Abstract

This current study describes the development of alternative technologies for the fabrication of microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs). The first technology refers to the manufacturing of a metal stamp for rapid prototyping of μ PADs. Basically, the method uses the heating process to transfer wax to the paper surface. The wax is required to create a hydrophobic barriers thus delimiting microfluidic channels for the fluid transport through lateral flow effect. Some remarkable advantages of the metal stamping process include robustness, portability and simplicity. Paraffin is a hydrophobic and thermoplastic material that can be easily molded. Furthermore, it shows high chemical resistance when exposed to different aqueous and organic solutions. The stamping-based technology allows the fabrication of μ PADs at very low cost. The proposed approach exhibited great reproducibility. The relative standard deviation (RSD) for the channel widths measured on 50 independent μ PADs revealed a value of 3.5%. The analytical performance of the paper-based device associated with colorimetric detection was tested for the nitrite analysis in clinical, food and environmental samples. The limit of detection (LD) nitrite assays without pre-concentration was 11.3 μ M. In order to access the nitrite concentration in environmental samples, a preconcentration method was developed allowing to achieve a LD of 5.6 μ M. The results obtained were compared to the spectrophotometric technique and the statistical test demonstrated no significant difference between both methodologies. The stamping process have demonstrated high potential to produce μ PADs in laboratories with none or minimal instrumentation. Besides the stamping process, another fabrication approach based on the spraying of white glue mixed with a sensitizing agent was also proposed to produce μ PADs. To create effective hydrophobic barriers, the white glue was first sprayed on the paper surface through a magnetic mask. Afterwards, the device was exposed to visible light for polymerization of the glue. In order to evaluate the fabrication methodology, 25 devices were produced and the RSD value achieved for the channel widths was 5.7%. The analytical feasibility of the μ PADs fabricated with white glue was successfully demonstrated for qualitative assays dedicated to urinalysis (glucose, uric acid, nitrite, pH, BSA, urea, ketones bodies and bilirubin) and pancreatitis assay (amylase and lipase). Both alternative methods based on stamping and spraying has exhibited great potential to be used for production in mass. Moreover, the proposed devices revealed high potential to be broadly explored in biological/clinical, food and environmental applications.

1. Introdução

1.1. Microfluídica

O conceito de sistemas miniaturizados para análises totais (μ TAS, do inglês micro total analysis systems) foi proposto no início da década de 1990 por Manz e colaboradores (MANZ, GRABER e WIDMER, 1990). Nesse trabalho pioneiro, os autores propuseram a ideia da integração de todas as etapas de uma análise em um único chip. Dessa forma, etapas relacionadas ao preparo ou pré-tratamento da amostra, injeção, separação e detecção podem ser conduzidos de forma automatizada em sistemas portáteis e integrados. A partir deste trabalho pioneiro, vários grupos de pesquisas no mundo começaram a se dedicar nessa nova área da ciência, uma vez que, a miniaturização oferece inúmeras vantagens incluindo a redução do consumo de reagentes, amostras e espaço; o aumento da frequência analítica, a portabilidade e o menor consumo energético (AUROUX et al., 2002; REYES et al., 2002; VILKNER, JANASEK e MANZ, 2004; DITTRICH, TACHIKAWA e MANZ, 2006; WEST et al., 2008; ARORA et al., 2010; MARK et al., 2010; KOVARIK et al., 2011; KOVARIK et al., 2013; COLTRO et al., 2014; CULBERTSON et al., 2014). O aumento da frequência analítica é um dos parâmetros mais buscado pelos químicos analíticos, a microfluídica é uma ferramenta muito útil para ser utilizada para este fim, pois possibilita processamento em paralelo de uma mesma amostra, assim realizando análise de vários analitos simultaneamente.

Com a miniaturização, o manuseio ou o transporte das soluções em microescala precisou ser melhor compreendido uma vez que o fluido apresenta propriedades físicas diferente da escala macro. Dessa forma, a microfluídica - ciência que estuda o comportamento de fluidos em canais micrométricos – teve origem e, graças aos estudos fundamentais dessa nova ferramenta analítica, atualmente é considerada uma das tecnologias com maior potencial tecnológico (WHITESIDES, 2006; SACKMANN, FULTON e BEEBE, 2014).

A microfluídica pode ser definida como uma ciência multidisciplinar que traz muitas vantagens para a ciência e para a sociedade, uma vez que

atua na fronteira entre diferentes áreas do conhecimento como a Química, a Física, a Matemática, a Engenharia, a Medicina, a Biomedicina, dentre outras. Essa fronteira permite que a associação de ferramentas instrumentais modernas possam resolver problemas específicos e diretamente envolvidos com a saúde e a expectativa de vida da sociedade. Nesse contexto, o uso dos sistemas analíticos miniaturizados vem oferecendo inúmeras vantagens, por exemplo para o desenvolvimento de ensaios dedicados a diagnósticos clínicos. (WHITESIDES, 2006; COLTRO *et al.*, 2014).

Com a evolução do desenvolvimento dos sistemas microfluídicos, os μ TAS começaram a serem explorados em diversas áreas como , genômica, diagnósticos clínicos, proteômica, monitoramento de reações enzimáticas, análises forenses, monitoramento ambiental e manipulação de células (AUROUX *et al.*, 2002; ARORA *et al.*, 2010; SACKMANN, FULTON e BEEBE, 2014). Além disso, devido à portabilidade intrínseca dos sistemas miniaturizados, o uso dos μ TAS para controle da qualidade de alimentos, bem como no monitoramento de processos metabólicos no ponto de necessidade vem recebendo cada vez mais atenção, uma vez que os mesmos propiciam um resultado imediato, não requerendo análises laboriosas (MARTÍN, VILELA e ESCARPA, 2012).

Atualmente, já existem tecnologias disponíveis no mercado que associam sistemas microfluídicos com a biomedicina (CHIN, LINDER e SIA, 2012). Um desses produtos é o medidor de glicose, onde o paciente adiciona uma gota de sangue na ponta de um chip descartável e o equipamento fornece o nível de concentração de glicose como ilustrado na Figura 1. O equipamento apresentado na Figura 1 é comercializado pela empresa Roche®, no entanto, existem outras empresas concorrentes com produtos similares como a G-Tech® e a Johnson & Johnson®, por exemplo. No equipamento de análise dos níveis de glicose utiliza a microfluídica para o transporte da amostra até os sensores do equipamento, para realizar a detecção da concentração de analito no sangue. Após a detecção, o display apresenta em questão de segundos o resultado da glicemia do paciente.



Figura 1. Representação da coleta de amostra para um exame de glicemia utilizando um equipamento que requer apenas de uma gota de sangue para realização do exame. Imagem retirada do site <http://www.tuasaude.com/aparelho-para-medir-a-glicose/> dia 11/11/2014 às 10h30.

1.2. Plataformas microfluídicas

A fabricação dos sistemas microfluídicos pode ser conduzida em diferentes plataformas como vidro, silício (HARRISON *et al.*, 1993; EFFENHAUSER, MANZ e WIDMER, 1995; RAYMOND, MANZ e WIDMER, 1996; VONHEEREN *et al.*, 1996), poli(dimetilsiloxano) (PDMS)(EFFENHAUSER *et al.*, 1997; GRZYBOWSKI *et al.*, 1998), poli(metilmacrilato) (PMMA)(FIORINI *et al.*, 2003), poli (tereftalato de etileno) (PET) (BECKER e LOCASCIO, 2002), poli(carbonato) (PC) (SHADPOUR *et al.*, 2006), poli(uretana) (PU) (PICCIN *et al.*, 2007), poliéster (VICKERS *et al.*, 2007), poliéster-toner (PT) (DO LAGO *et al.*, 2003), tecido(LI, TIAN e SHEN, 2010) e papel(MARTINEZ *et al.*, 2007; WEST *et al.*, 2008; COLTRO *et al.*, 2010; CATE *et al.*, 2014).

Nos primeiros trabalhos com sistemas microfluídicos, as plataformas mais utilizadas foram o silício e o vidro, mas estes materiais são frágeis e apresentam elevado custo. Além disso, os processos de fabricação são laboriosos e requerem infraestrutura de investimento bastante elevado para os países emergentes. Muitos dos processos convencionais envolvem a

fotolitografia para definição da estrutura microfluídica desejada, que muitas vezes requer o uso de salas limpas (GRZYBOWSKI *et al.*, 1998; REYES *et al.*, 2002). A partir do ano de 1995, alguns grupos de pesquisa começaram a relatar na literatura uso de materiais poliméricos (KIM, XIA e WHITESIDES, 1995; ZHAO, XIA e WHITESIDES, 1996; MARTYNOVA *et al.*, 1997). Com o uso de materiais poliméricos como plataformas microfluídicas também começou o desenvolvimento de técnicas mais baratas e sem a necessidade de uma infraestrutura sofisticada para microfabricação. Alguns exemplos incluem a ablação a *laser* (GRZYBOWSKI *et al.*, 1998; GABRIEL *et al.*, 2013), a litografia suave (XIA e WHITESIDES, 1998), a estampagem a quente (KAMEOKA *et al.*, 2001) e a impressão direta utilizando impressora a laser (DO LAGO *et al.*, 2003).

1.3. Papel

O papel é um material poroso, hidrofílico, maleável, barato, com disponibilidade global e que pode ser encontrado em diversas espessuras (MARTINEZ *et al.*, 2007; CARRILHO, MARTINEZ e WHITESIDES, 2009; COLTRO *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2010). Sua origem se deu na China no ano de 150 d.C. utilizando fibras de árvores e trapos de tecidos para a fabricação. Essa mistura era cozida e esmagada formando uma massa, que era estendida sobre grandes peneiras constituídas de uma moldura de bambu e um tecido esticado, e eram submetidas ao sol para a secagem (História do papel). O papel é constituído basicamente de celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n, um polímero de cadeia longa contendo apenas monômero de β-glicose. (NELSON e COX, 2013)

Na química, o papel é um material utilizado desde o século passado dentro dos laboratórios para diversas finalidades que incluem desde uma simples filtração até uma separação cromatográfica. Em 2007, o grupo de pesquisa do Professor George M. Whitesides, da Universidade de Harvard, propôs o uso desse substrato para a fabricação de dispositivos microfluídicos a base de papel (μPADs, do inglês *microfluidic paper-based analytical devices*) (MARTINEZ *et al.*, 2007). Desde essa data, vários grupos de pesquisa têm contribuído significativamente para a difusão dessa

plataforma em aplicações microfluídicas. Dentre as aplicações já reportadas, destacam-se o desenvolvimento de sensores, o uso em diagnósticos clínicos, o monitoramento ambiental e o controle de qualidade de alimentos (MARTINEZ *et al.*, 2007; COLTRO *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2010; JOKERST *et al.*, 2012; LI, BALLERINI e SHEN, 2012; BYRNES, THIESSEN e FU, 2013; CATE *et al.*, 2014; COLTRO *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2014; SANTHIAGO *et al.*, 2014).

O crescente aumento no número de aplicações dos μ PADs está relacionado com a possibilidade de uso no ponto de necessidade (POC do inglês *point-of-care*), pois são portáteis e não requerem o uso de equipamentos externos, como bombas ou fontes de alta tensão para promover o manuseio das soluções. Além disso, o papel apresenta compatibilidade com os processos de imobilização de biomoléculas (COLTRO *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2010; BYRNES, THIESSEN e FU, 2013; CATE *et al.*, 2014; SANTHIAGO *et al.*, 2014).

1.4. Métodos de fabricação de μ PADs

A fabricação dos μ PADs envolve, usualmente, a criação de barreiras hidrofóbicas para definir uma região por onde o fluido de amostra será transportado. Devido à natureza hidrofílica do papel, o transporte do fluido é induzido pela ação do fluxo lateral através da estrutura porosa do substrato. (FU *et al.*, 2010; OSBORN *et al.*, 2010) As barreiras hidrofóbicas são frequentemente fabricadas por técnicas convencionais e bem estabelecidas que incluem a fotolitografia, (MARTINEZ *et al.*, 2007; MARTINEZ, PHILLIPS e WHITESIDES, 2008) a impressão a cera, (CARRILHO, MARTINEZ e WHITESIDES, 2009; LU *et al.*, 2009) a serigrafia, (DUNGCHAI, CHAILAPAKUL e HENRY, 2011) a flexografia, (OLKKONEN, LEHTINEN e ERHO, 2010) o tratamento a laser, (CHITNIS *et al.*, 2011) a plotagem com poli(dimetilsiloxano) (PDMS) (BRUZEWICZ, RECHES e WHITESIDES, 2008) bem como o uso de tintas permanentes (CURTO *et al.*, 2013). Outras técnicas utilizadas para a confecção dos μ PADs são a gravação utilizando uma impressora a jato de tinta, (ABE, SUZUKI e CITTERIO, 2008) o corte à

laser (NIE *et al.*, 2013; SPICAR-MIHALIC *et al.*, 2013; EVANS *et al.*, 2014) e a imersão na cera (SONGJAROEN *et al.*, 2011). As principais técnicas de fabricação incluindo as convencionais e as alternativas estão descritas com mais detalhes a seguir.

1.5.1. Técnicas convencionais para fabricação de μ PADs

Fotolitografia

Atualmente, os métodos convencionais de fabricação de μ PADs envolvem a técnica de fotolitografia utilizando o SU-8* como fotorresiste (MARTINEZ *et al.*, 2007; MARTINEZ, PHILLIPS e WHITESIDES, 2008) ou processo de impressão a cera (CARRILHO, MARTINEZ e WHITESIDES, 2009; LU *et al.*, 2009). A técnica fotolitográfica apresenta uma excelente resolução e possibilidade a produção em massa, mas requer uma instrumentação de alto custo. A fotolitografia requer ambiente limpo, sistema de spin-coating, foto-alinhadora além de consumíveis importados como fotorresistes e reveladores. O custo estimado da infraestrutura necessária é superior a R\$ 1.000.000,00, valor que inviabiliza sua implementação em centros com recursos limitados.

O primeiro trabalho reportado na literatura sobre o uso de papel, como plataforma microfluídica foi do grupo de pesquisa do professor George M. Whitesides, da Universidade de Haward em 2007 (MARTINEZ *et al.*, 2007), o qual está apresentado na Figura 2.

* SU-8 é o nome comercial dado pela MicroChem® Corporation a uma resina à base de epóxi. Sua fotopolimerização ocorre com a exposição à radiação UV (365 nm). O SU-8 após polimerizado, apresenta caráter hidrofóbico e resistência à ácidos e bases.

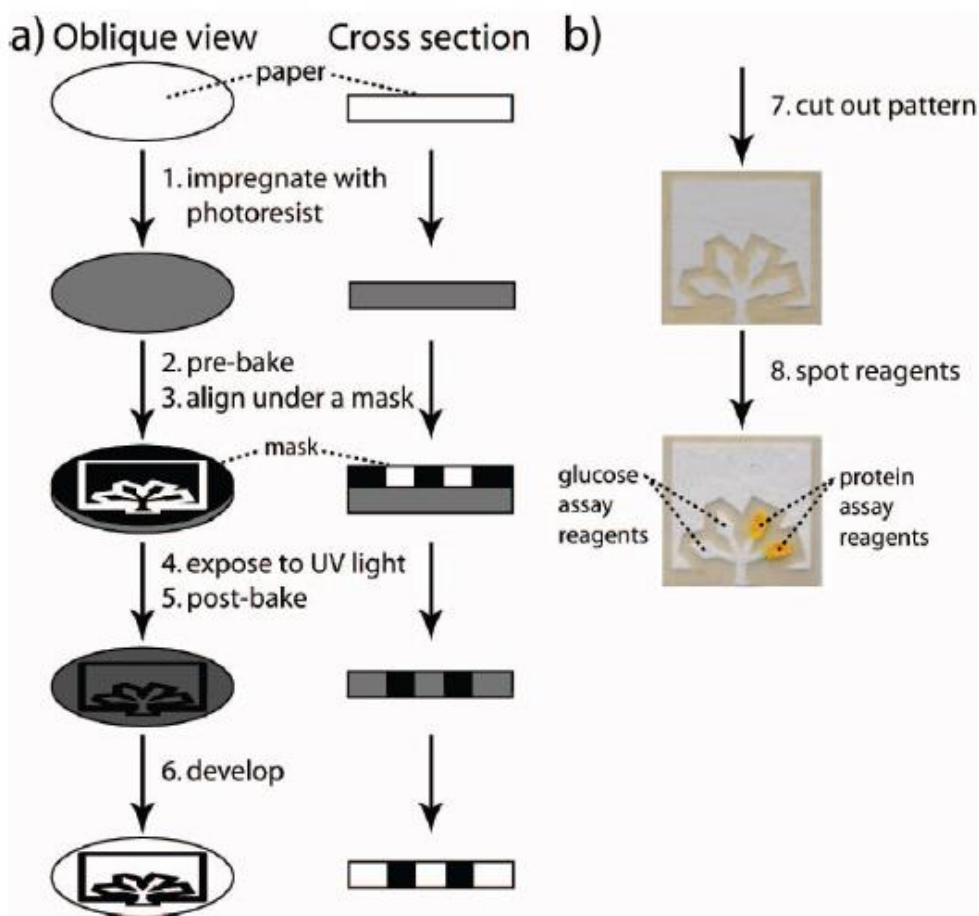


Figura 2. (a) Ilustra as etapas de fabricação dos μ PADs pela técnica fotolitografia e (b) ilustra o dispositivo pronto e com reagentes pipetados em suas zonas de detecção para a análise de glicose e proteínas. Figura extraída da referência (MARTINEZ *et al.*, 2008), com permissão. Copyright (2008) American Chemical Society.

Neste trabalho, um papel foi imerso em um recipiente contendo SU-8 e em seguida mantido em repouso para evaporar o excesso de solvente presente no fotorresiste. Com o auxílio de um software gráfico, a configuração do dispositivo foi projetada e impressa em fotolito. Em seguida, a máscara impressa foi posicionada e alinhada com o papel contendo SU-8. Por último, o conjunto foi exposto à radiação ultra-violeta (UV) para a gravação, do desenho previamente impresso na máscara, no papel contendo fotorresiste. Para revelar a gravação, o dispositivo foi lavado com isopropanol. Após essa etapa, a região protegida pelas áreas escuras da máscara continuou hidrofílica e a região exposta ficou hidrofóbica, devido à polimerização do fotorresiste (MARTINEZ *et al.*, 2007).

Impressão a Cera

Devido ao custo e ao número de etapas laboriosas do processo fotolitográfico, dois grupos propuseram, de forma independente, uma outra técnica para fabricação de μ PADs, a qual vem se tornando popular e, de certo modo, convencional para o mesmo propósito. Em 2009, Yao Lu e colaboradores (LU *et al.*, 2009) e Carrilho e colaboradores (CARRILHO, MARTINEZ e WHITESIDES, 2009) propuseram o uso de uma impressora a cera para a fabricação de μ PADs. Para a fabricação do dispositivo, basta desenhar a configuração desejada em um software gráfico e imprimir sobre a superfície do papel. Dessa forma, a impressora deposita uma camada de cera sólida que, quando aquecida a 150°C por 2 min, forma barreiras hidrofóbicas devido à penetração e solidificação na estrutura porosa do papel (CARRILHO, MARTINEZ e WHITESIDES, 2009). O método de fabricação está ilustrado na Figura 3. O uso da impressora a cera vem sendo explorado por diferentes grupos visando a fabricação de estruturas microfluídicas em multi-dimensões (MARTINEZ, PHILLIPS e WHITESIDES, 2008), microplacas para imunoenaios (CARRILHO *et al.*, 2009), desenvolvimento de sistemas eletroquímicos (DE ARAUJO e PAIXAO, 2014), sistemas para detecção de espécies gasosas (DOSSI *et al.*, 2012), dentre outras aplicações.

Mas este tipo de método de fabricação ainda possui um alto custo para ser implementado em laboratórios que possuem recursos limitados, pois os custos da impressora e o bastonete de cera (350 g) apresentam valores médios, no mercado brasileiro, iguais a R\$ 3.500,00 e R\$ 100,00, respectivamente.

Como os métodos de fabricação convencionais de μ PADs utilizando barreiras hidrofóbicas para delimitar o caminho do fluido tem um custo elevado ou requerem uma infraestrutura de alto custo vários grupos de pesquisas começaram a estudar novas metodologias de fabricação de μ PADs com materiais mais baratos e com uma infraestrutura mais simples.

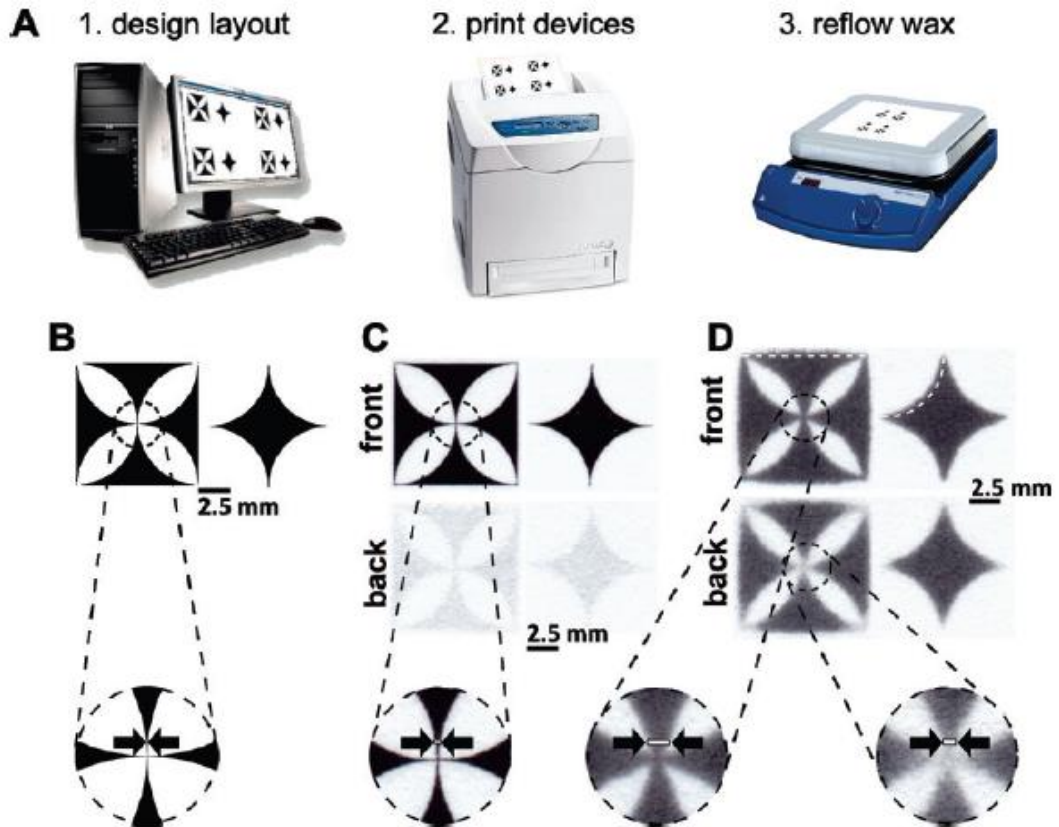


Figura 3. A figura ilustra as etapas de fabricação dos μ PADs pelo método de impressão a cera. Em (A) temos etapas de fabricação, em (B) temos como é o desenho do *layout* do dispositivo, (C) a visão de ambos os lados do papel após a impressão a cera e (D) após a folha de papel sofrer o aquecimento, onde a cera derrete e forma a barreira hidrofóbica efetiva. Figura extraída da referência (CARRILHO, MARTINEZ e WHITESIDES, 2009), com permissão. Copyright (2009) American Chemical Society.

1.5.2. Técnicas alternativas para fabricação de μ PADs

Em 2008, Bruzewicz e colaboradores (BRUZEWICZ, RECHES e WHITESIDES, 2008) desenvolveram uma caneta com tinta de PDMS para fabricar as barreiras hidrofóbica. A caneta análoga foi feita com pipeta de vidro com uma agulha na ponta presa por PU. Esta caneta foi fixada em uma impressora de mesa (X;Y), trocando a caneta de tinta do equipamento pela caneta feita de pipeta de vidro. Nesse caso, ao invés de usar tinta, a mesma foi preenchida com PDMS preparado em hexano (proporção 3:1). Após a impressão, as barreiras de PDMS foram impressas e, após a cura sob aquecimento, atuaram como barreiras hidrofóbicas (BRUZEWICZ, RECHES e WHITESIDES, 2008). O método de fabricação está apresentado na Figura 4.

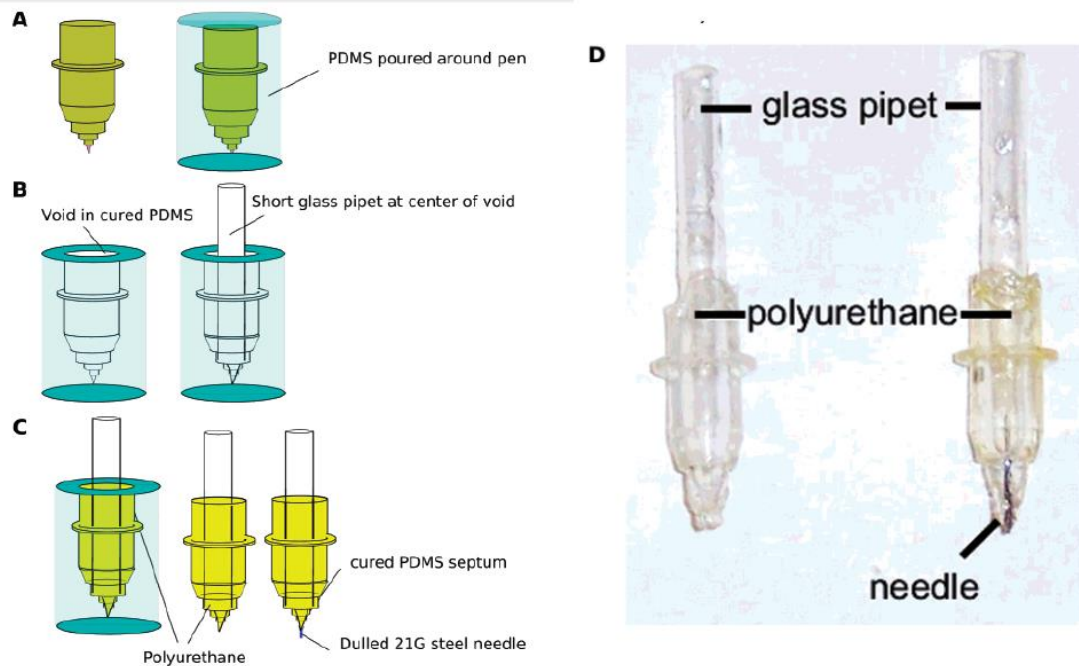


Figura 4. A figura ilustra as etapas de fabricação da caneta para construção das barreiras hidrofóbicas utilizando PDMS. Figura extraída da referência (BRUZEWICZ, RECHES e WHITESIDES, 2008), com permissão. Copyright (2008) American Chemical Society.

Em 2008, Abe e colaboradores (ABE, SUZUKI e CITTERIO, 2008) desenvolveram uma técnica de fabricação com uma adaptação em uma impressora a jato de tinta. O papel de filtro foi imerso em poliestireno 1% em tolueno por aproximadamente 2 horas. Em seguida, o mesmo foi removido da solução e mantido em repouso por 15 min em temperatura ambiente. Este papel modificado ficou com características hidrofóbicas. Logo após, desenhou-se o *layout* do dispositivo em um software gráfico e imprimiu-se o dispositivo em uma impressora a jato de tinta. Ao invés da tinta convencional, o “tolueno” foi depositado sobre a superfície. Esse procedimento foi repetido entre 10 a 15 vezes, para formar os canais hidrofílicos. Essa modificação ocorre devido ao tolueno solubilizar o poliestireno formando assim as regiões hidrofílicas (ABE, SUZUKI e CITTERIO, 2008). O método de fabricação está ilustrado na Figura 5.

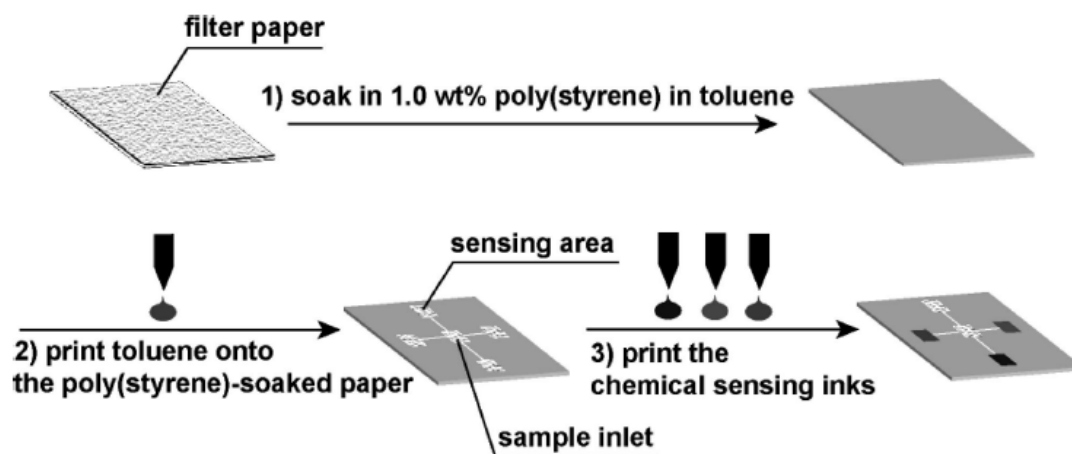


Figura 5. A figura ilustra as etapas de fabricação dos dispositivos analíticos utilizando uma impressora a jato de tinta para delimitar os canais microfluídicos no papel modificado com poliestireno. Figura extraída da referência (ABE, SUZUKI e CITTERIO, 2008), com permissão. Copyright (2008) American Chemical Society.

Em 2010, Li e colaboradores (LI *et al.*, 2010) relataram o uso de tratamento com plasma para a construção de barreiras hidrofóbicas. O papel de filtro foi imerso e logo retirado de uma solução de dímero de alquilcentena (0,6g/L) e heptano. Após a evaporação do heptano, o papel foi levado a um forno a 100°C por 5 minutos para a cura do dímero de alquilcentena nas fibras do papel, promovendo a hidrofobização do papel. Em seguida, o papel foi colocado entre duas placas iguais (máscaras metálicas com o desenho do dispositivo na forma negativa), alinhadas e presas uma contra a outra. Este sanduíche foi levado a um reator de plasma a vácuo por 15 s com intensidade de 15W. Após a etapa do reator o desenho da máscara foi transferido para o papel na forma de canais hidrofílicos (LI *et al.*, 2010).

Em 2010 Olkkonen e colaboradores (OLKKONEN, LEHTINEN e ERHO, 2010) realizaram a fabricação de barreiras hidrofóbicas utilizando uma técnica de impressão flexográfica. A impressora flexográfica é constituída por três rolos, todos interligados por contato físico: 1º) O primeiro foi onde a tinta foi colocada, ele transferiu a tinta para o segundo rolo. Para controlar a espessura de tinta no primeiro rolo que foi transferida para o segundo utilizou-se uma lâmina com regulagem de distância. 2º) Neste rolo ficou preso um clichê (carimbo) de foto-polímero ou borracha com o *layout*

em alto relevo do dispositivo; 3º) No último rolo da sequência estava o material (papel) ao qual foi impresso o dispositivo. Então quando foi imprimindo o primeiro rolo transferiu a tinta para o clichê, que transferiu o desenho para o papel. No lugar da tinta convencional utiliza-se uma solução de poli-estireno com tolueno ou xileno (OLKKONEN, LEHTINEN e ERHO, 2010). O método de fabricação está apresentado na Figura 6.

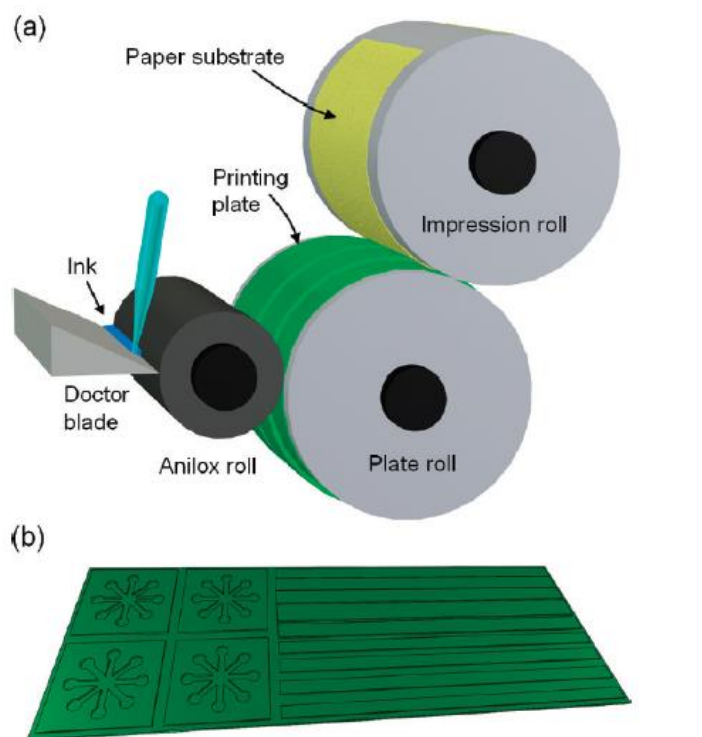


Figura 6. A figura (a) ilustra um esquema de uma impressora flexográfica utilizada para a impressão das barreiras hidrofóbicas e (b) o carimbo utilizado com os *layouts* dos dispositivos. Figura extraída da referência (OLKKONEN, LEHTINEN e ERHO, 2010), com permissão. Copyright (2010) American Chemical Society.

Em 2010 Dungchai e colaboradores (DUNGCHAI, CHAILAPAKUL e HENRY, 2011) realizaram a fabricação de barreiras hidrofóbicas para μ PADs pelo método conhecido como *screen-printing*. Uma máscara negativa foi colocada sobre o papel, com cera sólida passou-se sobre o papel e a máscara, assim onde não estiver coberta pela máscara foi depositada cera. Em seguida, tirou-se a máscara e aqueceu o papel com intuito da cera que foi depositada, na parte superior do papel possa derreter e penetrar no papel para formar as barreiras hidrofóbicas (DUNGCHAI, CHAILAPAKUL e HENRY, 2011). Um procedimento similar foi recentemente explorado por de

Araújo e Paixão (DE ARAUJO e PAIXAO, 2014) para confeccionar eletrodos em papel sulfite. Esta técnica alternativa está apresentada na Figura 7.

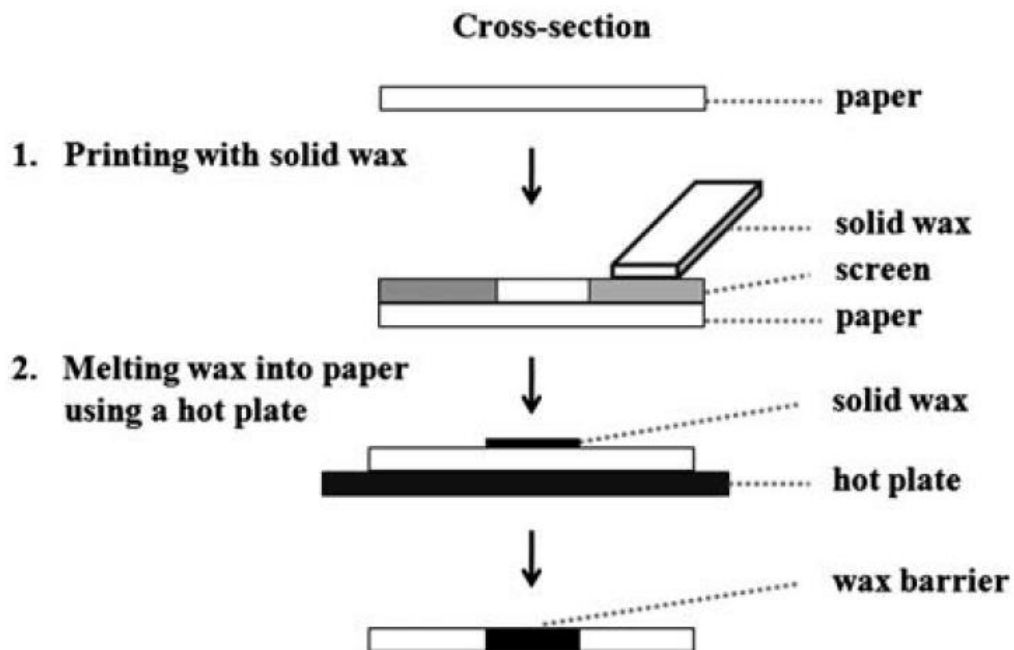


Figura 7. Esta figura ilustra as etapas de fabricação de μ PADs pelo método de impressão serigráfica ou impressão de tela. Figura extraída da referência (DUNGCHAI, CHAILAPAKUL e HENRY, 2011), com permissão da The Royal Society of Chemistry.

Em 2011, Delaney e colaboradores (DELANEY *et al.*, 2011) desenvolveram uma adaptação em uma impressora a jato de tinta para a construção das barreiras. O *layout* do dispositivo foi desenhado em um software gráfico e impresso em papel usando uma impressora de jato de tinta usando uma solução de Dímero de Alquil Centena em heptano 2% (v/v) ao invés de tinta convencional. Após a impressão levou o papel em um forno a 100° C por 8 min para a cura do Dímero Alquil Centena (AKD). A barreira hidrofóbica foi construída onde foi depositado o AKD pela a impressora (DELANEY *et al.*, 2011).

Em 2011, Chitnis e colaboradores (CHITNIS *et al.*, 2011) desenvolveram um tratamento a laser para a construção de canais hidrofílicos no papel. Basicamente, o *layout* dos canais microfluídicos foi primeiramente desenhado em um software gráfico. Em seguida, um pedaço

de papel previamente modificado com material hidrofóbico (cera, silicone e plástico) foi colocado numa impressora de corte a *laser*. Ao enviar o arquivo para a impressão, as condições do laser foram controladas para, ao invés de cortar o substrato, apenas criar canais ou zonas na superfície do papel, pois o energia fornecida pelo *laser* modificava a estrutura morfológica das fibras do papel. Após a impressão, uma emulsão de sílica foi aplicada nestas na região onde foi feita a impressão. Após, a emulsão de sílica secar a temperatura ambiente e o excesso de sílica foi retirada através da movimentação do papel. Com o movimento o material que não aderiu às regiões impressas no papel, foi descartado (CHITNIS *et al.*, 2011).

Em 2011, Songjaroen e colaboradores (SONGJAROEN *et al.*, 2011) relataram a fabricação de barreiras hidrofóbicas por imersão em solução de cera líquida. Sobre uma placa de vidro colocou-se o papel e sobre o papel um molde positivo inteiriço de ferro, na parte inferior da placa de vidro é colocada uma placa imã. Depois, mergulhou-se este sanduíche descrito acima, em cera líquida por 1 s. Após uma etapa de cura a temperatura ambiente, o dispositivo foi obtido de forma simples e rápida. A Figura 8 apresenta o método de fabricação desenvolvido por Songjaroen e colaboradores (SONGJAROEN *et al.*, 2011).

Em 2012, Nie e colaboradores (NIE *et al.*, 2012) propuseram a fabricação de barreiras hidrofóbica com o uso de um marcador com tinta permanente. A máscara foi fabricada em material rígido e na forma negativa. A máscara do dispositivo foi colocada sobre o papel, com uma caneta de tinta permanente escreveu rente às bordas da máscara. Em seguida foi retirada a máscara. O desenho da máscara ficou impressa sobre o papel. A tinta permanente foi a substância hidrofóbica. Os autores mostram neste trabalho que a penetração da tinta permanente é efetiva e os dispositivos não apresentaram vazamentos, após a adição de amostras nos dispositivos mostrando ser um método eficiente de construção de barreiras hidrofóbicas. (NIE *et al.*, 2012). O método de fabricação é ilustrada pela Figura 9.

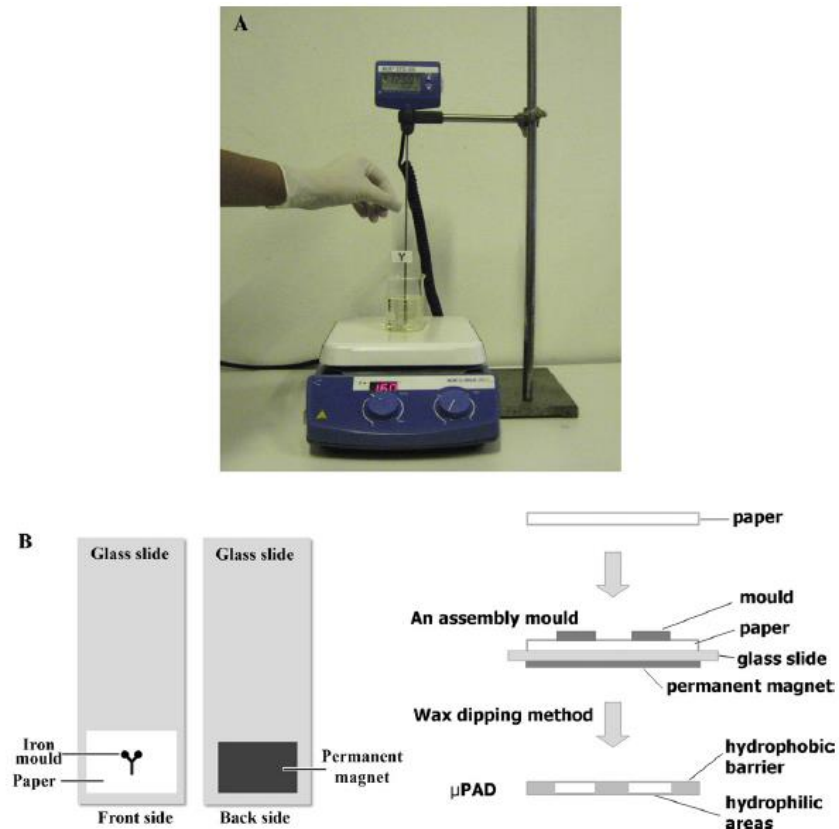


Figura 8. Esta figura ilustra as etapas de fabricação de μ PADs pelo método de mergulho na cera líquida, em (A) temos o mergulho do suporte com o sanduiche formado pelo suporte a máscara de ferro, o imã e o papel, (B) temos a visão frontal e da parte de trás do suporte com o sanduiche e um esquema mostrando a visão transversal das etapas de fabricação do dispositivo. Figura extraída da referência (SONGJAROEN et al., 2011), Copyright (2011) com permissão Elsevier.

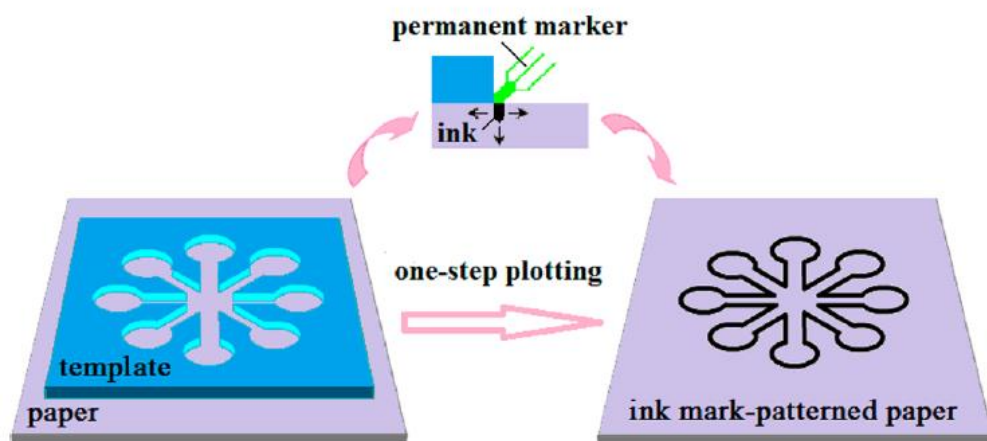


Figura 9. Esta figura ilustra as etapas de fabricação de μ PADs pelo método plotagem em uma etapa usando marcador com tinta permanente para delimitar as barreiras hidrofóbicas. Figura extraída da referência (NIE et al., 2012), com permissão. Copyright (2012) American Chemical Society.

Como pode ser observado pelos trabalhos apresentados na literatura, após o primeiro trabalho do Grupo do Prof. Whitesides que apresentou o uso e as potencialidades dos μ PADs. Estes dispositivos de análise despertou o interesse de vários outros grupos de pesquisa pelas vantagens do uso do papel como plataforma de análise. Mas estes grupos se esbararam na necessidade de equipamentos de alto custo, sendo inviável a fabricação destes dispositivos pelas técnicas convencionais. Então vários grupos de pesquisa começaram a desenvolverem técnicas cada vez mais simples e baratas, para utilizarem o papel como substrato para desenvolverem microdispositivos analíticos. Eles começaram a usarem ferramentas do cotidiano de um laboratório ou de fácil acesso para desenvolverem os métodos de fabricação alternativos aos métodos convencionais. Mas na minha opinião, os dispositivos que estes grupos apresentaram possuem etapas laboriosas para conseguirem dispositivos com boa reprodutibilidade entre os dispositivos ou técnicas com alta frequência de prototipagem mas sem uma boa reprodutibilidade.

A partir destas situações decidimos que iríamos desenvolver um método de fabricação com boa reprodutibilidade entre os dispositivos e uma alta frequência de prototipagem. Baseado nisso decidimos a utilização de um método de carimbagem para fabricação de μ PADs, baseado em métodos de fabricação de barreiras hidrofóbicas no papel, reportados na literatura no século passado.

1.5.2.1. Uso da parafina e desenvolvimento de carimbos

Na literatura existem dois trabalhos que reportam o uso da parafina para a construção de barreiras hidrofóbicas em substratos de papel. Muller e Clegg (MULLER e CLEGG, 1949) reportaram o uso da parafina para delimitar uma região no papel para que o ocorresse uma separação cromatográfica de alguns compostos. Yagoda (YAGODA, 1937) reportou o uso da parafina para construir barreiras no papel a fim de formar zonas circulares para a detecção de alguns metais. No entanto, é válido mencionar que nestes trabalhos pioneiros, os autores usaram moldes definidos com fios

metálicos, os quais foram prensados contra o papel com auxílio de barras, ou chapas, metálicas.

Recentemente, três trabalhos foram publicados na literatura abordando o uso de carimbos para prototipagem de μ PADs. Curto e colaboradores (CURTO *et al.*, 2013) descreveram a construção de um carimbo de PDMS em alto relevo, o qual requer um tempo de confecção de aproximadamente 8 horas. Usando essa ferramenta instrumental, os autores criaram barreiras hidrofóbicas, em um intervalo de tempo inferior a 10 s, com tinta permanente. Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2014) reportaram a fabricação de um carimbo de ferro com um sistema de ajuste magnético para realizar carimbagem de barreiras hidrofóbicas em papel usando cera como material para delimitar a região dos microcanais. O ajuste magnético possibilitou através de um mecanismo utilizando imãs, uma rápida mudança no *layout* do alto-relevo do carimbo, assim viabilizando a customização de diferentes geometrias microfluídicas, como mostrado na Figura 10. Os carimbos desenvolvidos, independentemente, por Curto e colaboradores (CURTO *et al.*, 2013) e Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2014) apresentaram peso de aproximadamente 500 gramas. Dornelas e colaboradores (DORNELAS, DOSSI e PICCIN, 2015) desenvolveram um carimbo leve de madeira e poliuretano. A fabricação deste carimbo mostrado foi rápida. Para construção das barreiras hidrofóbicas, a parte em alto relevo do carimbo era imerso em uma solução de PDMS e hexano; em seguida pressionava o carimbo sobre o papel. Após a etapa da carimbagem o papel era levado para a estufa a 70 °C por 30 minutos para a cura do PDMS. Este método de carimbagem se mostrou prático, porém o tempo para a obtenção do chip é longo, pois após a etapa de carimbagem é necessário um tempo para cura deste polímero.

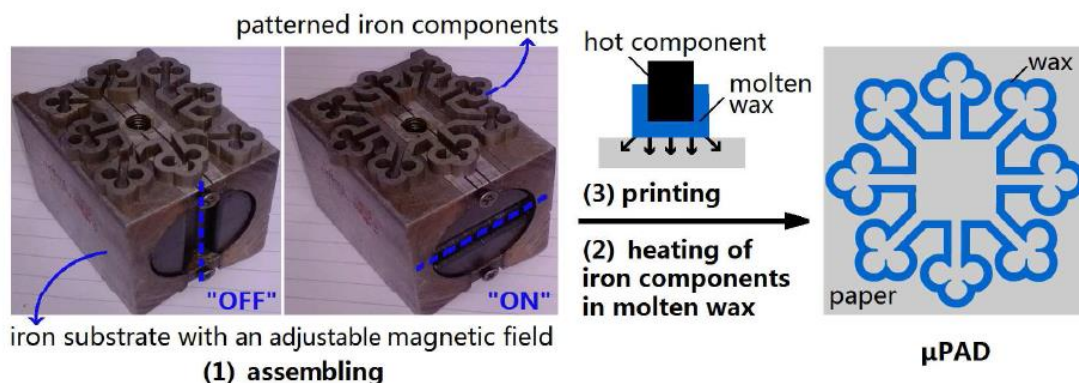


Figura 10. Esta figura ilustra o método de fabricação de μ PADs pelo método da carimbagem, com um carimbo com ajuste magnético. Figura extraída da referência (ZHANG *et al.*, 2014), com permissão. Copyright (2014) American Chemical Society.

Em 2014, nós do Grupo de Métodos Eletroforéticos da Universidade Federal de Goiás (GARCIA *et al.*, 2014) devolvemos um carimbo leve em aço inoxidável, para a construção de barreiras hidrofóbicas de parafina por estapagem a quente. Nesta dissertação será apresentada todo o desenvolvimento deste carimbo e suas vantagens como por exemplo sua alta frequência protipagem e a fabricação de dispositivos em questão de segundos.

1.5.2.2. Uso da técnica de jateamento

Em 2013, Nurak e colaboradores (NURAK, PRAPHAIRAKSIT e CHAILAPAKUL, 2013) relataram um método de fabricação de barreiras hidrofóbicas utilizando jateamento de uma resina acrílica sobre o papel. Os μ PADs foram usados para a detecção eletroquímica de níquel em águas residuais. Embora a técnica apresente simplicidade, a principal desvantagem deste método de fabricação é que a resina acrílica é solubilizada em solvente orgânico. No Brasil, os fabricantes deste tipo de resina utilizam como solvente o xileno, tolueno e ciclohexanona. Estes compostos orgânicos são nocivos e irritantes segundo a ficha de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ).

O método de fabricação baseado no jateamento da resina acrílica está apresentado na Figura 11. No método de fabricação proposta utilizou-se máscaras positivas feita de ferro. O papel foi colocado sobre uma placa

magnética, sobre o papel colocou-se a máscara para proteger as regiões dos *spots* para posterior construção dos eletrodos. Após a montagem do suporte com o papel e o imã foi executado o jateamento da solução de resina acrílica.

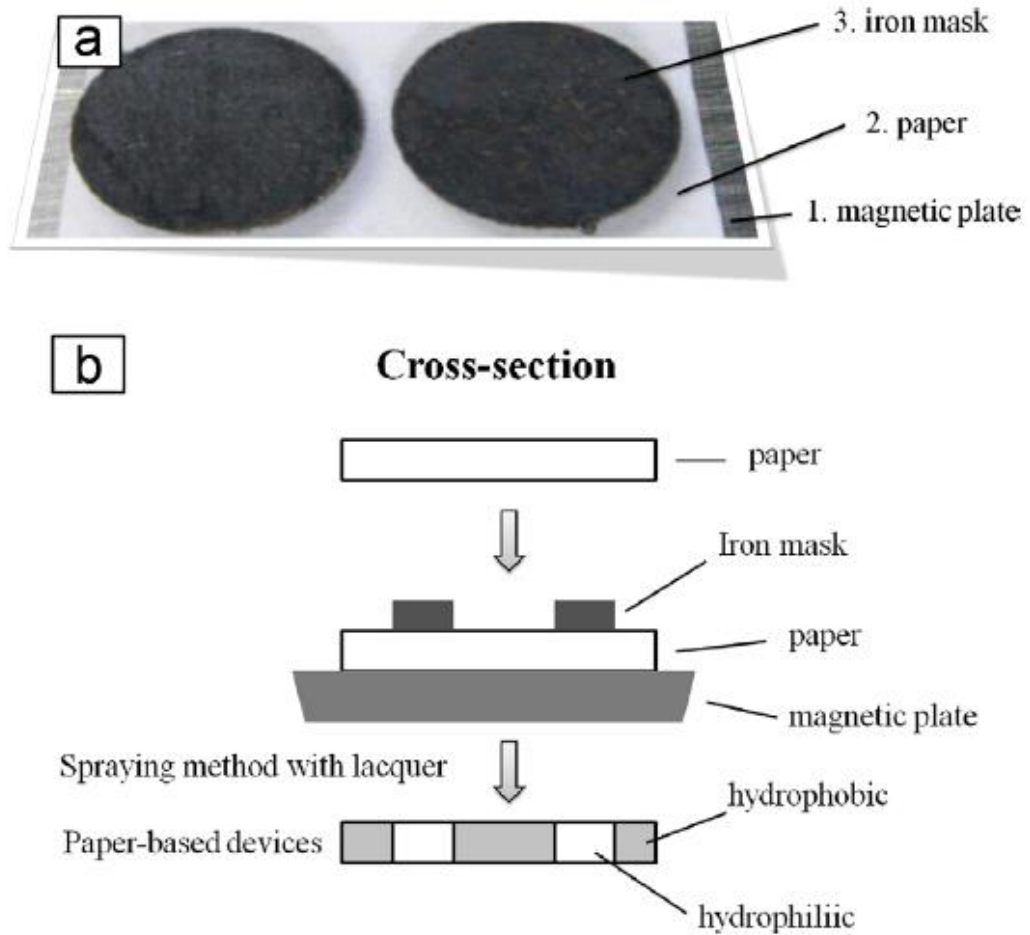


Figura 11. A figura ilustra o método de fabricação de barreiras hidrofóbicas utilizando a técnica de jateamento de cola com sensibilizante, (a) é a visão superior do sanduiche constituído de suporte magnético, papel e máscaras de ferro; (b) visão da secção transversal das etapas de fabricação dos dispositivos. Figura extraída da referência (NURAK, PRAPHAIRAKSIT e CHAILAPAKUL, 2013), Copyright com permissão da Elsevier.

2. Objetivos

2.1. Gerais

O objetivo principal desse trabalho visa o desenvolvimento de tecnologias alternativas para fabricação de dispositivos microfluídicos em papel a partir do uso de métodos de baixo custo e com disponibilidade global.

2.2. Específicos

Avaliar o uso de um carimbo metálico para prototipagem rápida dos dispositivos em papel.

Demonstrar a aplicabilidade analítica dos μ PADs carimbados para determinação de nitrito em amostras clínicas, alimentícias e ambientais.

Investigar o uso da cola escolar para a confecção de barreiras hidrofóbicas em substratos de papel.

Explorar o transporte microfluídico, via fluxos lateral e vertical, para ensaios clínicos multiplexados.

3. Parte Experimental

3.1. Materiais e Reagentes

Sulfanilamida, n(1-naftil) etilenodiamina (NED), ácido clorídrico, nitrito de sódio, glicose, periodato de sódio, cloreto de potássio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, azul de bromotimol, vermelho de metila, etanol, hidróxido de sódio, acetoacetato de etila, glicina, nitroprussiato de sódio, dimetilformamida (DMF), citrato de sódio, azul de tetrabromofenol, albumina de soro bovino (*BSA*, do inglês bovine serum albumin), ácido úrico, *uricase* (de *Candida.sp*), peroxidase (de *Horseradish*), 4-aminoantipirina (4-AAP), ácido 3,5-dicloro-2-hidroxi-benzesulfônico (DHBS), glicose oxidase (de *Aspergillus niger*), iodeto de potássio, trealose e ureia foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (Saint Louis, MO, EUA). Para os ensaios dedicados à determinação colorimétrica de ureia, amilase e bilirrubina foram utilizados *kits* comerciais da Doles Reagentes[®] (Goiânia, GO, Brasil). O ensaio para determinação colorimétrica de lipase foi realizado utilizando-se o *kit* comercial da Vida Biotecnologia[®] (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) A solução estoque de bilirrubina (105 mg/l) foram adquiridas da Doles Reagentes[®]. Os padrões das enzimas amilase e lipase foram doados pela Profa. Dra. Kátia F. Fernandes[†]. Papel de filtro quantitativo (modelo JP40, 12,5 cm de diâmetro e poros de diâmetro médio de 25 µm) e parafina (140°F/142°F com 2% de óleo) foram adquiridos junto à JProLab (São José dos Pinhais, PR, Brasil) e Petrobras Distribuidora (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), respectivamente.

Todos reagentes foram utilizados sem nenhuma etapa de purificação, com exceção do nitrito de sódio, o qual foi seco em estufa à 105°C durante uma hora e resfriado em dessecador, como descrito por Ramos e colaboradores (RAMOS, CAVALHEIRO e CAVALHEIRO, 2006). Cola branca de poli (acetato de vinila) (modelo cascorez extra) foi adquirida da Henkel (Düsseldorf, Alemanha) para a fabricação das barreiras hidrofóbicas. Sensibilizador serigráfico (modelo Bicromato) adquirido da Agabê (São

[†]Coordenadora do Laboratório de Química de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

Paulo, SP, Brasil). Mantas magnéticas (com 0.8 mm de espessura) adquirido da Flexmag Mantas Magnéticas (São Paulo, SP, Brasil). Água ultrapura obtida do purificador modelo DirectQ3 adquirida da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).

3.2. Instrumentação

Um *scanner* de mesa modelo G4050 da Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) foi explorado para a captura das imagens e consequente análise colorimétrica. Um compressor de ar direto com *kit* para pintura (modelo Jet Master) foi adquirido da empresa Schulz (Joinville, SC, Brasil) e foi usado para o jateamento da solução de cola sobre a superfície do papel. Um espectrofotômetro (modelo SP 1105) foi adquirido da empresa BEL Engineering (Monza, MB, Itália) e foi usado para as leituras de absorvância das amostras com nitrito.

3.3. Fabricação dos dispositivos analíticos em papel

No presente trabalho, duas tecnologias foram desenvolvidas para a fabricação de dispositivos microfluídicos em papel. A primeira se refere ao uso de um carimbo metálico para a prototipagem rápida dos μ PADs a partir da confecção de barreiras hidrofóbicas de parafina. A segunda se refere ao uso de cola escolar (cola branca) para delimitar regiões hidrofóbicas na superfície do papel. Os detalhes envolvidos em ambas as tecnologias estão descritos a seguir.

3.3.1. Prototipagem dos μ PADs

A fabricação dos μ PADs, via carimbagem, está esquematizada na Figura 12. Inicialmente fez-se a imersão de uma folha de papel de filtro nativo em uma solução contendo parafina líquida a 90°C durante 60 segundos. Ao final deste tempo, papel foi removido da solução deixando que a parafina se solidificasse em temperatura ambiente por 30 segundos. A folha contendo parafina foi fixada a folha de papel nativo com o auxílio de uma fita adesiva. Os carimbos metálicos confeccionados para este trabalho foram usinados em aço inoxidável em uma empresa local especializada (MS Máquinas, Goiânia, GO, Brasil).

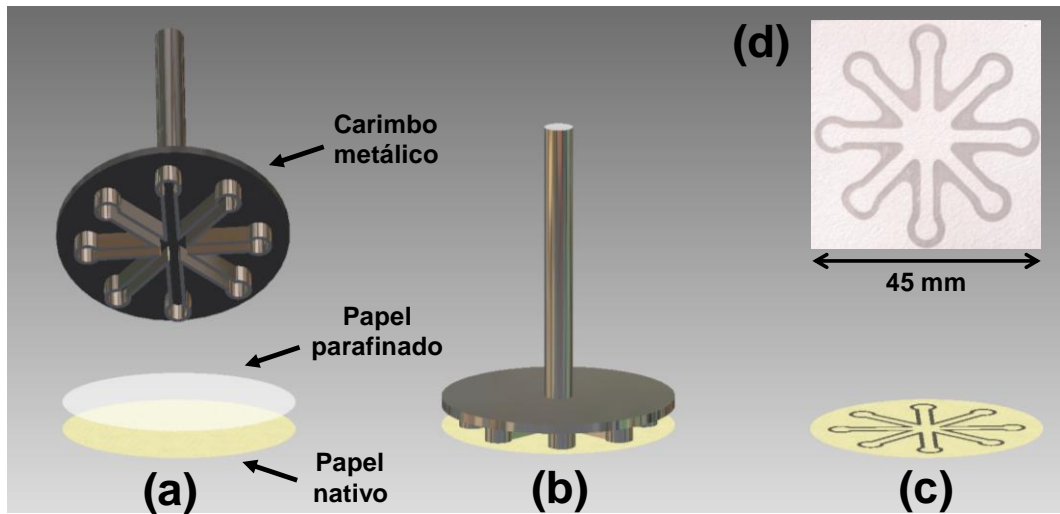


Figura 12. Processo de fabricação dos μ PADs baseado no processo de carimbagem. Em (a), um papel parafinado é colocado sobre um papel nativo; Em (b), o carimbo metálico pré-aquecido é colocado em contato com o “sanduíche” de papéis; (c) representa um μ PAD fabricado pelo método de estampagem. A micrografia óptica em (d) representa uma imagem real do μ PAD.

A estampagem dos dispositivos inicia-se pelo pré-aquecimento do carimbo a 150°C . Em seguida, o carimbo é colocado em contato com o papel parafinado Figura 12(a). Após o contato, uma pressão estimada em aproximadamente $0,1\text{ MPa}$ é aplicada manualmente ao carimbo durante 2 segundos para carimbar a estrutura microfluídica no papel nativo (Figura 12(b)). Ao remover o carimbo do contato com papel, as barreiras hidrofóbicas são obtidas, conforme representado nas Figuras 12(c) e 12(d). Após o processo de estampagem dos dispositivos, realizou-se a impermeabilização de um dos lados do dispositivo com fita adesiva para que o dispositivos possam ser utilizados sobre uma superfície lisa e plana para a realização dos ensaios utilizando-se o fenômeno do fluxo lateral.

Os μ PADs foram fabricados com um arranjo geométrico contendo oito zonas de detecção interconectadas por canais microfluídicos e uma zona central para a aplicação de amostra. Todos os canais foram projetados nominalmente com 10 mm de comprimento e 3 mm de largura. Os valores de diâmetros para a zonas de detecção e central foram 5 e 10 mm respectivamente. A dimensão final dos μ PADs foi de $45\text{ mm} \times 45\text{ mm}$.

3.2.3) Fabricação de μ PADs com cola branca

A fabricação dos μ PADs com cola escolar está descrita na Figura 13. Inicialmente, a geometria desejada (previamente desenhada no software gráfico Corel Draw™) do dispositivo microfluídico foi cortada, com auxílio de uma máquina de corte a laser, em uma empresa local (Ordones Laser, Goiânia, Go, Brasil), em uma manta magnética flexível com 0,8 mm de espessura. Essa manta magnética foi utilizada como máscara para a construção das barreiras hidrofóbicas (ver etapa II). Um detalhe relevante foi que todas as máscaras foram fabricadas no modo positivo[‡]. Uma placa de acrílico (200 mm de largura x 200mm de comprimento x 3mm de espessura) foi utilizada para construção de um suporte para fixação do papel e máscara durante o processo de jateamento. Um ímã de neodímio (com 50,8 mm de largura x 50,8 mm de comprimento x 25,4 mm de altura adquirido da Polimagnete América do Sul Ltda, (Diadema, SP, Brasil) foi fixado na parte inferior da placa de acrílico com fita adesiva. Na parte superior da placa de acrílica foi fixada com auxílio de fita crepe, um recorte triangular de 1/3 da folha de papel filtro quantitativo com 12,5 cm de diâmetro, sobre este papel foi fixado à máscara magnética com o auxílio do ímã. É importante mencionar que o alinhamento da máscara com o papel e o ímã representa uma das etapas mais importantes do processo.

[‡] Modo positivo: A máscara com o *layout* do dispositivo em alto relevo, ou seja a região onde estiver a máscara estará protegida.

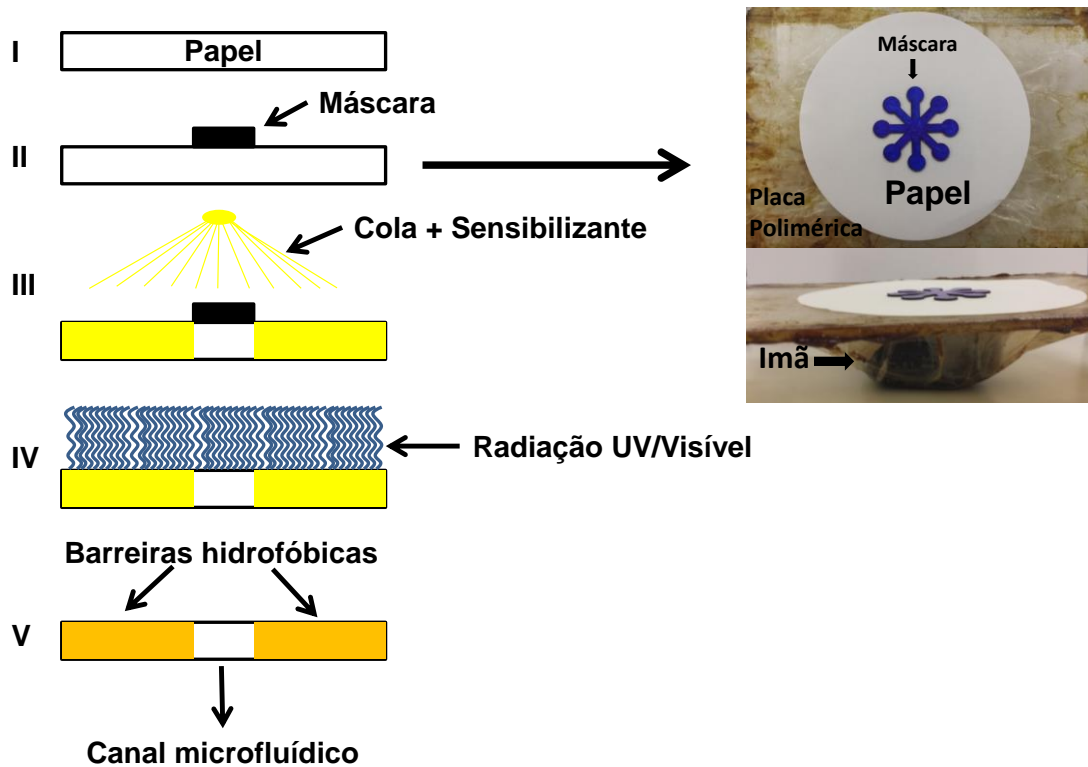


Figura 13. Esquema do processo de fabricação dos μ PADs pelo método de jateamento de cola, (I) papel nativo para a fabricação, (II) uma máscara com o layout do dispositivo é colocada sobre o papel nativo, (III) uma solução de cola escolar com sensibilizante é jateada sobre o papel com a máscara, (IV) O dispositivo é exposto a radiação UV/Visível e (V) o dispositivo com as barreiras hidrofóbicas e o canal microfluídico.

A cola branca à base de acetato de polivinila na forma de emulsão comercial foi diluída em água na proporção de 1:1, sem o sensibilizante serigráfico. A proporção utilizada para preparação da solução com o sensibilizante serigráfico foi de 46% de cola branca, 46% de água ultrapura e 8% de sensibilizante serigráfico sensível à luz visível.

A solução de cola já diluída foi colocada no interior de uma pistola de pintura, com o auxílio do compressor de ar-direto, e jateada sobre o suporte com o papel e a máscara (ver etapa III, Figura 13). Em seguida, o dispositivo foi exposto a um refletor com uma lâmpada halógena de 500 W de potência a uma distância de 20 cm de altura, por 5 minutos de cada lado do papel (ver etapa IV, Figura 13). Após a exposição, fez-se a impermeabilização de um dos lados do dispositivo com fita adesiva para permitir o uso do mesmo

sobre uma superfície lisa e plana para a realização dos ensaios utilizando-se o fluxo lateral.

3.4. Detecção Colorimétrica

A detecção colorimétrica foi conduzida com um *scanner* de mesa (*Hewlett-Packard*, modelo G4050), usando a resolução de 600 dpi. As imagens foram capturadas, convertidas para uma escala de cor, no canal RGB, com 24 bits de resolução (Canal RGB) e analisadas no software *Corel Photo-Paint™*. No software gráfico foi selecionada a ferramenta máscara com uma geometria circular, selecionou-se a região da zona de detecção por inteira. A média aritmética da intensidade de pixels de cada zona de detecção, foi obtida através da ferramenta de histograma do software, sendo usada para as análises quantitativas.

3.5. Determinação colorimétrica de nitrito em amostras reais

Os μ PADs carimbados foram explorados para determinação de nitrito em amostras clínicas, alimentícias e ambientais através do uso da reação de Griess (BHAKTA *et al.*, 2014). Para o ensaio colorimétrico de nitrito, alíquotas de 0,75 μ L da solução de cor foram pipetadas nas zonas de detecção. A solução cromógena é composta de uma mistura de 50 mM de sulfanilamida, 1,2 M de ácido clorídrico e 4 mM de NED. Após a pipetagem, o dispositivo foi mantido em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para promover a secagem dos reagentes. Em seguida, alíquotas de 40 μ L de amostra padrão ou amostras reais foram adicionadas à zona central. A partir do fluxo lateral, a amostra foi distribuída para as zonas de detecção através dos canais microfluídicos. As imagens digitais foram capturadas após 15 min de reação.

3.5.1. Saliva

Amostras de saliva foram obtidas pela doação voluntária de três pacientes. Alíquotas de 4 mL de saliva foram coletadas em um béquer 30 minutos após a higiene bucal do paciente. As amostras foram sonificadas

por 5 minutos a fim de retirar o excesso de bolhas da amostra. As amostras de saliva foram diluídas na proporção de 1:1 (v:v).

3.5.2. Água de Conserva

Utilizou-se da água de conserva de um alimento industrializado de origem animal (salsicha do tipo Viena). Após a abertura da embalagem, a água foi separada das salsichas e filtrada com um papel de filtro quantitativo com poros de diâmetro médio de 25 μm . Em seguida, a amostra foi filtrada usando um filtro com poros de diâmetro médio de 0,2 μm . As amostras foram diluídas na proporção de 1:1 (v:v).

3.5.3. Salsicha e Presunto

Os alimentos foram adquiridos em um supermercado local, onde se encontravam sob refrigeração no momento da compra. Os alimentos foram conduzidos para o laboratório para análise em caixa térmica, o tempo de transporte foi inferior a 10 minutos. No laboratório os alimentos foram acondicionados sob refrigeração seguindo as instruções dos fabricantes que constavam no rótulo. Os alimentos foram inicialmente macerados com o auxílio de um gral e um pistilo. Em seguida, pesou-se uma massa de 50 gramas de cada um dos alimentos e adicionou-se 100 mL de água ultra pura em um recipiente fechado com um sistema de condensação na parte superior. Para a extração do nitrito ferveu-se esta amostra por 1 h à temperatura de 100 °C. Em seguida, foi realizada a filtração utilizando um papel de filtro quantitativo com poros de diâmetro médio de 25 μm e o volume completado para 100 ml em um balão volumétrico.

3.5.4. Água de rio

A coleta de água de rio foi feita com uma garrafa de água mineral de 500 mL vazia e enxaguada 2 vezes com água ultra pura. Esta garrafa foi lançada a superfície do rio com auxílio de uma corda sobre uma ponte. Após a coleta amostra foi colocada sobre refrigeração e filtrada com auxílio de um papel de filtro quantitativo com poros de diâmetro médio de 25 μm . As amostras foram coletadas num mesmo rio (Rio Meia Ponte, Goiânia, Goiás, Brasil), em uma região onde começa a região urbana (Ponto A: coordenada geográfica 16.628291°S, 49.270308°W) e a outra em um ponto na região

mais central da cidade onde já houve a incorporação ao rio de alguns córregos da cidade (Ponto B: coordenada geográfica 16.642225°S, 49.256722°W).

3.6. Etapa de pré-concentração

Para as amostras de água de rio houve a necessidade de uma etapa de pré-concentração, pois a concentração de nitrito nesta amostra são baixas. Dez alíquotas de 40 µL de amostra padrão ou amostras reais foram adicionadas sequencialmente à zona central, aguardando 10 minutos entre uma adição e outra para a evaporação do solvente. Após a décima adição, os dispositivos foram mantidos em repouso por um novo período de 10 minutos para a secagem da amostra. Em seguida, alíquotas de 0,75 µL da solução cromogênea (ver composição descrita no item 3.6.1) foram adicionadas nas zonas de detecção. Após a adição do reagente de cor aguardou-se 15 minutos para fazer a aquisição da imagem *via* scanner.

3.7. Método Espectrofotométrico para a análise de nitrito

O ensaio colorimétrico realizado nos µPADs foi comparado com o método espectrofotométrico. Para o ensaio de nitrito foi pipetado 2,5 mL da solução cromogênea, composta por uma mistura de 200 mM de sulfanilamida, 4,8 M de ácido clorídrico e 16 mM de NED em um balão de 10 mL. O comprimento de onda utilizado para as análises foi 520 nm. Utilizou-se uma cubeta de vidro com um caminho óptico de 1 cm (RAMOS, CAVALHEIRO e CAVALHEIRO, 2006).

3.8. Ensaios clínicos multiplexados em µPADs fabricados com cola escolar

Para análise de analitos de interesse em urinálise os dispositivos de papel foram fabricados com cola escolar em um arranjo geométrico contendo oito zonas de detecção interconectadas por canais microfluídicos e uma zona central para a aplicação de amostra. A máscara utilizada para construção deste dispositivo tinha as seguintes dimensões zona central com 12,5 mm de diâmetro, canais microfluídicos com 4,5 mm de largura × 8,5 mm de comprimento e zonas de detecção com 9,5 mm de diâmetro. Os analitos de interesse foram nitrito, ureia, bilirrubina total, corpos cetônicos,

pH, glicose, ácido úrico e albumina. Além destes testes preliminares, ensaios colorimétricos para amilase e lipase também foram realizados visando a obtenção de um dispositivo para diagnóstico de pancreatite.

3.8.1. Nitrito

O ensaio para nitrito foi realizado conforme descrito no item 3.5, exceto com relação aos volumes utilizados. Nos dispositivos fabricados com cola escolar, alíquotas de 4 μL da solução de cor (ver composição descrita no item 3.5) foram pipetadas nas zonas de detecção. Em seguida, alíquotas de 150 μL de amostra padrão foram adicionadas à zona central.

3.8.2. Ureia

Para o ensaio de ureia, foi pipetada uma alíquota de 4 μL da solução denominada uréase, constituída de uréase 214,28 unidades/mL e estabilizantes em solução de glicerol 0,5 M, na zona de detecção e esperou 10 minutos em temperatura ambiente para promover a secagem do reagente. Em seguida, adicionou-se 4 μL da solução denominada Reagente 1 e aguardou-se 10 minutos para a secagem do reagente em temperatura ambiente. A solução do Reagente 1 foi reconstituído com apenas 50 mL de água ultra pura, ou seja a solução foi preparada para o uso nos μPADs , 10 vezes mais concentrada que para o uso em espectrofotômetro, para o qual se destina o uso comercial deste *kit*. O Reagente 1 é constituído de uma mistura de salicilato de sódio 60 mmol, nitroprussiato de sódio 3,4 mmol e etilenodiamino tetra-acético dissódico (EDTA dissódico) 1,35 mmol, sob forma de pó. Em seguida, alíquotas de 150 μL de amostra padrão foram adicionadas à zona central. A partir do fluxo lateral, a amostra foi distribuída para as zonas de detecção através dos canais microfluídicos. Após 10 minutos da adição de amostra padrão na zona central, adicionou-se na zona de detecção 4 μL da solução denominada de Reagente 2 e após 5 minutos foi feita a aquisição da imagem via scanner. O Reagente 2 assim como o Reagente 1 foi preparado 10 vezes mais concentrado do que se recomenda seu preparo para o uso em análise colorimétrica utilizando a detecção por espectrofotômetro, sua diluição foi feita utilizando água ultra pura. O Reagente 2 é constituído de hipoclorito de sódio 0,120 mol/L e hidróxido de

sódio 3,75 mol/L. Os valores de concentração apresentados são dos reagentes antes de serem diluídos para um volume final de 50 mL cada um.

3.8.3. Bilirrubina Total

Para o ensaio da bilirrubina, foi pipetada uma alíquota de 4 μL da solução denominada reagente acelerador na zona de detecção e aguardou-se 10 minutos em temperatura ambiente para a secagem do reagente. O reagente acelerador é constituído de uma mistura de benzoato de cafeína tamponada (benzoato de sódio 0,13 M e cafeína 0,13 M). Após a secagem do reagente acelerador, foi pipetada uma alíquota de 4 μL da solução denominada reagente sulfanílico e aguardado 10 minutos em temperatura ambiente para a secagem do reagente. O reagente sulfanílico é constituído de uma solução de ácido sulfanílico 0,04 M e ácido clorídrico 0,45 M. Após a secagem do reagente sulfanílico, foi pipetada uma alíquota de 4 μL da solução denominada nitrito de sódio e aguardei 10 minutos em temperatura ambiente para a secagem do reagente. O reagente de nitrito de sódio possui a concentração de 22,5 mM. Em seguida, alíquotas de 150 μL de amostra padrão foram adicionadas à zona central. A partir do fluxo lateral, a amostra foi distribuída para as zonas de detecção através dos canais microfluídicos. Após a adição da amostra aguardou-se 15 minutos para fazer a aquisição da imagem via scanner.

3.8.4. Corpos cetônicos

3.8.4.1. Síntese do padrão de corpos cetônicos (ácido acetoacético)

O ácido acetoacético é um composto orgânico instável, por este motivo ele deve ser sintetizado e em prazos curtos de tempo deve ser usado. O procedimento para a síntese do ácido acetoacético no volume final de 1 mL foi realizado adicionando 21 μL de acetoacetato de etila 99% e 250 μL de uma solução de hidróxido de sódio 500 mM em um tubo eppendorf, manteve-se em temperatura ambiente por agitação constante por 15 minutos. Em seguida adicionou-se 250 μL de uma solução de ácido clorídrico 750 mM agitou-se por 5 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 479 μL de água ultra pura e se manteve a solução em banho de gelo sob temperatura abaixo de 10 $^{\circ}\text{C}$. O produto da síntese foi usado na

análise com um tempo inferior a 3 horas após sua síntese (GRAYSON e TUIITE, 1986).

3.8.4.2. Análise de corpos cetônicos

Para o ensaio de corpos cetônicos, alíquotas de 4 μL de uma solução de glicina 100 mM em tampão fosfato 100 mM pH 10,0 foram pipetadas nas zonas de detecção. Após a pipetagem, o dispositivo foi mantido em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para promover a secagem dos reagentes. Em seguida, alíquotas de 150 μL de amostra padrão foram adicionadas à zona central. A partir do fluxo lateral, a amostra foi distribuída para as zonas de detecção através dos canais microfluídicos. Após 5 minutos adicionou-se 4 μL de uma solução de nitroprussiato de sódio 5% (m/v) e de DMF 5% (v/v). Após a adição da solução de nitroprussiato de sódio aguardou-se 10 minutos para fazer a aquisição da imagem via scanner.

3.8.5. pH

Para o ensaio de pH, alíquotas de 4 μL da solução indicadora foram pipetadas nas zonas de detecção. A solução de indicadora foi composta de uma mistura de 0,2% (m/v) de azul de bromotimol e 0,01% (m/v) de vermelho de metila, o solvente para esta solução foi uma mistura de 50% de etanol em água ultra pura. Após a pipetagem, o dispositivo foi mantido em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para promover a secagem dos reagentes. Em seguida, alíquotas de 150 μL de amostra padrão foram adicionadas à zona central. A partir do fluxo lateral, a amostra foi distribuída para as zonas de detecção através dos canais microfluídicos. Após a adição da amostra aguardou-se 15 minutos para fazer a aquisição da imagem via scanner.

3.8.6. Glicose

Para o ensaio de glicose, alíquotas de 4 μL da solução enzimática foram pipetadas nas zonas de detecção. A solução enzimática foi composta de uma mistura de 115 unidades/mL de glicose oxidase e 5 unidades/mL de peroxidase, em tampão fosfato 100 mM pH 6,0. Após a pipetagem, o dispositivo foi mantido em repouso à temperatura ambiente durante 10

minutos para promover a secagem dos reagentes. Em seguida, alíquotas de 4 μL da solução cromógena foram pipetadas nas zonas de detecção. A solução cromógena foi composta de uma mistura de 600 mM de iodeto de potássio e 300 mM trealose em água ultra pura. Após a pipetagem, o dispositivo foi mantido em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para promover a secagem dos reagentes. Em seguida, alíquotas de 150 μL de amostra padrão foram adicionadas à zona central. A partir do fluxo lateral, a amostra foi distribuída para as zonas de detecção através dos canais microfluídicos. Após a adição da amostra aguardou-se 15 minutos para fazer a aquisição da imagem via scanner.

3.8.7. Ácido úrico

Para o ensaio de ácido úrico, alíquotas de 4 μL da solução alcalina foram pipetadas nas zonas de detecção. A solução alcalina foi composta de uma solução de hidróxido de sódio 100 mM. Após a pipetagem, o dispositivo foi mantido em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para promover a secagem do reagente. Após o tempo para secagem da solução alcalina, alíquotas de 4 μL da solução enzimática foram pipetadas nas zonas de detecção. A solução enzimática foi composta de uma mistura de 80 unidades/mL de uricase e 339 unidades/mL de peroxidase, em tampão fosfato 100 mM pH 6,0. Após a pipetagem, o dispositivo foi mantido em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para promover a secagem dos reagentes. Em seguida, alíquotas de 4 μL da solução cromógena foram pipetadas nas zonas de detecção. A solução cromógena foi composta de uma mistura de 4 mM de 4-AAP e 8 mM de DHBS em água ultra pura. Após a pipetagem, o dispositivo foi mantido em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para promover a secagem dos reagentes. Em seguida, alíquotas de 150 μL de amostra padrão foram adicionadas à zona central. A partir do fluxo lateral, a amostra foi distribuída para as zonas de detecção através dos canais microfluídicos. Após a adição da amostra aguardou-se 15 minutos para fazer a aquisição da imagem via scanner.

3.8.8. Albumina

Para o ensaio de albumina, alíquotas de 4 μL da solução tampão foram pipetadas nas zonas de detecção. A solução tampão foi composta de uma solução tampão citrato 250 mM pH 1,8. Após a pipetagem, o dispositivo foi mantido em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para promover a secagem do reagente. Após o tempo para secagem da solução tampão, alíquotas de 4 μL da solução cromógena foram pipetadas nas zonas de detecção. A solução cromógena foi composta azul de tetra-bromofenol, em solução de etanol 95%. Após a pipetagem, o dispositivo foi mantido em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para promover a secagem dos reagentes. Em seguida, alíquotas de 150 μL de amostra padrão foram adicionadas à zona central. A partir do fluxo lateral, a amostra foi distribuída para as zonas de detecção através dos canais microfluídicos. Após a adição da amostra aguardou-se 15 minutos para fazer a aquisição da imagem via scanner.

3.8.9. Diagnóstico de pancreatite

Para análise de analitos de interesse em pancreatites, os dispositivos foram fabricados com um arranjo geométrico de um **T**, conforme mostrado na **Figura 14** contendo duas zonas de detecção nas extremidades interconectadas por canais microfluídicos. O diâmetro das zonas de detecção, o comprimento e a largura dos canais foram iguais a 5 mm, 10 mm, e 3 mm, respectivamente. Os analitos de interesse foram lipase e amilase.

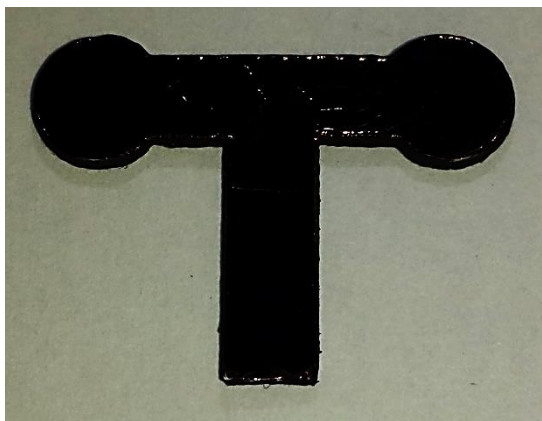


Figura 14. Máscara com a geometria do dispositivo utilizado para os ensaios de amilase e lipase.

Amilase

Para o ensaio de amilase, foi pipetada uma alíquota de 4 μL da solução denominada substrato na zona de detecção e esperou 10 minutos em temperatura ambiente para promover a secagem do reagente. O reagente substrato é constituído de uma solução tampão fosfato 0,19 M, contendo cloreto de sódio 0,03 M, ácido benzoico 0,07 M, estabilizantes e 400 mg/L de amido solúvel, o pH da solução é 7,0. Em seguida, adicionou-se 4 μL da solução denominada solução de iodo e aguardou-se 10 minutos para a secagem do reagente em temperatura ambiente. A solução de iodo concentrada do *kit* foi diluída com água ultra pura para a seguinte concentração, iodeto de potássio 25,2 mM e iodo 14 mM para o uso nos μPADs , 7 vezes mais concentrada que para o uso em espectrofotômetro, para o qual se destina o uso comercial deste *kit*. Após a etapa de secagem da solução de iodo, alíquotas de 25 μL de amostra padrão foram adicionadas à ao início do canal microfluídico. A partir do fluxo vertical, a amostra foi distribuída para as zonas de detecção através dos canais microfluídicos. Após a adição da amostra aguardou-se 15 minutos para fazer a aquisição da imagem via scanner.

Lipase

Para o ensaio de lipase, foram pipetadas alíquotas de 1,0 μL da soluções Reagente 1, Reagente 2, Reagente 3, Reagente 4 e Reagente 5 na zona de detecção, pipetou-se um reagente de cada vez e esperou 10

minutos em temperatura ambiente para promover a secagem do reagente entre um reagente e outro. O Reagente 1 é constituído de uma solução tampão tris(hidroximetil) aminometano 0,1 M e azida sódica 7,7 mM. A solução de Reagente 2 é constituída de uma solução de fenil-metil-sufonil fluoreto (PMSF) 20 mM em etanol. A solução de Reagente 3 é constituído de acetato de sódio 15 mM, ácido ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) 3 mM e azida sódica 7,7 mM. A solução de Reagente 4 é constituído por tributirato de 2,3 dimercapto propanol 20 mM e lauril sulfato de sódio 20 mM em etanol. A solução de Reagente 5 é constituído lauril sulfato de sódio 27,6 mM. Após a etapa de secagem da solução de Reagente 5, alíquotas de 25 µL de amostra padrão foram adicionadas ao início do canal microfluídico. A partir do fluxo vertical, a amostra foi distribuída para as zonas de detecção através dos canais microfluídicos. Após a adição da amostra aguardou-se 15 minutos para fazer a aquisição da imagem via scanner.

3.9. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para o estudo morfológico de como a barreira hidrofóbica de parafina é formada nas fibras do papel foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a caracterização da superfície do substrato de papel foi realizada antes e após a etapa de carimbagem. Utilizou-se o microscópio modelo JSM-6610 adquirido junto a JEOL (Waltham, MA, EUA). Para realizar as análises de MEV, inicialmente realizou-se a metalização com ouro de duas peças quadrada de papel (10 x 10 mm), uma contendo apenas o papel nativo e outra com os microcanais carimbados, posteriormente analisaram-se no microscópio. Estas análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), situado no Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.

3.10. Microscopia Óptica.

Para um estudo sobre a morfologia do papel e a efetividade das barreiras hidrofóbicas, dos dispositivos fabricados pela a técnica de jateamento de cola, utilizou a técnica de microscopia óptica. Utilizou-se o microscópio óptico biológico triocular modelo N107T adquirido junto a Coleman Equipamentos para Laboratório® (Santo André, SP, Brasil). Para a

análise das fibras do papel antes e após o jateamento, os dois tipos de papel foi recortado na forma de quadrado (20 mm × 20 mm) e para coleta das imagens foi utilizado a lente objetiva acromática 10x/0.25. Para a verificação da efetividade, da barreira hidrofóbica feita de cola com sensibilizante foi utilizada a lente objetiva acromática 4x/0.10, foi feita a captura da imagem de um μ PADs na interface do canal microfluídico e da barreira de cola antes e após a adição de corante azul no dispositivo.

4. Resultados e Discussão

4.1. Uso do Carimbo

4.1.1. Escolha da parafina e método de prototipagem

A parafina é um produto derivado do petróleo e, por ser classificada como um hidrocarboneto saturado, apresenta-se como um material inerte e com propriedades apolares. Além disso, esse material é altamente hidrofóbico, oferece propriedades termoplásticas e possui um ponto de fusão entre 60 e 62 °C. Outro fator favorável é que a parafina apresenta baixo custo (aproximadamente R\$ 3,00 por kilograma)(KENISARIN, 2014; OGDEN *et al.*, 2014). A parafina é um sólido que varia de coloração entre branco e o incolor e apresenta resistência a muitos compostos químicos(YAGODA, 1937). Por estas qualidades descritas acima, a parafina se mostrou um material bastante atrativo para seu uso na construção de barreiras hidrofóbicas em microdispositivos analíticos em papel. A parafina por ser basicamente constituída de hidrocarbonetos saturados possui um alto grau de hidrofobicidade. Para demonstrar esta característica um papel nativo foi imerso em solução de parafina líquida à 90°C em seguida retirou-se o papel desta solução e deixou a parafina solidificar a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se um volume de solução aquosa de azul de metileno (corante) sobre a superfície do papel parafinado como mostrado nas Figura 15 A e B. O alto grau de hidrofobicidade pode ser observado pelo ângulo formado pela gota de corante sobre o papel parafinado, já o mesmo não ocorre quando um volume de solução aquosa de azul metileno é adicionada sobre a superfície do papel nativo como mostrado nas Figura 15 C e D, onde o papel absorve todo o volume de corante adicionado. Como o papel nativo apresenta alto grau de hidrofiliicidade não é formada uma gota sobre a superfície do papel, sendo todo o volume da solução absorvida pelo papel.

Como mencionado anteriormente, Yagoda (YAGODA, 1937) e Muller e Clegg (MULLER e CLEGG, 1949) foram os primeiros a demonstrar a potencialidade do uso da parafina como um agente hidrofóbico para geração de barreiras hidrofóbicas no papel. A partir destes trabalhos pioneiros e do avanço na área da microfluídica, desenvolvemos a técnica de carimbagem

para a prototipagem rápida de dispositivos analíticos em papel. A principal motivação está relacionada com a possibilidade de conduzir múltiplos ensaios simultaneamente com detecção colorimétrica e consumo reduzido de amostras e reagentes. Além disso, a busca por métodos simples, baratos e rápidos tem despertado o interesse de muitos pesquisadores nessa área multidisciplinar.

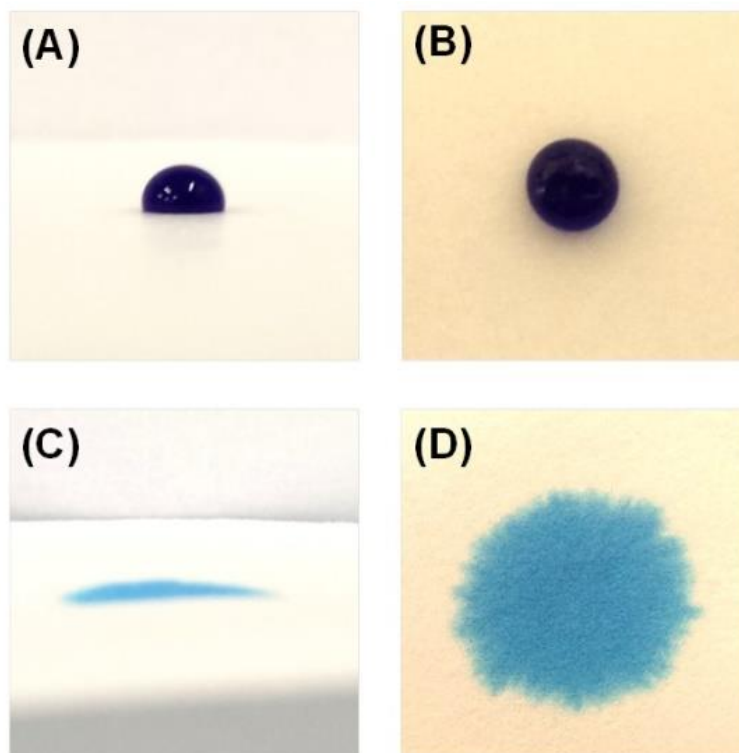


Figura 15. Diferença de hidrofiliabilidade entre o papel de filtro quantitativo saturado com parafina e o papel nativo. Foi colocado na superfície dos dois papéis uma gota de 10µL de corante (azul de metileno) em água. (A) Visão lateral da gota no papel saturado de parafina. (B) Visão superior da gota no papel saturado de parafina. (C) Visão lateral da gota no papel nativo. (D) Visão superior da gota no papel nativo.

Alguns grupos de pesquisa demonstraram recentemente o desenvolvimento de carimbos metálicos para prototipagem de dispositivos analíticos em papel. Em 2012, Zhang e Zha (ZHANG e ZHA, 2012) reportaram a construção de um molde em uma folha de cobre pela corrosão deste metal e a utilização de um ferro de passar para a transferência da parafina para o papel. A desvantagem deste método é que o molde, após a

fabricação de cada dispositivo, deve passar novamente pela etapa de impregnação da parafina para ser novamente usado.

Em 2013, Curto e colaboradores (CURTO *et al.*, 2013) desenvolveram um carimbo elastomérico (em PDMS) que apresentava massa aproximadamente igual a 500 gramas. O processo desenvolvido requer uma sequência laboriosa de etapas, onde o tempo de fabricação é de 8 horas. Em 2014, Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2014) divulgaram a fabricação de um carimbo de ferro com ajuste magnético para uso de várias geometrias, o qual pesava em torno de 500 gramas.

Em comparação com os trabalhos recentemente publicados, o carimbo desenvolvido nesse trabalho exibe várias vantagens, como menor peso, maior resistência mecânica e menor reatividade do material com o ar. Em termos de peso e tempo de fabricação, o carimbo fabricado em aço inoxidável apresenta 80 g e pode ser obtido em aproximadamente 4h. O custo estimado por unidade é de R\$ 150,00. As vantagens proporcionadas pelo método de fabricação implementado ainda se somam à excelente reprodutibilidade e à capacidade de produção em massa. O número de μ PADs fabricados com o carimbo utilizado nesse trabalho é superior a 10.000 unidades. A simplicidade de operação e o custo reduzido estimulam o uso em laboratórios com recursos limitados.

4.1.2. Geração I e II dos carimbos

No desenvolvimento da tecnologia de fabricação baseada na carimbagem, dois modelos diferentes de carimbos metálicos foram confeccionados. O primeiro foi usinado na primeira etapa do trabalho, quando ainda estávamos otimizando os parâmetros operacionais. Este carimbo foi desenhado com a geometria de um canal único com dois reservatórios nas extremidades (Geração I). O canal presente nessa geometria apresentou comprimento de 50 mm e largura interna de 3 mm. Considerando a espessura da borda, a largura total foi igual a 5 mm. Os reservatórios (zonas de detecção) apresentaram diâmetros interno e externo de 10 e 12 mm, respectivamente.

Após a otimização dos parâmetros envolvidos (pressão, temperatura e tempo) no processo de transferência da parafina, este carimbo começou a ser usado para fabricação de dispositivos para análise de analitos de interesse da área de diagnósticos. No entanto, a geometria definida na geração I limitava-se à análise simultânea de apenas dois analitos. Levando-se em consideração que o uso de sistemas analíticos miniaturizados permite o auto-processamento em paralelo, o fenômeno do transporte microfluídico sob ação das forças capilares – também conhecido como fluxo lateral – foi explorado para conduzir até oito ensaios simultâneos em uma mesma amostra de interesse. Nesse contexto, um segundo modelo de carimbo foi confeccionado, que foi batizado de geração II.

Na geração II, o carimbo foi fabricado no mesmo material (aço inox) em uma geometria constituída de oito zonas de detecção interligadas por canais microfluídicos a uma zona central. As dimensões deste carimbo estão citadas na parte experimental. A zona central foi projetada para ocorrer a adição da amostra para então ser transportada por fluxo lateral até as zonas de detecção, as quais são, na maioria das aplicações, previamente preparadas com a imobilização ou impregnação de reagentes cromógenos. O contato desses reagentes com o analito promove uma reação química que leva à formação de um produto colorido, cuja intensidade está correlacionada com a concentração analítica. A Figura 16 ilustra as duas gerações dos carimbos desenvolvidos e os dispositivos microfluídicos resultantes da tecnologia proposta.

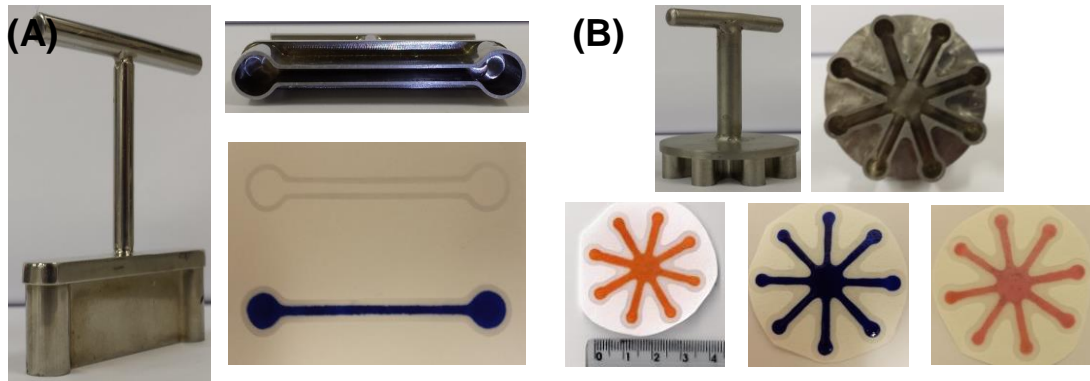


Figura 16. (A) Imagem do carimbo geração I e o dispositivo fabricado com o respectivo carimbo, sendo um canal único com duas zonas de detecção; (B) imagem do carimbo geração II e o dispositivo fabricado com respectivo carimbo, sendo oito zonas de detecção interligadas por canais microfluídicos a uma zona central de injeção de amostra.

4.1.3. Caracterização

A criação de barreiras de parafina é simples e pode ser completamente construída em um intervalo da ordem de segundos. Basicamente, quando o carimbo aquecido entra em contato com o papel parafinado, a parafina se funde e penetra na estrutura porosa do papel nativo, que se encontra na parte inferior do papel parafinado. Durante este processo, as barreiras hidrofóbicas são definidas nas regiões onde o carimbo entrou em contato com a superfície do papel nativo.

Ao investigar a transferência da parafina para formação da barreira variando o tempo de carimbagem de 1 a 10 segundos e levando-se em conta que esta técnica proposta baseia-se na fusão da parafina, o tempo de estampagem à uma pressão constante promove transferência de diferentes quantidades de parafina para a superfície do papel nativo. Pode-se observar na Figura 17 que a quantidade de parafina transferida do papel parafinado para o papel nativo por dispositivo é de 15 para 35 mg, quando o tempo aumenta de 1 para 10 segundos.

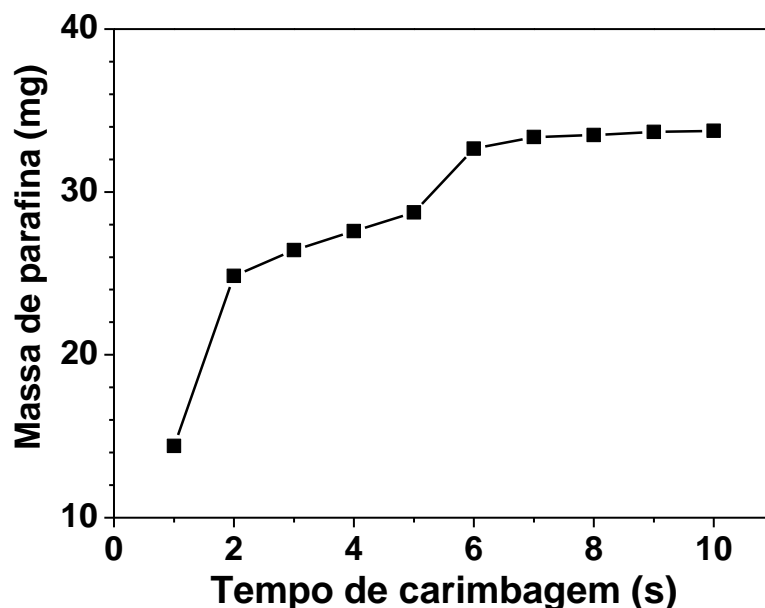


Figura 17. Transferência de massa de parafina para o papel em diferentes tempos de carimbagem.

Entretanto usando um carimbo nestas dimensões e geometria, deve-se evitar carimbagens com tempo superior a 5 segundos, pois começa-se a observar canais, parcialmente ou totalmente bloqueados pelo excesso de parafina transferida. Além disso, observou-se que a massa transferida com os tempos de carimbagem acima de 6 segundos é bem similar. Este fato pode ser atribuído à espessura das bordas do carimbo que entra em contato com o papel parafinado, limitando assim a quantidade de parafina transferida do papel parafinado para o papel nativo.

A Figura 18 mostra três micrografias ópticas de μ PADs com tempo de carimbagens de 2, 5, 10 segundos. Além da quantidade de parafina transferida, a largura do canal e das barreiras hidrofóbicas são dependentes do tempo de carimbagem. As larguras dos canais e das barreiras variaram, respectivamente de 2,5 para 2,0mm e de 1,4 para 2,2 mm quando o tempo de carimbagem foi aumentado de 2 para 5 segundos. O fato visto é que os canais são totalmente bloqueados a partir de 10 segundos de carimbagem. Baseado na imagem óptica mostrada na Figura 19, a parafina fundida no processo de carimbagem penetra na superfície porosa do papel nas orientações verticais e horizontais. Este fenômeno justifica a mudança da largura dos canais e barreiras com o decorrer do tempo de carimbagem.

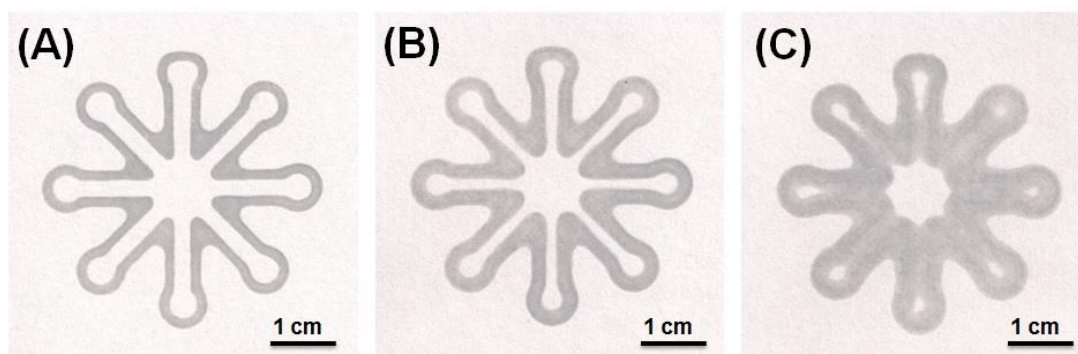


Figura 18. O tempo de carimbagem é diretamente ligado a largura das barreiras hidrofóbicas bem como a largura dos canais. Tempo de carimbagem (A) 2 segundos, (B) 5 segundos e (C) 10 segundos.

Este processo produz barreiras hidrofóbicas bastante efetivas, conforme visualizado na Figura 19. Para representar o transporte fluídico nos dispositivos fabricados com parafina, uma solução do corante azul de metileno foi adicionada na zona central de μ PADs carimbados com 2, 5 e 10 s. Conforme visualizado na Figura 19, não foram observados vazamentos da solução nem na parte superior e nem na parte inferior do dispositivo, o que demonstra a efetividade da barreira hidrofóbica. No entanto, conforme discutido previamente, o tempo longo de carimbagem promove uma obstrução parcial ou total do canal definido pelas barreiras. Por estas razões apresentadas o tempo de carimbagem foi fixado em 2 segundos. Quando comparado com outras técnicas de fabricação, o tempo requerido a prototipagem baseada na carimbagem dos μ PADs é relativamente pequeno.

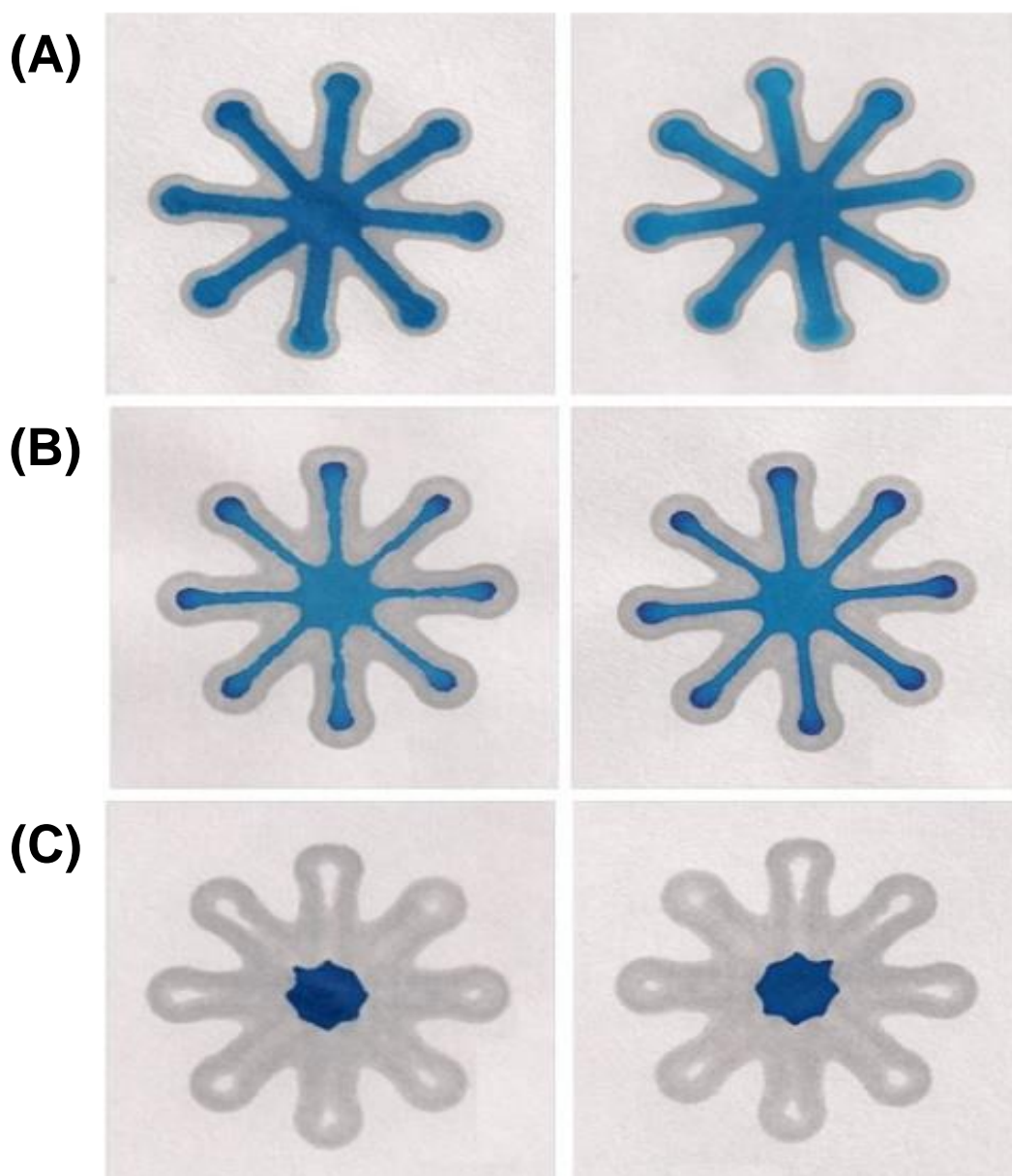


Figura 19. Dispositivos fabricados em diferentes tempos de carimbagem (A) 2 segundos, (B) 5 segundos, (C) 10 segundos preenchidos por corante em água. As imagens a esquerda mostram a face do papel onde se encontrava em contato com o papel saturado com parafina e a direita a face inferior do papel no momento da carimbagem.

A ferramenta portátil de fácil replicagem de μ PADs não compromete a reprodutibilidade de dispositivo para dispositivo, como pode se observar na Figura 20. Para realizar esta análise, 50 dispositivos foram fabricados, posteriormente escaneados juntamente com objeto de dimensões conhecida. As imagens adquiridas foram analisados com o auxílio do software gráfico CorelDrawTM, a largura dos canais microfluídicos e das

barreiras hidrofóbicas foram medidas e corrigidas para a dimensão real, com auxílio da medida do objeto com dimensões conhecidas. O valor médio para a largura dos canais medidos em 50 μ PADs fabricados sob as mesmas condições experimentais foi igual a de $2,6 \pm 0,1$ mm. Para cada dispositivo, a largura foi medida em três pontos diferentes com um desvio padrão relativo variando de 1 a 7%.

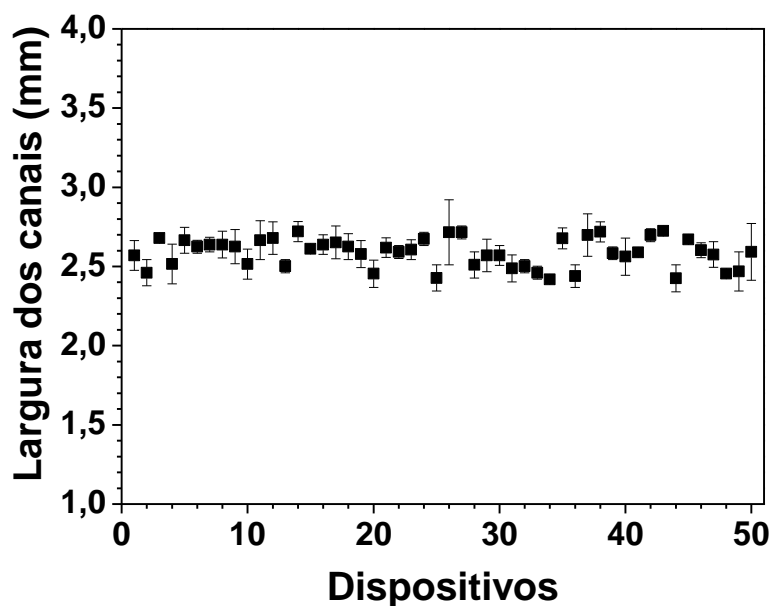


Figura 20. Medidas de largura dos canais de 50 dispositivos diferentes.

A morfologia da superfície dos dispositivos também foi estudada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), visando compreender o procedimento de criação das barreiras de parafina. As Figura 21A e Figura 21B mostram imagens de MEV da superfície de papel antes e depois da carimbagem com parafina no papel nativo, respectivamente. Analisando estas imagens é possível observar que a estrutura porosa do papel é preenchida com parafina depois da etapa de carimbagem, dando origem assim as barreiras hidrofóbicas, que são primordiais para aplicações microfluídica. A Figura 21C exibe uma imagem de MEV mostrando um corte da secção transversal do dispositivo, no qual pode ser visualizado a definição do canal em papel com barreiras de parafina. Como já mencionado anteriormente, a parafina penetra verticalmente através da estrutura porosa do papel definido as barreiras hidrofóbicas depois da etapa de solidificação.

Da mesma forma que as larguras dos canais foram investigadas, também investigamos a reprodutibilidade das barreiras hidrofóbicas com o tempo de carimbagem de 2 segundos. A largura da barreira apresentada foi medida em 64 canais independentes, o valor médio é de $1,4 \pm 0,1$ mm.

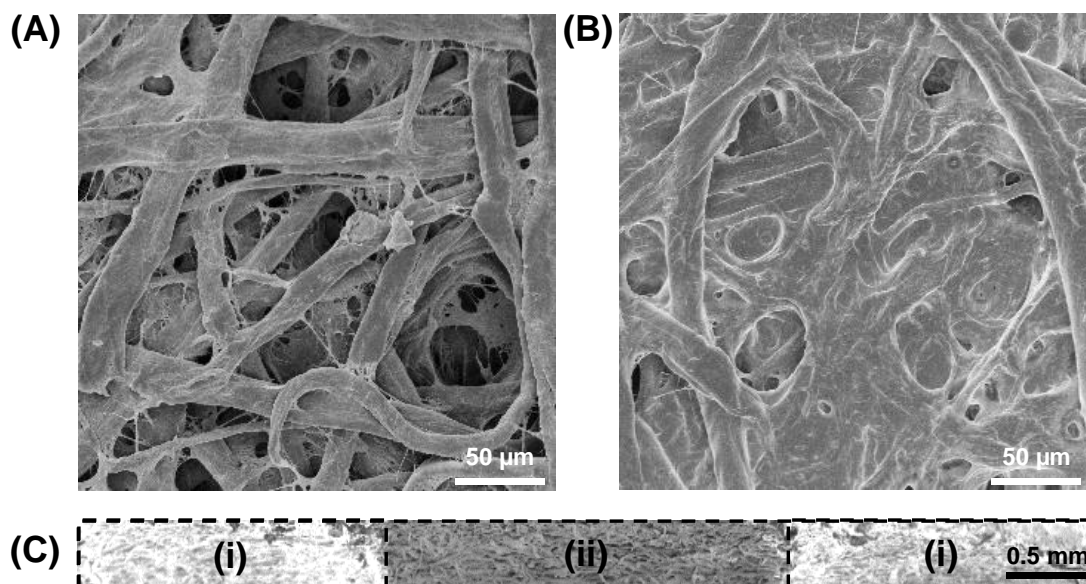


Figura 21. Imagens de MEV mostrando a estrutura do papel (A) antes e (B) após etapa de carimbagem, qual possibilita o recobrimento das fibras com parafina e (C) visão perpendicular do papel onde (i) barreira hidrofóbica de parafina e (ii) canal hidrofílico.

Para avaliar a robustez dos chips fabricados pelo método de estampagem a quente, em relação a variação de temperatura, dispositivos foram estocados em 4 diferentes temperaturas (-4 °C, 8 °C, 25 °C e 37 °C) por 15 dias, para verificar a possibilidade de ocorrer dilatação ou contração das larguras das barreiras hidrofóbicas e dos canais microfluídicos. Este teste foi realizado com 5 dispositivos estocados por temperatura. A largura de cada canal microfluídico e cada barreira hidrofóbica foi medido em 3 lugares diferentes (em cada extremidade e no meio), em cada dispositivo foram realizadas medidas nos 8 canais microfluídicos. Como mostrado na **Figura 22** (A) não há uma dilatação ou contração significativa na largura dos canais microfluídicos, após o período de estocagem, pois a diferença entre as larguras foi $<1,2\%$. A Figura 22 (B) apresenta que as larguras das barreiras hidrofóbicas também não apresentaram diferença significativa, após o período de estocagem a diferença entre a largura das barreiras foi

<1,9%. Estes resultados mostra que mesmo com uma variação muito grande, não houve uma mudança significativa na morfologia do dispositivo.

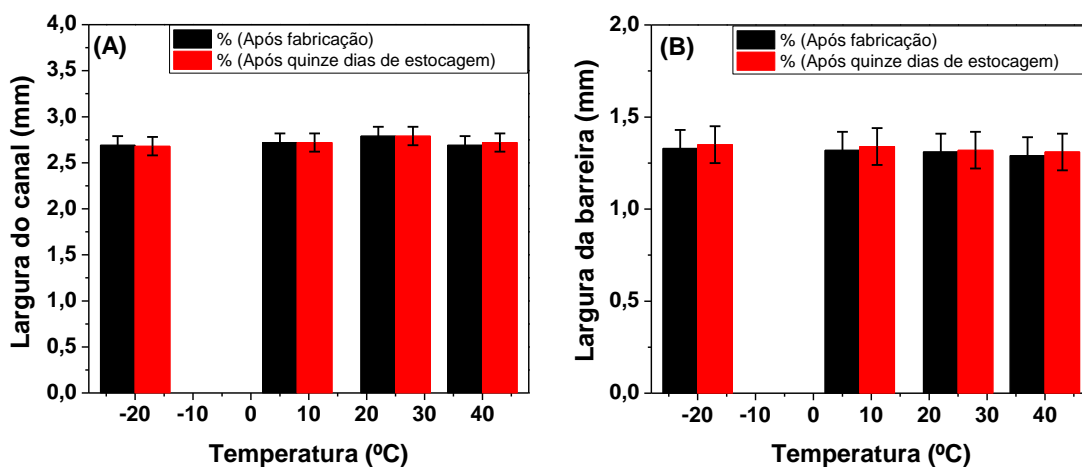


Figura 22. Teste de robustez dos μ PADs mostrando a estabilidade térmica da morfologia dos dispositivos.

4.1.4. Desempenho Analítico

4.1.4.1. μ PADs

O desempenho analítico dos μ PADs fabricados pelo processo de carimbagem foi investigado afim de verificar a sua viabilidade para a determinação quantitativa de nitrito em amostras de origem biológica (saliva), alimentícia (salmoura de alimentos industrializados de origem animal e dois produtos industrializados de origem animal). A Figura 23 ilustra um μ PADs usado para a realização das análises de nitrito, sendo três zonas utilizadas para controle e cinco zonas para a realização do ensaio de nitrito utilizando a reação de Griess.

De acordo com a curva analítica apresentada na Figura 24, pode-se observar que o ensaio colorimétrico para determinação de nitrito apresentou boa correlação linear para a faixa de concentração entre 0 e 100 μ M, no qual o coeficiente de correlação foi igual a 0,993. O limite de detecção (LD) obtido para o ensaio de nitrito nos μ PADs foi igual a 11,3 μ M. Esse valor foi calculado levando-se em consideração a razão entre três vezes o desvio padrão do branco e o coeficiente angular da curva analítica.

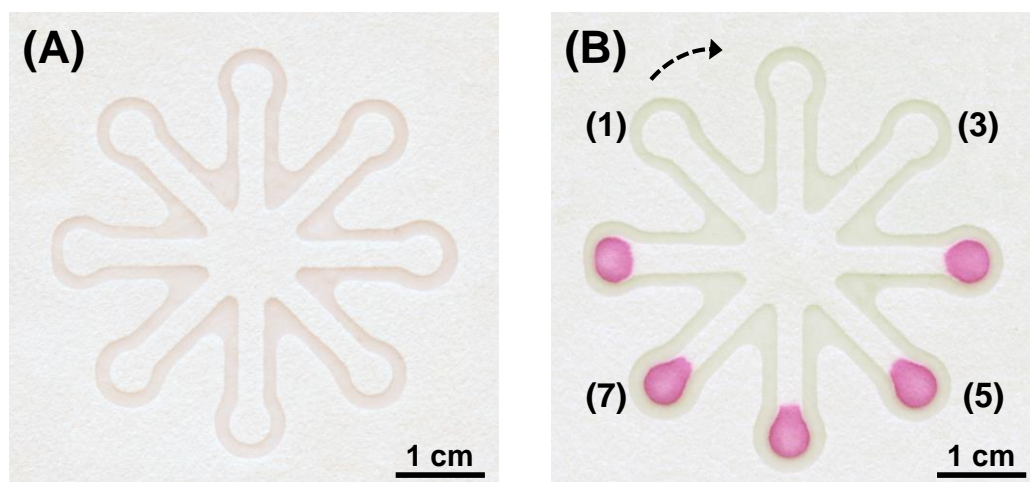


Figura 23. Imagens ópticas dos μ PADs utilizados para análise de nitrito em amostra reais; (A) imagem de um μ PADs antes da aplicação da amostra com cinco zonas com reagentes cromógenos em sua zona e três zonas sem nada com a função de zona controle; (B) imagem de um μ PADs após 15 minutos da injeção de uma amostra de padrão de 300 μ M de nitrito.

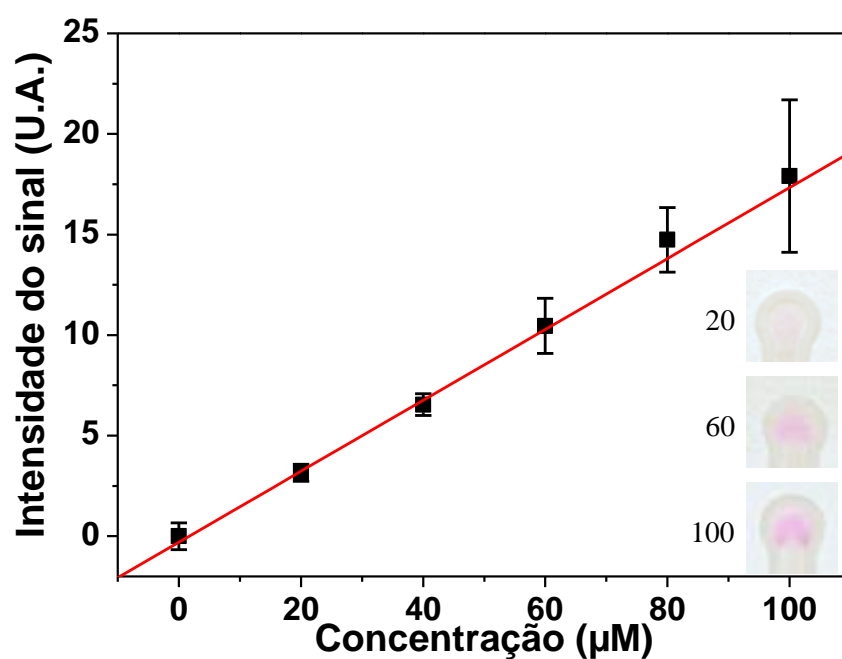


Figura 24. Curva analítica para determinação de nitrito usando μ PADs sem pré-concentração. Equação da curva: Intensidade do sinal = $-0,2985 + 0,1763 [\text{NO}_2^-]$. $R^2 = 0,993$. (n= 5)

4.1.4.2. Espectrofotometria

Para comparação entre as técnicas (proposta *versus* padrão) realizaram-se os mesmos testes com detecção usando o espectrofotômetro, construiu-se uma curva analítica com as concentrações de padrões variando de 0 a 75 μM . De acordo com a curva analítica mostrada na Figura 25, pode-se observar que os dados apresentaram boa correlação linear para a faixa de concentração de 0 a 75 μM . O LD obtido foi de 0,16 μM , calculado da mesma maneira descrita anteriormente.

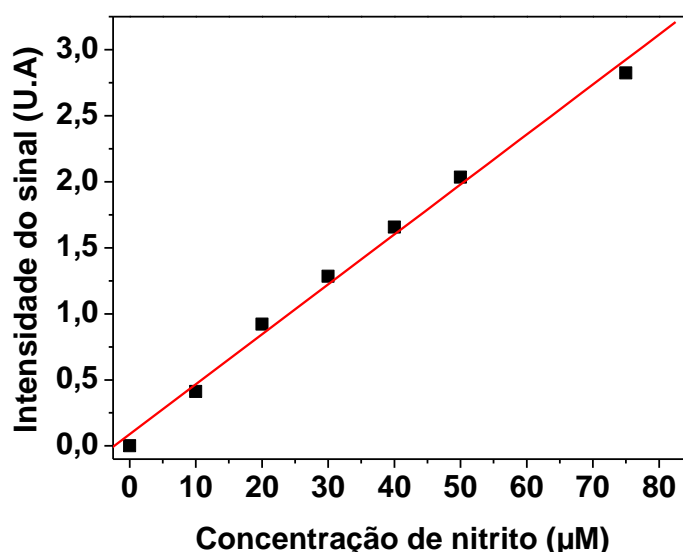


Figura 25. Curva analítica para determinação de nitrito usando o espectrofotômetro. Equação da curva: Intensidade do sinal= 0,001 + 0,047 $[\text{NO}_2^-]$. $R^2= 0,997$. (n= 5).

Na Tabela 1 está apresentada uma comparação dos parâmetros analíticos, dos volumes utilizados e do custo da instrumentação entre os μPADs e a espectrofotometria utilizadas para a análise de nitrito.

O preço de uma análise de nitrito nos μPADs é inferior a R\$ 0,01. Esse valor inclui os custos dos reagentes, do papel e da parafina. Por outro lado, a análise no espectrofotômetro apresenta custo unitário, pelo menos, quatro vezes maior. Além disso, conforme apresentado na Tabela 1, o volume necessário de cromógeno em uma análise no espectrofotômetro seria suficiente para fazer mais de 1000 análises nos μPADs . Adicionalmente, o volume de resíduo gerado nos μPADs é aproximadamente 250 vezes menor do que espectrofotômetro por análise.

Outra vantagem que os μ PADs apresentam é a portabilidade, pois estas análises não requerem instrumentação específica. Usando-se a detecção colorimétrica, o método proposto requer apenas um instrumento de captura de imagem e um software para aquisição dos dados. Este instrumento pode ser um *smartphone*, um iPad[®], um microscópio portátil com câmera integrada ou um *scanner* de mão (SOUZA *et al.*, 2014).

Tabela 1. Análise comparativa da instrumentação e dos parâmetros analíticos associados com os μ PADs e a análise espectrofotométrica.

	μ PADs	Espectrofotômetro
Limite de detecção (μM)	11,3	0,16
Desvio Padrão Relativo (%)	8-21%	0,02%
Sensibilidade Analítica	0,0176(U.A/ μ M)	0,0378(U.A/ μ M)
Coefficiente de Correlação	0,993	0,997
Volume de amostra⁺⁺	40 μ L	7,5 mL
Volume de cromógeno⁺⁺	0,75 μ L	2,5 mL
Custo da instrumentação	R\$ 1.600,00 ^{**}	R\$ 3.000,00

⁺⁺ Para cinco análises. ^{**}Considerando o uso de um computador e scanner de mesa.

4.1.4.3. Amostras Reais

O nitrito nos alimentos industrializados de origem animal apresenta-se como função principal e primordial de bactericida, a principal preocupação é a *Clostridium Botulinum*, que causa o botulismo. O botulismo é uma doença onde a toxina gerada pela *Clostridium Botulinum* afeta o sistema nervoso gerando uma paralisia dos músculos, quando esta toxina afeta o diafragma, ele não exerce a contração e o paciente morre por asfixia. Outro benefício para a indústria alimentícia é que a adição de nitrito em alimentos fixa a cor no alimento, assim dando um atrativo visual para o seu consumo pela população.(NANTEL, 1999; PARDI *et al.*, 2007).

A utilização dos μ PADS para a análise de nitrito em alimentos mostrou-se bastante eficiente, pois os valores encontrados foram similares aos dados obtidos pela técnica de referência. Além disso, é importante

salientar que o valor permitido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de nitrito de sódio residual em conserva de salsichas é de 2,17 mM (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2007). Este dispositivo se torna um instrumento de análise em campo das amostras de alimentos de origem animal durante a fiscalização. Se o resultado de uma amostra estiver fora dos parâmetros da legislação específica será possível apreensão de lotes de produtos irregulares, sem a necessidade de coleta e transporte da amostra para laboratório para análise posterior.

O nitrito na saliva pode ser um indicativo da quantidade de NO na corrente sanguínea, pois a saliva contém muitos componentes derivados do soro (GRIFFITHS, 2003). O NO tem uma função primordial na vaso-dilatação dos vasos sanguíneos e é convertido rapidamente em nitrato e nitrito nos fluidos biológicos (BLICHARZ *et al.*, 2008). Neste trabalho avaliou-se a saliva de três pacientes do mesmo sexo, no qual apenas um deles consumia em sua dieta suplemento alimentar à base de *L-arginina*, que é um aminoácido fundamental na síntese precursora do NO.

A determinação de nitrito em águas é um parâmetro muito importante para verificar qual o nível de qualidade da água, assim poderemos classificar esta água para o seu correto uso, como por exemplo, potável ou apenas para irrigação. A presença de nitrito é um indicio que a carga de matéria orgânica (origem animal e/ou vegetal) está alta ou esta água passou por um processo de contaminação recente com matéria orgânica. A ação de bactérias ou microorganismos que decompõem a matéria orgânica convertem nitrogênio amoniacal em nitrito como produto de decomposição biológica. O nitrito é um estado intermediário no ciclo do nitrogênio, podendo ser gerado pela oxidação da amônia, como também pela redução do nitrato. Os processos de oxidação e redução do nitrito ocorrem naturalmente nas águas naturais ou induzidos por estações de tratamentos. Segundo a legislação brasileira o órgão regulador de qualidade de água no Brasil é o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (AMBIENTE, 2005) que regulamenta por meio de uma portaria que em águas naturais, a concentração máxima de nitrito é de 22 µM. Com o valor de concentração que a portaria regulamenta e com o procedimento de pré-concentração

podemos afirmar que os μ PADs tem um grande potencial para ser usado neste tipo de análise.

As amostras reais foram analisadas nos μ PADs e também no método espectrofotométrico. Quando a análise de nitrito foi realizada nas amostras de água de rio via espectrofotometria, observou-se que os valores encontrados na amostra se encontravam abaixo do LD obtido nos μ PADs . Dessa forma, foi necessário realizar uma etapa de pré-concentração da amostra, conforme detalhado na Parte Experimental. A Figura 26 apresenta a curva analítica obtida após a etapa de pré-concentração para uma faixa de concentração de nitrito entre 0-25 μ M.

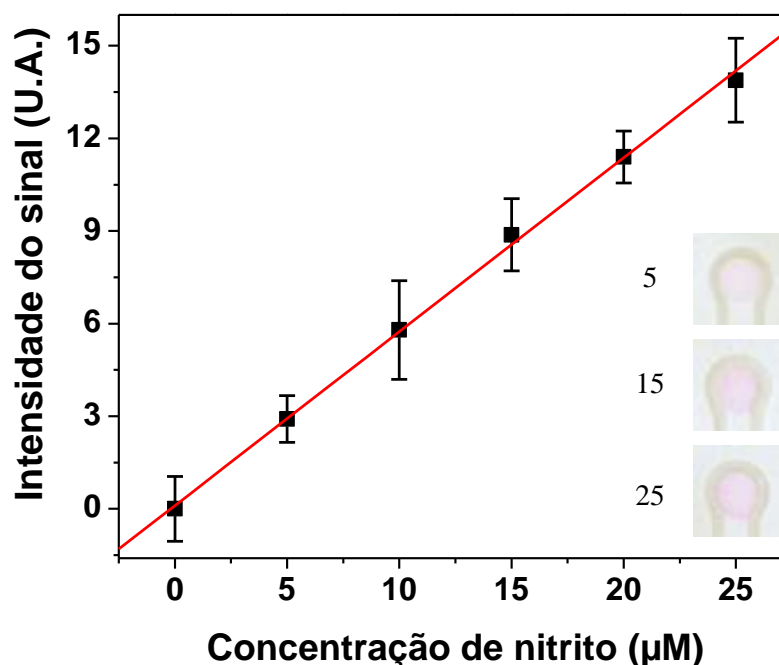


Figura 26. Curva analítica para determinação de nitrito usando pré-concentração nos μ PADs. Equação da curva: Intensidade do sinal= $0,1040 + 0,5636 [\text{NO}_2^-]$. $R^2 = 0,997$. (n= 5)

Entretanto, quando comparamos as sensibilidades das duas curvas analíticas a com pré-concentração e a sem pré-concentração, foi possível observar um fator de enriquecimento da amostra de aproximadamente 3,5 vezes com a etapa de pré-concentração. O limite de detecção obtido após a etapa de pré-concentração foi de 5,6 μ M. Então com a utilização da etapa de pré-concentração é possível a utilização dos μ PADs para análise de interesse ambiental.

Na literatura trabalhos relatando o uso de μ PADs para a análise de nitrito, como de Xiao e colaboradores que relataram um limite de detecção de 0,4694 μ M de nitrito (XIAO *et al.*, 2013), outros trabalhos relataram limites de detecção entre 5 – 15 μ M (KLASNER *et al.*, 2010; METTERS *et al.*, 2013; BHAKTA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014). O valor do limite de detecção calculado para este trabalho se encontra dentro da faixa para a maioria dos artigos publicados, com exceção para o artigo de Xiao e colaboradores, que obtiveram um limite de detecção 12 vezes menor.

Após, a otimização da etapa de pré-concentração para uso dos μ PADs nas amostras de águas de rio e a utilização dos μ PADs sem a etapa de pré-concentração para as amostras de interesse clínico e de alimentos, foi possível a realização dos ensaios com as amostras reais para comparação entre a metodologia proposta e metodologia convencional. Os valores obtidos para as concentrações de todas as amostras reais estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores das concentrações de nitrito encontradas em amostras reais através da análise colorimétrica nos μ PADs e no espectrofotômetro.

Amostra	Método de referência (μmol L⁻¹)	μPADs (μmol L⁻¹)
Saliva #1	83,1 \pm 0,1	73 \pm 10
Saliva #2	171,5 \pm 0,1	176 \pm 22
Saliva #3	21,2 \pm 0,1	26 \pm 7
Salmoura	105,9 \pm 0,1	103 \pm 11
Salsicha	185,7 \pm 0,1	186 \pm 25
Presunto	150,0 \pm 0,2	149 \pm 11
Água de rio – Ponto A	2,8 \pm 0,2	<LD
Água de rio – Ponto B	8,3 \pm 0,1	8 \pm 1

Para verificar se houve diferença significativa, entre os resultados obtidos pela metodologia de análise proposta e metodologia de referência foi realizado o teste estatístico *t-student*, com 95% de certeza e obteve um *t*-calculado igual a 0,62 sendo que o *t*-crítico é igual a 2,57. Com os resultados obtidos é possível afirmar com 95% de certeza que não existe diferença significativa entre os dois resultados.

Conforme apresentado na Tabela 2, os valores encontrados com uso dos μ PADs foram similares com os dados obtidos com a técnica de referência. No entanto, mesmo não tendo validado o método proposto, pode-se concluir que os dispositivos propostos nesse trabalho apresentam elevado potencial para análises semi-quantitativa. O monitoramento de nitrito em amostras clínicas é de extrema importância. Além do exemplo apresentado, o nitrito pode ser um indicativo de infecção bacteriana em amostras de urina. No meio ambiente, o nitrito também apresenta sua importância em amostras de água e solo, o qual faz parte do processo relacionado ao ciclo do nitrogênio.

A vantagem do uso dos μ PADs em relação as técnicas convencionais de análise (por exemplo a espectrofotometria) para a detecção de analitos de interesse ambiental é que a análise pode ser conduzida em campo, em seguida da coleta da amostra. As amostras ambientais podem sofrer alterações químicas e biológicas se sua coleta, armazenamento e transporte não forem efetuados de forma correta, gerando resultados que não condiz com concentrações da amostra em seu equilíbrio no meio ambiente. Um exemplo dessas alterações pode ser que, após uma coleta um micro-organismo continue oxidando um composto gerando uma maior concentração deste composto oxidado, quando esta amostra for analisada posteriormente em laboratório dará uma concentração acima, da concentração real da amostra no meio ambiente.

4.2. Uso da cola escolar

4.2.1. Cola Branca ou Cola escolar

A cola branca é constituída de uma emulsão de acetato de poli(vinila) em água. Compostos com grupamento ésteres como o acetato de poli(vinila)

podem sofrer hidrólise em meio fortemente ácido ou alcalino. O produto da reação de hidrólise é o álcool de poli(vinila), que apresenta alta solubilidade em água (ARANHA e LUCAS, 2001).

A cola branca, após o tempo de cura recomendado pelo fabricante, apresenta caráter hidrofóbico devido a etapa de polimerização. Mesmo assim, é possível observar que a solubilização da cola em soluções aquosas em curtos intervalos de tempo (30-45 min). A emulsão de acetato de poli(vinila) em água sem adição de aditivos polimeriza em um tipo de polimerização chamada de linear. Quando se adiciona um aditivo a base de bicromato® ou um diazo® e expõem a radiação UV/Vis a uma polimerização cruzada. Na polimerização cruzada, estes aditivos reagem nos grupos reativos do polímero e se ligam entre dois monômeros ou mais monômeros assim formando interação (quando se formam complexos) e ligações (quando a ligações covalentes entre os monômeros) (GRIMM, HILKE e SCHARRER, 1983). Quando o acetato de polivinila é polimerizado usando aditivos e radiação UV/visível para promover ligações cruzadas observa-se que torna-se totalmente insolúvel em meio neutro ou em acidez e basicidade branda.

4.2.1. Escolha da cola e processo de jateamento

A emulsão de acetato de polivinila em água (cola branca ou cola escolar) é uma solução atóxica, com propriedades elastômeras e um custo baixo (de aproximadamente R\$ 15,00 por kilograma) (MESQUITA, 2002). A cola branca pode ser encontrada em qualquer região no mundo. A metodologia desenvolvida apresenta uma grande facilidade para ser adaptada em escala industrial, pois os equipamentos necessários apresentam um baixo custo de aquisição mesmo em modelos industriais, com baixo custo de manutenção; outra vantagem desta metodologia é que o processo exige um baixo gasto energético para a sua execução.

Pelo motivo apresentado acima há a necessidade de adicionar um aditivo à solução de cola para realizarmos em vez de uma polimerização com ligações linear, realizarmos uma polimerização com ligações cruzadas. A ligação cruzada dará uma maior característica hidrofóbica ao material

após sua etapa de cura (polimerização). O aditivo escolhido foi os sensibilizantes serigráficos podendo ser o bicromato para ser sensibilizado com radiação visível ou o diazo para ser sensibilizado com radiação ultravioleta com comprimento de onda entre 400-350 nm (comprimento de onda informado pelo fabricante).

Esta metodologia de fabricação de μ PADs se torna ecologicamente correta quando se utiliza o sensibilizante serigráfico a base de Diazo (denominação a um sensibilizante serigráfico a base de diazo). Esse sensibilizante quando exposto à radiação ultravioleta de comprimento de onda entre 400-350 nm provoca a fotopolimerização do acetato de polivinila de forma cruzada.

Os sensibilizantes apresentam custo relativamente barato. Levando-se em consideração o custo-benefício oferecido na efetividade das barreiras hidrofóbicas, um frasco de Bicromato para sensibilizar 1 kg de cola comercial custa aproximadamente R\$ 5,00 e um frasco do Diazo para sensibilizar 1 kg de cola comercial custa aproximadamente R\$ 12,00.

Entretanto a barreira formada com cola branca e sensibilizante bicromato mesmo depois de curada não oferece uma barreira tão efetiva quando se trabalha com soluções extremamente ácidas e básicas. Nos testes realizados, observou-se uma perda da sua efetividade provocada provavelmente por uma polimerização incompleta do acetato de poli(vinila). O estudo para a verificação de uma efetiva barreira hidrofóbica em condições extremamente ácida e básica com o uso do diazo como sensibilizante não foi realizado por falta de tempo, mas é um estudo que será realizado em breve.

O custo final dos dispositivos fabricados com o jateamento de cola branca e sensibilizante serigráfico: é de R\$ 0,07 para o dispositivo com a geometria de para oito análise simultânea e R\$ 0,03 para geometria de T.

4.2.2. Caracterização morfológica

Para avaliar a reprodutibilidade dos dispositivos confeccionados pela técnica de jateamento de solução de cola, foram fabricados 25 μ PADs com a máscara contendo um canal microfluídico de 4 mm. A largura do canal foi

medido nos 25 μ PADs independentes e obteve-se um valor médio de $3,5 \pm 0,2$ mm.

A resolução mínima obtida foi com a máscara de 1 mm como mostrada na **Figura 27**, mas o fator limitante desta resolução é a cortadora a laser que ao cortar a manta magnética, ela provoca um aquecimento na região das bordas da máscara. Conseqüentemente, a máscara com canais de 1 mm é deformada pelo aquecimento do polímero durante o processo de corte e após o resfriamento a máscara fica empenada. Também quando se realizou a tentativa de corte com dimensões menores de 1 mm ao retirar a máscara da manta magnética a máscara quebrava, pois perdia toda resistência mecânica durante o corte provocada pelo processo de aquecimento e resfriamento. Uma alternativa para conseguir dimensões menores de canais é o uso de uma impressora de corte modelo silhouette®.

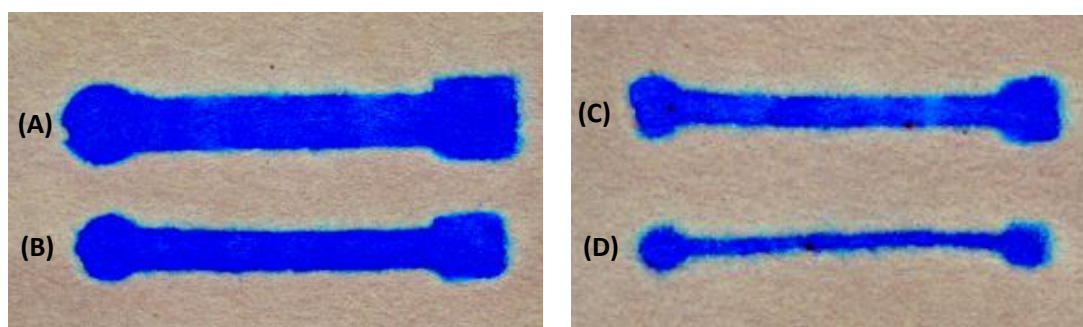


Figura 27. Imagens ópticas de dispositivos fabricados com máscaras de diferentes larguras de canais, (A) 4 mm (B) 3 mm (C) 2 mm e (D) 1 mm.

A **Figura 28** mostra em (A) uma região da fibra de um papel nativo, ou seja, região protegida pela máscara durante o processo de jateamento; (B) uma região onde houve o jateamento de cola, para formação de uma região hidrofóbica, para possibilitar a criação de barreiras hidrofóbicas para formar caminhos para guiar a solução; (C) a interface entre o canal microfluídico (à esquerda) e barreira hidrofóbica (a direita); (D) a efetividade da barreira hidrofóbica (o canal microfluídico foi preenchido com um corante azul).

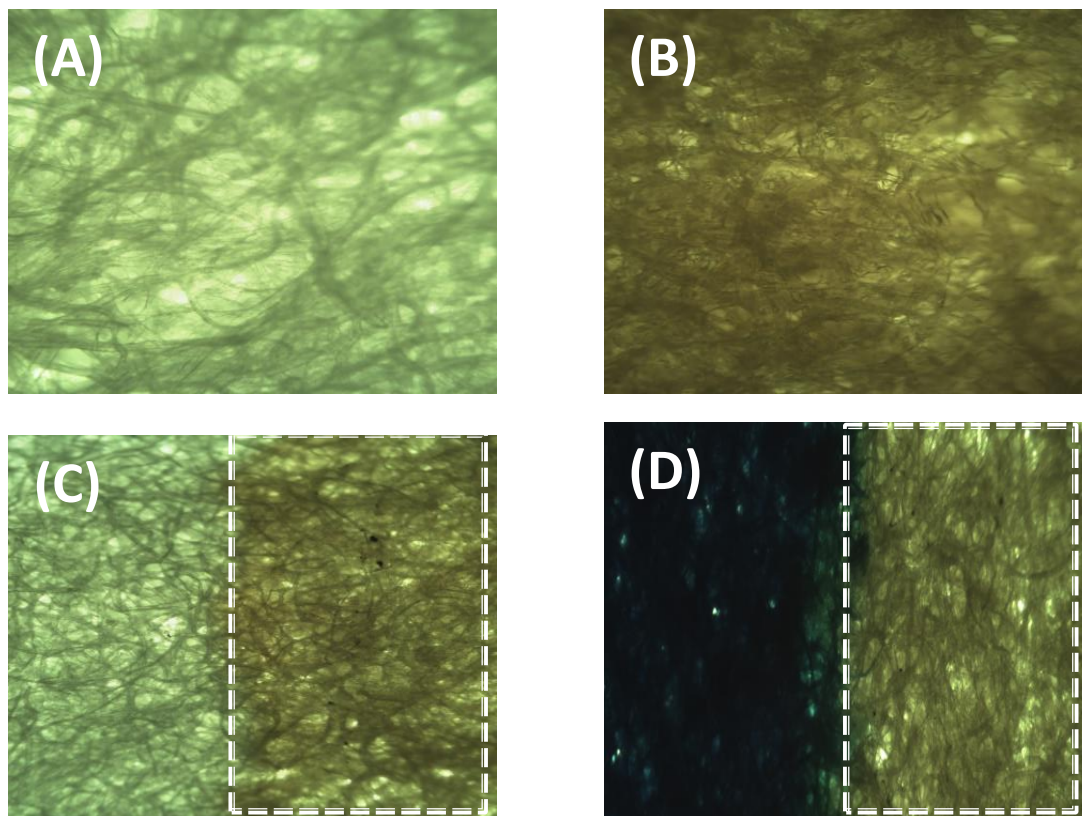


Figura 28. Imagem de microscopia óptica (A) fibras do papel nativo, (B) das fibras do papel com cola e sensibilizante, (C) de uma região de interface entre um canal microfluídico e a barreira hidrofóbica de cola com sensibilizante e (D) de uma região de interface entre um canal microfluídico e a barreira hidrofóbica de cola com sensibilizante e com o canal hidrofílico preenchido com solução aquosa de azul de metileno (corante azul).

Como observado na Figura 28 a barreira hidrofóbica de cola mostrou-se efetiva para delimitar caminhos microfluídicos para soluções aquosa, pois a solução aquosa não penetrou a barreira hidrofóbica.

4.3. Ensaios Clínicos multiplexados

A geometria com oito zonas de análise apresenta uma grande potencialidade para a realização da urinálise, pois a urina é um fluido biológico que sua coleta é realizada de forma não invasiva. A urina é um fluido que não necessita de pré-tratamento da amostra para sua análise. Através do laudo de uma urinálise, o médico em um pronto socorro já pode conduzir melhor o tratamento para o paciente. Outra aplicação deste tipo de exame acompanhamento das concentrações de algum analito para monitoramento durante um tratamento médico (BURTIS, ASHWOOD e

BRUNS, 2008; MCPHERSON e PINCUS, 2011). A Figura 29 ilustra um teste preliminar apresentando oito ensaios simultâneos para análise de espécies clinicamente relevantes e presentes na urina, o volume utilizado de amostra utilizado para realizar a urinálise foi de apenas 150 μ L. Neste estudo, foi realizado ensaio para glicose, ácido úrico, albumina, nitrito, ureia, bilirrubina, corpos cetônicos e pH. As colorações dos reagentes cromógenos nas zonas de detecção antes da adição da amostra foram: incolor (glicose), incolor (ácido úrico), amarelo gema (albumina), incolor (nitrito), incolor (ureia), incolor (corpos cetônicos) e vermelho-alaranjado (pH).

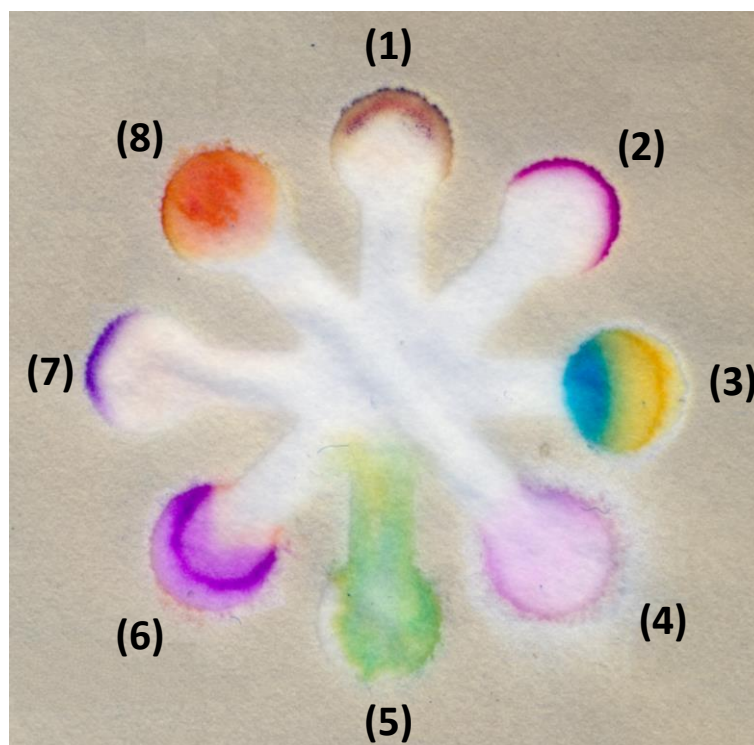


Figura 29. A imagem mostra um ensaio multiplexado para uma urinálise em um μ PADs fabricado pela técnica de jateamento de cola com sensibilizante, com fluxo lateral para o transporte da amostra, os analitos analisados foram: (1) glicose, (2) ácido úrico, (3) albumina, (4) nitrito, (5) ureia, (6) bilirrubina, (7) corpos cetônicos e (8) pH.

A bilirrubina geralmente é derivada da porção heme da hemoglobina, quando a hemoglobina velha é degradada pelo organismo forma a bilirrubina. Todas as frações da bilirrubina a direta (hidrossolúvel) e indireta (hidro insolúvel), não são excretadas pela urina. Quando os rins começam a

excretar a bilirrubina, através da urina é um indicativo que a concentração de bilirrubina na corrente sanguínea se encontra em níveis e elevados. Quando a bilirrubina se encontra com níveis elevados é um marcador de que pode estar sendo uma obstrução das vias biliares ou lesão de hepatócitos. No caso de uma obstrução das vias biliares é necessário uma intervenção cirúrgica com urgência para a desobstrução das vias (BURTIS, ASHWOOD e BRUNS, 2008).

Os corpos cetônicos (acetona, ácido hidroxibutírico e ácido acetoacético) são produtos de metabolismo incompleto de lipídeos. Quando o organismo começa a consumir lipídeos como fonte de energia em vez de carboidratos, os corpos cetônicos são encontrados na urina como marcador desta disfunção. Os lipídeos são consumidos nas seguintes ocasiões: como a diabetes *mellitus* não controlada, jejum prolongado e raras doenças metabólicas hereditárias (BURTIS, ASHWOOD e BRUNS, 2008; MCPHERSON e PINCUS, 2011).

A ureia é o principal produto final do metabolismo proteico. Os rins tem a função de eliminar o excesso de ureia da corrente sanguínea no processo de filtração, se o paciente começa apresentar quantidades inferiores de ureia na urina pode ser um indicativo de que o paciente esta com problemas de insuficiência renal (BURTIS, ASHWOOD e BRUNS, 2008).

O pH normal da urina é aproximadamente 6,0. Alteração de pH para valores acima de 6,0 ou urina básica pode indicar duas possíveis alterações, sendo a primeira uma infecção urinária onde as bactérias estão convertendo ureia em amônia, ou presença de alguns cristais como de fosfatos e carbonatos de cálcio. Outro teste que pode ser usado para complementar a suspeita de infecção é o teste para nitrito. Alteração de pH para valores abaixo de 6,0 pode indicar a presença de cristais como por exemplo o oxalato de cálcio e ácido úrico (BURTIS, ASHWOOD e BRUNS, 2008; MCPHERSON e PINCUS, 2011).

O ácido úrico é o produto de degradação da purina no organismo humano, a purina é um tipo de proteínas contido em alguns alimentos. O ácido úrico é facilmente eliminado pela a urina, mas se houver algum

problema renal os rins podem começar não excretar o ácido úrico. O ácido úrico em concentrações acima do normal começa a precipitar, principalmente nas articulações dos membros do corpo na forma de cristais, dando origem a “gota”. A gota provocar dores nas articulações e até processos inflamatórios. Outro problema que podem ser acarretados por altas concentrações de ácido úrico no sangue são a formação de cálculos renais e um aumento no risco de acidentes cardiovasculares(BURTIS, ASHWOOD e BRUNS, 2008).

A detecção de nitrito na urina se faz importante, pois várias bactérias que provocam infecção urinária convertem nitrato em nitrito. O nitrato é um composto presente na urina de todos os seres humanos. Mas o teste de nitrito não é teste conclusivo, este teste é apenas para uma triagem rápida do paciente para um diagnóstico conclusivo de infecção urinaria se faz necessária a urocultura, que é um ensaio mais demorado. Mas com o ensaio de nitrito positivo e alguns exames de sangue rápido, já é possível constatar uma infecção na urina e começar um tratamento, enquanto a urocultura não aponta especificamente a bactéria que está provocando a infecção e qual o estado da infecção(MCPHERSON e PINCUS, 2011).

A albumina é uma proteína produzida pelo fígado e é responsável pela circulação nos vasos sem que haja a formação de edemas, os rins são responsáveis em filtrar e devolver a corrente sanguínea, o sangue sem excretar a albumina. Se for detectada albumina requer uma investigação profunda, pois indica uma alteração no sistema renal(BURTIS, ASHWOOD e BRUNS, 2008; MCPHERSON e PINCUS, 2011).

A glicose é a principal fonte de energia do nosso organismo. A glicose está presente no sangue para distribuída aos tecidos. A presença de glicose na urina tem dois significados; o primeiro é que se os rins estiverem com alguma alteração ele começará excretar a glicose na urina durante o processo de filtração do sangue ou o segundo caso é se o níveis de glicose estiverem muito altos no sangue, com valores acima de 180 mg/dL, sugerindo algum tipo do diabetes *mellitus*(BURTIS, ASHWOOD e BRUNS, 2008; MCPHERSON e PINCUS, 2011).

4.4. Diagnóstico de Pancreatite – Ensaios Preliminares

A pancreatite é uma doença onde há uma disfunção no pâncreas, gerando uma disfunção das enzimas produzidas pelo pâncreas para a digestão dos alimentos. Quando ocorre esta disfunção no pâncreas estas enzimas (amilase e lipase) têm suas concentrações na corrente sanguínea aumentada. A amilase e a lipase são enzimas produzidas no pâncreas para realizar a digestão de amido e glicogênio no intestino delgado. Estas enzimas são utilizadas como marcadores para o diagnóstico de pancreatite. A presença de ambas em altas concentrações na corrente sanguínea indica que está ocorrendo alguma disfunção no pâncreas, como por exemplo, uma inflamação (BURTIS, ASHWOOD e BRUNS, 2008; MCPHERSON e PINCUS, 2011). Se a pancreatite não for diagnosticada rapidamente, ela pode evoluir para um câncer de pâncreas, sendo este um dos mais letais tipos de câncer (FRANCIS *et al.*, 2013). A Figura 30 ilustra um ensaio para diagnóstico de pancreatite utilizando-se o fluxo vertical para o transporte da amostra. Neste caso necessita de um pré-tratamento da amostra que consiste em separar o soro do sangue bruto.

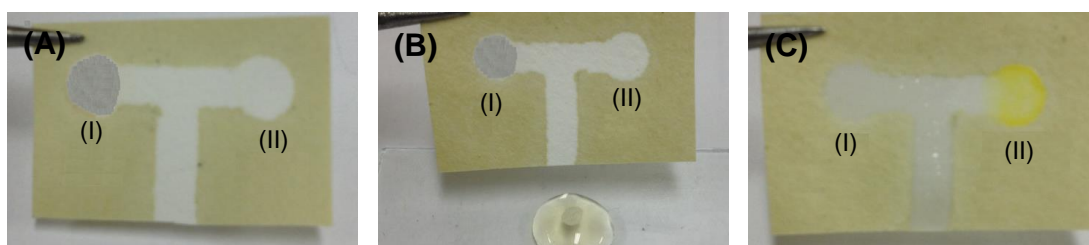


Figura 30. A imagem mostra um dispositivo fabricado pela técnica de jateamento de cola com sensibilizante, com fluxo vertical para o transporte da amostra, os analitos analisados foram (I) amilase e (II) lipase. Imagens com as etapas da análise são (A) o μ PADs com os reagentes cromógenos específicos nas zonas de detecção, (B) aplicação da amostra por fluxo vertical e (C) o μ PADs após 15 minutos de injeção da amostra.

Vale ressaltar que todos os ensaios que foram realizados nos dispositivos de papel com barreiras de cola com sensibilizante foram realizados com analitos na faixa clínica, mas de forma qualitativa. Estudos mais aprofundados estão sendo viabilizada por outros pesquisadores do grupo de pesquisa.

5. Conclusões

A partir dos dados apresentados, pode-se concluir que os métodos de fabricações propostos neste trabalho apresentam elevada potencialidade para a área da microfluídica, em especial, para a produção de μ PADs direcionados para aplicações analíticas sem instrumentação sofisticada. Quando comparado aos métodos já descritos na literatura, o uso do carimbo apresentou simplicidade, robustez, baixo custo, alta resistência mecânica e baixa reatividade química. Mesmo sendo um processo artesanal (até o momento), a reprodutibilidade entre os dispositivos fabricados se mostrou satisfatório, pois o desvio padrão relativo entre a largura dos canais de 50 diferentes dispositivos foi $<4\%$. O uso do carimbo de um mesmo carimbo já permitiu a fabricação de uma quantidade de protótipos superior a 10.000 unidades.

Em termos de aplicações, pode-se afirmar que há um campo infinito para ser explorado. Nesse trabalho, mostraram-se aplicações em amostras biológicas, de alimentos e ambiental; através da quantificação da concentração nitrito. O limite de detecção para a análise de nitrito nos μ PADs sem a etapa de pré-concentração foi de $11,3 \mu\text{M}$ e com a etapa de pré-concentração foi de $5,6 \mu\text{M}$. Mesmo usando um método de detecção baseado na captura de imagens digitais, o erro obtido em comparação com uma técnica de referência (espectrofotometria) e pela aplicação dos testes estatísticos não houve diferença estatística entre os resultados da técnica convencional e proposta.

O método de fabricação com o jateamento de cola com sensibilizante serigráfico demonstrou ser uma técnica simples, fácil, de baixo custo e com fácil adaptação para a produção industrial, apresentou uma boa reprodutibilidade das larguras dos canais fabricados. Uma grande vantagem deste dispositivo foi a versatilidade para a realização de várias geometrias possibilitando a realização de ensaio qualitativo como urinálise e pancreatites. Utilizando a geometria com oito zonas de detecção foi realizada a urinálise com análise dos seguintes analitos através do fluxo lateral: glicose, ácido úrico, albumina, nitrito, ureia, corpos cetônicos,

bilirrubina e pH. A geometria de **T** foi utilizada para ensaios para diagnosticar pancreatite os analitos foram amilase e lipase.

Estas técnicas de fabricação de μ PADs apresentadas se mostraram bastante atrativas para ser implementadas em laboratórios que possuem recurso limitados tanto para infra-estrutura, como também para material de consumo. A instrumentação necessária para a implementação destas duas técnicas de fabricação exige investimento mínimo, além de não requerer materiais de consumo com preço elevado quando comparado com técnicas convencionais.

Além da possibilidade de implementação em laboratórios com recursos limitados, estes métodos de fabricação também pode ser facilmente adaptados para ser implementados em escala industrial.

Cada um dos dispositivos apresentados possui uma vantagem em relação ao outro. Os μ PADs fabricados com a barreira de parafina tem a vantagem deste material ser mais inerte em relação a ataque por soluções químicas quando comparado com os chips fabricado com barreiras de cola branca, mas este chip possui uma menor resistência mecânica, pois se houver mal uso ou estocagem a barreira de parafina pode ser quebrada provocando vazamento de soluções dos canais microfluídicos. Entretanto os chips fabricados com barreiras de cola branca possui uma menor resistência a soluções químicas quando comparado com a parafina, mas possui uma maior resistência mecânica ao ser movimentado, sem o risco da barreira de cola branca quebrar.

6. Perspectivas Futuras

As próximas etapas deste trabalho estarão divididas em duas vertentes: uma estará ligada à otimização do processo de fabricação dos dispositivos com cola escolar e outra às aplicações dos dispositivos fabricados pelos dois métodos de fabricação.

6.1 Otimização do processo de fabricação pelo método de jateamento.

A próxima etapa de fabricação dos dispositivos pelo método de jateamento de cola será a troca do sensibilizante a base de bicromato para a base de sal diazo. Apesar do bicromato em solução de acetato de poli(vinila) exposto a luz não represente risco a saúde (pois o crômio está com número de oxidação 3+), o seu manuseio antes de exposição a dever ser procedida com cuidado, pois é uma substância tóxica (pois o crômio está com número de oxidação 6+). Neste processo deverá ser otimizado o tipo de lâmpada mais adequado e o tempo de exposição. Outro fator que deve ser melhorado é a efetividade da barreira hidrofóbica para soluções com pH extremos.

6.2 Aplicações dos dispositivos.

Uma das etapas será desenvolvimento de métodos para realização de análise de diversos analitos, nas diversas áreas como diagnósticos clínicos, alimentos, ambientais e forenses. Outra etapa será a realização dos ensaios quantitativos dos analitos para urinálise, pancreatites e distúrbios lipídicos. Subsequentemente, uma das etapas primordiais, será a validação dos dispositivos em parceria com LACES-UFG (Laboratório de Análise Clínica e Ensino de Saúde da Universidade Federal de Goiás).

Atualmente, já se encontra em andamento o estudo de criação de barreiras hidrofóbicas com uso da técnica de carimbagem, para aplicar em análises quantitativas utilizando o paper-spray e espectrometria massa, em parceria com o professor Boniek Gontijo Vaz do Instituto de Química da UFG. Os dispositivos já se encontram em uso para desenvolvimento de métodos de imobilização de enzima, para melhorar a uniformidade de color nas zonas de detecção (evitar o efeito de lavagem), estão sendo estudadas várias estratégias como o uso de modificação química do papel, uso de nano-materiais e bio-materiais.

Anexos

As figuras abaixo apresentam os esquemas reacionais dos ensaios colorimétricos realizados nos dispositivos de papel.

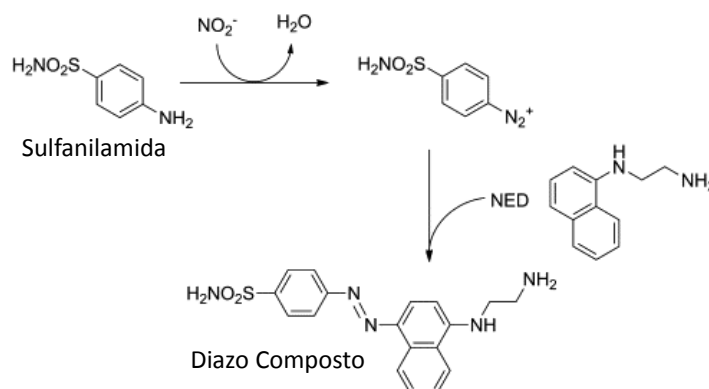


Figura A- 1. Esquema reacional para detecção de nitrito. Figura adaptada de (BHAKTA *et al.*, 2014) com permissão. Copyright (2014) com permissão Elsevier.

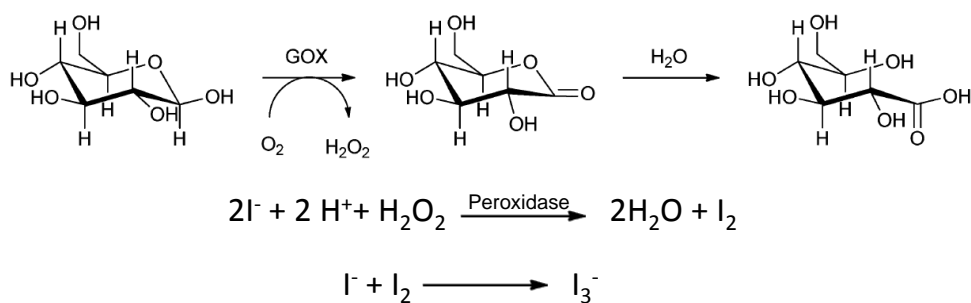


Figura A- 2. Esquema reacional para detecção de glicose. Figura adaptada de (FRANSSEN *et al.*, 2013) com permissão da The Royal Society of Chemistry.

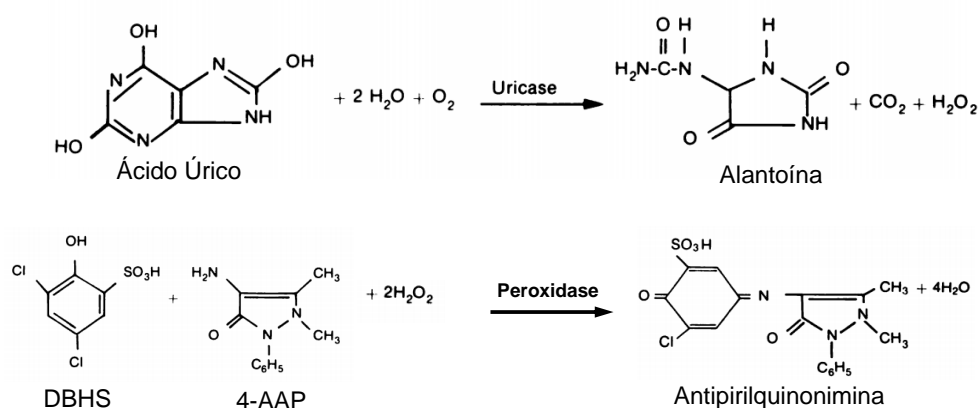


Figura A- 3. Esquema reacional para a detecção de ácido úrico. Figura adaptada (FOSSATI, PRENCIPE e BERTI, 1980) com permissão. Copyright (1980) com permissão da American Association for Clinical Chemistry.

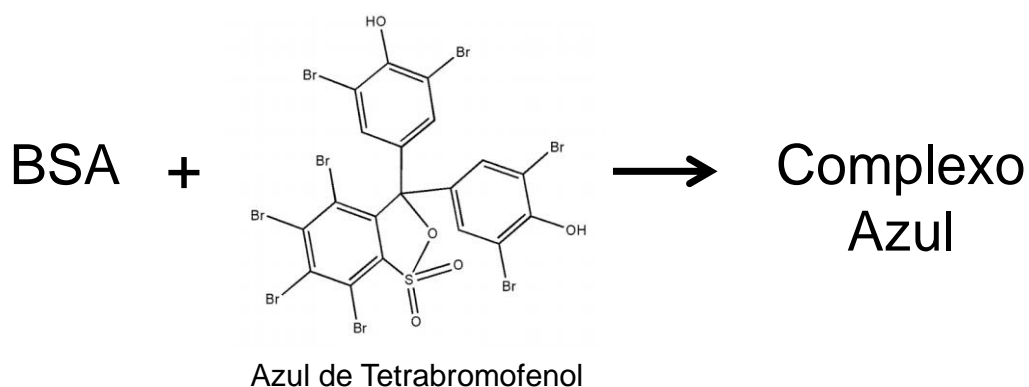


Figura A- 4. Esquema reacional para a detecção de albumina.

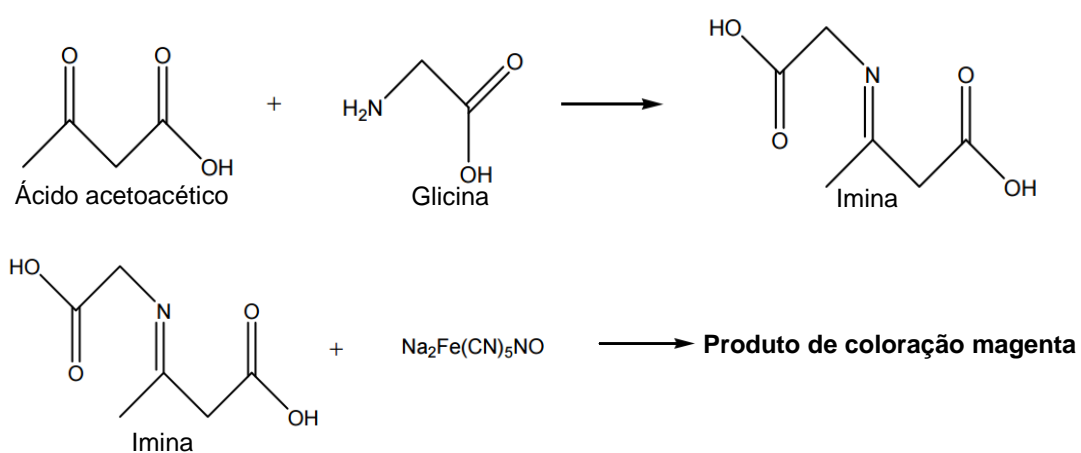


Figura A- 5. Esquema reacional para a detecção dos corpos cetônicos. Figura adaptada (KLASNER *et al.*, 2010) com permissão da Springer Science and Business Media.

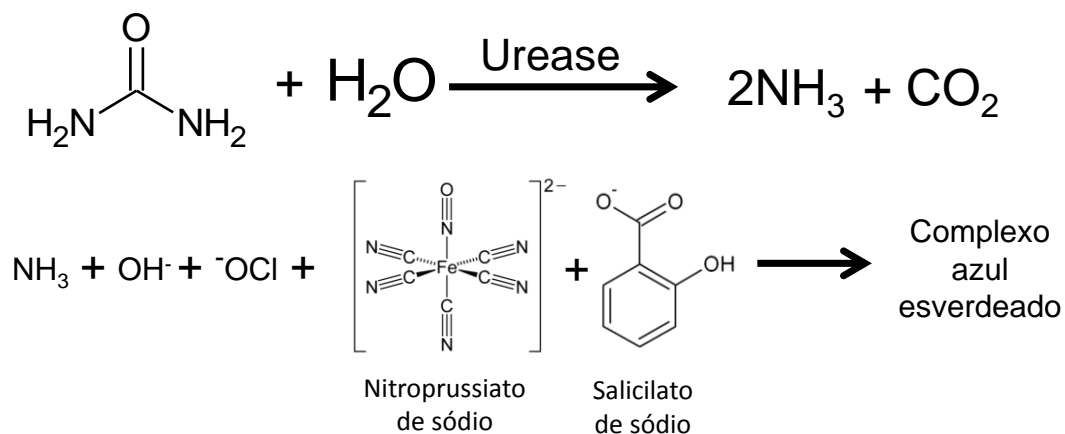


Figura A- 6. Esquema reacional da detecção de ureia.

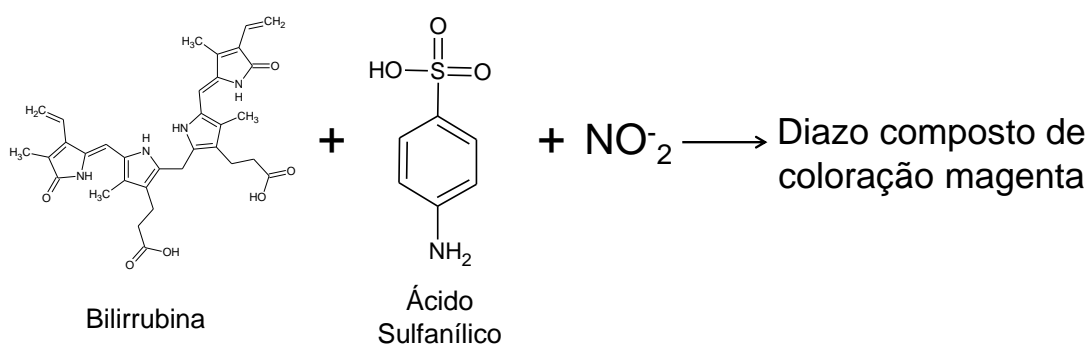


Figura A- 7. Esquema reacional da detecção de bilirrubina.

Solução de amido + KI + $\text{I}_2 \longrightarrow$ Formação de um composto cinza-azulado solúvel

Composto cinza-azulado + Amilase \longrightarrow Descoloração do composto cinza-azulado

Figura A- 8. Esquema reacional da detecção de amilase.

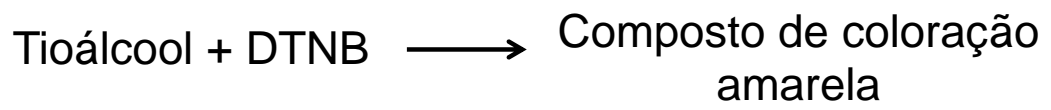


Figura A- 9. Esquema reacional da detecção de Lipase.

7. Referências

ABE, K.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 6928-6934, 2008.

AMBIENTE, C. N. D. M. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento**. BRASIL, C.-. Brasília -Brasil 2005.

ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F. Poli(Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo. *Polímeros*, v. 11, p. 174-181, 2001.

ARORA, A.; SIMONE, G.; SALIEB-BEUGELAAR, G. B.; KIM, J. T.; MANZ, A. Latest Developments in Micro Total Analysis Systems. *Analytical Chemistry*, v. 82, 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, p. 2637-2652, 2002.

BECKER, H.; LOCASCIO, L. E. Polymer microfluidic devices. *Talanta*, v. 56, p. 267-287, 2002.

BHAKTA, S. A.; BORBA, R.; TABA JR, M.; GARCIA, C. D.; CARRILHO, E. Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices. *Analytica Chimica Acta*, v. 809, p. 117-122, 2014.

BLICHARZ, T. M.; RISSIN, D. M.; BOWDEN, M.; HAYMAN, R. B.; DICESARE, C.; BHATIA, J. S.; GRAND-PIERRE, N.; SIQUEIRA, W. L.; HELMERHORST, E. J.; LOSCALZO, J.; OPPENHEIM, F. G.; WALT, D. R. Use of colorimetric test strips for monitoring the effect of hemodialysis on salivary nitrite and uric acid in patients with end-stage renal disease: a proof of principle. *Clin Chem*, v. 54, p. 1473-80, 2008.

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

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. *Tietz: Fundamentals of clinical chemistry*, 6, Philadelphia: Elsevier Saunders 2008.

BYRNES, S.; THIESSEN, G.; FU, E. Progress in the development of paper-based diagnostics for low-resource point-of-care settings. *Bioanalysis*, v. 5, p. 2821-2836, 2013.

CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*, v. 81, p. 7091-7095, 2009.

CARRILHO, E.; PHILLIPS, S. T.; VELLA, S. J.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Paper Microzone Plates. *Analytical Chemistry*, v. 81, p. 5990-5998, 2009.

CATE, D. M.; ADKINS, J. A.; METTAKOONPITAK, J.; HENRY, C. S. Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. *Analytical Chemistry*, 2014.

CHIN, C. D.; LINDER, V.; SIA, S. K. Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, v. 12, p. 2118-2134, 2012.

CHITNIS, G.; DING, Z. W.; CHANG, C. L.; SAVRAN, C. A.; ZIAIE, B. Laser-treated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform. *Lab on a Chip*, v. 11, p. 1161-1165, 2011.

COLTRO, W. K. T.; CHENG, C. M.; CARRILHO, E.; DE JESUS, D. P. Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications. *Electrophoresis*, v. 35, p. 2309-2324, 2014.

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, p. 2487-2498, 2010.

CULBERTSON, C. T.; MICKLEBURGH, T. G.; STEWART-JAMES, S. A.; SELLENS, K. A.; PRESSNALL, M. Micro total analysis systems: fundamental advances and biological applications. *Analytical Chemistry*, v. 86, p. 95-118, 2014.

CURTO, V. F.; LOPEZ-RUIZ, N.; CAPITAN-VALLVEY, L. F.; PALMA, A. J.; BENITO-LOPEZ, F.; DIAMOND, D. Fast prototyping of paper-based microfluidic devices by contact stamping using indelible ink. *Rsc Advances*, v. 3, p. 18811-18816, 2013.

DE ARAUJO, W. R.; PAIXAO, T. R. L. C. Fabrication of disposable electrochemical devices using silver ink and office paper. *Analyst*, v. 139, p. 2742-2747, 2014.

DELANEY, J. L.; HOGAN, C. F.; TIAN, J. F.; SHEN, W. Electrogenerated Chemiluminescence Detection in Paper-Based Microfluidic Sensors. *Analytical Chemistry*, v. 83, p. 1300-1306, 2011.

DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry*, v. 78, 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 films. *Analytical Chemistry*, v. 75, p. 3853-3858, 2003.

DORNELAS, K. L.; DOSSI, N.; PICCIN, E. A simple method for patterning poly(dimethylsiloxane) barriers in paper using contact-printing with low-cost rubber stamps. *Analytica Chimica Acta*, v. 858, p. 82-90, 2015.

DOSSI, N.; TONIOLO, R.; PIZZARIELLO, A.; CARRILHO, E.; PICCIN, E.; BATTISTON, S.; BONTEMPELLI, G. An electrochemical gas sensor based on paper supported room temperature ionic liquids. *Lab on a Chip*, v. 12, p. 153-158, 2012.

DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. *Analyst*, v. 136, p. 77-82, 2011.

EFFENHAUSER, C. S.; BRUIN, G. J. M.; PAULUS, A.; EHRAT, M. Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices: Analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips. *Analytical Chemistry*, v. 69, p. 3451-3457, 1997.

EFFENHAUSER, C. S.; MANZ, A.; WIDMER, H. M. Manipulation of Sample Fractions on a Capillary Electrophoresis Chip. *Analytical Chemistry*, v. 67, p. 2284-2287, 1995.

EVANS, E.; GABRIEL, E. F. M.; COLTRO, W. K. T.; GARCIA, C. D. Rational selection of substrates to improve color intensity and uniformity on microfluidic paper-based analytical devices. *Analyst*, v. 139, p. 2127-2132, 2014.

FIORINI, G. S.; JEFFRIES, G. D. M.; LIM, D. S. W.; KUYPER, C. L.; CHIU, D. T. Fabrication of thermoset polyester microfluidic devices and embossing masters using rapid prototyped polydimethylsiloxane molds. *Lab on a Chip*, v. 3, p. 158-163, 2003.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L.; BERTI, G. Use of 3,5-Dichloro-2-Hydroxybenzenesulfonic Acid-4-Aminophenazone Chromogenic System in Direct Enzymic Assay of Uric-Acid in Serum and Urine. *Clin Chem*, v. 26, p. 227-231, 1980.

FRANCIS, T.; GRAF, A.; HODGES, K.; KENNEDY, L.; HARGROVE, L.; PRICE, M.; KEARNEY, K.; FRANCIS, H. Histamine regulation of pancreatitis and pancreatic cancer: a review of recent findings. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, v. 2, p. 216-226, 2013.

FRANSSEN, M. C.; STEUNENBERG, P.; SCOTT, E. L.; ZUILHOF, H.; SANDERS, J. P. Immobilised enzymes in biorenewables production. *Chem Soc Rev*, v. 42, p. 6491-533, 2013.

FU, E.; LUTZ, B.; KAUFFMAN, P.; YAGER, P. Controlled reagent transport in disposable 2D paper networks. *Lab on a Chip*, v. 10, p. 918-920, 2010.

GABRIEL, E. F. M.; DO LAGO, C. L.; GOBBI, A. L.; CARRILHO, E.; COLTRO, W. K. T. Characterization of microchip electrophoresis devices fabricated by direct-printing process with colored toner. *Electrophoresis*, v. 34, p. 2169-2176, 2013.

GARCIA, P. T.; CARDOSO, T. M. G.; GARCIA, C. D.; CARRILHO, E.; COLTRO, W. K. T. A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays. *Rsc Advances*, v. 4, p. 37637-37644, 2014.

GRAYSON, D. H.; TUIITE, M. R. J. Knoevenagel reactions with [small beta]-oxo acids. Regiospecific enol equivalents for syntheses of [small alpha],[small beta]-unsaturated ketones and of some [small beta]-ketols. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, p. 2137-2142, 1986.

GRIFFITHS, G. S. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, v. 31, p. 32-42, 2003.

GRIMM, L.; HILKE, K. J.; SCHARRER, E. The Mechanism of the Cross Linking of Poly(Vinyl Alcohol) by Ammonium Dichromate with U.V.-Light. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 130, p. 1767-1771, 1983.

GRZYBOWSKI, B. A.; HAAG, R.; BOWDEN, N.; WHITESIDES, G. M. Generation of micrometer-sized patterns for microanalytical applications using a laser direct-write method and microcontact printing. *Analytical Chemistry*, v. 70, p. 4645-4652, 1998.

HARRISON, D. J.; FLURI, K.; SEILER, K.; FAN, Z. H.; EFFENHAUSER, C. S.; MANZ, A. Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical-Analysis System on a Chip. *Science*, v. 261, p. 895-897, 1993.

História do papel. <http://www.bracelpa.org.br/bra2/?q=node/170>, Acesso em: 17/03/2014.

HU, J.; WANG, S.; WANG, L.; LI, F.; PINGGUAN-MURPHY, B.; LU, T. J.; XU, F. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 54, p. 585-97, 2014.

JOKERST, J. C.; ADKINS, J. A.; BISHA, B.; MENTELE, M. M.; GOODRIDGE, L. D.; HENRY, C. S. Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of select foodborne pathogens. *Analytical Chemistry*, v. 84, p. 2900-7, 2012.

KAMEOKA, J.; CRAIGHEAD, H. G.; ZHANG, H. W.; HENION, J. A polymeric microfluidic chip for CE/MS determination of small molecules. *Analytical Chemistry*, v. 73, p. 1935-1941, 2001.

KENISARIN, M. M. Thermophysical properties of some organic phase change materials for latent heat storage. A review. *Solar Energy*, v. 107, p. 553-575, 2014.

KIM, E.; XIA, Y. N.; WHITESIDES, G. M. Polymer Microstructures Formed by Molding in Capillaries. *Nature*, v. 376, p. 581-584, 1995.

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

KOVARIK, M. L.; GACH, P. C.; ORNOFF, D. M.; WANG, Y.; BALOWSKI, J.; FARRAG, L.; ALLBRITTON, N. L. Micro Total Analysis Systems for Cell Biology and Biochemical Assays. *Analytical Chemistry*, v. 84, p. 516-540, 2011.

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: fundamental advances and applications in the laboratory, clinic, and field. *Analytical Chemistry*, v. 85, p. 451-72, 2013.

LI, B.; FU, L.; ZHANG, W.; FENG, W.; CHEN, L. Portable paper-based device for quantitative colorimetric assays relying on light reflectance principle. *Electrophoresis*, v. 35, p. 1152-1159, 2014.

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

LI, X.; TIAN, J.; SHEN, W. Thread as a versatile material for low-cost microfluidic diagnostics. *ACS Appl Mater Interfaces*, v. 2, p. 1-6, 2010.

LI, X.; TIAN, J. F.; GARNIER, G.; SHEN, W. Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 76, p. 564-570, 2010.

LU, Y.; SHI, W. W.; JIANG, L.; QIN, J. H.; LIN, B. C. Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. *Electrophoresis*, v. 30, p. 1497-1500, 2009.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized Total Chemical-Analysis Systems - a Novel Concept for Chemical Sensing. *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 1, p. 244-248, 1990.

MARK, D.; HAEBERLE, S.; ROTH, G.; VON STETTEN, F.; ZENGERLE, R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews*, v. 39, p. 1153-1182, 2010.

MARTÍN, A.; VILELA, D.; ESCARPA, A. Food analysis on microchip electrophoresis: An updated review. *Electrophoresis*, v. 33, p. 2212-2227, 2012.

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, p. 1318-1320, 2007.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS, 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, p. 3699-3707, 2008.

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, p. 19606-19611, 2008.

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, p. 3-10, 2010.

MARTYNOVA, L.; LOCASCIO, L. E.; GAITAN, M.; KRAMER, G. W.; CHRISTENSEN, R. G.; MACCREHAN, W. A. Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. *Analytical Chemistry*, v. 69, p. 4783-4789, 1997.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 22, Philadelphia, Pennsylvania, USA: Saunders Elsevier, 2011.

MESQUITA, A. C. **Estudo da polimerização do acetato de vinila utilizando a radiação ionizante**. 2002. (Dissertação). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

METTERS, J. P.; HOUSSEIN, S. M.; KAMPOURIS, D. K.; BANKS, C. E. Paper-based electroanalytical sensing platforms. *Analytical Methods*, v. 5, p. 103-110, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **REGULAMENTO TÉCNICO DE ATRIBUIÇÃO DE ADITIVOS, E SEUS LIMITES DAS SEGUINTE CATEGORIAS DE ALIMENTOS 8: CARNE E PRODUTOS CÁRNEOS**. MAPA. Brasil 2007.

MULLER, R. H.; CLEGG, D. L. Automatic Paper Chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 21, p. 1123-1125, 1949.

NANTEL, A. J. CLOSTRIDIUM BOTULINUM. International Programme on Chemical Safety, 1999.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 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, p. 6331-5, 2012.

NIE, J. F.; LIANG, Y. Z.; ZHANG, Y.; LE, S. W.; LI, D. N.; ZHANG, S. B. One-step patterning of hollow microstructures in paper by laser cutting to create microfluidic analytical devices. *Analyst*, v. 138, p. 671-676, 2013.

NURAK, T.; PRAPHAIRAKSIT, N.; CHAILAPAKUL, O. Fabrication of paper-based devices by lacquer spraying method for the determination of nickel (II) ion in waste water. *Talanta*, v. 114, p. 291-6, 2013.

OGDEN, S.; KLINTBERG, L.; THORNELL, G.; HJORT, K.; BODÉN, R. Review on miniaturized paraffin phase change actuators, valves, and pumps. *Microfluidics and Nanofluidics*, v. 17, p. 53-71, 2014.

OLKKONEN, J.; LEHTINEN, K.; ERHO, T. Flexographically Printed Fluidic Structures in Paper. *Analytical Chemistry*, v. 82, p. 10246-10250, 2010.

OSBORN, J. L.; LUTZ, B.; FU, E.; KAUFFMAN, P.; STEVENS, D. Y.; YAGER, P. Microfluidics without pumps: reinventing the T-sensor and H-filter in paper networks. *Lab on a Chip*, v. 10, p. 2659-2665, 2010.

PARDI, M. C.; DOS SANTOS, I. C.; DE SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*, Editora UFG, 2007.

PICCIN, E.; COLTRO, W. K.; FRACASSI DA SILVA, J. A.; 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, p. 151-8, 2007.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. *Quimica Nova*, v. 29, p. 1114-1120, 2006.

RAYMOND, D. E.; MANZ, A.; WIDMER, H. M. Continuous separation of high molecular weight compounds using a microliter volume free-flow electrophoresis microstructure. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 2515-2522, 1996.

REYES, D. R.; IOSSFIDIS, D.; AUROUX, P. A.; MANZ, A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry*, v. 74, p. 2623-2636, 2002.

SACKMANN, E. K.; FULTON, A. L.; BEEBE, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, v. 507, p. 181-189, 2014.

SANTHIAGO, M.; NERY, E. W.; SANTOS, G. P.; KUBOTA, L. T. Microfluidic paper-based devices for bioanalytical applications. *Bioanalysis*, v. 6, p. 89-106, 2014.

SHADPOUR, H.; MUSYIMI, H.; CHEN, J. F.; SOPER, S. A. Physicochemical properties of various polymer substrates and their effects on microchip electrophoresis performance. *Journal of Chromatography A*, v. 1111, p. 238-251, 2006.

SONGJAROEN, T.; DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; LAIWATTANAPAISAL, W. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. *Talanta*, v. 85, p. 2587-2593, 2011.

SOUZA, F. R. D.; DUARTE JUNIOR, G. F.; GARCIA, P. D. T.; COLTRO, W. K. T. Avaliação de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. *Quimica Nova*, v. 37, p. 1171-1176, 2014.

SPICAR-MIHALIC, P.; TOLEY, B.; HOUGHTALING, J.; LIANG, T.; YAGER, P.; FU, E. CO₂ laser cutting and ablative etching for the fabrication of paper-based devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, v. 23, 2013.

VICKERS, J. A.; DRESSEN, B. M.; WESTON, M. C.; BOONSONG, K.; CHAILAPAKUL, O.; CROPEK, D. M.; HENRY, C. S. Thermoset polyester as an alternative material for microchip electrophoresis/electrochemistry. *Electrophoresis*, v. 28, p. 1123-9, 2007.

VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Recent developments. *Analytical Chemistry*, v. 76, p. 3373-3385, 2004.

VONHEEREN, F.; VERPOORTE, E.; MANZ, A.; THORMANN, W. Micellar electrokinetic chromatography separations and analyses of biological samples on a cyclic planar microstructure. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 2044-2053, 1996.

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

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

XIA, Y. N.; WHITESIDES, G. M. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science*, v. 28, p. 153-184, 1998.

XIAO, L.; LIU, X.; ZHONG, R.; ZHANG, K.; ZHANG, X.; ZHOU, X.; LIN, B.; DU, Y. A rapid, straightforward, and print house compatible mass fabrication method for integrating 3D paper-based microfluidics. *Electrophoresis*, v. 34, p. 3003-3007, 2013.

YAGODA, H. Applications of Confined Spot Tests in Analytical Chemistry. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, v. 9 p. 3, 1937.

ZHANG, A. L.; ZHA, Y. Fabrication of paper-based microfluidic device using printed circuit technology. *Aip Advances*, v. 2, 2012.

ZHANG, Y.; ZHOU, C.; NIE, J.; LE, S.; QIN, Q.; LIU, F.; LI, Y.; LI, J. Equipment-free quantitative measurement for microfluidic paper-based analytical devices fabricated using the principles of movable-type printing. *Analytical Chemistry*, v. 86, p. 2005-12, 2014.

ZHAO, X. M.; XIA, Y. N.; WHITESIDES, G. M. Fabrication of three-dimensional microstructures: Microtransfer molding. *Advanced Materials*, v. 8, p. 837-&, 1996.

8. Currículum Vitae

1. Informações Pessoais

Nome Completo: Thiago Miguel Garcia Cardoso.

Endereço eletrônico: tmgcgyn@gmail.com

Naturalidade: Goiânia- Goiás

Data de Nascimento: 01/11/1988

Filiação: Alberto Ferreira Cardoso

Lourença Garcia Cardoso

2. Formação Acadêmica

Bacharel em Química

Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil.

2007 – 2012

3. Produção Científica e Tecnológica

3.1. Processos ou técnicas

1. CARDOSO, T. M. G. ; GARCIA, P.T. ; SANTOS, J. B. C. ; COLTRO, W. K. T. **Método de fabricação de dispositivos analíticos em substratos de papel: deposição de barreiras hidrofóbicas de parafina a partir do processo de estampagem a quente e uso dos referidos dispositivos.** 2013, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020130175307, data de depósito: 09/07/2013.

3.2. Artigos publicados/Aceitos

1. CARDOSO, T.M.G.; GARCIA, P.T.; COLTRO, W.K.T. **Colorimetric determination of nitrite in clinical, food and environmental samples using microfluidic devices stamped in paper platforms.** Analytical Methods, DOI: 10.1039/c5ay00466g, 2015.

2. GARCIA, P.T.; CARDOSO, T.M.G.; GARCIA, C.D.; CARRILHO, E.; COLTRO, W.K.T. **A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays.** RSC Advances, v. 4, p. 37637-37644, 2014.

3. MESQUITA, N. A. S. ; CARDOSO, T. M. ; SOARES, M. H. F. B. **O projeto de educação instituído a partir de 1990: caminhos percorridos na formação de professores de química no brasil.** Química Nova (Impresso), v. 36, p. 195-200, 2013.

4. CAVALCANTI, E. L. D.; CARDOSO, T. M. G.; MESQUITA, N. A. S.; SOARES, M. H. F. B.. **Perfil químico: debatendo ludicamente o conhecimento científico em nível superior de ensino.** Revista Electrónica de Investigación en Educación en Ciencias (En línea), v. 7, p. 73-86, 2012.

3.2. Principais trabalhos apresentados em reuniões científicas

1. GARCIA, P.T.; CARDOSO, T.M.G.; COLTRO, W.K.T. **Ensaio bioanalítico em dispositivos de papel fabricados por estampagem a quente**. 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013.

2. CARDOSO, T.M.G.; GARCIA, P.T.; SANTOS, J.B.C.; COLTRO, W.K.T. **Fabricação de dispositivos analíticos em substratos de papel por estampagem a quente**. 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013.

3. GARCIA, P.T.; CARDOSO, T.M.G.; COLTRO, W.K.T. **Estampagem de dispositivos microfluídicos em substratos de papel: fabricação, caracterização e aplicações**. II Escola de Bioanalítica, 2013.

4. GARCIA, P.T.; CARDOSO, T.M.G.; SANTOS, J.B.C.; COLTRO, W.K.T. **Fabrication of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices by Stamping**. 3rd Annual Conference & Exhibition of Society for Laboratory Automation and Screening, 2014.

5. GARCIA, P.T.; CARDOSO, T.M.G.; GARCIA, C.D. ; CARRILHO, E. ; COLTRO, W.K.T. **Stamping of microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical diagnostics**. 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2014.

6. CARDOSO, T. M. G.; GARCIA, P. T.; GABRIEL, E. F. M. SOUZA, F. R.; ARAÚJO, M. O.; COLTRO, W. K. T.; **Stamping of paper-based microfluidic devices for clinical and food analysis**. 21st International Symposium and Liquid-Phase Separation Techniques and Industrial Application of Separation Techniques 20th Latin American Symposium on Biomedical, Biopharmaceutical and Application of Capillary Electrophoresis and Microchip. 04-08 de outubro de 2014, Natal, RN, Brasil.

3.3. Prêmios e Entrevistas

1. Tony B. Academic Travel Award. 4th Annual Conference & Exhibition of Society for Laboratory Automation and Screening, 07-11 de fevereiro de 2015, Washington, D.C., EUA.

2. *Analytical Methods Poster Prize*. IV Workshop em Microfluídica, 24-25 de Julho de 2014, Campinas-SP, Brasil.

3. Poster Award. 21st International Symposium and Liquid-Phase Separation Techniques and Industrial Application of Separation Techniques 20th Latin American Symposium on Biomedical, Biopharmaceutical and Application of Capillary Electrophoresis and Microchip. 04-08 de outubro de 2014, Natal, RN, Brasil.

4. Entrevista jornal O Popular, Caderno guia das faculdades, 02/11/2014.